EDMO MONTES RODRIGUES

BIODIVERSIDADE MICROBIANA DA ILHA DA TRINDADE, PROSPECÇÃO GENÉTICA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS UTILIZANDO MICRO-ORGANISMOS AUTÓCTONES

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T
R696b 2016

Rodrigues, Edmo Montes, 1989-
Biodiversidade microbiana da Ilha da Trindade, prospecção genética e aplicações biotecnológicas utilizando micro-organismos autóctones / Edmo Montes Rodrigues. – Viçosa, MG, 2016.
x, 150f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador: Marcos Rogério Tótola.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Biorremedição. 2. Hidrocarbonetos. 3. Bactérias - Microbiologia Aplicada. 4. Emulsões. 5. *Rhodococcus rhodochrous*. 6. *Nocardia farcinica* . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 628.55

EDMO MONTES RODRIGUES

BIODIVERSIDADE MICROBIANA DA ILHA DA TRINDADE, PROSPECÇÃO GENÉTICA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS UTILIZANDO MICRO-ORGANISMOS AUTÓCTONES

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA:

Prof. Alvaro V. N. de Carvalho Teixeira	Prof.ª Dionéia Evangelista Cesar
Prof. Juraci Alves de Oliveira	Prof.ª Ana Carolina Morais Apolônio

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

"A obrigação de produzir aliena a paixão de criar"

Raoul Vaneigem

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter permitido chegar até aqui e sempre me acompanhar.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Marcos Rogério Tótola, por todo o conhecimento transmitido, pelo incentivo, apoio e suporte na realização do meu trabalho e principalmente pela confiança em mim depositada.

Aos servidores do Departamento de Microbiologia, que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão de meu trabalho.

À minha excepcional amiga e co-orientadora Dionéia Evangelista Cesar, que foi meu ponto de referência desde o início em minha vida acadêmica.

Aos amigos e colegas de trabalho Bruna, Fernanda, Tatiane, Pedro, Péricles, Karlos, Daniel, Victor, Tércia e Taídes por terem estado presentes e me ajudando a crescer a cada troca de experiência realizada.

A todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente com o PROTRINDADE, especialmente ao Capitão-de-Fragata Rodrigo Otoch Chaves e ao Capitão-de-Fragata Sidnei da Costa Abrantes.

Ao meu companheiro, no sentido mais amplo que a palavra possa ter, Carlos Vitor, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais Caio e Sônia e meu irmão Élder, que mesmo um pouco longe, sempre foram meu porto seguro.

Aos meus familiares, por todo o apoio e pensamentos positivos que me fizeram sempre seguir em frente.

Aos meus eternos amigos, Tatiana, Geraldo, Anderson, Layon, William, Lívia, Felipe, Carla, Cissa, Cássia, Izabela, Neima, Bruna, Ju e Raíza. Alguns, mesmo que distantes, me proporcionam um sorriso no rosto toda vez que no encontramos.

BIOGRAFIA

EDMO MONTES RODRIGUES, filho de José do Carmo Rodrigues e Sônia Maria Montes Rodrigues, nasceu em Leopoldina, Minas Gerais, no dia 14 de maio de 1989.

Em agosto de 2011, diplomou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora e em dezembro do mesmo ano, diplomou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas pela mesma Universidade.

Em Março de 2012 iniciou o programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, na área de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental, onde se tornou mestre em 2014.

Em Março de 2014, ainda no mesmo programa de Pós-graduação, iniciou seus estudos, em nível de Doutorado, seguindo a mesma linha de pesquisa.

SUMÁRIO

Resumo	.....	vii
Abstract	.....	ix
Introdução Geral	.....	1
Capítulo 1	Biorremediação microbiana de hidrocarbonetos pesados e PAHs: Implicações ambientais…….....	4
1.1	Introdução.....	5
1.2	Remediação ambiental de hidrocarbonetos.....	7
1.3	Obtenção de micro-organismos hidrocarbonoclásticos.....	10
1.4	Vias metabólicas envolvidas na biodegradação de PAHs.....	11
1.5	Implicações da biodegradação incompleta de PAHs……..……....	17
1.6	Recalcitrância e biodegradação de hidrocarbonetos.....……....	20
1.7	Particularidades ambientais e estratégias de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos…….....	24
1.7.1	Biorremediação de hidrocarbonetos em solos…….....	25
1.7.2	Biorremediação de hidrocarbonetos em ambientes marinhos ……	30
1.8	Influência de fatores ambientais na biodegradação de hidrocarbonetos.....	32
1.9	Referências.....	34
Capítulo 2	Draft Genome of *Rhodococcus rhodochrous* TRN7, isolated from the coast of Trindade Island, Brazil.....	48
2.1	Genome announcement…….	49
2.2	Acknowledgments……..	51
2.3	References……..	52
Capítulo 3	Draft genome of *Nocardia farcinica* TRH1, a linear and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the coast of Trindade Island, Brazil.....	53
3.1	Genome announcement……..	54
3.2	Acknowledgments.....	56
3.3	References.....	57
Capítulo 4	Microbial diversity and metabolism of hydrocarbons in a pristine sea-water from Trindade Island….....	58
4.1	Introduction.....	60
4.2	Material and methods.....	62
4.2.1	Site description and sample collection.....	62
4.2.2	Experimental desing.....	63
4.2.3	Biodegradation of phenanthrene-9-^{14}C.....	63
4.2.4	Molecular analysis.....	64
4.2.4.1	Experimental design.....	64
4.2.4.2	DNA extraction.....	64
4.2.4.3	High-throughput sequencing.....	65

4.2.4.4	Data analysis	65
4.2.4.5	Accession numbers	65
4.2.5	Statistical analysis	66
4.5	Results	66
4.5.1	Phenanthrene-9-^{14}C mineralization	66
4.5.2	Sequencing output	67
4.5.3	Diversity comparisons	68
4.5.4	Taxonomic comparisons	71
4.6	Discussion	76
4.7	Acknowledgments	82
4.8	References	83
4.9	Supplementary Material	91
Capítulo 5	Desenvolvimento e uso de emulsões W/O/W e bactérias hidrocarbonoclásticas autóctones para biodegradação de óleo cru em ambientes marinhos oligotróficos	96
5.1	Introdução	98
5.2	Material e métodos	100
5.2.1	Materiais	100
5.2.2	Produção de emulsões W/O/W	101
5.2.3	Inoculantes microbianos e hidrofobicidade da superfície celular	101
5.2.4	Estabilidade temporal das emulsões W/O/W	102
5.2.5	Eficiência das emulsões e inoculantes na biodegradação de hidrocarbonetos	102
5.2.6	Análises de Macronutrientes	105
5.2.7	Análises estatísticas	105
5.3	Resultados e Discussão	105
5.3.1	Caracterização microscópica das emulsões W/O/W	105
5.3.2	Hidrofobicidade da superfície celular	108
5.3.3	Liberação de nutrientes pelas emulsões W/O/W fertilizadas	112
5.3.4	Estabilidade das emulsões W/O/W	114
5.3.5	Ensaio de biorremediação utilizando emulsões W/O/W	116
5.4	Conclusão	123
5.5	Referências	124
Anexo I		131
Conclusões Gerais		149

RESUMO

RODRIGUES, Edmo Montes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Biodiversidade microbiana da Ilha da Trindade, prospecção genética e aplicações biotecnológicas utilizando micro-organismos autóctones**. Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Dionéia Evangelista Cesar.

Esse estudo é iniciado com uma revisão bibliográfica em que aborda a biorremediação de hidrocarbonetos pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Na revisão, são explorados aspectos que incluem a obtenção de micro-organismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos, vias metabólicas de biodegradação, as consequências ambientais da contaminação e por fim aborda novos estudos que utilizam estratégias e novas tecnologias de biorremediação possíveis em ambientes aquáticos e solos. A parte experimental de nosso estudo segue a mesma linha de pesquisa desenvolvida durante o mestrado. De maneira preventiva, busca-se avaliar e desenvolver metodologias para biorremediar as adjacências da Ilha da Trindade, ambiente pristino e de valor ecológico, caso ocorram acidentes envolvendo o derramamento de hidrocarbonetos. Inicialmente, objetivamos avaliar o genoma dos isolados bacterianos autóctones da comunidade microbiana existente nas águas marinhas que circundam a Ilha da Trindade, *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1, isolados durante o trabalho de mestrado como sendo capazes de degradar uma grande variedade de hidrocarbonetos de petróleo. Nosso objetivo também foi avaliar a estrutura da comunidade microbiana e o catabolismo de fenantreno após contaminação de microcosmos contendo água coletada na mesma região e utilizar micro-organismos autóctones como estratégia de bioaumentação. Por fim, objetivou-se desenvolver um produto biotecnológico baseado em emulsões duplas W/O/W fertilizadas, capaz de promover a bioestimulação sem a perda instantânea de nutrientes em águas oceânicas oligotróficas contaminadas por compostos orgânicos hidrofóbicos. Os genomas de *R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1 possuem genes de degradação de compostos alifáticos e aromáticos, sendo que 17 genes envolvidos com a biossíntese de antibióticos foram anotados com o genoma de *R. rhodochrous* TRN7, enquanto que no genoma de *N. farcinica* TRH1 foram identificados genes relacionados à degradação de caprolactam, precurssor do nylon, e do pesticida atrazina, o que torna ambos os isolados candidatos a serem empregados tanto em estratégias de bioaumentação quanto em outras áreas biotecnológicas. Após a

contaminação de microcosmos com hidrocarbonetos, a comunidade microbiana da água litorânea da Ilha da Trindade passa a ser dominada por Gammaproteobacteria, grupo que compõe mais de 72% das sequências analisadas, enquanto que no tratamento controle houve predomínio de Proteobacteria (95% das sequências). Destaca-se a abundância de representantes do gênero *Alteromonas,* presentes em todos os tratamentos contaminados, com maior valor de abundância (66% das sequências) no tratamento contendo apenas fenantreno como contaminante. Decorridos 30 dias da contaminação, os valores de diversidade foram reduzidos, havendo domínio de grupos bacterianos reconhecidos pela presença de membros com atividade hidrocarbonoclástica. A capacidade de mineralização de fenantreno pela microbiota autóctone da Ilha da Trindade é reduzida quando outros PAHs e hidrocarbonetos de alto peso molecular estão presentes no ambiente. Em relação às emulsões produzidas, nossos resultados mostraram que elas podem ser utilizadas com o propósito de liberação gradual de nutrientes na fase aquosa dispersa. A emulsão é composta por gotículas que variam em um amplo espectro de tamanho que se desestabilizam temporalmente, resultando na liberação da fase aquosa interna, contendo nutrientes inorgânicos. Quando utilizadas em conjunto ou não, com bactérias hidrocarbonoclásticas, em microcosmos contendo água litorânea da Ilha da Trindade contaminada com petróleo, as emulsões W/O/W fertilizadas proporcionaram aumentos significativos da atividade microbiana. Como conclusões, nosso trabalho mostrou que a contaminação por hidrocarbonetos resulta na perda de diversidade microbiana da comunidade microbiana da água litorânea da Ilha da Trindade, e que um ambiente considerado pristino possui microbiota capaz de degradar hidrocarbonetos. Por fim, conclui-se que emulsões duplas W/O/W fertilizadas são uma alternativa para proporcionar aumento significativo na atividade catabólica de hidrocarbonetos em ambientes marinhos oligotróficos.

ABSTRACT

RODRIGUES, Edmo Montes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Microbial biodiversity in the Trindade Island, genetic prospecing and biotechnological appliccations using indigenous microorganisms**. Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-advisors: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira and Dionéia Evangelista Cesar.

This study starts with a literature review approach in heavy hydrocarbon bioremediation and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In the review are explored aspects from obtaining microorganisms capable of degrading hydrocarbons, metabolic biodegradation pathways, environmental consequences of contamination and finally discusses new studies using new strategies and bioremediation technologies in water and soil environments. The experimental part of our study follows the same research line developed during the Masters. Preventively, seeks to assess and develop bioremediation methodologies for Trindade Island shoreline, pristine environment with ecological value, should they occur involving the oil spill. Initially we aimed to evaluate the genome of indigenous bacterial isolates *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 and *Nocardia farcinica* TRH1, isolated during master's work as being capable of degrading a wide range of petroleum hydrocarbons. Our aim was also to evaluate the microbial community structure and metabolism of PAHs after contamination in microcosms and use indigenous microorganisms as bioaugmentation strategy. Finally, it aimed to develop a biotechnolocal product based on double emulsion W/O/W fertilized able to promote biostimulation without the instant loss of nutrients in oligotrophic oceanic waters contaminated with hydrophobic organic compounds. The genomes of *R. rhodochrous* TRN7 and *N. farcinica* TRH1 presents aliphatic and aromatic compounds degradation genes. Moreover, 17 genes involved in the biosynthesis of antibiotics were recorded in the genome of *R. rhodochrous* TRN7 while in the genome of *N. farcinica* TRH1 were identified genes related to the degradation of caprolactam, a nylon precursor, and the pesticide atrazine, which makes the isolates candidates to be used in both strategies bioaugmentation as for other biotechnological activity. After contamination by hydrocarbons, in microcosms, the microbial community of the coastal water from Trindade Island becomes dominated by Gammaproteobacteria, a group that makes up more than 72% of the analyzed sequences, while in the control treatment predominated Proteobacteria (95% of the sequences). Noteworthy is the abundance of representatives of the genus *Alteromonas*, present in all the contaminated treatments

with highest abundance (66% of the sequences) in the treatment containing phenanthrene as only contaminant. After 30 days of contamination, diversity values were reduced, with domain of bacterial groups recognized by the presence of members with hydrocarbonoclastic activity. The phenanthrene mineralization capacity by the indigenous microbiota of the Trindade Island is reduced when other PAHs and high molecular weight hydrocarbons are present in the environment, however, does not cease to occur. With respect to emulsions produced, our results showed that they can be used for the purpose of slow release nutrients in the dispersed aqueous phase. The emulsion comprises droplets ranging in a wide range of size that destabilize temporally, resulting in the release of the internal aqueous phase, containing inorganic nutrients. When used together or not, hydrocarbonoclastic bacteria in microcosms containing coastal water from Trindade Island contaminated with oil, the fertilized W/O/W emulsion provided significant increases in microbial activity. In conclusion, our work has shown that hydrocarbons contamination results in the loss of microbial diversity in marine environments, in addition to state that as environment considered pristine has microbiota capable of degrading hydrocarbons and therefore it becomes viable the use of strategies as biostimulation and bioaugmentation employing indigenous bacterial isolates previously selected. Finally, it is concluded that fertilized W/O/W emulsions are an alternative to provide significant increase in catabolic activity hydrocarbons oligotrophic marine environments.

Introdução Geral

Introdução Geral

Desastres ambientais causados por derramamentos de petróleo em ambientes naturais sempre foram alvos de críticas de uma grande parcela da sociedade. Entretanto, atualmente o petróleo ainda é uma fonte indispensável para suprir a demanda energética mundial. Em 2010, um acidente em uma plataforma de extração de petróleo no Golfo do México liberou aproximadamente 780 milhões de litros de petróleo na água, destruindo o hábitat de diversas espécies marinhas, atingindo a costa de vários estados norte-americanos e consequentemente afetando a vida de milhares de pessoas que viviam nessas áreas.

Vários métodos de limpeza de ambientes oceânicos afetados por derramamento de óleo estão disponíveis. Contudo, consistem de métodos de alto custo e que não garantem alta eficiência na remoção dos contaminantes. Grande parte do óleo que é derramado em um ambiente natural pode ser eliminado pela atividade decompositora de micro-organismos presentes no próprio ambiente. Portanto, o uso de micro-organismos para atuar na remediação de ambientes contaminados com petróleo e derivados tem se tornado promissor, embora existam algumas limitações.

Os trabalhos de nosso grupo na área de biorremediação oceânica foram iniciados no ano de 2012, após a aprovação de projeto de pesquisa no Programa de Pesquisas Científicas na Ilha da Trindade - PROTRINDADE. Desde então, foram realizados estudos nas adjacências da ilha, com o objetivo de avaliar a capacidade da microbiota autóctone em degradar hidrocarbonetos. Esses estudos foram conduzidos com o objetivo de se gerar conhecimento que permita uma rápida tomada de decisões caso acidentes envolvendo derramamento de óleo venham a afetar a região. Durante o mestrado, realizamos o isolamento de bactérias da água costeira da Ilha da Trindade com capacidade de degradar hidrocarbonetos, para então propor utilizá-las como estratégia de bioaumentação. Duas das bactérias obtidas mostraram capacidade de catabolizar uma ampla gama de hidrocarbonetos e então seus genomas foram sequenciados e revelados no presente estudo. Ao mesmo tempo, estratégias de biorremediação de hidrocarbonetos foram avaliadas para a região. E, entretanto, uma das maiores limitações para se conduzir a biorremediaçãode águas oceânicas abertas é a perda imediata de nutrientes inorgânicos assim que são aplicados na região contaminada, o que limita a bioestimulação. O presente trabalho teve, portanto, o

objetivo de desenvolver um produto biotecnológico capaz de liberar gradualmente nutrientes no ambiente e que, ao mesmo tempo, apresente superfície hidrofóbica para permitir sua permanência na interface água/óleo.

Os objetivos aqui propostos visam contribuir para o avanço do conhecimento na área de biorremediação de petróleo em ambientes marinhos, promovendo o suporte à atividade microbiana para catabolizar e, assim, remover os contaminantes do ambiente, com foco na região da Ilha da Trindade, situada no oceano Atlântico a aproximadamente 1.140 km da costa da cidade de Vitória/ES – Brasil.

O capítulo 1, "Biorremediação Microbiana de Hidrocarbonetos Pesados e PAHs: Implicações Ambientais" foi produzido para se tornar capítulo do livro intitulado "*Microbial bioremediation of xenobiotic compounds*", após convite feito pelo editor do respectivo livro proposto pela *CRC Press, Taylor & Francis Group*.

Nos capítulos 2 e 3 são apresentados os *Genome Annoucement*s dos isolados bacterianos *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1, respectivamente. Ambos isolados são provenientes da região costeira da Ilha da Trindade. Trabalhos anteriores mostraram que os isolados obtidos possuem características genéticas que os permitem catabolizar compostos alifáticos e aromáticos, as quais são de grande interesse biotecnológico, visto que hidrocarbonetos, principalmente os aromáticos, são altamente danosos a vários grupos de organismos vivos.

No capítulo 4, "Microbial diversity and metabolism of hydrocarbons in a pristine sea-water from Trindade Island", são avaliadas as taxas de mineralização de fenantreno por micro-organismos autóctones na presença de outros hidrocarbonetos e é realizada análise metagenômica para se avaliar a modificação da comunidade microbiana local em resposta à contaminação ambiental.

No capítulo 5, "Desenvolvimento e uso de emulsões W/O/W e bactérias hidrocarbonoclásticas autóctones para biodegradação de óleo cru em ambientes marinhos oligotróficos", são avaliadas emulsões fertilizadas W/O/W produzidas com o objetivo de aplicá-las em ambientes marinhos oligotróficos contaminados com hidrocarbonetos. São realizadas análises de distribuição de tamanho e estabilidade das gotículas de óleo imersas no meio circundante aquoso, bem como o uso combinado das emulsões com *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia* farcinica TRH1 e a avaliação de seu efeito na biodegradação de hidrocarbonetos em água oceânica coletada no litoral da Ilha da Trindade.

Capítulo 1

Biorremediação microbiana de hidrocarbonetos pesados e PAHs: Implicações ambientais

Biorremediação microbiana de hidrocarbonetos pesados e PAHs: Implicações ambientais

Edmo M. Rodrigues, Marcos R. Tótola

Departamento de Microbiologia, Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

1.1. Introdução

Vários são os contaminantes liberados no ambiente como resultado de ações antrópicas. Considerando-se que o petróleo é a principal fonte de energia global, atendendo a aproximadamente 50% da demanda energética mundial na atualidade, o volume de óleo atualmente produzido mundialmente (aproximadamente 96 milhões de barris/dia, segundo a *U.S. Energy Information* Administration) e a complexidade das operações de exploração, transporte e distribuição, não causa surpresa que os hidrocarbonetos sejam um dos principais contaminantes ambientais, sendo muitos deles recalcitrantes.

Embora por definição nem todos os hidrocarbonetos sejam enquadrados como xenobióticos, estão incluídos nessa classe de poluentes compostos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e hidrocarbonetos de alto peso molecular. Dentre os PAHs, 16 moléculas são classificadas como *priority pollutant* pela *US EPA* (Bojes and Pope, 2007). Segundo a *US EPA* (2010), PAHs ocorrem no ambiente primariamente como misturas complexas geradas a partir da combustão de substâncias contendo carbono e hidrogênio, e raramente ocorrem no ambiente como entidades isoladas. Portanto, a biorremediação ambiental desses compostos deve ser planejada de forma que organismos vivos, principalmente micro-organismos, por meio de suas vias metabólicas, sejam capazes não apenas de degradar algumas frações dos contaminantes, mas também de tolerar as demais.

Os hidrocarbonetos conhecidos como BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos) são moléculas aromáticas de baixo peso molecular, voláteis e altamente prejudiciais tanto para micro-organismos quanto para organismos de maior complexidade (Jo et al., 2008). Por serem de cadeias carbônicas relativamente pequenas, esses compostos possuem solubilidade em água relativamente elevada, quando comparados a outros hidrocarbonetos, o que os torna biodisponíveis e potencialmente capazes de produzir efeitos tóxicos (Aguilera et al., 2009). Ao entrar em contato com células microbianas, hidrocarbonetos solúveis podem causar rompimento das células (Chiou et al., 1998) e, assim, causar declínio das populações microbianas que poderiam atuar na biodegradação de hidrocarbonetos menos solúveis e mais recalcitrantes no ambiente afetado.

Os problemas relacionados à contaminação por petróleo são evidentes. Porém, mesmo após a remoção da parte visível do óleo, ocorrem efeitos tóxicos crônicos que podem perdurar por décadas (Haritash e Kaushik, 2009). A contaminação de solos geralmente ocorre em regiões próximas a campos de extração, refinarias e postos de combustíveis, enquanto que contaminações de ambientes aquáticos, mais especificamente de ambientes marinhos, são comuns quando poços de extração são explorados em águas oceânicas, através de atividades ligadas tanto à extração quanto ao transporte do petróleo até as bases receptoras continentais. Regiões de portos e de atracação de navios são foco de contaminação em regiões costeiras, sendo esse um grave problema ambiental e sócio-econômica, visto que tais regiões tendem a apresentar alta produtividade primária e são o habitat de uma grande diversidade de animais, plantas e microrganismos, muitos desses explorados comercialmente ou como itens de subsistência.

As consequências resultantes de acidentes envolvendo derramamentos de óleo em ambientes naturais dependem de diversos fatores, como por exemplo o tipo de ambiente (solo ou ambientes aquáticos), a temperatura local, os índices de precipitação, a facilidade de dispersão do óleo, dentre outros fatores intrínsecos. Um fator chave, o número de átomos de carbono presentes nas moléculas de hidrocarbonetos, está diretamente ligado à densidade do

óleo, que de acordo com o *American Petroleum Institute* pode ser expressa como grau API, sendo diferentes óleos classificados em:

- Óleo Leve: apresenta grau API maior que 31.1º (densidade menor que 870 kg/m^3);
- Óleo Médio: apresenta grau API entre 22.3 º e 31.1º (densidade variando entre 870 e 920 kg/^{3});
- Óleo Pesado: apresenta grau API entre de 10.0 º e 22.3 º (densidade variando entre 920 e 1.000 kg/m^3);
- Óleo Ultra Pesado: apresenta grau API abaixo de 10.0 º (densidade maior que 1.000 kg/m^3).

Quanto mais pesado o óleo, maior é a proporção de moléculas com cadeias carbônicas grandes, o que diminui a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos e torna mais difícil a sua assimilação por micro-organismos. Isso faz com que essas moléculas sejam mais recalcitrantes e, assim, mais persistentes no ambiente contaminado. Conversivamente, óleos leves apresentam maior proporção de hidrocarbonetos de cadeias carbônicas de menor tamanho, os quais são mais prontamente biodegradados (Salanitro et al., 1997). Essas diferenças determinam, em grande parte, a velocidade de biodegradação de óleo cru no ambiente.

1.2. Remediação ambiental de hidrocarbonetos

Dentre as tecnologias disponíveis para se promover a remediação ambiental de hidrocarbonetos, técnicas físicas, químicas e biológicas estão disponíveis. Os tratamentos físicos e químicos geralmente causam a dispersão de parte do poluente e não sua efetiva remoção, o que torna sua eficácia limitada. Essas tecnologias apresentam ainda como desvantagens custos elevados e complexo processo logístico para sua aplicação. A remoção através da remediação por micro-organismos, quando comparada aos métodos físicos e químicos, tende a apresentar menor custo, podendo alcançar alta eficiência (Bao et al., 2012).

Em algumas situações, utilizam-se produtos químicos para auxiliar na mitigação dos impactos decorrentes da contaminação ambiental por hidrocarbonetos. Entretanto, do ponto de vista biológico, produtos químicos podem apresentar alta toxicidade, o que caracteriza um risco

ecológico (Murado et al., 2011). A título de exemplo, surfactantes sintéticos geralmente são utilizados para aumentar a solubilidade dos hidrocarbonetos, tornando-os assim mais biodisponíveis e mais suscetíveis à biodegradação. Porém, ao entrar em contato com organismos vivos, alguns desses surfactantes e outros produtos podem interferir na embriogênese, no crescimento de larvas e na própria sobrevivência de organismos, tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres. Considerando esses fatores, populações de organismos que possuem ciclos de vida curtos sofrem mais danos, visto que os produtos químicos podem causar a morte de toda uma geração (Fucik et al., 1994; Beiras et al., 1999).

Além dos danos potenciais causados pela toxicidade da própria molécula, em ambientes aquáticos os surfactantes tendem a dispersar o óleo, aumentando a concentração biodisponível de hidrocarbonetos na água. Quando em solo ou em subsolo, esse efeito de solubilização é também potencialmente prejudicial, na medida em que pode proporcionar aumento da área afetada e da concentração de hidrocarbonetos na solução do solo (Fucik et al., 1994). A dispersão de hidrocarbonetos por surfactantes, executada sem controle e conhecimento prévio do ambiente contaminado, pode resultar em efeitos ainda mais nocivos do que a contaminação em si. A dispersão de hidrocarbonetos, sem sua efetiva remoção, aumenta a chance de que o contaminante entre em contato com maior número de organismos vivos. Pode ocorrer contato com a membrana celular, difusão por pele e mucosas, bioacumulação em tecidos vivos (Ramachandran et al., 2004) ou mesmo recobrimento de espécies animais e vegetais pelo óleo derramado. Em alguns casos, são utilizados também desemulsificantes e solidificantes, dependendo da situação do ambiente e do tipo de óleo. Novamente, esses produtos também podem ser tóxicos para os micro-organismos, com a consequente redução da eficácia da atenuação natural por parte da microbiota local (Patrick et al., 2012).

Como forma de remediação física, barreiras de contenção podem ser utilizadas tanto em ambientes aquáticos quando terrestres, de forma a bloquear e direcionar a pluma de óleo para áreas em que o recolhimento seja mais fácil e/ou impedir que a poluição atinja outras áreas não afetadas. Equipamentos como *skimmers* e absorventes granulados podem ser utilizados para recolher o óleo do ambiente (Wolfe et al., 1999; Zhu et al., 2001), mas essas ações dependem

das condições ambientais no momento da intervenção, bem como das características físico-químicas do óleo. Apesar de não ser danosa para o ambiente, e ação de recolher o óleo utilizando barreiras é ineficiente para as frações que se solubilizam na água, se aderem a agregados de solo ou ainda as que são adsorvidas em material particulado e migram para a porção bentônica de ambientes aquáticos. A lavagem do óleo, tanto *in situ* quanto *ex situ*, é por vezes empregada para se retirar o óleo aderido a rochas, solo e sedimentos. Quando *in situ*, água quente ou fria, empregada com pressão, é utilizada com esse propósito (Patrick et al., 2012). Na técnica *ex situ*, o solo ou sedimento afetado é retirado do ambiente e levado até locais específicos, onde surfactantes ou biosurfactantes podem ser empregados para promover a liberação do óleo dos agregados de solo (Pavel e Gavrilescu, 2008).

Micro-organismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos são ubíquos, mas normalmente ocorrem em pequenas proporções em ambientes não contaminados. Diversas espécies de bactérias, arqueias e fungos podem degradar hidrocarbonetos de petróleo. Ao metabolizar hidrocarbonetos, os micro-organismos os convertem em energia, biomassa celular e resíduos biológicos (Rahman et al., 2002). A biorremediação de hidrocarbonetos por micro-organismos visa a mineralização ou pelo menos a conversão dos hidrocarbonetos em formas menos tóxicas e/ou menos móveis no ambiente. Enzimas do grupo das oxigenases (mono e dioxigenases) são essenciais às principais vias catabólicas desses compostos (Karigar e Rao, 2011). Portanto, a presença de oxigênio tende a favorecer a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos (Huesemann e Truex, 1996).

Dentre os hidrocarbonetos mais recalcitrantes, destacam-se as resinas, os asfaltenos e os PAHs, que podem ser metabolizados por uma menor proporção de espécies microbianas (Rodrigues e Tótola, 2015). Embora os PAHs ocorram em baixa concentração no óleo cru, são moléculas altamente tóxicas e de difícil remoção do ambiente. Através da introdução de moléculas de oxigênio a esses compostos por ação das oxigenanses, dá-se início à biodegradação microbiana, embora possa também ocorrer a degradação desses compostos, embora mais lentamente, em condições de anaerobiose (Tian et al., 2002; Yu et al., 2005; Atlas e Hazen, 2011).

1.3. Obtenção de micro-organismos hidrocarbonoclásticos

Micro-organismos normalmente utilizam em seu metabolismo tanto compostos que ocorrem naturalmente quanto químicos sintéticos. As moléculas de hidrocarbonetos são compostas basicamente por átomos de carbono e hidrogênio, e uma pequena fração contém nitrogênio, enxofre e oxigênio. Nesse sentido, grande atenção deve ser dada à presença dos átomos de carbono dos hidrocarbonetos, pois esse é o elemento que constitui a maior proporção da biomassa de seres vivos. Além disso, é a sua oxidação que propicia a maior parte da energia metabólica por meio da respiração celular.

Um procedimento comumente empregado para se avaliar a capacidade de utilização de hidrocarbonetos por micro-organismos e se isolar micro-organismos hidrocarbonoclásticos consiste no cultivo da espécie microbiana de interesse ou de um consórcio de micro-organismos em um meio mineral contendo um hidrocarboneto como única fonte de carbono e energia (Rodrigues et al., 2015a). O método é baseado na vantagem seletiva de micro-organismos que conseguem utilizar o composto disponibilizado para produzir biomassa e energia. Dessa maneira, os micro-organismos que podem utilizar os hidrocarbonetos são capazes de se multiplicar e formar colônias, quando esse material é reinoculado em meio mineral solidificado contendo a mesma fonte de carbono. Portanto, a técnica de cultura de enriquecimento é base para o isolamento de culturas puras de bactérias e fungos capazes de utilizar esses compostos como fonte de carbono e energia. Quando o procedimento não resulta no crescimento microbiano, ainda que sejam utilizadas diferentes composições do meio de cultivo mineral e a combinação de faixas de variação de variáveis importante como temperatura, pH, salinidade e concentração de oxigênio disponível, pode-se presumir que não existam micro-organismos com a capacidade de utilizar o hidrocarboneto-alvo ou que a sua concentração está abaixo ou acima da ideal para proporcionar o desenvolvimento das células.

Membros de diversos gêneros bacterianos e fúngicos têm sido isolados através da técnica de enriquecimento em meios minerais contendo hidrocarbonetos (Gargouri et al., 2015; Rodrigues et al., 2015a). Em meios sólidos contendo um único hidrocarboneto como fonte de carbono e energia, o desenvolvimento de colônias de espécies diferentes é um indicativo de que as

populações ali presentes não liberam intermediários tóxicos no meio. Essas populações são, portanto, promissoras para uso em biorremediação, especialmente quando se considera a segurança do processo no que tange à geração de intermediários ou sub-produtos tóxicos a partir da biodegradação dos hidrocarbonetos.

A busca por micro-organismos capazes de metabolizar hidrocarbonetos em ambientes ainda não explorados é um campo possível para se encontrarem espécies candidatas a serem utilizadas na biorremediação de ambientes contaminados, com base na aplicação da bioaumentação.

1.4. Vias metabólicas envolvidas na biodegradação de PAHs

PAHs representam risco econômico e sócio-ambiental significativos, pois são moléculas tóxicas, carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e resistentes à biodegradação (Fernández-Luqueño et al., 2008; Saraya et al., 2011). Do ponto de vista ambiental, os principais PAHs encontrados como contaminantes são os que contêm entre dois e cinco anéis aromáticos na molécula. Embora os PAHs sejam conhecidos por constituírem frações do petróleo e seus derivados, a combustão incompleta de matéria orgânica é fonte de geração dessa classe de poluentes ambientais, razão por que sua presença na água, ar e solo não é incomum (Abdel-Shafy e Mansour, 2016). A recalcitrância desses compostos pode ser atribuída em parte à densidade de elétrons no entorno das estruturas em anel, tornando-os resistentes à ação de enzimas hidrolíticas (Ukiwe et al., 2013). São ainda estáveis termodinamicamente e a estrutura de suas moléculas os torna pouco solúveis em água, o que diminui a biodisponibilidade e dificulta uma rápida utilização por micro-organismos (Dabrowska et al., 2008; Shukla et al., 2014) Como consequência de sua recalcitrância, os PAHs podem se acumular tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres, promovendo toxicidade crônica nos ambientes afetados. A biodegradação de PAHs ocorre através da clivagem de um, vários ou todos os anéis que compõem a molécula. Enzimas como PAH dioxigenase e catecol oxigenase exercem papéis-chave para possibilitar que micro-organismos possam degradar PAHs (Tian et al., 2002). Essas enzimas e os radicais formados pelos sistemas enzimáticos são fundamentais nos processos de catabolismo e degradação desses compostos. Antes de iniciar a oxidação dos substratos, a célula

realiza a absorção dos compostos por difusão passiva na membrama citoplasmática (Wattiau, 2002), visto que a ação das dioxigenases ocorre no interior celular. A oxidação inicial da molécula por um sistema enzimático multicomponente geralmente resulta na formação de *cis*-dihidrodióis, após a adição de dois átomos de oxigênio à molécula de PAH. Esses intermediários podem ser processados através da *orto*-clivagem ou *meta*-clivagem, além de sofrerem ações de desidrogenases. A ação das desidrogenases resulta na formação de intermediários como salicilato, gentisato, protocatecuatos e catecol, que serão então convertidos a intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (Kanaly e Harayama, 2000; Samanta et al., 2002).

Considerando a biodegradação de PAHs como forma de obtenção energética, todo o composto ou parte dele é mineralizado. Cerniglia (1984) concluiu que os PAHs podem ser utilizados como substrato para a excreção de compostos intermediários, principalmente em células fúngicas, onde a oxidação intracelular e a hidroxilação de PAHs são passos iniciais para que intermediários metabólicos sejam excretados. Já em bactérias, essas reações de oxidação e hidroxilação parecem estar ligadas diretamente à assimilação do carbono, devido à sua maior plasticidade em obter fontes energéticas.

Processos de co-metabolismo, em que ocorre degradação da molécula sem a geração de energia ou assimilação de carbono na célula, são conhecidos por proporcionarem a biodegradação de PAHs. Nesse processo ocorre uma reação enzimática não-específica, em que um substrato (no caso em questão, um PAH) compete com o substrato primário de estrutura similar pelo sítio ativo da enzima (Johnsen et al., 2005). Recentemente, Khan et al. (2015) realizaram o isolamento de bactérias do solo capazes de realizar co-metabolismo de PAHs. Os autores reportaram o co-metabolismo de acenaftileno, antraceno e fenantreno pela via de degradação de naftaleno.

A prospecção por bactérias que degradam hidrocarbonetos recalcitrantes é de grande interesse para a comunidade científica, à medida que elas podem ser candidatas à aplicação em processos de bioaumentação. Rodrigues et al. (2015a) isolaram diferentes espécies bacterianas a partir de colônias desenvolvidas na superfície de óleo curado, o qual foi deixado como

"armadilha" em água litorânea da ilha tropical de Trindade, localizada em região distante de centros industriais. Dentre os isolados obtidos, duas actinobacterias se destacaram em ensaios de crescimento utilizando hidrocarbonetos individuais como única fonte de carbono e energia. As bactérias *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1 foram submetidas a crescimento em meio mineral contendo tanto hidrocarbonetos alifáticos como PAHs, e foram capazes de crescer em todos os ensaios realizados. Outras bactérias, tais como *Pseudomonas* spp., *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Tistrella* spp., têm sido investigadas e sua capacidade de degradar PAHs é reportada (Zhang et al., 2006).

O catabolismo bacteriano de naftaleno inicia-se com um sistema multicomponente enzimático, naftaleno dioxigenase. Essa enzima, ao se ligar à molécula, promove a dihidroxilação da molécula, produzindo cis 1,2-dihidroxynaftaleno (Fig. 1). A ação da cis-dihidrodiol desidrogenase converte o composto resultante em 1,2-dihidroxinaftaleno e, então, ocorre a clivagem do anel aromático, resultando na formação do salicilato (Seo et al., 2009; Tomás-Gallardo et al., 2013). Esse composto resultante pode ser metabolizado para formar catecol ou gentisato, dependendo da via utilizada pela bactéria. A via de degradação do naftaleno é bem conhecida para *Pseudomonas* spp. e *Ralstonia* spp. Em *Pseudomonas*, sabe-se que a degradação do composto ocorre por meio da via utilizada para a formação do catecol (Eaton e Chapman, 1992), enquanto em *Ralstonia* sp. U2, a via utilizada é a do gentisato (Jeon et al., 2006).

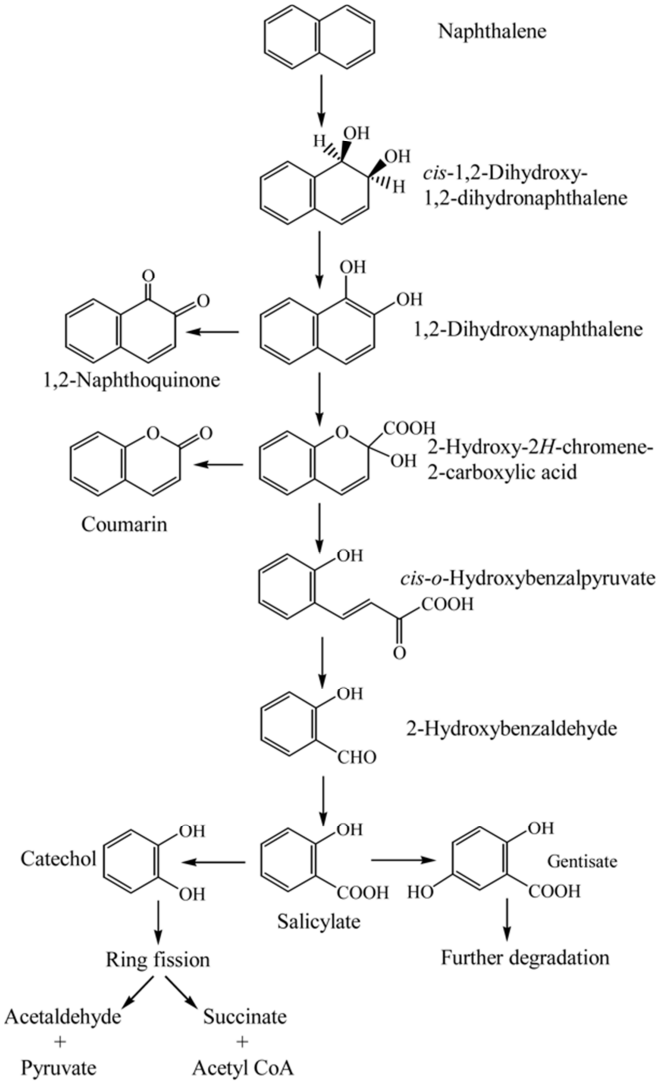


Fig. 1. Via catabólica aeróbica do naftaleno em bactérias (Proposto pot Denome et al., 1993; Kiyohara et al., 1994; Auger et al., 1995; Goyal et al., 1997; Baboshin et al., 2008)

A biodegradação de fenantreno e antraceno, ambas moléculas com três anéis aromáticos, inicia-se também pela ação de um sistema multicomponente de dioxigenases, que incorpora átomos de oxigênio nos anéis de forma a produzir cis-dihidrodióis. Em algumas espécies de *Pseudomonas* já foram verificadas duas diferentes vias de degradação de fenantreno. Uma é a via em que a dioxigenação ocorre inicialmente nos carbonos das posições 3 e 4 da molécula e que, por fim, resulta na formação de salicilato e catecol ou ftalato e protocatecoato. A segunda via inicia-se com a dioxigenação dos carbonos 1 e 2, e resulta na formação de cis-1,2-dihidrodiol (Evans et al., 1965; Moody et al., 2001; Prabhu e Phale, 2003).

Moody et al. (2001) sugeriram que *Mycobacterium* sp. PYR-1 possui várias dioxigenases e que essa característica está ligada à capacidade desse isolado em promover a degradação de uma variedade de PAHs, como antraceno, fenantreno e pireno. Nesse isolado foram observadas semelhanças, mas também diferenças nas vias *orto-* e *meta-* de fissão dos anéis aromáticos em relação a outras linhagens bacterianas, o que indica a existência de rotas metabólicas alternativas para a degradação de PAHs.

A degradação de pireno pode ocorrer de diferentes maneiras, uma vez que as enzimas responsáveis pelas etapas iniciais da via catabólica podem se ligar em diferentes regiões da molécula. Como uma forma de destoxificação, a degradação pode ser iniciada com a oxigenação dos carbonos das posições 1 e 2 da molécula, de forma a dar origem a pireno-1,2-diol (Kim et al., 2004). Entretanto, a degradação desse PAH pode ser iniciada por meio da ação enzimática de oxigenação nos carbonos 4 e 5 da molécula. Após vários passos de clivagem dos anéis, o composto resultante é o *o*-ftalato (Heitkamp et al., 1988; Kim et al., 2005). Ao analisar, por estudos de proteômica, a via de degradação de pireno por *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, Kim et al. (2007) identificaram 27 enzimas necessárias à completa degradação de pireno que, nesse micro-organismo, ocorre em 25 etapas. Dentre as proteínas identificadas, 14 são responsáveis pela conversão de pireno a ftalado, seis outras pela transformação de ftalato a protocatecoato, sete são relacionadas às vias de conversão do protocatecoato até acetil-CoA e succinil-CoA. No mesmo estudo, analisou-se o genoma desse micro-organismo, sendo reportado que muitos genes envolvidos na degradação de compostos aromáticos eram encontrados em clusters.

O fluoreno é um dos principais componentes dos combustíveis fósseis e sua degradação pode ser iniciada pela oxigenação dos carbonos nas posições 1 e 2 ou 3 e 4 da molécula. Os *cis*-dihidrodióis resultantes sofrem desidrogenação e então meta-clivagem. Os produtos resultantes são indanonas, que são substratos para a produção de 3-isocromanona e 3,4-dihidrocoumarina. A hidrólise enzimática desses compostos resulta na produção do ácido 3-(2-hidroxifenil) propiônico, que é metabolizado pela via do catecol para então entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (Peng et al., 2008).

Todas as vias metabólicas indicadas levam em consideração a necessidade da atuação de dioxigenases sobre as moléculas de PAHs. Embora o oxigênio seja um fator-chave para a degradação desses compostos, a degradação também pode ocorrer em ambientes anóxicos. Entretanto, a velocidade das reações é menor. O crescimento de bactérias capazes de degradar esses compostos sob condições anaóxicas mostrou ser bastante lento, variando de uma a duas semanas a até mesmo alguns meses (Widdel et al., 2010; Meckenstock e Mouttaki, 2011), provavelmente em razão da baixa conservação de energia a partir da oxidação dos PAHs na ausência de oxigênio (Meckenstock et al., 2016). Após realizar a inoculação de um consórcio de bactérias anaeróbias adaptadas a PAH's em microcosmo, Chang et al. (2002) observaram o desaparecimento de 80 a 100% do fenantreno, acenaftaleno, antraceno, fluoreno e pireno presentes após 90 dias de incubação. A degradação de PAHs sob anaerobiose tem sido registrada também em aquíferos contaminados e em incubações com sedimentos marinhos (Tabak et al., 2003; Chang et al., 2008; Bahr et al., 2015).

Kümmel et al. (2015) avaliaram a capacidade de bactérias degradarem PAH utilizando sulfato como aceptor de elétrons. Os resultados por eles obtidos indicam que a reação $C_{10}H_8 + 6\ SO_4^{2-} + 2\ H^+ + 6\ H_2O \rightarrow 10\ HCO_3^- + 6\ H_2S$ ocorre e foi comprovada através da utilização de naftaleno-^{13}C. Embora se tenha utilizado um grande período de incubação (500 dias), a degradação de naftaleno sob condições anaeróbicas é um indício de que, mesmo na ausência de oxigênio, a atenuação natural ocorre no ambiente, mesmo que de maneira lenta. Ao realizar a análise da composição da comunidade microbiana nesses experimentos, foram identificadas como dominantes as famílias *Anaerolineaceae*, *Desulfobacteraceae* e *Spirochaetaceae*. A degradação de fenol por representantes da família *Anaerolineaceae* foi constatada por Rosenkranz et al. (2013), indicando que essa família pode conter representantes capazes de degradar compostos aromáticos sob anaerobiose.

A linhagem N49, capaz de degradar naftaleno sob anaerobiose, foi cultivada na presença de íon férrico como aceptor de elétrons e naftaleno como fonte de carbono e energia. O balanço de reações bioquímicas indicou a mineralização total do naftaleno disponibilizado. Durante o processo de incubação, a concentração do metabólito central de degradação do

naftaleno, o ácido 2-naftóico, aumentou à medida que ocorria o crescimento da cultura. O estudo indicou que a degradação de PAHs pode ser acoplada à redução do íon férrico (Kleemann e Meckenstock, 2011).

A degradação de PAHs tem sido registrada também em condição de metanogênese. Zhang et al. (2012) avaliaram a degradação de antraceno e produção de metano a partir de microcosmos inoculados com sedimento de aquífero contaminado. Após 120 dias, a remoção de antraceno chegou a 88%. Após realizar a incubação com antraceno contendo ^{13}C, a técnica *stable-isotope probing* (SIP) foi utilizada para se obter o DNA dos grupos microbianos que incorporaram o ^{13}C. Após o sequenciamento do gene 16S rRNA, foram identificados os gêneros *Methylibium* e *Legionella* e a ordem Rhizobiales como sendo os responsáveis por degradar o antraceno disponibilizado nos microcosmos.

A possibilidade de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, tanto em aerobiose como em anaerobiose, torna possível a biorremediação de ambientes variados. As águas subterrâneas, presentes em aquíferos, representam a maior reserva de água doce do mundo. Em decorrência da contínua deterioração da qualidade dos mananciais de água doce superficiais, parte deles é hoje imprestável ao consumo humano. A possibilidade de biorremediar ambientes subterrâneos contaminados por PAHs e outros hidrocarbonetos é fundamental para se garantir o abastecimento a partir dessas fontes de água, as que tendem a se tornar cada vez mais importantes para a humanidade.

1.5. Implicações da biodegradação incompleta de PAHs

Os PAHs são compostos lipofílicos e quimicamente inertes. Entretanto, após o contato com organismos vivos, eles podem ser metabolizados e gerar formas tóxicas e reativas. Alguns intermediários metabólicos formados durante seu metabolismo podem ser mais nocivos para a biota do que a molécula do contaminante (Abdel-Shafy e Mansour, 2016). A presença de PAHs no organismo humano e de outros animais é altamente danosa, na medida em que reações de ativação dessas moléculas podem ocasionar a formação de intermediários reativos. A alta reatividade de alguns deles pode induzir uma série de problemas, variando desde efeitos

narcotizantes até mutagênicos (La Rocca et al., 1996; Ritter et al., 2002; Chen and White, 2004; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004; Mehdinia et al., 2015; Abdel-Shafy e Mansour, 2016).

Alguns PAHs não apresentam efeitos genotóxicos. Entretanto, após metabolizados, podem dar origem a diol-epóxidos, moléculas altamente reativas, caracterizadas por conter um éter cíclico com três átomos de carbono que formam um anel. A conformação dessas moléculas lhes confere uma alta densidade e torna os epóxidos mais reativos do que os demais éteres. Por conta dessas características, os diol-epóxidos podem se ligar covalentemente ao DNA e induzir danos genotóxicos, que podem ocasionar processos carcinogênicos em seres humanos e em outros animais (Schwerdtle et al., 2010; Rengarajan et al., 2015).

Luckert et al. (2013) investigaram a capacidade de PAHs induzirem a atividade da enzima citocromo P450 3A4 (CYP3A4). Como resultado, foi verificado que benzo[c]fenantreno (BcP) e dibenzo[a,l]pireno (DBalP), bem como seus respectivos dihidrodióis e diol-epóxidos, podem induzir a atividade do CYP3A4. As reações desses compostos com o citocromo P450 resultam em moléculas reativas que podem induzir mutações no genoma, expondo os organismos a efeitos carcinogênicos.

A formação de catecóis durante as vias de degradação de PAHs pode resultar tanto em problemas do ponto de vista ambiental quanto para a saúde humana. Catecóis podem formar complexos estáveis com vários íons metálicos di- e trivalentes e, com isso, permanecer por mais tempo no ambiente. Quando o catecol é oxidado enzimaticamente ou na presença de oxigênio e metais pesados, um elétron é transferido para o oxigênio molecular, resultando na formação do íon superóxido. Na presença de metais pesados, como ferro e cobre, o superóxido é reduzido a peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. As espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas podem ser altamente danosas para células e organismos, caso sua eliminação não ocorra de maneira rápida (Schweigert et al., 2000). Catecóis podem danificar membranas por meio de sua atividade redox e também danificar DNA e proteínas. Esses compostos não causam danos oxidativos ao DNA. Entretanto, quando combinados com metais pesados e na presença de oxigênio molecular, podem resultar na quebra da fita do ácido desoxirribonucléico. A quebra é causada após uma sequência de reações redox (Fig. 2) que resultam em intensa liberação de

radicais hidroxilas nas proximidades do DNA (Schweigert et al., 2000). Outros efeitos provenientes da presença de catecol em tecidos animais têm sido relatados. A geração de superóxidos e quinonas durante a auto-oxidação do catecol já foi relatada como fator citotóxico para células gliais (Pereira et al., 2004), podendo resultar na indução de apoptose dessas células (Oliveira et al., 2010). Além disso, a existência de ROS é causa comum de problemas ligados a doenças degenerativas que atingem o sistema nervoso central (Oliveira et al., 2012).

catechol	+	Cu^{2+}			catechol^{+}	+	Cu^{1+}					(1)
O_2	+	Cu^{1+}			O_2^{-}	+	Cu^{2+}					(2)
O_2^{-}	+	Cu^{1+}	+	$2\,H_2O$	H_2O_2	+	Cu^{2+}	+	$2\,OH^{-}$			(3)
O_2^{-}	+	H_2O_2			OH^{-}	+	OH	+	$^1O_2$			(4)
H_2O_2	+	Cu^{1+}			$Cu^{1+}OOH$	+	H^{+}		free OH	+	Cu^{2+} + OH^{-}	(5)
H_2O_2	+	DNA-Cu^{1+}			DNA-Cu^{1+}OOH	+	H^{+}		OH	+	DNA-Cu^{2+}OH	(6)

Fig. 2. Produção de radicais hidroxila capazes de degradar DNA na presença de oxigênio, cobre e DNA (Adaptado de Schweigert et al., 2000).

A degradação parcial de PAHs e, principalmente, de benzeno, um composto ubíquo devido à grande utilização em atividades humanas, pode resultar na formação de hidroquinona. A hidroquinona é uma molécula contendo um anel benzênico com duas hidroxilas na posição *para*. Quando oxidada, resulta na formação de quinonas reativas, por exemplo p-benzoquinona (Bahrs et al., 2013). As quinonas podem induzir estresse oxidativo e formar ligações inespecíficas em DNA e proteínas (Bolton et al., 2000). A hidroquinona é conhecida por seu potencial altamente tóxico para organismos aquáticos, como *Pimephales promelas, Brachydanio rerio, Daphnia magna, Desmodesmus armatus, Synechocystis sp., Nostoc sp.* e *Microcystis aeruginosa* (Bahrs et al., 2013). Em células de mamíferos, a hidroquinona pode induzir leucemia de células mononucleares, tumores de células tubulares renais e câncer de fígado em roedores (Kari, 1992). A ação em conjunto de hidroquinona e catecol é conhecida por sua relação com danos oxidativos ao DNA e genotoxicidade em células de mamíferos *in vivo* (Marrazzini et al., 1994).

1.6. Recalcitrância e biodegradação de hidrocarbonetos

A recalcitrância de hidrocarbonetos está diretamente relacionada com o tamanho e complexidade da molécula. Hidrocarbonetos aromáticos de baixa massa molecular, como benzeno, tolueno e xileno, causam efeitos imediatos de toxicidade no ambiente afetado, mas podem ser degradados com facilidade por micro-organismos ambientais (Cury 2002). Moléculas que possuem dois ou mais anéis aromáticos condensados ou ramificações são mais difíceis de serem degradadas e uma menor variedade de micro-organismos é capaz de metabolizá-las (Hernández-López et al. 2015). Se comparadas a moléculas mais simples, essas apresentam menor toxicidade. No entanto, são mais persistentes no ambiente e causam efeitos duradouros, denominados efeitos tóxicos crônicos (Aske et al., 2002; Ghazali et al., 2004), além de formar nanoestruturas entre 2-20 nm que resultam das fortes interações das moléculas que compõem o óleo cru, com forte capacidade de adesão a superfícies (Mostowfi et al., 2009).

PAHs contendo seis ou mais anéis aromáticos são recalcitrantes ao ataque microbiano (Das e Chandran, 2011). Embora não exista um consenso na literatura, alguns autores consideram PAHs contendo quatro ou mais anéis aromáticos como sendo de alto peso molecular, enquanto que outros consideram como sendo de alto peso apenas os que possuem mais de seis anéis. Recentemente, Marín-Spiotta et al. (2013) sugeriram que o termo "recalcitrante" deve estar principalmente relacionado à baixa solubilidade ao invés da complexidade molecular. Os asfaltenos são moléculas de hidrocarbonetos grandes presentes no óleo bruto. Em óleos leves, esses compostos representam aproximadamente 1% da composição total, enquanto que em óleos pesados, os valores podem ultrapassar 20% (Hernández-López et al. 2016). Os asfaltenos são representados, principalmente, por moléculas contendo de 4 a 10 anéis, aromáticos ou não, contendo ramificações na cadeia (Groenzin e Mullins, 2000), incluindo moléculas aromáticas de alto peso molecular (Mullins, 2011), cujas estruturas complexas e a alta hidrofobicidade os fazem resistentes à biodegradação. São solúveis em solventes aromáticos como tolueno e benzeno, e insolúveis em *n*-alcanos, como *n*-heptano ou *n*-pentano (Strausz et al., 2006; Gray et al., 2011).

O fungo *Neosartorya fischeri* foi o primeiro micro-organismo a ser associado à mineralização de asfaltenos de petróleo. Após 11 semanas de crescimento em meio contendo asfaltenos como única fonte de carbono e energia, o fungo foi capaz de metabolizar 15,5% do asfalteno presente e mineralizou 13,2% do total (Uribe-Alvarez et al., 2011). Mais tarde, Yanto e Tachibana (2013 e 2014) relataram a capacidade de *Pesalotiopsis* sp. de degradar asfaltenos. Esse fungo halotolerante degradou 12,4% dos asfaltenos após 15 dias de incubação. Recentemente, Hernández-López et al. (2016) avaliaram a capacidade do fungo *Neosartorya fischeri* degradar esses hidrocarbonetos de alto peso molecular. Após a inoculação de micélios, a degradação de asfalteno, coroneno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno foi avaliada de acordo com o consumo de oxigênio em cada ensaio. O maior consumo de oxigênio se deu nos ensaios contendo asfaltenos (138 mg l^{-1} dia^{-1}), seguido por coroneno (82 mg l^{-1} dia^{-1}), indeno(1,2,3-cd)pireno (81 mg l^{-1} dia^{-1}) e por fim benzo(g,h,i)perileno (62 mg l^{-1} dia^{-1}). No trabalho, foram observados fortes indícios de que genes responsáveis pela síntese de monooxigenases do sistema citocromo P450 são induzidos quando o fungo é cultivado na presença de asfaltenos. A indução desses genes em resposta à presença de diferentes PAHs tem sido relatada, assim como o seu papel na biotransformação desses compostos, incluindo PAHs com seis anéis aromáticos (Syed et al., 2010, 2011, 2013). Utilizando microscopia confocal e baseando-se na fluorescência emitida por PAHs, Hernández-López et al. (2016) reportaram a presença de PAHs de alto peso molecular no interior de hifas fúngicas de *Neosartorya fisceri*, constatando ainda a ocorrência do catabolismo desses compostos por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).

O metabolismo de PAHs de alto peso molecular parece ocorrer no interior das hifas fúngicas (Hernández-López et al., 2016). Em 2014, Fayeulle e colaboradores encontraram benzo(a)pireno no interior de hifas, sugerindo que corpos lipídicos constituem os locais de armazenamento intracelular de PAHs, os quais são obtidos por meio de absorção dependente de energia (Fayeulle et al. 2014).

Representantes de *Pseudomonas*, *Citrobacter*, E*nterobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus,* e *Lysinibacillus* são normalmente mencionados na literatura pela capacidade de degradar

hidrocarbonetos (Atlas, 1981; Cerniglia, 1984; Denome et al., 1993; Johnsen et al., 2005; Chang et al., 2008; Das e Chandran, 2011; Bao et al., 2012; Baruah et al., 2016), incluindo PAHs com até sete anéis aromáticos. Baruah et al. (2016) isolaram 14 linhagens bacterianas hidrocarbonoclásticas de solo contaminado com óleo cru na Índia. Foram empregados microcosmos contendo óleo cru constituído de 37,5% de asfaltenos. Os isolados *Enterobacter* sp. RC4 e *Bacillus* sp. RC6 foram capazes de metabolizar, respectivamente, 80% e 64%, do óleo cru. O isolado *Enterobacter* sp. RC4 foi capaz de metabolizar 78% e 73% de resina e asfalteno, respectivamente, nesses ensaios. A presença do gene citocromo P450, confirmado nesse isolado, parece ser o fator-chave para proporcionar as altas taxas de degradação observadas.

O crescimento de bactérias em ambientes onde a principal fonte de carbono e energia são os hidrocarbonetos pode ser limitado pela baixa disponibilidade desse substrato, a qual é atribuída à sua baixa solubilidade (Sekelsky e Shreve, 1999). Surfactantes produzidos por uma variedade de micro-organismos (biossurfactantes) podem aumentar a biodisponibilidade dos compostos hidrofóbicos, na medida em que aumentam sua solubiludade em água (Marcoux, 2000). Mnif et al. (2011) realizaram isolamento de bactérias a partir de campos de óleo, obtendo isolados com capacidade de degradar hidrocarbonetos e produzir biossurfactantes. Dentre os isolados, foi possível relacionar positivamente a capacidade de uma *Pseudomonas* spp. em produzir biossurfactantes e concomitantemente degradar *n*-alcanos. *Bacillus cereus* isolado a partir de amostra de solo contaminado com petróleo foi capaz de produzir biossurfactantes usando melaço como fonte de carbono e mostrou habilidade hidrocarbonoclástica. O isolado degradou 40% de asfalteno durante incubação em meio mineral (5 g/L de asfalteno) por 60 dias a 28ºC (Asadollahi et al., 2016). O uso de biossurfactantes já purificados em um ambiente contaminado por óleo pode favorecer a biodegradação dos hidrocarbonetos. Rodrigues et al (2015b) mostraram que o uso de ramnolipídeo em microcosmos contendo água do mar contaminada com óleo cru proporcionou aumento da atividade microbiana da comunidade autóctone, sugerindo que, nessa condição, os micro-organismos ali presentes tiveram maior

acesso aos contaminantes, o que favoreceu a sua utilização como fonte de carbono e energia pela comunidade microbiana estabelecida nos microcosmos.

A biodegradação de hidrocarbonetos pode ser mais eficiente quando um conjunto de micro-organismos com capacidades catabólicas conhecidas e capazes de produzir biossurfactantes são empregados em conjunto em ambientes contaminados, de forma que interações sinérgicas ocorram durante a utilização dos contaminantes (Ghazali et al., 2004). Embora os consórcios microbianos sejam capazes de degradar contaminantes em culturas, os micro-organismos, quando inoculados em ambientes naturais, podem não se adaptar, anulando assim o seu potencial efeito beméfico sobre a biodegradação dos contaminantes-alvo (Tyagi et al., 2011).

Ao usar consórcios bacterianos, Jahromi et al. (2014) obtiveram uma média de 51,5% de degradação de asfaltenos após dois meses de incubação em meio basal. A utilização de consórcios bacterianos pode conferir certas vantagens para os processos de biodegradação, já que diferentes populações microbianas possuem vias metabólicas diversas, o que amplia a gama de substratos que podem ser consumidos, incluindo as moléculas contaminantes. Um consórcio bacteriano composto por *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis*, *Ochrobactrum anthropi* e duas linhagens de *Acinetobacter baumannii* isolados de ambientes com histórico de contaminação de hidrocarbonetos foi utilizado por Leal (2009). Esse consórcio possuía representantes com genes para degradação de hidrocarbonetos e alguns produtores de biossurfactantes. Em ensaios em meio de cultura contendo óleo diesel, a degradação de alcanos chegou a mais de 90% em apenas sete dias. Os hidrocarbonetos foram mais rapidamente degradados na presença do consórcio do que das culturas puras dos membros do consórcio. Populações microbianas podem apresentar vias metabólicas complementares, de modo que produtos do metabolismo de uma população podem ser metabolizados por outras populações (McGenity et al., 2012). Além disso, a existência de um ou mais membros do consórcio com potencial de produção de biossurfactantes pode facilitar o acesso dos membros do consórcio a substratos hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos, favorecendo a sua biodegradação (Li et al., 2016).

1.7. Particularidades ambientais e estratégias de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos

Após a contaminação de ambientes por hidrocarbonetos, bem como por qualquer outro composto, é necessária uma avaliação técnica para se traçarem os modos de ação dos contaminantes. Os efeitos da contaminação em solos e águas devem ser avaliados, considerando-se especialmente os potenciais efeitos sobre as comunidades biológicas no local afetado e no entorno. Um fator crítico em situações de contaminação ambiental é a visualização de todos os problemas que a contaminação pode ocasionar, bem como o delineamento da extensão da contaminação (Roy e McGill, 2000). Embora em um momento inicial a extensão do local afetado possa ser definida, a mobilidade das plumas de contaminação vai depender de condições intrínsecas do ambiente afetado. Uma avaliação abrangente e bem planejada da extensão da contaminação permitirá que os gestores desses locais tomem decisões sobre o potencial de remediação e de danos ao entorno do local inicialmente contaminado (Das e Chandran, 2011).

As técnicas de biorremediação são utilizadas para acelerar a biodegradação de contaminantes e recuperar o ambiente contaminado para uma condição semelhante à encontrada antes da contaminação (Röling et al., 2002; Stroud et al., 2007; Minai-Tehrani et al., 2015). A manipulação do ambiente, bem como das populações microbianas envolvidas na biodegradação, devem ser realizadas para se assegurar eficiência no processo de biorremediação adotado (Stroud et al., 2007). As estratégias de biorremediação disponíveis incluem a bioestimulação, que envolve a adequação de fatores ambientais (Gallego et al., 2001; Ruberto et al., 2009; Abed et al., 2015); a bioaumentação, baseada na inoculação de micro-organismos hidrocarbonoclásticos (Hassanshahian et al., 2014; Mao et al., 2015; Rodrigues et al., 2015b) e/ou micro-organismos produtores de biossurfactantes, visando ao aumento da solubilidade de contaminantes hidrofóbicos (Chang et al., 2015) e, por fim, a atenuação natural, uma metodologia de remediação passiva, onde ocorre apenas o monitoramento da degradação dos contaminantes. Essa técnica é eficiente em ambientes que possuem potencial genético e metabólico, bem como condições ambientais que permitam a biodegradação do contaminante

em um período tido como razoável pelos gestores do programa de descontaminação (Kao et al., 2006).

Considerando-se que os ambientes mais susceptíveis à contaminação por hidrocarbonetos do petróleo são solos e águas marinhas, são descritas, a seguir, peculiaridades nas estratégias de biorremediação em cada um desses ambientes:

1.7.1. Biorremediação de hidrocarbonetos em solos

A contaminação de solos por hidrocarbonetos é um problema ambiental grave (Sutton et al., 2013; Aller et al., 2014), ocasionado principalmente por vazamentos durante a extração, transporte e refino do petróleo, ou durante o armazenamento de seus derivados em postos revendedores de combustíveis (Lin e Mendelssohn, 2012; Mosaed et al., 2015). A recuperação desses ambientes tem sido intensamente estudada, o que tem permitido traçar estratégias eficientes para a mitigação dos impactos ambientais e eliminação eficiente dos hidrocarbonetos (Gogoi et al., 2003; Lin e Mendelssohn, 2012; Gordon et al., 2015; Mosaed et al., 2015).

Em solos, o conhecimento de fatores como a granulometria, compactação, umidade, pH, teor de matéria orgânica e de nutrientes inorgânicos é fundamental para que estratégias de biorremediação sejam traçadas para se lidar com um evento de contaminação por hidrocarbonetos. O oxigênio é um fator-chave para que as oxigenases possam agir sobre as moléculas de hidrocarbonetos, devendo-se considerar ainda seu papel como aceptor de elétrons na cadeia respiratória dos micro-organismos responsáveis pela biodegradação (Karigar e Rao, 2011). Portanto, o revolvimento de solos compactados contaminados pode ser uma maneira simples e eficiente de se obter maior velocidade de biodegradação. A umidade é também fator determinante da atividade microbiana e, consequentemente, da biodegradação de contaminantes orgânicos. A escassez de água diminui a atividade e o desenvolvimento microbianos, enquanto seu excesso pode levar à menor difusão de oxigênio nos solos contaminados. Geralmente, a atividade microbiana ótima ocorre quando a umidade do solo está entre 50 e 80% de sua capacidade de retenção de água, que, como sugerido por Baker (1994), corresponde à

quantidade de água que permanece no solo após sua drenagem pela força gravitacional. Nos experimentos de biorremediação de hidrocarbonetos em solo conduzidos por Viñas et al. (2005), foi avaliada a influência tanto da comunidade bacteriana nativa do solo quanto da umidade do solo sobre a biodegradação dos contaminantes (Tabela 1). Os autores concluíram que ambos os fatores avaliados são essenciais para se obter a biodegradação dos contaminantes em níveis compatíveis com os objetivos propostos para a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos.

Tabela 1. Biodegradação de hidrocarbonetos após incubação de solo por 200 dias*

	Concentração inicial (mg/Kg de solo seco)	% de biodegradação após 200 dias		
		Controle (5,8% da CRA)	Solo Autoclavado	Tratamento (40% da CRA)
TPH	8196 ± 285	1	8	79
Fluoreno	182 ± 2	25	36	100
Fenantreno	496 ± 24	0	7	96
Antraceno	114 ± 15	26	17	84
Fluoranteno	693 ± 48	0	0	92
Pireno	387 ± 30	0	1	87
Criseno	144 ± 10	0	0	62
PAHs totais	2724 ± 134	3	8	87

* Adaptada de Viñas et al. (2005).

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo tende a ser menos eficiente em solos com baixo teor de matéria orgânica (Sullivan and Krieger, 2001). O efeito parece ser atribuído ao fato de que micro-organismos são mais ativos em solos ricos em matéria orgânica do que em solos pobres, visto que essas moléculas servem de substrato para sustentar o metabolismo primário microbiano (Fontaine et al., 2003; Johnsen et al., 2005). Além disso, a presença de matéria orgânica proporciona a adsorção dos hidrocarbonetos, diminuindo sua concentração na fase aquosa e gasosa do solo, levando a uma menor inibição das populações microbianas (Labud et al., 2007). Entretanto, a adsorção dos hidrocarbonetos pelas moléculas orgânicas do solo resulta na diminuição da biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, o que pode, conversivamente, afetar negativamente a biodegradação, principalmente se os micro-organismos não forem capazes de produzir biossurfactantes ou mesmo de se aderirem aos hidrocarbonetos (Labud et

al., 2007; Marín-Spiotta et al., 2013; Li et al., 2016). Nesse contexto, o uso dos biossurfactantes pode favorecer a atividade decompositora, uma vez que essas moléculas aumentam a solubilidade e dessorção dos hidrocarbonetos e, consequentemente, a sua biodisponibilidade (Chang et al., 2015; Li et al., 2016). O uso de surfactantes sintéticos pode ser um problema, visto que, além de serem também considerados contaminantes ambientais, podem ainda inibir o desenvolvimento microbiano e, assim, afetar o catabolismo dos hidrocarbonetos (Bramwell e Laha, 2000).

De acordo com as características do solo, sua granulometria pode proporcionar a existência de microssítios anóxicos, os quais inibem a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Por fim, deve-se considerar que a disponibilidade de carbono aumenta abruptamente após a contaminação por hidrocarbonetos, podendo a biodegradação desses compostos, nessas circunstâncias, ser restringida por uma escassez de nutrientes minerais, especialmente de nitrogênio e fósforo (Das e Chandran, 2010). Nessas condições, a adição de fertilizantes para se levar a razão C:N:P para valores próximos a 100:10:1 tende a estimular a ação microbiana sobre os contaminantes (Hoeppel and Hinchee 1994; Bouchez et al. 1995; Cookson 1995, Leys et al., 2005).

Micro-organismos hidrocarbonoclásticos são extensivamente distribuídos em habitats de solo (Pandey et al., 2016). Bactérias do solo são capazes de se adaptar e metabolizar uma ampla variedade de hidrocarbonetos para obtenção de carbono e de energia (Viñas et al., 2005; Wang et al., 2008). Morais et al. (2016) avaliaram as modificações na estrutura da comunidade microbiana em solos prístinos contaminados por petróleo. A abundância de alguns *taxa*, como Rubrobacteraceae, Streptomycetaceae, *Nocardia, Pimelobacter*, *Acinetobacter*, *Perlucidibaca,* dentre outros, aumentou significativamente, levando a sugerir que esses membros da comunidade microbiana são potencialmente capazes de utilizar hidrocarbonetos em seu metabolismo. Outros relatos indicando o metabolismo de PAHs por micro-organismos nativos de solos prístinos são encontrados na literatura (e.g. Tervahauta et al., 2009; Yrjala et al., 2010).

Estratégias que fazem o uso de linhagens bacterianas como inoculantes, denominadas de bioaumentação, podem aumentar a eficiência e velocidade do processo de biorremediação

(Tyagi et al., 2011). Uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada de solo contaminado com petróleo e, em experimentos em biorreatores, foram realizadas análises para se verificar sua capacidade em degradar hidrocarbonetos de diesel. Foi observado aumento da atividade enzimática de desidrogenases, catalases, lipases e hidrolases durante o período de incubação. Após 30 dias foram realizadas análises por FTIR e cromatografia gasosa, de forma a confirmar a degradação de até 66% do diesel adicionado nos tratamentos, constatando-se a degradação até mesmo de alcanos de cadeias longas durante o período (Sharma et al., 2014). O emprego de consórcios bacterianos pode ser ainda mais efetivo na remoção de hidrocarbonetos do solo. A obtenção de um consórcio bacteriano por Gargouri et al. (2014), a partir de reator de tanque agitado contínuo contendo efluentes de refinaria, foi utilizado na biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos do petróleo. Compostos alifáticos de 12 a 30 carbonos foram analisados e, após 30 dias de tratamento, ocorreu redução da concentração de todos eles. A densidade populacional de bactérias aeróbias heterotróficas também aumentou e a redução de TPHs chegou a 96,05%. O solo tratado foi considerado como não-fitotóxico.

Uma técnica que pode aumentar a eficiência da degradação de hidrocarbonetos em solos é baseada no uso de eletrodos que são inseridos diretamente no solo contaminado. A eletro-biorremediação é uma tecnologia híbrida para a remediação de contaminantes orgânicos, que se baseia no uso da eletrocinética em conjunto com técnicas de biorremediação, de forma a aumentar o potencial de mobilização dos poluentes e das células microbianas capazes de realizar o catabolismo desses compostos (Wick et al., 2007). Os eletrodos são utilizados para promover a formação de fracos campos elétricos, por exemplo, entre 0,2 e 2 V/cm (Hassan et al., 2016). Através do campo magnético criado pelo eletrodo, pode ocorrer o direcionamento de íons através da matriz do solo e, com isso, promover o contato de nutrientes com micro-organismos capazes de degradar os contaminantes, da mesma maneira que pode proporcionar maior contado desses micro-organismos com os contaminantes (Hassan et al., 2016). Essa técnica pode, ainda, ser eficiente na distribuição uniforme de nutrientes adicionados ao solo (Xu et al., 2010) e também na disponibilização de oxigênio na região do anodo pela reação de eletrólise da água (Ramirez et al., 2014). Algumas limitações ocorrem para a aplicação em

campo dessa técnica, pois o gasto energético para disponibilizar energia nos eletrodos é alto. Há ainda o potencial de aumento da competição e de relações desarmônicas entre os micro-organismos autóctones e/ou adicionados ao solo nas regiões de concentração de células, além de ser necessária a utilização de compostos para diminuir as variações de pH que normalmente ocorrem entre catodo e anodo (Wick et al., 2007). A aplicação da corrente elétrica pode ainda interromper os fluxos da membrana plasmática devido à orientação dos lipídeos de membrana (Groves et al., 1997). Portanto, apesar de promissora, a eletro-biorremediação deve ser ainda mais bem estudada para que se promovam, futuramente, ensaios em grande escala.

A remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos pode se tornar ainda mais difícil no caso de existirem metais pesados contaminando o mesmo sítio, já que esses inibem a atividade microbiana e, consequentemente, a biodegradação de poluentes orgânicos (Sandrin e Maier, 2003; Thavamani et al., 2012a, 2012b). Após obter isolados de solo contaminado com hidrocarbonetos e metais pesados em meios de enriquecimento contendo fenantreno e pireno, Thavamani et al. (2012c) realizaram testes de degradação de PAHs usando um consórcio microbiano composto por representantes dos gêneros *Pandoraea*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus*. Mesmo na presença de cádmio o consórcio foi capaz de degradar efetivamente PAHs, mas a eficiência de degradação foi reduzida quando se utilizaram concentrações do metal maiores do que 5 mg L^{-1}.

A presença de plantas pode auxiliar na degradação de hidrocarbonetos, uma vez que elas podem estimular o desenvolvimento de micro-organismos hidrocarbonoclásticos na região rizosférica (Kirk et al., 2005; Kim et al., 2006; Zhuang et al., 2007; Gaskin et al., 2008). Pagé et al. (2015) relataram que genes bacterianos específicos relacionados à degradação de xenobióticos tem a expressão estimulada pela espécie vegetal *Salix purpúrea* quando hidrocarbonetos estão presentes no solo. Os exsudatos vegetais liberados na região radicular seleciona a microbiota, de forma que os micro-organismos protegem a planta contra os contaminantes tóxicos e contribuem para seu crescimento (Segura et al., 2009; Hayat et al., 2010). A prevalência de genes catabólicos de hidrocarbonetos tem sido relatada quando algumas espécies de plantas são encontradas no ambiente contaminado (Siciliano et al., 2001; Siciliano

et al., 2003; Palmroth et al., 2005; Palmroth et al., 2007; Marecik et al., 2015). Com base nos resultados desses e de outros estudos, é possível sugerir que a rizorremediação é uma alternativa promissora para a remoção de hidrocarbonetos em solos contaminados.

1.7.2. Biorremediação de hidrocarbonetos em ambientes marinhos

Ambientes marinhos estão sujeitos à contaminação por diversos compostos associados a atividades antrópicas. O óleo cru e seus derivados são alguns dos poluentes orgânicos mais importantes no ambiente marinho, pois causam uma série de problemas econômicos, sociais e ambientais (Peterson et al., 2003). As contaminações de ambientes marinhos por hidrocarbonetos de petróleo podem ser originadas tanto de atividades em terra, que ocasionem o carreamento de material para as áreas costeiras, bem como atividades de transporte marítmo e na própria indústria de produção de óleo *offshore*, onde existem riscos desde a extração até a chegada do óleo nas refinarias *onshore*. Acidentes envolvendo o derramamento de óleo são ainda mais danosos quando contaminam regiões costeiras, que estão entre os ambientes mais produtivos da Terra, causando acelerada degradação e redução da biodiversidade desses ecossistemas (Lotze et al., 2006).

Em 1989 ocorreu um dos maiores acidentes da história envolvendo derramamento de óleo no mar pelo navio *Exxon Valdez* (Peterson et al., 2003). Na ocasião foram liberados 42 milhões de litros de óleo cru no mar, que se espalharam por 1.990 km de área costeira, com maior impacto na enseada *Prince William*. A contaminação foi responsável por influenciar negativamente o desenvolvimento de algas, em decorrência da toxicidade exercida pelos hidrocarbonetos e, como consequência da menor produtividade primária, toda a cadeia trófica foi afetada. Houve rápido declínio de indivíduos da ictiofauna, caranguejos, estrelas-do-mar e invertebrados. Alguns grupos de organismos resistentes aos efeitos da contaminação se tornaram mais abundantes, como por exemplo, oligoquetos e poliquetas, provavelmente como resultado da redução de seus predadores, tendo sido constatado, ainda, aumento da abundância de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (Peterson, 2001). Mesmo após seis anos do desastre, persistiam plumas e sedimentos contaminados com óleo, de forma que efeitos tóxicos

pontuais poderiam ainda ocorrer (Carls et al., 2001). Após 13 anos do acidente, resíduos de óleo eram encontrados principalmente nas regiões intertidais superiores, associados com sedimentos finos e areia (Taylor e Reimer, 2008). Em 2010, o acidente envolvendo a plataforma da empresa *Deepwater Horizon* no Golfo do México afetou uma grande área costeira dos EUA e expôs a fragilidade de ecossistemas costeiros. Várias foram as medidas tomadas para a remoção do óleo das áreas afetadas, mas estima-se que 25% do óleo ainda permaneceram no ambiente (Tate et al., 2011).

Técnicas de biorremediação são mais efetivas e de menor custo na remoção dos contaminantes de ambientes aquáticos quando comparadas com as técnicas físicas e químicas (Khan et al., 2004; Bao et al., 2012). Entretanto, para aumentar a eficiência das ações, as técnicas devem ser usadas como complementares (Harayama et al., 1999; Aburto-Medina et al., 2015). A remoção de moléculas de hidrocarbonetos solubilizadas ou dispersas na coluna d'água em ambientes marinhos para posterior tratamento em locais específicos é inviável. Portanto, técnicas *in situ* são as mais utilizadas no mar, compreendendo tanto a bioaumentação e a bioestimulação quanto a atenuação natural (Yu et al., 2005). Quando o óleo atinge o ambiente marinho, ocorrem mudanças em sua composição físico-química em razão da atuação de diversos fatores ambientais, que interferem diretamente na permanência dos hidrocarbonetos naquele ambiente, tais como a evaporação, a dissolução, a dispersão, a oxidação fotoquímica, a emulsificação, a adsorção em partículas e a sedimentação (Miller et al., 1988; Atlas, 1981; Garret et al., 1998; Dutta e Harayama, 2000; Medina-Bellver et al., 2005; Haritash e Kaushik, 2009; Karakoç et al., 2015).

Embora sejam ubíquos, micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos constituem apenas cerca de 0,1% da comunidade microbiana total em ambientes não-contaminados. Após um evento de contaminação, no entanto, a proporção de microrganismos hidrocarbonoclásticos na comunidade microbiana pode chegar a 100% (Atlas, 1981). Rodrigues et al. (2015b) mostraram que, em água oceânica, representantes do domínio *Bacteria* prevalecem na colonização do óleo derramado, seguidos por fungos e então *Archaea*.

Recentemente, Rodrigues et al. (2015a) utilizaram meios de enriquecimento para obter isolados a partir da região costeira de uma ilha oceânica tropical considerada como prístina para hidrocarbonetos. Posteriormente, Rodrigues et al. (2015b) utilizaram um desses micro-organismos, a bactéria *Rhodococcus rhodochrous* TRN7, em microcosmos simulando bioaumentação na presença de óleo previamente aquecido para remoção de hidrocarbonetos mais voláteis. A atividade microbiana nos microcosmos contendo células de *R. rhodochrous* TRN7 aumentou significativamente durante o período de incubação, sugerindo que tal isolado é capaz de utilizar as frações de hidrocarbonetos disponibilizadas. No mesmo sentido, apenas a bioestimulação simulada nesse ambiente foi responsável por aumento na atividade bacteriana, de forma a sugerir que a bioestimulação é uma técnica eficiente na biorremediação de ambientes oligotróficos considerados prístinos.

Pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno são os PAHs mais abundantes em zonas úmidas do estuário Liaohe, na China. *Pseudomonas putida* PYR1 e *Acinetobacter baumannii* INP1 imobilizadas em esferas de pó de cinza ou como células livres foram utilizadas como estratégia de bioaumentação em microcosmos com ambos os contaminantes (Huang et al., 2016). Após 30 dias de incubação, a eficiência da biodegradação dos PAHs foi maior quando as células estavam imobilizadas em comparação com as células livres, provavelmente por causa da adsorção dos contaminantes às esferas de cinzas, proporcionando maior contato com as células ali presentes. Tecnologias capazes de aumentar a eficiência de biodegradação de hidrocarbonetos em ambientes costeiros e oceânicos têm sido propostas também como agentes de bioestimulação, por exemplo, ao se utilizar flocos flutuantes de argila fertilizada com nutrientes inorgânicos (Warr et al., 2013) em águas abertas oligotróficas. A utilização de fertilizantes oleofílicos como o Inipol EAP 22 foi proposta como forma de aumentar a eficiência da biodegradação em oceanos. Entretanto, após a sua utilização em regiões afetadas pelo acidente do navio *Exxon Valdez*, alguns relatórios contestaram a eficácia do produto (Nikolopoulou e Kalogerakis, 2008), pois sua fórmula contém o 2-butoxietanol, um composto potencialmente tóxico. Além disso, tratando-se do Inipol EAP 22, quando o produto entra em contato com a água ocorre quebra da emulsão, liberando toda a uréia na fase aquosa, que se perde rapidamente (Ron e Rosenberg,

2014). Nikolopoulou et al., 2007 propuseram, como alternativa, a utilização de ácido úrico e lecitina de soja (compostos de baixa solubilidade em água) como fontes de nitrogênio e fósforo, respectivamente, para estimular a biodegradação de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos oligotróficos.

1.8. Influência de fatores ambientais na biodegradação de hidrocarbonetos

Hidrocarbonetos de alto peso molecular e os PAHs não persistem no ambiente apenas por características intrínsecas da molécula, mas também por fatores ambientais que podem não favorecer a biodegradação (Taylor e Reimer, 2008). Se a presença de micro-organismos hidrocarbonoclásticos é necessária para eliminá-los, bem como a existência de condições ambientais para que o catabolismo desses compostos ocorra, intervenções no ambiente contaminado devem ser realizadas. A contaminação por outros compostos ou por metais tóxicos pode dificultar o desenvolvimento microbiano. Entretanto, a prospecção e *screening* de micro-organismos que sejam efetivos em metabolizar os hidrocarbonetos na presença desses possíveis agentes inibitórios pode viabilizar a biorremediação mesmo nessas condições aparentemente inibitórias.

A particularidade de cada ambiente muitas vezes exige que diferentes técnicas de remediação sejam adotadas para que se obtenha uma remoção eficiente dos contaminantes de um dado local. Portanto, conhecer fatores bióticos e abióticos do ambiente contaminado é fundamental para se dar início ao planejamento de quais ações devem ser tomadas. Micro-organismos hidrocarbonoclásticos isolados de solos podem não se adaptar a ambientes aquáticos e vice-versa. Portanto, a bioaumentação utilizando micro-organismos autóctones pode ser mais eficiente, pois sabe-se que esses isolados conseguem se readaptar com facilidade ao seu ambiente de origem (Aburto-Medina et a., 2015). Deve-se ainda levar em consideração fatores como predação por protozoários, competição por nutrientes, temperatura do local, incidência de radiação solar, dentre outros. A título de exemplo, a bioestimulação por compostos fontes de nitrogênio e fósforo pode não resultar em efeito algum na remoção dos hidrocarbonetos quando esses micronutrientes não são o fator limitante da atividade microbiana no ambiente

contaminado. Em contrapartida, a atenuação natural pode ser a maneira mais eficiente e de menor custo caso o ambiente possua micro-organismos hidrocarbonoclásticos e ainda apresentem valores significativos de nitrogênio e fósforo, além de micronutrientes (El Fantroussi e Agathos, 2005; Yu et al., 2005).

A persistência de um contaminante no ambiente pode ser reduzida caso ações sejam tomadas para proporcionar maior biodisponibilidade do mesmo e, consequentemente, maior velocidade de biodegradação. Entretanto, o custo dessas ações, que podem demandar tempo, torna-se o principal impedimento da ação contínua nos ambientes contaminados. Nesse caso, uma avaliação criteriosa da relação custo/benefício e uma análise de risco adequada são essenciais para uma tomada de decisão coerente, tirando-se o máximo proveito do potencial metabólico dos micro-organismos com vistas à preservação dos ambientes e da saúde de homens, animais e de outros membros da biosfera.

1.9. Referências

Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M. 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egyptian J Petroleum. 25: 107-123.

Abed, R.M.M., Al-Kharusi, S., Al-Hinai, M. 2015. Effect of biostimulation, temperature and salinity on respiration activities and bacterial community composition in an oil polluted desert soil. Int. Biodeterior. Biodegr. 98: 43-52.

Aburto-Medina, A., Adetutu, E.M., Aleer, S., Weber, J., Patil, S.S., Sheppard, P.J., Ball, A.S., Juhasz, A.L. 2015. Comparison of indigenous and exogenous microbial populations during slurry phase biodegradation of long-term hydrocarbon-contaminated soil. Biodegradation 23: 813–822.

Aguilera, R.F., Eggert, R.G., Lagos, C.C.G, Tilton, J.E. 2009. Depletion and the Future Availability of Petroleum Resources. Energy J. 30: 141-174.

Aller, S., Adetutu, E.M., Weber, J., Ball, A.S., Juhasz, A.L. 2014. Potential impact of soil microbial heterogeneity on the persistence of hydrocarbons in contaminated subsurface soils. J. Environ. Manage. 136: 27-36.

Asadollahi, L., Salehizadeh, H., Yan, N. 2016. Investigation of biosurfactant activity and asphaltene biodegradation by *Bacillus cereus*. J. Polym. Environ. 24: 119-128.

Aske, N., Kallevik, H., Sjöblom, J. 2002. Water-in-crude oil emulsion stability studied by critical electric field measurements. Correlation to physico-chemical parameters and near-infrared spectroscopy. J. Pet. Sci. Eng. 36: 1–17.

Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol. Rev. 45: 180–209.

Atlas, R.M., Hazen, T.C. 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. Environ. Sci. Technol. 45: 6709–6715.

Auger, R.L., Jacobson, A.M., Domach, M.M. 1995. Effect of nonionic surfactant addition on bacterial metabolism of naphthalene: Assessment of toxicity and overflow metabolism potential. J. Hazard Mater. 43: 263–272.

Baboshin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T.L., Khan, S.U., Golovleva, L. 2008. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. Biodegradation. 19: 567–576.

Bahr, A., Fischer, A., Vogt, C., Bombach, P. 2015. Evidence of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a contaminated aquifer by combined application of in situ and laboratory microcosms using (13)C-labelled target compounds. Water Res. DOI: 10.1016/j.watres.2014.10.045

Bahrs, H., Putschew, A., Steinberg, C.E. 2013. Toxicity of hydroquinone to different freshwater phototrophs is influenced by time of exposure and pH. Environ. Sci. Pollut. R. 20: 146–154.

Baker, K.H. 1994. Biodegradation of surface and subsurface soils. Bioremediation. Ed by Baker, K.H. and Herson, D.S. McGraw-Hill, Ins. New York. p.203-259.

Bao, M.T., Wang, L.N., Sun, P.Y., Cao, L.X., Zou, J., Li, Y.M. 2012. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. Mar. Pollut. Bull. 64: 1177–1185.

Baruah, R., Kalita, D.J., Saikia, B.K., Gautam, A., Singh, A.K., Boruah, H.P.D. 2016. Native hydrocarbonoclastic bacteria and hydrocarbon mineralization processes. Int. Biodeter. Biodegrad. 112: 18-30.

Beiras, E.H.R., Seaman, M.N.L., France, A. 1999. The Assessment of Marine Pollution - Bioassays with Bivalve Embryos and Larvae. Adv. Mar. Biol. 37: 1-178.

Bojes, H.K., Pope, P.G. 2007. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. Regul. Toxicol. Pharmacol. 47: 288-295.

Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J. 2000. Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol. 13: 135-160.

Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by purê strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biot. 43: 156-164.

Bramwell, D.P., Laha S. 2000. Effects of surfactant addition on the biomineralization and microbial toxicity of phenanthrene Biodegrad, 11: 263–277.

Carls, M.G., Babcock, M.M., Harris, P.M., Irvine, G.V., Cusick, J.A., Rice, S.D. 2001. Persistence of oiling in mussel beds after the Exxon Valdez oil spill. Mar. Environ. Res. 51: 167–190.

Cerniglia, C.E. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons Adv. Appl. Microbiol. 30: 31–71.

Chang, B.V., Chang, I.T., Yuan, S.Y. 2008. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 80: 145–149.

Chang, B.V., Shiung, L.C., Yuan, S.Y. 2002. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. Chemosphere. 48: 717–724.

Chang, J.S., Cha, D.K., Radosevich, M., Jin, Y. 2015. Effects of biosurfactants-producing bacteria on biodegradation and transport of phenanthrene in subsurface soil. J. Environ. Sci. Heal. A. 50: 611-616.

Chen, G., White, P.A. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. Mutat Res. 567: 151–225.

Chiou, C.T., Mcgroddy, S.E., Kile, D.E., Survey, U.S.G., Federal, D. 1998. Partition Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Soils and Sediments. Environ. Sci. Technol. 32: 264–269.

Cookson, J.R.J. 1995. Bioremediation engineering: design and application. McGraw-Hill Inc., New York.

Cury, J.D.E.C. 2002. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. Master's Dissertation. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brazil.

Dabrowska, D., Kot-Wasik, A., Namiesnik, J. 2008. Stability studies of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in different organic solvents and identification of their transformation products. Polish J Environ Stud. 17: 17-24.

Das, N., Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnol. Res. Int. 2011: 1–13.

Denome, S.A., Stanley, D.C., Olson, E.S., Young, K.D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* Strains: Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. 175: 6890–6901.

Dutta, T.K., Harayama, S. 2000. Fate of crude oil by the combination of photooxidation and 543 biodegradation. Environ. Sci. Technol. 34: 1500–1505.

Eaton, R.W., Chapman, P.J. 1992. Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. J. Bacteriol. 174: 7542–7554.

El Fantroussi, S., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? Curr Opin Microbiol. 8: 268–275.

Evans, W.C., Fernley, H.N., Griffiths, E. 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. Biochem. J. 95: 819–831.

Fayeulle, A., Veignie, E., Slomianny, C., Dewailly, E., Munc, J.C., Rafin, C. 2014. Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani*. Environ. Sci. Pollut. Res. 21: 3515–3523.

Fernández-Luqueño, F., Marsch, R., Espinosa-Victoria, D., Thalasso, F., Hidalgo Lara, M.E., Munive, A., Luna-Guido, M.L., Dendooven, L. 2008. Remediation of PAHs in a saline-alkaline soil amended with wastewater sludge and the effect on dynamics of C and N. Sci. Total. Environ. 402: 18–28.

Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, l. 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? Soil Biol. Biochem. 35: 837-843.

Fucik, K.W., Carr, K.A., Balcom, B.J. 1994. Dispersed Oil Toxicity Tests with Biological Species Indigenous to the Gulf of Mexico. U.S . Department of the Interior, New Orleans.

Gallego, J.L.R., Loredo, J., Llamas, J.F., Vázquez, F., Sánchez, J. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. Biodegradation. 12: 325–335.

Gargouri, B., Karray, F., Mhiri, N., Aloui, F., Sayadi, S. 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil by bacterial consortium isolated from an industrial wastewater treatment plant. J. Chem. Technol. Biotechnol. 89: 978-987.

Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F., Sayadi, S. 2015. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading yeast strains from petroleum contaminated industrial wastewater. Biomed. Res. Int. 929424.

Garrett, R.M., Pickering, I.J., Haith, C.E., Prince, R.C. 1998. Photooxidation of crude oils. Environ. Sci. Technol. 32: 3719–3723.

Gaskin, S., Soole, K., Bentham, R., 2008. Screening of Australian native grasses for rhizoremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. Int. J. Phytoremed. 10: 378-389.

Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. Int. Biodeterior. Biodegr. 54: 61–67.

Gogoi, B.K., Dutta, N.N., Goswami, P., Krishna Mohan, T.R. 2003. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. Adv. Environ. Res. 7: 767-782.

Gordon, A., Zakpaa, H.D., MakMensah. 2015. Biodegradation potentials of bacterial isolates from petroleum storage facilities within the Kumasi Metropolitan area. Afr. J. Microbiol. Res. 9: 433-447.

Goyal, A.K., Zylstra, G.J. 1997. Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19: 401–407.

Gray, R., Tykwinski, R.R., Stryker, J.M., Tan, X. 2011. Supramolecular assembly model for aggregation of petroleum asphaltenes. Energy Fuel 25:3125–3134.

Groenzin, H., Mullins, O.C. 2000. Molecular size and structure of asphaltenes from various sources. Energy Fuels. 14: 677–684.

Groves, J.T., Boxer, S.G., McConnel, H.M. 1997. Electric Field-Induced Reorganization of Two-Component Supported Bilayer Membranes. P. Natl. Aca. Sci. USA. 94: 13390-13395.

Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., Shutsubo, K. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1: 63–70.

Haritash, A.K., Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. J. Hazard. Mater. 169: 1–15.

Hassan, I., Mohamedelhassan, E., Yanful, E.K. and Yuan, Z.-C. 2016. A Review Article: Electrokinetic Bioremediation Current Knowledge and New Prospects. Adv. Microb. 6: 57-72.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Caruso, G., Cappello, S. 2014. Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: A mesocosm simulation study. Mar. Environ. Res. 95: 28-38.

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annu. Microbiol. 60: 579-598.

Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Miller, D.W., Cerniglia, C.E. 1988. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 54**:** 2556-2565.

Hernández-López, E.L., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R. 2015. Microbial and enzymatic biotransformations of asphaltenes. Pet. Sci. Technol. 33: 1019–1027.

Hernández-López, E.L., Perezgasga, L., Huerta-Saquero, A., Mouriño-Pérez, R., Vazquez-Duhalt, R. 2016. Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 32: 10773-10784.

Hoeppel, R.E., Hinchee, R.E. 1994. Enhanced biodegradation for onsite remediation of contaminated soils and groundwater. Marcel Dekker Inc., New York

Huang, R.Y., Liu, Q., Yu, H., Jin, X., Zhao, Y.G., Zhou, Y.H., Feng, G. 2016. Enhanced biodegradation of pyrene and indeno(1,2,3-cd)pyrene using bactéria immobilized in cinder beads in estuarine wetlands. Mar Pollut Bull. 102: 128-133.

Huesemann, M.H., Truex, M.J. 1996. The role of oxygen diffusion in passive bioremediation of petroleum contaminated soils. J Hazard Mater. 51: 93-113.

Jahromi, H., Fazaelipoor, M.H., Ayatollahi, S.H., Niazi, A. 2014. Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. Fuel. 117: 230-235.

Jeon, C.O., Park, M., Ro, H.S., Park, W., Madsen, E.L. 2006. The naphthalene catabolic (nag) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1086–1095.

Jo, M.S., Rene, E.R., Kim, S.H., Park, H.S. 2008. An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology J. Hazard. Mater. 152: 1276–1284.

Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-biodegradation in soil. Environ. Pollut. 133: 71-84.

Kanaly, R.A., Harayama, S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic aromatic hydrocarbons by bactéria. Appl. Environ. Microbiol. 182: 2059-2067.

Kao, C.M., Huang, W.Y., Chang, L.J., Chen, T.Y., Chien, H.Y., Hou, F. 2006. Application of monitored natural attenuation to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site Water Sci. Technol. 53: 321–328

Karakoç, F.T., Atabay, H., Tolun, L., Kuzyaka, E. 2015. Fast scanning of illegal oil discharges for forensic identification: a case study of Turkish coasts. Environ. Monit. Assess. 187: 211.

Kari, F.W., Bucher, J., Eustis, S.L., Haseman, J.K., Huff, J.E. 1992. Toxicity and carcinogenicity of hydroquinone in F344/N rats and B6C3F1 mice. Food Chem. Toxicol. 30: 737–747.

Karigar, C.S., Rao, S.S. 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. Enzyme Res. doi: http://dx.doi.org/10.4061/2011/805187.

Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. J. Environ. Manag. 71: 95–122.

Khan, S.A., Bibi, N., Shrewani, S.K. 2015. Isolation, screening and co-metabolism of policyclic aromatic hydrocarbons by soil bacteria. American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 15: 800-812.

Kim, J., Kang, S.H., Min, K.A., Cho, K.S., Lee, I.S. 2006. Rhizosphere microbial activity during phytoremediation of diesel-contaminated soil. J. Environ. Sci. Health Part A. 41: 2503-2516.

Kim, Y.H., Freeman, J.P., Moody, J.D., Engesser, K.H., Cerniglia, C.E. 2005. Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by*Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67**:** 275-285.

Kim, Y.H., Moody, J.D., Freeman, J.P., Engesser, K.H., Cerniglia, C.E. 2004. Evidence for the existence of PAH-quinone reductase and catechol-*O*-methyltransferase in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31: 507-516.

Kim, S.J., Kweon, O., Jones, R.C., Freeman, J.P., Edmondson, R.D., Cerniglia, C.E. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. J. Bacteriol. 189: 464–472.

Kirk, J.L., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T. 2005. The effects of perennial ryegrass and alfafa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. Environ. Pollut. 133: 455-465.

Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H., Takizawa, N. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2439–2443.

Kleemann, R., Meckenstock, R.U. 2011. Anaerobic naphthalene degradation by Gram-positive, ironreducing bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 78 :488–496.

Kümmel, S., Herbst, F.A., Bahr, A., Duarte, M., Pieper, D.H., Jehmlich, N., Seifert, J., von Bergen, M., Bombach, P., Richnow, H.H., Vogt, C. 2015. Anaerobic naphthalene degradation by sulfate-reducing Desulfobacteraceae from various anoxic aquifers. FEMS Microbiol. Ecol. 91: fiv006.

La Rocca, C., Conti, L., Crebelli, R., Crochi, B., Iacovella, N., Rodriguez, F., Turrio-Baldassarri, L., di Domenico, A. 1996. PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice lagoon. Ecotoxicol Environ. Saf. 33: 2362–45.

Labud, V., Garcia, C., Hernandez, T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Chemosphere 66: 1863–1871.

Leal, P.L. Atividade e dinâmica populacional de um consórcio bacteriano durante biodegradação de óleo diesel no solo. Viçosa: UFV, 1983. 99 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

Leys, N.M., Bastiaens, L., Verstraete, W., Springael, D. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by Mycobacterium and Sphingomonas in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 726–736.

Li, X., Zhao, L., Adam, M. 2016. Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China. Mar Pollut Bull. 105: 43-50.

Lin, Q., Mendelssohn, I.A. 2012. Impacts and recovery of the Deepwater Horizon oil spill on vegetation structure and function of coastal salt marshes in the Northern Gulf of Mexico. Environ. Sci, Technol. 46: 3737-3743.

Lotze, H.K., Lenihan, H.S., Bourque, B.J., Bradbury, R.H., Cooke, R.G., Kay, M.C., Kidwell, S.M., Kirby, M.X., Peterson, C.H., Jackson, J.B.C., Bay, M. 2006. Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. Science 312: 1806–1809.

Luckert, C., Ehlers, A., Buhrke, T., Seidel, A., Lampen, A., Hessel, S. 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR. Toxicol. Lett. 222: 180–188.

Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., Yu, J. 2015. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. J. Hazard. Mater. 285: 419-435.

Marcoux, J. 2000. Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation in a two-liquid-phase bioreactor. J. Appl. Microbiol., 88: 655-662.

Marecik, R., Chrzanowski, L., Piotrowska-Cyplik, A., Juzwa, W., Biegańska. 2015. Rhizosphere as a tool to introduce a soil-isolated hydrocarbon-degrading bacteriaç consortium into a wetland environment. Int. Biodeter. Biodegr. 97: 135-142.

Marín-Spiotta, E., Gruley, K.E., Crawford, J., Atkinson, E.E., Miesel, J.R., Greene, S., Cardona-Correa, C., Spencer, R.G.M. 2013. Paradigm shift in soil organic matter research affect interpretations of aquatic carbon cycling: transcending disciplinary and ecosystem boundaries. Biogeochemistry. 117: 279–297

Marrazzini, A., Chelotti, L., Barrai, I., Loprieno, N., Barale, R. 1994. *In vivo* genotoxic interactions among three phenolic benzene metabolites. Mutat. Res. 341: 29–46.

McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A., Sanni, G.O. 2012 Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. Aquat Biosyst 8: 10.

Meckenstock, R.U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J.S., Cunha Tarouco, P., Weyrauch, P., Dong, X., Himmelberg, A.M. 2016. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 26: 92-118.

Meckenstock, R.U., Mouttaki, H. 2011. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. 22: 406– 414.

Medina-Bellver, J.I., Marin, P., Delgado, A., Rodriguez-Sanchez, A., Reyes, E., Ramos, J.L., Marques, S. 2005. Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill. Environ. Microbiol. 7: 773–779.

Miller, R.M., Singer, G.M., Rosen, J.D., Bartha, R. 1988. Photolysis primes biodegradation of benzo[a]pyrene. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1724–1730.

Minai-Tehrani D, Rohanifar P, Azami S. 2015. Assessment of bioremediation of aliphatic, aromatic, resin, and asphaltene fractions of oil-sludge-contaminated soil. Int. J. Environ. Sci. Technol. 12: 1253-1260.

Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S. 2011. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. J. Appl. Microbiol. 111: 525-536.

Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E. 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. App. Env. Microbiol. 67: 1476-1483.

Morais, D., Pylro, V., Clark, I.M., Hirsch, P.R., Tótola, M.R. 2016. Responses of microbial community from tropical pristine coastal soil to crude oil contamination. PeerJ doi: 10.7717/peerj.1733.

Mosaed, H.P., Sobhanardakani, S., Merrikhpour, H., Farmany, A., Cheraghi, M., Ashorlo, C. 2015. The effect of urban fuel stations on soil contamination with petroleum hydrocarbons. Iran. J. Toxicol. 9: 1378-1384.

Mostowfi, F., Indo, K., Mullins, O.C., McFarlane, R. 2009. Asphaltene nanoaggregates studied by centrifugation. Energy Fuels 23:1194–1200

Mullins, O.C. 2011. The asphaltenes. Annu. Rev. Anal. Chem. 4: 393–418.

Murado, M.A., Vázquez, J.A., Rial, D., Beiras, R. 2011. Dose-response modelling with two agents: application to the bioassay of oil and shoreline cleaning agents. J. Hazard. Mater. 185: 807–817.

Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N. 2008. Enhanced Bioremediation of Crude Oil Utilizing Lipophilic Fertilizers Combined with Biosurfactants and Molasses. Mar. Pollut. Bull. 56: 1855-1861.

Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Kalogerakis, N. 2007. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. Desalination. 211: 286–295

Oliveira, D.M., Ferreira Lima, R.M., El-Bachá, R.S. 2012. Brain rust: recent discoveries on the role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nutr. Neurosci. 15: 94–102.

Oliveira, D.M., Pitanga, B.P.S., Grangeiro, M.S., Lima, R.M.F., Costa, M.F.D., Costa, S.L., Clarêncio, J., El-Bachpa, R.S. 2010. Catechol cytotoxicity in vitro: induction of glioblastoma cell death by apoptosis. Hum. Exp. Toxicol. 29: 199–212.

Pagé, A.P., Yergeau, É., Greer, C.W. 2015. *Salix purpurea* stimulates the expression of specific bacterial xenobiotic degradation genes in a soil contaminated with hydrocarbons. PLos One. 10, e0132062.

Palmroth, M.R.T., Koskinen, P.E.P., Kaksonen, A.H., Munster, U., Pitchel, J., Puhakka, J.A. 2007. Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminates with weathered hydrocarbons and heavy metals. Biodegradation. 18: 769-782.

Palmroth, M.R.T., Munster, U., Pitchel, J., Puhakka, J.A. 2005. Metabolic responses of microbiota to diesel fuel addition in vegetated soil. Biodegradation. 16: 91-101.

Pandey, P., Pathak, H., Dave, S. 2016. Microbial ecology of hydrocarbon degradation in the soil: a review. Res. J. Environ. Toxicol. 10: 1-15.

Patrick, A., Craig, D.L., Sena, E., Magalhães, L., Canielas, M. 2012. Técnicas de limpeza de vazamentos de petroleo em alto mar. Cad. Grad. - Ciências Exatas e Tecnológicas 1: 75–86.

Pavel, L.V., Gavrilescu, M. 2008. Overview of *ex situ* decontamination techniques for soil cleanup. Env Engin Manag J. 7: 815-834.

Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., Yao, Q.H. 2008 Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol. Rev. 32: 927–955.

Pereira, M.R.G., de Oliveira, E.S., de Villar, F.A.G.A., Grangeiro, M.S., Fonseca, J., Silva, A.R., Costa, M.F.D., Costa, S.L., El-Bachá, R.S. 2004. Cytotoxicity of catechol towards human glioblastoma cells via superoxide and reactive quinones generation. J. Bras. Patol. Clín. 40: 281–286.

Peterson, C.H. 2001. The "Exxon Valdez" Oil Spill in Alaska : Acute, Indirect and Chronic Effects on the Ecosystem. Adv. Mar. Biol. 39: 1–103.

Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E., Irons, D.B. 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. Science 302: 2082–2086.

Prabhu, Y., Phale, P.S. 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 342–351.

Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresour. Technol. 85: 257-261.

Ramachandran, S.D., Hodson, P.V., Khan, C.W., Lee, K. 2004. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59: 300–308.

Ramirez, E.M., Camacho, J.V., Rodrigo, M.A.R. and Canizares, P.C. 2014. Feasibility of Electrokinetic Oxygen Supply for Soil Bioremediation Purposes. Chemosphere. 117: 382-387.

Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., Nishigaki, I. 2015. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 5: 182–189.

Ritter, K.S., Paul Sibley, L. 2002. Sources, Pathways, and Relative Risks of Contaminants in Surface Water and Groundwater: a Perspective Prepared for the Walkerton Inquiry. J Toxicol Environ Health A. 65: 1-142.

Rodrigues, E.M., Kalks, K.H.M., Tótola, M.R. 2015a. Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island. Braz. J. Environ. Manag. 156: 15–22.

Rodrigues, E.M., Tótola, M.R. 2015. Petroleum: From basic features to hydrocarbons bioremediation in oceans. OALib. 2: e2136.

Rodrigues, E.M., Kalks, K.H.M., Fernandes, P.L., Tótola, M.R. 2015b. Bioremediation strategies of hydrocarbons and microbial diversity in the Trindade Island shoreline – Brazil. Mar. Pollut. Bull. 101: 517-525.

Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, I.M. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. App Environ. Microbiol. 68: 5537-5548.

Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. Curr. Opin. Biotechnol. 27: 191-194.

Rosenkranz, F., Cabrol, L., Carballa, M, Donoso-Bravo, A., Cruz, L., Ruiz-Filippi, G., Chamy, R., Lema, J.M. 2013. Relationship between phenol degradation efficiency and microbial community structure in an anaerobic SBR. Water Res. 47: 6739-6749.

Roy, J.L., McGill, W.B. 2000. Investigation into mechanisms leading to the development, spread and persistence of soil water repellencyfollowing contamination by crude oil. Can J Soil Sci. 80: 595-606.

Ruberto, L., Dias, R. Lo, B.A., Vazquez, S.C., Hernandez, E.A., Mac Cormack, W.P. 2009. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. J. Appl. Microbiol. 106: 1101-1110.

Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Huesemann, M.H., Moore, K.O., Rhodes, I.A., Jackson, L.M.R., Vipond, T.E., Western, M.M., Wisniewski, H.L. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. Environ Sci Technol. 31: 1769-1776.

Samanta, S.K., Singh, 0.V., Jain, R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol. 20: 243-248.

Sandrin, T.R., Maier, R.M. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. Environ. Health. Perspect. 111: 1093–1101

Sayara, T., Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., Sánchez, A. 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. Int. Biodeterior. Biodegrad. 65: 859–865.

Schweigert, N., Acero, J.L., von Gunten, U., Canonica, S., Zehnder, A.J.B., and Eggen, R.I.L. 2000. DNA degradation by the mixture of copper and catechol is caused by DNA-copperoxo complexes, probably DNA-Cu (I) OOH. Environ. Mol. Mutagen. 36: 5-12.

Schwerdtle, T., Ebert, F., Thuy, C., Richter, C., Mullenders, L.H., Hartwig, A. 2010. Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. Chem. Res. Toxicol. 23: 432–442.

Segura, A., Rodríguez-Conde, S., Ramos, C., Ramos, J.L. 2009. Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. Microb. Biotecnol. 2: 452-464.

Sekelsky, A.M., Shreve, G.S. 1999. Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol. Bioeng. 63: 401-409.

Seo, J.S., Keum ,Y.S., Li, Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. Int. J. Environ. Res. Public Health. 6: 278-309.

Sharma, A., Kumar, P., Rehman, M.B. 2014. Biodegradation of diésel hydrocarbon in soil by bioaugmentation of Pseudomonas aeruginosa: a laboratory scale study. Int. J. Environ. Bioremed. Biodegr. 2: 202-212.

Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. Cancer Sci. 95: 1–6.

Shukla, S.K., Mangwani, N., Rao, T.S., Das, S. Biofilm-mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Microbial Biodegradation and Bioremediation 1st edition. 2014.

Siciliano, S.D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L.G., Banks, M.K., Schwab, P., Lee, K., Greer, C.W. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2469-2475.

Siciliano, S.D., Germida, J.J., Banks, M.K., Greer, C.W. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. Appl. Environ. Microbiol. 69: 483-489.

Strausz, O.P., Torres, M., Lown, E.M., Safarik, I., Murgich, J. 2006. Equipartitioning of precipitant solubles between the solution phase and precipitated asphaltene in the precipitation of asphaltene. Energy Fuels 20: 2013–2021.

Stroud, J.L., Paton, G.I., Semple, K.T. 2007. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. J. Appl. Microbiol. 102: 1239-1253.

Sullivan, J.B., Krieger, G.R. 2001. Environmental sciences: pollutant fate and transport in the environment. *In.*Clinical environmental health and toxic exposures. 2nd edition. Ed. LWW.

Sutton, N.B., Maphosa, F., Morillo, J.Á., Abu Al-Soud, W., Langenhoff, A.A., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H.H., Smidt, H. 2013. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 79:619-630.

Syed, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lam, Y.W., Yadav, J.S. 2010. Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Biochem. Biophys. Res. Commun. 399: 492–497.

Syed, K., Kattamuri, C., Thompson, T.B., Yadav, J.S. 2011. Cytochrome b5 reductase–cytochrome b5 as an active P450 redox enzyme system in Phanerochaete chrysosporium: atypical properties and in vivo evidence of electron transfer capability to CYP63A2. Arch. Biochem. Biophys. 509: 26–32.

Syed, K., Porollo, A., Lam, Y.W., Grimmett, P.E., Yadava, J.S. 2013. CYP63A2, a catalytically versatile fungal P450 monooxygenase capable of oxidizing higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols, and alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 79: 2692–2702.

Tabak, H.H., Lazorchak, J.M., Khodadoust, A.P., Antia, J.E., Bagchi, R., Suidan, M.T. 2003. Studies on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments: bioavaiability, biodegradability, and toxicity issues. Environ Toxicol Chem. 22: 473-483.

Tate, P.T., Shin, W.S., Pardue, J.H., Jackson, W.A. 2011. Bioremediation of an experimental oil spill in a coastal Louisiana salt marsh. Water Air Soil Pollut. 223: 1115–1123.

Taylor, E., Reimer, D. 2008. Oil persistence on beaches in Prince William Sound – a review of SCAT surveys conducted from 1989 to 2002. Mar. Pollut. Bull. 43: 458–474.

Tervahauta, A.I., Fortelius, C., Tuomainen, M., Akerman, M.L., Rantalainen, K., Sipilä, T., Lehesranta, S.J., Koistinen, K.M., Kärenlampi, S., Yrjälä, K. 2009. Effect of birch (*Betula* spp.) and associated rhizoidal bacteria on the degradation of soil polyaromatic hydrocarbons, PAH-induced changes in birch proteome and bacterial community. Environ. Pollut. 157: 341-346.

Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R 2012a. Microbial activity and diversity in long term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. J Environ Manag 99: 10–17

Thavamani, P., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R 2012b. Mixed contamination of polyaromatic hydrocarbons and metals at manufactured gas plant (MGP) sites: toxicity and implications to bioremediation. In: Wong MH (ed) Environmental contamination: health risks, bioavailability and bioremediation. Taylor & Francis Inc, London, pp 347–368.

Tian, L., Ma, P., Zhong, J.J. 2002. Kinetics and key enzyme activities of phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*. Process Biochem. 37: 1431-1437.

Tomás-Gallardo, L., Gómez-Álvarez, H., Santero, E., Floriano, B. 2013. Combination of degradation pathways for naphthalene utilization in *Rhodococcus* sp. strain TFB. Microbial Biotechnol. 7: 100-113.

Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., de Carvalho, C.C.C.R. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation 22: 231–241.

U.S. EPA. Development of a Relative Potency Factor (RPF) Approach for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Mixtures (External Review Draft). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/635/R-08/012A, 2010.

Ukiwe, L.N., Egereonu, U.U., Njoku, P.C., Nwoko, C.I.A., Allinor, J.I. 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation techniques? A review. Int J Chem. http://dx.doi.org/10.5539/ijc.v5n4p43

Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., Vazquez-Duhalt, R. 2011. First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. Microb. Biotechnol. 4: 663–672.

Wang, Z.Y., Gao, D.M., Li, F.M., Zhao, J., Xin, Y.Z., Simkins, S., Xing, B.S. 2008. Petroleum hydrocarbon degradation potential of soil bacterial native to the Yellow River Delta. Pedosphere. 18: 707-716.

Warr, L.N., Friese, A., Schwarz, F., Schauer, F., Portier, R.J., Basirico, L.M., Olson, G.M., 2013. Bioremediating oil spills in nutrient poor ocean water using fertilized clay mineral flakes: some experimental constraints. Biotechnol. Res. Int. 704806.

Wattiau, P. 2002. Microbial aspects in bioremediation of soils polluted by polyaromatic hydrocarbons. *In*: Biotechnology for the environment:Strategy and fundamentals. Edited by: Agathos, S.N. and Reineke, W. Springer Science Business Media, B.V.

Wick, L.Y., Shi, L., Harms, H. 2007. Electro-bioremediation of hydrophobic organic soilcontaminants: a review of fundamental interactions. Electrochim. Acta. 52: 3441–3448.

Widdel, F., Knittel, K., Galushko, A. 2010. Anaerobic hydrocarbon-degrading microorganisms: an overview; in Timmis KN (ed): Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin, Springer, pp 1997–2021.

Wolfe, M.F., Schwartz, G.J.B., Singaram, S., Mielbrecht, E.E. 1999. Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of phenanthrene to algae and rotifers. Aquat. Toxicol. 48: 13–24.

Xu, W., Wang, C.P., Liu, H.B., Zhang, Z.Y., Sun, H.W. 2010. A Laboratory Feasibility Study on a New Electrokinetic Nutrient Injection Pattern and Bioremediation of Phenanthrene in a Clayey Soil. J. Hazard. Mater. 184: 798-804.

Yanto, D.H.Y., Tachibana, S. 2013. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. Int. Biodeterior. Biodegrad. 85: 438–450.

Yanto, D.H.Y., Tachibana, S. 2014. Potential of fungal co-culturing for accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. J. Hazard. Mater. 278: 454–463.

Yrjälä, K., Keskinen, A.K., Akerman, M.L., Fortelius, C., Sipilä, T.P. 2010. The rhizosphere and PAH amendment mediate impacts on functional and structural bacterial diversity in sandy peat soil. Environ. Pollut. 158: 1680-1688.

Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y. 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Mar. Pollut. Bull. 51: 1071–1077.

Zhang, S., Wang, Q., Xie, S. 2012. Stable isotope probing identifies anthracene degraders under methanogenic conditions. Biodegradation. 23: 221–230.

Zhang, X.X., Cheng, S.P., Zhu, C.J., Sun, S.L. 2006. Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathwaus and contributing factors. Pedosphere 16: 555-565.

Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T., Lee, K. 2001. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati.

Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. Environ. Int. 33: 406-413.

Capítulo 2

Draft genome of* Rhodococcus rhodochrous *TRN7, isolated from the coast of Trindade Island, Brazil

Draft genome of *Rhodococcus rhodochrous* TRN7, isolated from the coast of Trindade Island, Brazil [1]

Edmo M. Rodrigues[a], Victor S. Pylro[b], Priscila T. Dobbler[c], Filipe Victoria[d], Luiz F. W. Roesch[c], Marcos R. Tótola[a]

[a] Departamento de Microbiologia, Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

[b] René Rachou Research Centre, Genomics and Computational Biology Group CPqRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

[c] Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia, CIP-Biotec, Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil

[d] Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica, Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

Here, we present a draft genome and annotation of *Rhodococcus rhodochrous* TRN7, isolated from Trindade Island, Brazil, which will provide genetic data to benefit the understanding of its metabolism.

2.1. Genome announcement

The genus *Rhodococcus* is closely related to *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, and *Mycobacterium* and belongs to the *Actinobacteria* phylum and *Nocardiaceae* family. *Rhodococcus rhodochrous* is a metabolically diverse species found in different environmental niches, from soil to waste treatment plants (1–3). Such diversity can be used in the bioremediation of hydrocarbons, toluene, and other aromatic compounds. Members of the genus *Rhodococcus* have been shown to synthesize and accumulate triacylglycerol (TAGs) (4), which can be an alternative in the production of biofuels.

The strain *R. rhodochrous* TRN7 was isolated from the coast of Trindade Island, Brazil. It was isolated in a medium containing naphthalene as the sole source of carbon and energy. *R.*

---

[1] Paper published in Genome Announcements | Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi: 10.1128/genomeA.01707-15

rhodochrous TRN7 was able to grow in 13 different hydrocarbons as sole source of carbon and energy (5).

Genome sequencing for *R. rhodochrous* TRN7 was performed using the Ion Torrent PGM platform (Life Technologies). Briefly, the genomic DNA was fragmented by using the Bioruptor UCD- 200. The template library was prepared with the Ion Plus fragmente library kit and clonally amplified in the One Touch System with the Ion PGM template OT2 400 kit. The amplified library was sequenced using the Ion PGM sequencing 400 kit within the 318 Chip version 2. A total of 5,048,800 reads, ranging from 25 to 484 bp in length, were sequenced. The resulting reads were assembled using the MyPro pipeline software (6). Briefly, sequences were trimmed and filtered, followed by genome assembly. MyPro groups five different genome assemblers: VelvetOptimiser, Edena, Abyss, SOAPdenovo, SPAdes, and SOAP2. Integration of the resulting contigs was performed using CISA and SOAP2. Integration resulted in 173 contigs, totaling 4,871,006 bp, with an average size (*N*50) of 70,171 bp, longest contig size of 278,361 bp, and G+C content of 70.2%.

Genome annotation was performed using Prokka (7) and Swiss-Prot (8) and revealed 4 rRNAs, 55 tRNAs, 1 tmRNA, and 5,067 genes, of which 5,007 were protein-coding-sequences, including 509 putative proteins and 1,753 hypothetical proteins. The KEGG Automatic Annotation Server (KASS) (9) was used for pathways analysis, which identified 45 genes related to metabolic pathways. Moreover, 24 genes related to microbial metabolism in diverse environments were found.

KASS also identified the HpaB and BenA-XylX genes as being responsible for the degradation of aromatic compounds, and 17 genes involved in the biosynthesis of antibiotics. Furthermore, several enzymes were identified as being related to biosynthesis and metabolism of fatty acid, such as TAGs, like pyruvate carboxylase, acetyl-CoA C-acetyltransferase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and fatty acid synthase. In addition, it also has genes for cytochrome P450 monooxygenase and an Alk gene cluster, which is part of an alkane degradative system.

Bearing in mind the adaptability of metabolism found in *R. rhodochrous* TRN7, the genome sequencing data in this study will support a better understanding of its metabolism and the application of TRN7 for bioremediation of oil spills, or as a new possible source for the production of biofuels.

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession numbers FBUK01000001 to FBUK01000173. The versions described in this paper are the first versions.

2.2. Acknowledgments

We thank the Brazilian Navy and Rodrigo Otoch Chaves for logistic support while collecting samples and for providing the essential structure to transport and store samples. CNPq grant 405544/2012-0 (PROTRINDADE), FAPEMIG, and CAPES (PROEX) funded this work. This work is also supported by the Brazilian Microbiome Project (http://brmicrobiome.org).

2.3. References

1. Larkin MJ, De Mot R, Kulakov LA, Nagy I 1998. Applied aspects of *Rhodococcus* genetics. Antonie Van Leeuwenhoek 74:133–153.

2. Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CC 2005. Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. Curr Opin Biotechnol 16:282–290. doi:.10.1016/j.copbio.2005.04.007

3. Finnerty WR. 1992. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. Annu Rev Microbiol 46:193–218. doi:.10.1146/annurev.mi.46.100192.001205

4. Alvarez HM, Steinbüchel A 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 60:367–376. doi:.10.1007/s00253-002-1135-0

5. Rodrigues EM, Kalks KH, Tótola MR 2015. Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island, Brazil. J Environ Manage 156:15–22. doi:.10.1016/j.jenvman.2015.03.016

6. Liao Y-C, Lin H-H, Sabharwal A, Haase EM, Scannapieco FA 2015. MyPro: A seamless pipeline for automated prokaryotic genome assembly and annotation. J Microbiol Methods 113:72–74. doi:.10.1016/j.mimet.2015.04.006

7. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics30:2068–2069.

8. The UniProt Consortium 2015. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Res 43:D204–D212. doi:.10.1093/nar/gku989

9. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M 2007. The metabolic pathways were examined through KAAS (KEGG automatic annotation server): an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic Acids Res 35(suppl 2):W182–W185. doi:.10.1093/nar/gkm321

Capítulo 3

Draft genome of* Nocardia farcinica *TRH1, a linear and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the coast of Trindade Island, Brazil

Draft genome of *Nocardia farcinica* TRH1, a linear and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the coast of Trindade Island, Brazil. [1]

Edmo M. Rodrigues[1*]. Pedro Marcus P. Vidigal[2], Victor S. Pylro[3], Daniel K. Morais[3], Laura Rabelo Leite[3], Luiz F. W. Roesch[4], Marcos R. Tótola[1*]

[1]Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

[2]Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

[3]Biosystems Informatics and Genomics Group, René Rachou Research Centre – CPpRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

[4]Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

Here, we report the draft genome sequence and annotation of *Nocardia farcinica* TRH1, a petroleum hydrocarbons degrading Actinobacteria isolated from the coastal water of Trindade Island, Brazil.

3.1. Genome Announcement

Several species of the genus *Nocardia* are known to degrade hydrocarbons[1]. The strain *Nocardia farcinica* TRH1 was isolated from the coastal water of Trindade Island, a pristine oceanic island in Brazil[2]. It is capable of growing using several petroleum hydrocarbons as the sole source of carbon and energy, such as phenanthrene, pyrene, anthracene, eicosane, pentacontane, triacontane, tetracosane, naphthalene, hexadecane, octane, toluene and xylene[2].

---

[1] Paper accepted for publication in Brazilian Journal of Microbiology | Copyright © 2016, Elsevier B. V. All Rights Reserved

Genome sequencing of *N. farcinica* TRH1 was performed using the Ion Torrent PGM platform (ThermoFisher Scientific). Briefly, the genomic DNA was fragmented using the Bioruptor UCD-200. The template library was prepared with the Ion Plus fragment library kit and clonally amplified in the One Touch System with the Ion PGM template OT2 400 kit. The amplified library was sequenced using the Ion PGM sequencing 400 kit within the 318 v2 microchip. A total of 2,531,733 reads were obtained with sizes ranging from 25 to 492 bp in length. The reads were filtered for length (minimum, 100 bp) and quality (minimum score, Q20) and used for *de novo* assembling using CLC Genomics Workbench version 6.5.1 (CLC bio). From assembling, we obtained 321 contigs, corresponding to 5,230,013 bp, with an average size (N_{50}) of 9,853 bp, longest contig size of 122,221 bp, G+C content of 68.0% and genome coverage of 52.53X. Genes from the contigs were predicted using GeneMarkS[3], which revealed 4,946 coding sequence set (CDS). The protein sets were functionally annotated using BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), and approximately 68.6% of the proteins were assigned to Clusters of Orthologous Groups (COG) families[4].

Genome annotation was performed using BlastKOALA[5] and revealed 1,869 protein-coding-sequences, including 106 related with xenobiotics biodegradation and metabolism, and 309 unclassified. The KEGG Automatic Annotation Server (KASS)[6] was used for pathways analysis, which identified 516 genes related to metabolic pathways, including 21 genes related to biodegradation of aromatic compounds.

KASS also identified the presence of catA and dmpC, which are among the genes of the catabolic pathways of ortho and meta-cleavage of catechol, respectively. Catechol is a toxic intermediate generated during the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[7]. Furthermore, several genes were identified as being related to biodegradation of aliphatic hydrocarbons as the alkB gene. We also found aldH, paaF, fadB and fadJ genes related to biodegradation of the nylon precursor caprolactam, as well as the atzD gene, related to the degradation of the pesticide atrazine, showing another possibility for biotechnological applications of this strain.

The abundance of genes involved in biodegradation pathways in the genome of *N. farcinica* TRH1 implies in high metabolic plasticity of this strain, what is consistent with the results obtained during the screening of bacteria for hydrocarbon biodegradation[2]. The genome sequencing data from this study will support a better understanding of the metabolism and the potential applications of *N. farcinica* TRH1 in biotechnological processes, as hydrocarbons and xenobiotics bioremediation.

Nucleotide sequence accession numbers: This WGS BioProject has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number PRJNA322144 and the sequences under the accession number LYCQ00000000. The versions described in this paper are the first versions.

3.2. Acknowledgments

We thank the Brazilian Navy and Rodrigo Otoch Chaves for logistic support while collecting samples and for providing the essential structure to transport and store samples. CNPq grant 405544/2012-0 (PROTRINDADE), FAPEMIG, and CAPES (PROEX) funded this work. This work is also supported by the Brazilian Microbiome Project (http://brmicrobiome.org).

3.3. References

1. Lara-Severino RC, Camcho-López MA, García-Macedo JM, Gómez-Oliván LM, Sandoval-Trujillo AH, Isaac-Olive K. Ramírez-Durán N. 2016. Determination of the residual anthracene concentration in cultures of haloalkalitolerant actinomycetes by excitation fluorescence, emission fluorescence, and synchronous fluorescence: comparative study. J anal Methods Chem. doi: 10.1155/2016/6287931
2. Rodrigues, EM, Kalks, KHM, Tótola, MR. 2015. Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island, Brazil. J Environ Manage. 156, 15-22.
3. Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. 2001. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. Nucleic Acids Res 29, 2607-2618.
4. Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT,Rao BS, Kiryu tin B, Galperin MY, Fedorova ND, Koonin EV. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. Nucleic Acids Res 29, 22–28.
5. Kanehisa, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. J. Mol. Biol. 428, 726-731.
6. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. 2007. The metabolic pathways were examined through KAAS (KEGG automatic annotation server): an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic Acids Res 35, 182–185.
7. Schweigert N, Zehnder AJ, Eggen RI. 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. Environ Microbiol. 3, 81-91.

Capítulo 4

Microbial diversity and metabolism of hydrocarbons in a pristine sea-water from Trindade Island

Microbial diversity and metabolism of hydrocarbons in a pristine sea-water from Trindade Island

Edmo Montes Rodrigues [a]#, Daniel Kumazawa Morais[b], Victor Satler Pylro[b], Juraci Alves de Oliveira[c], Luiz Fernando Wurdig Roesch[d], Dionéia Evangelista Cesar[e], Marcos Rogério Tótola[a]#

[a] Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade parar o Meio Ambiente, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[b] Genomics and Computational Biology Group, René Rachou Research Center (CPqRR-FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

[c] Laboratório de Biofísica Ambiental, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[d] Centro para Pesquisa Interdisciplinar em Biotecnologia, CIP-Biotec, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil

[e] Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microorganismos, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

Abstract

Aquatic microorganisms are essential for ecosystem regulation and functioning. However, microbial communities present in tropical oceanic islands are poorly described, regarding both diversity and functioning. Our research aimed to verify the occurrence of hydrocarbon co-oxidation by marine microbial populations and elucidate the effects of hydrocarbons (aliphatic and polycyclic aromatic) on microbial taxonomic diversity in the sea-water surrounding the Trindade Island/Brazil. Microcosms containing sea-water from Trindade Island and phenanthrene-9-^{14}C (for phenanthrene biodegradation analysis) or non-radioactive phenanthrene

(for biodiversity analysis) together with hexadecane, weathered oil, fluoranthene or pyrene and combinations of these compounds were incubated for 30 days at 24 ^{o}C, the mean temperature of the water in the vicinities of Trindade Island. Biodegradation of phenanthrene-9-^{14}C was not affected by other PAHs, but increased in presence of hexadecane. After 30 days, metagenomic DNA was extracted and the 16S rDNA gene was sequenced. We detected significant shifts in the microbial community of contaminated samples, compared to the non-contaminated control. The microbial community in the control showed higher alpha diversity and dominance of Alphaproteobacteria. In contaminated microcosms, the microbial communities had reduced alpha diversity and were dominated by Gammaproteobacteria. The alpha diversity reached the lowest values in microcosms contaminated with combinations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Microbial taxa reported as possessing hydrocarbon-degrading members were always in higher abundance in contaminated microcosms. We conclude that the microbial community of the pristine sea-water surrounding Trindade Island adapt rapdly to hydrocarbon contamination and undergo enrichment in hydrocarbon-degrading taxa. Furthermore, the combination of polycyclic aromatic hydrocarbons pose a strong negative effect on the microbial community, reducing its diversity and thus affecting ecological functions exerted by some of the reduced microbial populations. Our results are important to understand the dynamics of bacterial communities in response to the type of hydrocarbon contamination and to trace bioremediation strategies in case of accidents involving oil spillage near the Trindade Island.

4.1. Introduction

Marine environments are subject to anthropogenic contamination by metals and organic compounds. Petroleum hydrocarbons are some of the most hazardous organic pollutants in the marine environments, and petroleum spills entails a series of economic, social, and environmental problems (Grigalunas et al., 1986; Peterson et al., 2003). Among these organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are listed as priority-pollutants by the European Union and the United States Environmental Protection Agency (USEPA). They

represent a group of compounds with mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects (Sverdrup et al., 2002; Qiao et al., 2006).

PAHs are formed from pyrogenic, petrogenic and diagenic processes. Pyrogenic PAHs result from incomplete combustion of organic materials under either high and low temperatures (Neff, 1979; Meyers and Ishiwatari, 1993). Petrogenic PAHs result from biogenic processes at relatively low temperatures during geological time scale, and have the same origin as oil and other fossil fuels (Neff, 1979; Boehm et al., 2001). The diagenic PAHs are produced by biochemical reactions from biogenic precursors, for example, plant terpenes (Silliman et al., 1998; Wu et al., 2001).

Although occurring in low concentrations in crude oil, PAHs are of concern due to their high toxicity and recalcitrance in the environment (Atlas and Hazen, 2011). Most PAHs are highly hydrophobic and can adsorb onto organic and inorganic particles in the water columm (Mehdinia et al., 2015). Sedimentation of these PAHs-carrying particles can contaminate the benthic region of aquatic environments. The sediment thus becomes a reservoir of contaminants, which can be gradually released, causing long-term ecotoxicological effects (Rodrigues and Tótola, 2015).

In the environment, PAHs are generaly present as mixtures of molecules associated with other classes of hydrocarbons. The biodegradation of PAHs is mediated by a consortium of microorganisms with diferent and interconnected metabolic pathways. Microbial guilds can be a key factor for the occurrence of co-metabolism and cooperation between microorganisms, which contribute to the catabolism of these compounds (Vila et al., 2015). Some microorganisms have the ability to degrade or oxidize a contaminant while their energy and carbon needs are provided by another compound. This process is known as co-metabolism and is described for some microbial taxa (Bouchez et al., 1995; Zhong et al., 2007; Khan et al., 2015).

Although PAHs are regarded as recalcitrant, a large number of bacterial groups is known to degrade them. The *Methylophaga* and *Marinobacter*, both members of the order Gammaproteobacteria, as well as members of the Actinobacteria, have been described as able to

catabolize such compounds (Vila et al., 2010). Recently, Rodrigues et al. (2015a) described and isolated representatives of Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria from a biofilm developed on a weathered oil surface left in the sea for 30 days. These isolates were able to grow in mineral medium containing PAHs as the sole source of carbon and energy. Using PAH-SIP, Gutierrez et al. (2011) described the dominance of Rhodobacteraceae associated with low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation, while in subsequente studies, Guitierrez et al. (2013a, 2013b, 2014) isolated some species of Gammaproteobacteria and Bacteriodetes and suggested that they play a key role in the biodegradation of PAHs containing 2 or 3 rings. Therefore, a wide range of microorganisms can utilize these compounds.

Trindade Island is a Brazilian oceanic island of volcanic origin (Barros, 1959) with no evidence of contamination by hydrocarbons. The access to the island is restricted to research and military purposes. Trindade has unique features such as endemic species, biogeographic isolation and unique climatic conditions (Soares, 1964, Parinsipat et al., 2010; Zhu et al., 2012). However, Trindade is located in the same latitude of the main Pre-Salt oilfields and thus is at risk due to eventual oil spills. Our interest is to evaluate how this pristine environment will respond to eventual contamination by crude oil and delineate strategies to copy with future accidents involving oil spills. The objective of this study was to elucidate the effect of mixtures of hydrocarbons on the microbial community of the sea-water from the coast of the Trindade Island, and relate the variations of diversity to PAHs mineralization by the indigenous microorganisms.

4.2. Material and Methods

4.2.1. Site description and sample collection

For this study, 20 liters of sea-water were collected ca. 100 m from the Tartarugas beach at Trindade Island, Brazil (20° 29', 20° 32' S; 29° 17', 29° 21' W; Fig. S1), with anual average water temperature of 24 °C (according to daily data collected by the weather station of Trindade

Island – EMIT). The sample was kept refrigerated at 4 °C for 6 days until its use in the experiments.

4.2.2. Experimental design

In this study, two similar sets of treatments were assembled. The first set consisted of water from the Trindade Island coast supplemented with inorganic nutrients, hydrocarbons, and phenanthrene-9-^{14}C. These treatments (Table 1) were used to assess the biodegradation of phenanthrene in presence of other hydrocarbons. The second set included other treatments (Table 2), and phenanthrene-9-^{14}C was replaced by unlabed phenanthrene. This set was used for metagenomic analysis. All experiments were conducted with three replicates.

4.2.3. Biodegradation of phenanthrene -9-^{14}C

The biodegradation of phenanthrene-9-^{14}C was evaluated in microcosms of 100 mL borosilicate (Wheaton ®) respirometric flasks containing 50 mL of Bushnell Haas-enriched sea-water and phenanthrene-9-^{14}C or phenanthrene-9-^{14}C plus one additional hydrocarbon (Table 1). Each microcosm received 1 g/L phenanthrene -9-^{14}C (320,000 dpm). In treatments with additional hydrocarbons, these were also added at a concentration of 1 g/L. Bushnell Haas mineral medium (HIMEDIA) was added at 0.1 X (final concentration) to support microbial growth.

Table 1. Set of treatments using phenanthrene-9-^{14}C.

Treatment	Description
^{14}PHE	Phenanthrene-9-^{14}C
^{14}PHE + PYR	Phenanthrene -9-^{14}C + Pyrene
^{14}PHE + FLU	Phenanthrene -9-^{14}C + Fluoranthene
^{14}PHE + HEX	Phenanthrene -9-^{14}C + Hexadecane
^{14}PHE + OIL	Phenanthrene -9-^{14}C + Weathered oil

To each respirometric flask a scintillation vial containing 2 mL of KOH 1M was added to capture the CO_2 emited by microbial respiration. The microcosms were incubated for 30 days at 100 rpm and 24 °C. The scintillation vials were exchanged every 5 days for scintilation count

analysis. The $K_2{}^{14}CO_3$-containing KOH solution (2mL) was mixed with 5 mL of Ultima™ Gold LSC Cocktail (Sigma-Aldrich®). The radiation emitted by the solution of each vial was measured in a LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (©Beckman Coulter, Inc) and expressed as dpm.

4.2.4. Molecular analysis

4.2.4.1. Experimental design

Microcosms for microbial community analyzes were prepared as described in the last section. New treatments were included (Table 2) and phenanthrene-9-^{14}C was replaced by non-labeled phenanthrene.

Tabela 2. Hydrocarbons added to water from coast of Trindade Island to evaluate the effect of the contaminants on the microbial community. Hydrocarbons were added at 1 g L^{-1}.

Treatment	Description
OIL	Weathered oil
PHE + OIL	Phenanthrene + Weathered oil
PHE	Phenanthrene
PYR	Pyrene
PHE + PYR	Phenanthrene + Pyrene
FLU	Fluoranthene
PHE + FLU	Phenanthrene + Fluoranthene
HEX	Hexadecane
PHE + HEX	Phenanthrene + Hexadecane

The microcosms consisted of 125 mL Erlenmeyers flasks containing 50 mL of Bushnell Haas-enriched seawater contaminated with 1 g/L of each hydrocarbon. Microcosms were incubated for 30 days at 100 rpm and 24 °C. Non-contaminated sea-water was used as control.

4.2.4.2. DNA extraction

After the incubation period, the water was filtered through 0.22 μm ester membranes (©Merck Millipore). Metagenomic DNA was extracted and purified from the membranes with *PowerWater™ DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA) following the manufacturer's protocol. The integrity and quantification of DNA was determined in a 0.8%

agarose gel in 1X TAE buffer and with the 2.0 Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectively.

4.2.4.3. High-throughput sequencing

Sequencing was performed on the Ion Torrent PGM platform (Life Technologies) in the Interdisciplinary Center for Research in Biotechnology (CIP-Biotec), Universidade Federal do Pampa (São Gabriel, RS, Brazil). Bacterial and archaeal 16S rRNA genes were amplified using primers 515F (5'–GTGCCAGCMGCCGCGGTAA–3') and 806R (5'–GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2011).

4.2.4.4. Data analysis

Metagenomic data were analyzed using the 16S bioinformatics pipeline developed by the Brazilian Microbiome Project, available at http://brmicrobiome.org (Pylro et al., 2014). This pipeline uses QIIME (Caporaso et al., 2010) and Usearch 7.0 (Edgar, 2010) for filtering low quality sequences, clustering sequences, diversity comparisons, diversity analysis and graphical plotting. It uses the rarefaction strategy to randomly sub-sample sequences from each sample to equalize the number of sequences per sample. It performs alpha and beta diversity analysis with the rarefyied sequences. The Good's coverage (Good, 1953) was used to assess the coverage achieved using the chosen level of rarefaction. Microbial diversity analysis were performed by applying the indexes Faith's PD (phylogenetic measure of diversity based on total branch lenght of phylogeny captured by a sample, proposed by Faith (1992)), Chao-1 (estimator of total species richness proposed by Chao (1984)) and observed species (number of species detected). Weighted unifrac was used to estimate beta diversity (Lozupone and Knight, 2005).

4.2.4.5. Acession numbers

The sequences of the 16S rRNA gene reads obtained by amplicon Ion Torrent were deposited in MG-RAST under accession numbers 4706729.3, 4706730.3, 4706731.3, 4706734.3, 4706735.3, 4706736.3, 4706738.3, 4706739.3, 4706740.3, 4706741.3, 4706742.3,

4706743.3, 4706744.3, 4706745.3, 4706746.3, 4706747.3, 4706748.3, 4706749.3, 4706750.3, 4706751.3, 4706752.3, 4706753.3, 4706754.3, 4706755.3, 4706756.3, 4706757.3, 4706758.3, 4706759.3, 4706760.3 and 4706761.3.

4.2.5. Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the software "R". The data of mineralization of phenanthrene-9-^{14}C and alpha diversity were submited to the Shapiro-Wilks test and data were considered normal. The Scott-Knott test was used at 5% probability. Likewise, data groups of beta diversity were analyzed at 5% probability by the "t" test (Bonferroni corrected). The bioconductor EdgeR package was used for hypothesis testing to compare taxonomic diferences between treatments (Robinson et al., 2010). The count matrix at species level was normalized through the relative log expression (RLE) proposed by Anders and Huber (2010), by which the median count is calculated from the geometric mean of all columns and the median ratio of each sample to the median library is used as the scale factor. The Benjaming-Hochberg false discovery rate method (FDR) was used to correct the *p*-values.

4.5. Results

4.5.1. Phenanthrene-9-^{14}C mineralization

The radiation emitted by the microcosms contaminated with phenathrene-9-^{14}C is shown in Figure 1. Differences between treatments were detected only after 15 days of incubation.

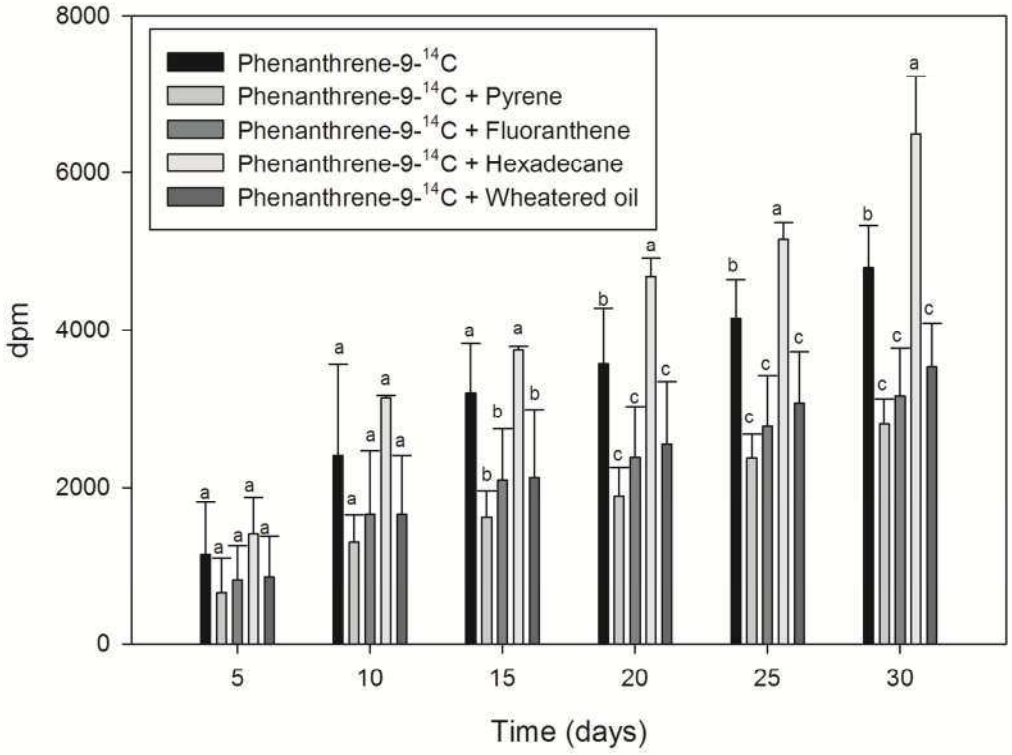


Figure 1. Cumulative radiation emitted by $K_2{}^{14}CO_3$, the product of the mineralization of phenanthrene-9-^{14}C by the microbial community of sea-water from the coast of Trindade Island. Bars in each sampling time with the same letter do not differ significantly at 5% probability by the Scott-Knott test.

There was a greater $^{14}CO_2$ emission by microcosms containing only phenanthrene-9-^{14}C and phenanthrene-9-^{14}C + hexadecane. From the 20th day, the treatment containing hexadecane becomes statistically diferent from the treatment with only phenanthrene-9-^{14}C. Treatments which received other PAHs (fluoranthene or pyrene) or weathered oil in addition to phenanthrene presented lower $^{14}CO_2$ emission.

4.5.2. Sequencing output

Sequencing of the 16S rRNA from all treatments generated 880,273 high quality filtered reads (Table S1). There was a great variability in the number of sequences among the treatments. Rarefaction method (random subsampling sequences) was applied to the sequencing data in order to minimize the effects of sequencing depth variation on diversity analysis and *taxa* comparison. Estimates of alpha and beta diversity were based on evenly rarefied OTU matrices, totalizing 5,600 sequences per sample for *Bacteria* and *Archaea*.

4.5.3. Diversity comparisons

There was a significant reduction (up to 70%) of microbial diversity in all treatments in relation to the control (Fig. 2). This result was observed in all three alpha diversity indexes. The lowest values of diversity estimators were found in treatments containing phenanthrene combined or not with other hydrocarbons and in treatment containing pyrene.

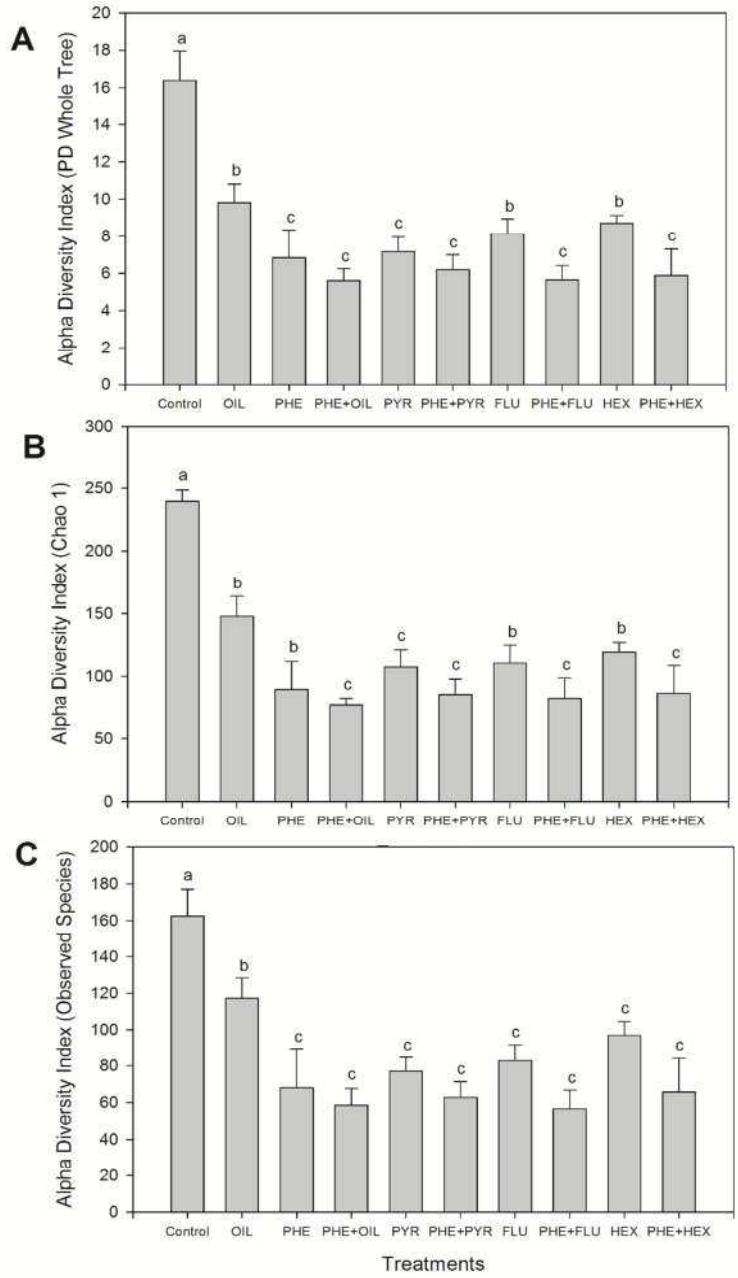


Figure. 2. Average (n = 3) alpha diversity of prokaryotic sequences in sea-water from the coast of Trindade Island contaminated with hydrocarbons (1 g/L). Microcosms of 50 mL in

borosilicate respirometric flasks were fertilized with Bushnell-Haas medium 0.1X and incubated at 100 rpm at 24 ºC during 30 days. (A) PD Whole Tree index; (B) Chao 1 index; (C) Observed Species index. Control: no contamination; Oil: weathered oil; PHE: phenanthrene; PYR: pyrene; FLU: fluoranthene; HEX: hexadecane.

The Good's coverage applied to rarefaction curves shows that the sequencing effort was sufficient to capture most of the microbial diversity of samples (Fig. 3), since the curves tend to stabilize with grow of number of sequenced OTU's . The highest numbers of distinct OTU's were found in the control (Fig. 3). These results show that the alpha diversity is adversely affected by the presence of hydrocarbons and specially by the presence of PAHs.

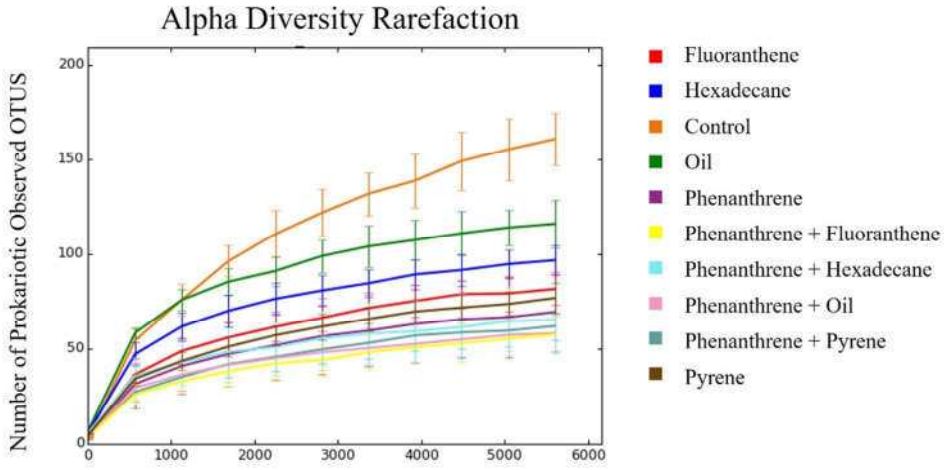


Figure 3. Average alpha diversity rarefaction plot for prokaryotic sequences in microcosms containing sea-water from the coast of Trindade Island contaminated with crude oil, hexadecane and PAHs. It shows the number of observed species at a random pool of sequences at different sequencing depths.

Beta diversity analysis showed that the microbial community of the non-contaminated control microcosm was very distinct from that in microcosms contaminated with hydrocarbons (Fig. 4). Treatments with PAHs and weathered oil, which also contain PAHs in minor proportion (Liu et al., 2012), grouped together, and the latter was closer to the treatment with hexadecane.

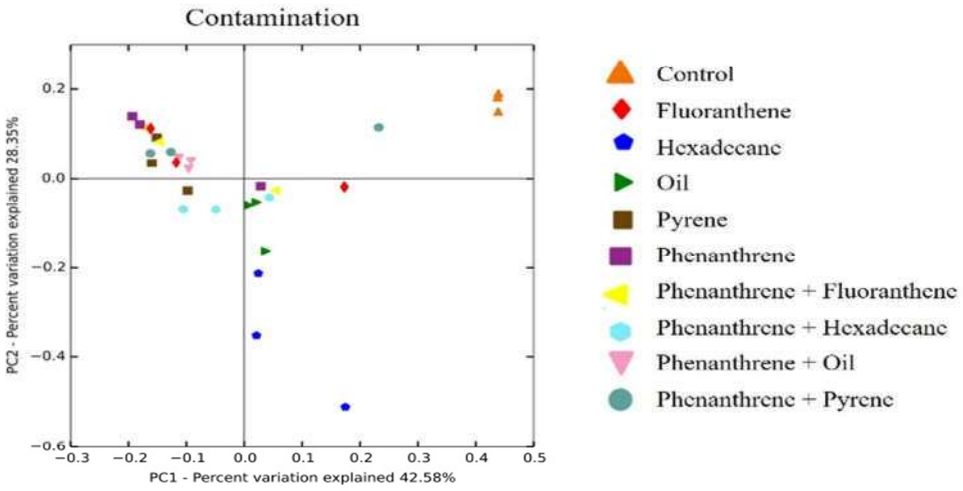


Figure 4. Principal coordinate analysis (PCoA) of beta diversity (determined by Weighted Unifrac distance matrix) of microbial communities in microcosms containing sea-water from Trindade Island contaminated with hydrocarbons. Each treatment was analysed with three replicates. Sequences were rarefied at the same sequencing depth and abundance matrixes were generated using taxa tables summarized at the lowest possible taxonomic level, ranging from domains to species.

Paired comparisions of beta diversity were evaluated according to the types of hydrocarbons in each treatment [Linear (hexadecane); PAH (only PAHs); Mix (Weathered oil); PAH + Linear (PAHs + hexadecane); and PAH + Mix (PAHs + Weathered oil)] (Fig. 5). The greatest differences were found between the microbial communities of the control and those present in the microcosms with hydrocarbons, and between the treatments Linear *vs.* PAH + Mix and Linear *vs.* PAH. The lowest differences between microbial communities were found when compairing treatments containing PAHs and these with treatments with weathered oil, which also contain PAHs (Liu et al., 2012).

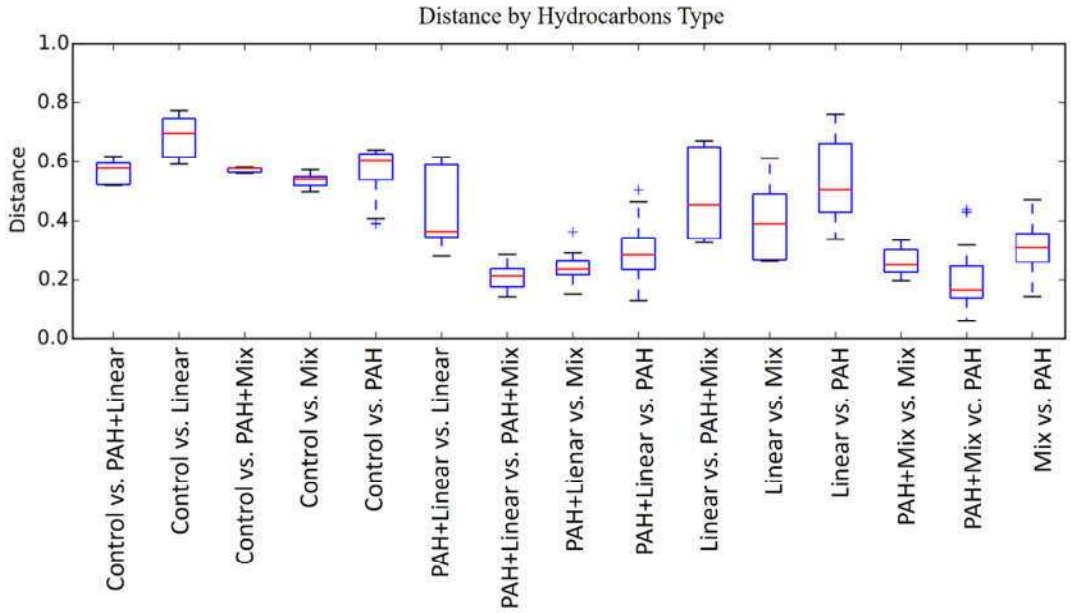


Figure 5. Mean values of the beta diversity distance between two treatments. The boxes indicate where 50% of the data are contained; the red line inside each box indicates the median; the outer bars correspond to extreme, but not discrepant, data; the signal "+" correspond to discrepant data. PAH = polycyclic aromatic hydrocarbons; Linear = hexadecane; Mix = weathered oil.

4.5.4. Taxonomic comparisons

Proteobacteria was the dominant phylum in all treatments. The abundance of Proteobacteria was always higher than 86%, except in the mesocosms where hexadecane was the sole carbon and energy source (Fig. 6A). In this treatment, Proteobacteria represented 52.54% of the sequences, followed by Bacteroidetes (44.25%). The abundance of Bacteroidetes also increased in treatments OIL (12.6%) and PHE + HEX (8.3%) and decreased in treatments PHE + FLU (0.3%), PHE + OIL (0.1%) and PHE + PYR (0.2%). The *Archaeae* domain was represented only by the class Thermoplasmata, phylum Euryarchaeota, detected only in the microcosm contaminated with weathered oil, although in a very small abundance (0.009%). The treatments differed greatly from the control in the sense that the dominant class of Proteobacteria in the control was Alphaproteobacteria (95.02% of the Proteobacteria sequences), while in the other treatments the dominant class was Gammaproteobacteria (72.93% to 94.19% of the Proteobacteria sequences) (Fig. 6B). The treatment containing only hexadecane, differed from the other contaminated treatments, in the sense that there was a similar dominance of the

bacterial community by the classes Flavobacteria (41.99%), Gammaproteobacteria (38.35%) and Alphaproteobacteria (12.87%) (Fig. 6B).

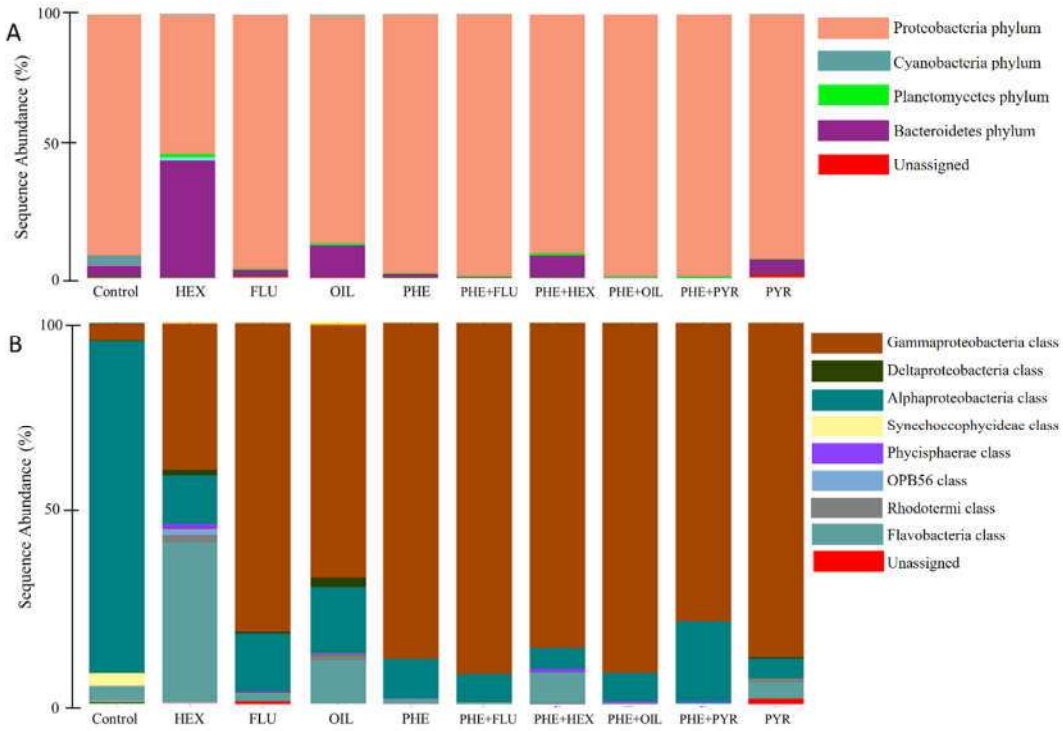


Figure 6. Relative abundance of prokaryotic phyla (A) and classes (B) in microcosms containing sea-water from the coast of Trindade Island contaminated (1 g/L) or not with hydrocarbons, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), according to 16 rDNA sequencing. Samples are presented with mean values of triplicates. Control = non-contaminated; HEX = hexadecane; FLU = fluoranthene; OIL = weathered oil; PHE = phenanthrene; PHE+FLU = phenanthrene + fluorantene; PHE+HEX = phenanthrene + hexadecane; PHE+OIL = phenanthrene + weathered oil; PHE+PYR = phenanthrene + pyrene; PYR = pyrene. The microcosms were maintained at 24 ºC and 100 rpm during 30 days before sampling. The average abundances or for each replica of microorganisms groups identified in our metagenomic analyzes can be accessed at the links ftp://ftp.ufv.br/dmb/metagenomic_data/Rodrigues_et_al_2016_average.html and ftp://ftp.ufv.br/dmb/metagenomic_data/Rodrigues_et_al_2016_each_replicate.html.

We detected 53 bacterial orders and 1 order of *Archaea* (Thermoplasmata) as members of the microbial community in the non-contaminated microcosm (control). . *Archae* was not detected in the contaminated microcosms. The number of bacterial orders in the contaminated microcosms decrease in relation to the non-contaminated control: Oil (46), Fluoranthene (38),

Pyrene (35), Phenanthrene (32), Phenanthrene + Pyrene (31), Hexadecane (33), Phenanthrene + Fluoranthene (27), Phenanthrene + Hexadecane (28) and Phenanthrene + Oil (24). Rhodobacterales was the dominant order of the bacterial community in the non-contaminated microcosm (84.35%), while the communities in the contaminated microcosms were dominated by the orders Alteromonadales and Oceanospirillales. The exception was again in the microcosm contaminated with hexadecane, where the order of highest abundance was Flavobacteriales (41.99%) (Fig. 7A). Among the representatives of the Alteromonadales, the genus *Alteromonas* was the most abundant, accounting for > 90% of the sequences of this order in all of treatments (Fig. 7B).

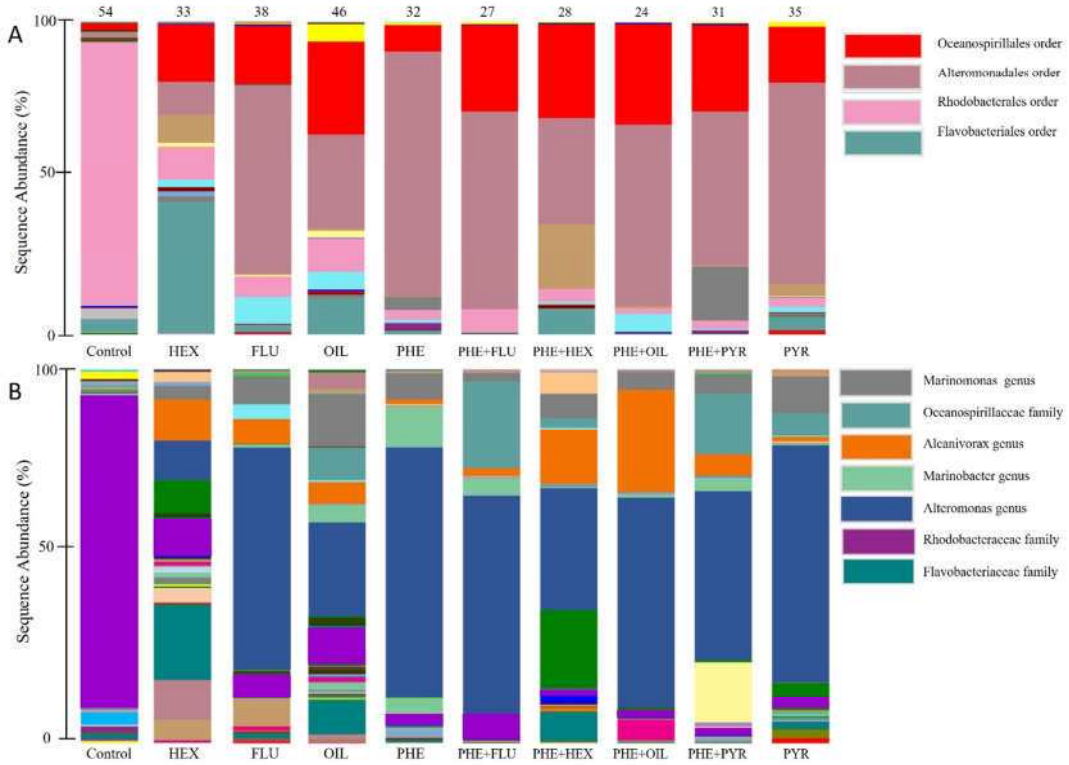


Figure 7. Relative abundance of prokaryotic orders (A) and family/genus (B) using 16 rDNA sequences. Samples are presented with mean values of triplicates. Only the more abundant groups were represented in the legends. Control = water; HEX = hexadecane; FLU = fluoranthene; OIL = weathered oil; PHE = phenanthrene; PHE+FLU = phenanthrene + fluorantene; PHE+HEX = phenanthrene + hexadecane; PHE+OIL = phenanthrene + weathered oil; PHE+PYR = phenanthrene + pyrene; PYR = pyrene. Numbers above bars (A) represent the number of orders detected in the treatment. The microcosms were maintained at 24 ºC and 100 rpm during 30 days before sampling. The average abundances or for each replica of microorganisms groups identified in our metagenomic analyzes can be accessed at the links ftp://ftp.ufv.br/dmb/metagenomic_data/Rodrigues_et_al_2016_average.html and ftp://ftp.ufv.br/dmb/metagenomic_data/Rodrigues_et_al_2016_each_replicate.html.

The contamination of the sea-water from the coast of Trindade Island with hydrocarbons resulted in a significant shift of the microbial community (Table 3). Rhodobacteraceae was the dominant family of *Bacteria* in the non-contaminated treatment, accounting to > 84% of the OTU's. The frequency of this family decreased significantly in presence of hydrocarbons, ranging between 1.2% in the microcosms containing phenanthrene and weathered oil to 9.9% in the microcosms containing hexadecane. Alteromonadaceae was dominant in microcosms containing hydrocarbons, except hexadecane. In the former, the abundance of Alteromonadaceae ranged between 29.6% (with weathered oil) to 78% (with phenanthrene). It is noteworth that the abundance of this family was > 48% in all microcosms containing only PAHs or the combination of weathered oil plus phenanthrene. In all these microcosms, the genus *Alcanivorax* was the sole representative of the family Alcanivoracaceae. Among the genera of the Alteromonadaceae family, Alteromonas was the most abundant (83.1% to 99.5% of the Alteromonadaceae sequences).

Table 3. Taxonomic families with dominant relative proportion (above 1%) in each set of treatments

Taxonomic Families	**Relative proportion in each treatment (%)**									
	Control	HEX	FLU	OIL	PHE	PHE+FLU	PHE+HEX	PHE+OIL	PHE+PYR	PYR
Flavobacteriaceae	3.4	36.0	1.7	10.8	-	-	8.0	-	-	2.2
Alcanivoracaceae	-	11.2	6.9	5.6	1.1	2.1	14.73	27.5	5.9	-
Alteromonadaceae	1.5	10.4	60.0	29.6	78.0	62.8	33.1	57.3	48.8	63.9
Rhodobacteraceae	84.3	9.9	6.3	9.8	3.0	7.0	-	1.2	2.3	2.3
Cryomorphaceae	-	5.4	-	-	-	-	-	-	-	2.4
Oceanospirillaceae	-	4.7	8.1	23.2	7.1	25.5	9.0	4.7	21.7	16.4
Oleiphilaceae	-	2.6	-	-	-	-	5.9	-	-	-
Hyphomicrobiaceae	-	-	7.7	-	-	-	-	-	-	-
Halomonadaceae	2.2	-	3.9	-	-	-	-	-	-	-
Nannocystaceae	-	-	-	1.9	-	-	-	-	-	-
Vibrionaceae	-	-	-	4.6	-	-	-	-	-	-
Erythrobacteraceae	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-
Kiloniellaceae	-	-	-	-	2.1	-	-	-	-	-
Cohesibacteraceae	-	-	-	-	-	-	-	5.4	-	-
Sphingomonadaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	17.1	-
Synechococcaceae	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

The average abundances or for each replica of microorganisms groups identified in our metagenomic analyzes can be accessed at the links ftp://ftp.ufv.br/dmb/metagenomic_data/Rodrigues_et_al_2016_average.html and ftp://ftp.ufv.br/dmb/metagenomic_data/Rodrigues_et_al_2016_each_replicate.html.

The family Hyphomicrobiaceae, the genera *Alcanivorax* and *Marinomonas* and the species *Alteromonas dieselolei* were absent from the microbial community of the non-contaminated microcosm, but were detected in all contaminated treatments at abundance above 0.1% (data not showed). Statistical analysis based on the abundances of OTUs showed statistical differences for a few taxa at family level between some contaminated treatments (EdgeR Fisher's exact test, $\alpha = 0.05$) (Table S2). Based on the statistical differences in the abundance of taxonomic groups, we can not conclude that specific PAHs pose a selective effect on specific bacterial groups. Some families that appeared in relative abundances lowest than 1.0% in the control showed high abundance in specific treatments, as Hyphomicrobianceae (7.7% in FLU), Vibrionaceae (4.6% in OIL), Erythrobacteraceae (4.0% in PHE), Sphingomonadaceae (17.1% in PHE+PYR) and others that were the most adapted to the environment with the hydrocarbons and/or its combinations in the microcosms.

4.6. Discussion

Using ^{14}C-labeled phenanthrene, we demonstrate that hexadecane stimulates the biodegradation of this polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) by the microbial community of the sea-water from the Trindade Island. On the other hand, phenanthrene mineralization is inhibited when other PAHs (fluoranthene and pyrene) and crude oil (which also contains PAHs in its composition) are also present as contaminants. This result contrasts with our hypothesis that the biodegradation of phenanthrene would be stimulated in presence of these compounds, since the catabolism of PAHs and cycloalkanes involves co-oxidation (Bouchez et al., 1995).

Crude oil is composed of a wide variety of molecules, which theoretically should stimulate the co-oxidation of phenanthrene (Richard and Vogel, 1999). However, weathered oil is enriched in PAHs and in high molecular weight hydrocarbons, which are less bioavailable and thus more recalcitrant. The microbial populations in the sea-water contaminated with weathered oil are faced with low-bioavailable carbon sources that can not sustain co-oxidation of phenanthrene, and with a higher toxic effect due to the presence of other PAHs. This also

explains the lower mineralization of phenanthrene-9-^{14}C in microcosms containing pyrene and fluoranthene (Samanta et al., 2002; Haritash and Kaushik, 2009).

Hexadecane, an aliphatic hydrocarbon with 16 carbons, is considered less recalcitrant and toxic (Heipieper et al., 1994) than the other contaminants used in our work (Haritash and Kaushik, 2009). Some members of the microbial community that developed using this compound as a source of carbon and energy were also able to mineralize phenanthrene-9-^{14}C, thus stimulating the biodegradation of this PAH.

By contrasting the data of phenanthrene mineralization with the diversity and taxonomic analysis, we conclude that hexadecane supports the development of a significantly wider range of microbial *taxa* when compared to the other compounds used our work. This is in agreement with previous studies showing that many microbial species are known to grow on hexadecane (Bouchez, et al., 1999; Stagars et al., 2015). This could explain the higher biodegradation of phenanthrene in the treatment phenanthrene-9-^{14}C + hexadecane. A higher diversity is directly linked to higher metabolic diversity (Delgado-Baquerizo et al., 2016), which may stimulate the metabolism of recalcitrant molecules, like PAHs.

The genus *Alteromonas* was the taxon with the highest abundance in all contaminated microcosms. Alhough also present in the treatments with hexadecane and crude oil, this genus predominated in the treatments containing PAHs. When compairing the treatments HEX and OIL, the genus *Alteromonas* is more abundant in the latter. Since weathered oil also contains PAHs in its composition, we conclude from our results that this class of molecules acts as a selective factor of *Alteromonas*. This is in agreement with the results obtained by Jin et al. (2012), who showed that, after enrichment cultures with naphthalene and isolation, members of this genus from coastal sediments are able to degrade a broad range of PAHs. The authors also confirmed the existence of *in situ* expression of *Alteromonas*-associated naphthalene dioxygenase genes, and analysis by GC/MS showed the existence of gentisate and catechol metabolic pathways in tidal-flat samples with high abundance of genus *Alteromonas*. These results, together with those obtained in the present study, points to the genus *Alteromonas* as a key player in environmental biodegradation of PAHs.

The bacterial genus *Alcanivorax* is known to possess genes coding for alkane hydroxylases and by their capacity to use alkanes as carbon source in marine environments (Hara et al., 2004; Mishamandani et al., 2014). Although other groups of marine bacteria are also known for their ability to use hydrocarbons, *Alcanivorax* showed a better ability to compete in the microcosms containing hydrocarbon-contaminated sea-water from the coast of Trindade Island (Table S2). Similarly, *Marinomonas* spp. (Melcher et al., 2002) and *Alteromonas dieselolei* (Cui et al., 2008), both known for their hability to degrade PAHs in marine environments, were enriched in contaminated treatments when compared to the control (Table S2).

Alpha diversity analyses (Fig. 2 and 3) showed that all the hydrocarbons used in our work have deleterious effects on bacterial diversity in the sea-water from Trindade Island. Although all contaminants are potentially harmful to the environment, they differed in the impact on the microbial community. The lowest impact were caused by weathered oil and hexadecane, compared to the treatments with PAHs. Belkin et al. (1994) demonstrated that when the PAHs degradation is incomplete, the potential genotoxicity and toxicity increases, so there is an increase in the selective pressure on the microorganisms in the environment. This potential toxicity is directly related to intermediary metabolities formed during PAHs biodegradation. One such intermediates are catechols, which are highly toxic not only to microorganisms, but also to other organisms (Schweigert et al., 2001). This affects not only the taxonomic diversity, but also the functional diversity of the impacted environment, which by its turn may affect the mineralization of phenanthrene, as shown in Figure 1.

The microbial communities in the microcosms formed distinct clusters (Fig. 5). There was a clear distinction between the non-contaminated control and the microcosms contaminated with hydrocarbons. These differences are also observed in the profiles of orders and family/genus (Fig. 7). Among the contaminated microcosms, those with only hexadecane also formed a distinct cluster. Hexadecane is regarded as less toxic than crude oil and PAHs (Bouchez et al., 1999; Haritash and Kaushik, 2009; Stagars et al., 2015). It is a linear hydrocarbon with the lowest density compaired to the other contaminats used in this study. This fact, together with its know lability (Bachoon et al., 2001), explain the differences between the treatment with

hexadecane with those containing PAHs. We argue here that the difference between the microbial community of hexadecane-contaminated microcosm and that of the non-contaminated control is due to a mechanism of enrichment of hydrocarbonoclastic populations in the former, which resulted in a shift of the microbial community. In the other treatments, hydrocarbon toxicity seems to be the main responsible for the observed changes in the composition of the microbial communities.

Alphaproteobacteria is the dominant class in non-contaminated microcosms, while Gammaproteobacteria dominates the microbial communities of the hydrocarbon-contaminated microcosms (except in treatment with hexadecane, where Flavobacteria is the dominant class) (Fig. 7B). Members of Gammaproteobacteria are known for their involvement in the aerobic degradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons (Viñas et al., 2005; Kostka et al., 2011; Kleindienst et al., 2015). Some species of this class have been used successfully as part of microbial consortia for bioremediation of environments contaminated with hydrocarbons, including PAHs (Vila et al., 2010; Santisi et al., 2015).

Most families listed in Table 3 were in relative proportions just above 1% in at least one of the treatments.The relative abundance of Sphingomonadaceae family on the control treatment and contaminates microcosms was lower than 1%, in contrast with the exception of 17.1% of relative abundance in the treatment PHE+PYR, demonstring that the combination of this hydrocarbons to confer a favorable environment for its growth. The same situation occur to others families, as weel as Hyphomicrobiaceae, Vibrionaceae and Cohesibacteraceae.

The lower relative proportion of these families in the other treatments may be related to the difficulty of adapting to contamination and incubation conditions, as well as competition with microorganisns that have adapted more quickly to the microcosms. Representatives of Flavobacteriaceae appear to be sensitive to the phenanthrene and favored principally by hexadecane, but also to crude oil, because the abundance of this family was not above 1% in the treatments with phenanthrene and phenanthrene in combination with others compounds, exception in combination with hexadecane (8.0% of relative abundance). The relative abundance of 2.6% and 5.9% in the treatments HEX and PHE+HEX, respectively, for

Oleiphilaceae family indicates that this group can adapt to hexadecane contamination, and that the grow in its presence, can also metabolize phenanthrene. Likewise, Cryomorphaceae seems to adapt to hexadecane, however, when coupled with phenanthrene, the toxicity exerted by this PAHs seems to affect negatively this group. The families Hyphomicrobiaceae, Halomonadaceae, Nannocystaceae, Erythrobacteriaceae and Kiloniellaceae were detected with abundance above 1% only in the treatments FLU, FLU, OIL, PHE and PHE, respectively, indicating that these groups adapt to specific situations of hydrocarbons contamination.

At genus/family levels, Rhodobacteraceae is the dominant taxon in the non-contaminated microcosms, accounting for > 84% of the OTU's (Fig. 7B). This family is drastically reduced in contaminated microcosms, and is replaced by other dominant taxa specially the genus *Alteromonas* (except in treatment with hexadecane, where Flavobacterales was the highest abundant taxon). There was a detectable growth of the family Oceanospirillaceae in treatments where phenanthrene was combined with other PAHs (PHE+FLU; PHE+PYR). This may point to the resistence of members of this family to these toxic molecules. The negative selection caused by the tocixity of combined PAHs tends to afford the growth of the relative proportion of taxa resistents and hydrocarbonoclastic. The genus *Alcanivorax* was also stimulated in microcosms containing phenanthrene combined with linear (PHE+HEX) and mixed hydrocabons (PHE+OIL). This genus is known for degrade straight-chain and branched alkanes (Harayama et al., 2004; Coulon et al., 2007; Teramoto et al., 2009; Kostka et al., 2011), including long-chain *n*-alkanes (Liu et al., 2011). Our results showed that representatives this genus can resist to contamination by PAHs, thus can be candidates as bioaugmentation agents in sea-water hydrocarbon-contaminated sites containing relevant concentration of PAHs.

Dubinsky et al. (2013) analysed the dynamics of bacterial community after the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico. They observed dominance of Flavobacteria, Alteromonadaceae and Rhodobacteraceae four months after the begin of the oil spill, all known to be with degraders of complex organic matter. Flavobacteriaceae representatives of the family are known by not only degrading hydrocarbons, but also produce biosurfactants (Bodour et al., 2004; Hemalatha and Veeramanikandan, 2011). The presence of this taxon, when analyzed their

abundance in PHE+HEX (Fig. 8B) can be related to increased mineralization of phenanthrene obtained due to biosurfactant production, which may have helped in increasing the bioavailability and hence the degradation of phenanthrene.

Vibrio fortis was found in greater abundance in four of the contaminated treatments compared to the control. *Vibrio* spp. are ubiquitous in marine environments and are known pathogens of wild organisms, for example shrimps and sea urchins (Thompson et al., 2003; Haldar et al., 2011; Wang et al., 2012). Therefore, contamination by hydrocarbons can not only bring problems related to toxicity to local organisms, but also increase the abundance of potentially pathogenic microorganisms, further damaging the biota of the contaminated area. Liu and Liu (2013) suggested that *Vibrio* spp. can be associated to hydrocarbon biodegradation, but this association was contradicted by other studies (Kostka et al., 2011; Redmond and Valentine, 2011; Beazley et al., 2012). Smith et al. (2012) obtained 17 isolates of *V. parahaemolyticus* from polluted Louisiana coast after Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico. None of the strains was shown to metabolize phenanthrene and naphthalene. Likewise, Kostka et al. (2011) isolated a strain of *Vibrio hepatarius* from a sandy beach contaminated with oil which no significant hability of hydrocarbon biodegradation. Therefore, *Vibrio* spp. appear to be able to adapt to oil-contaminated environments, but do not exert a significant effect on degradation of hydrocarbons. The enrichement of this pathogenic group in oil-contaminated sites may pose an additional challenge to the local biota (Thompson et al., 2003; Haldar, et al., 2011; Wang, et al., 2012).

Many *taxa* found in greater abundance in microcosms containing water from Trindade Island contaminated with hydrocarbons are usually present in contaminated environments (Chakraborty et al., 2012; McGenity et al., 2012; Gutierrez et al., 2013b), suggesting that these populations are stimulated by the contaminants. Although the Trindade Island is considered a pristine environment, the distribution of hydrocarbonoclastic microorganisms seems to be ubiquitous, regardless of previous contamination (Head et al., 2006; Yakimov et al., 2007). Although representatives of *Archaeae* are capable of degrading hydrocarbons (Tapulati et al., 2010), this domain was not detected in our study, except in the non-contaminated microcosm.As

previously reported by Rodrigues et al. (2015b), after the contact of weathered oil with sea-water, considering the microbial colonization of the oil surface, *Archaea* occur in fewer number compared to bacteria and fungi.

Despite the lack of recorded contamination by hydrocarbons in the vicinity of the Trindade Island, it is at the same latitude of the the region with the highest volume of offshore oil extraction in Brazil, the Campos Basin. With the growing interest of Petrobras in oil extraction in deep water, especially in the known region of the pre-salt, it is feasible to assume that oil exploration activities will move east of the Campos Basin towards the Trindade Island. If this scenario is confirmed, the region of the Trindade Island will be subject to negative impacts caused by acidentes involving oil spills. Although Morais et al. (2015) have already reported the impact of oil contamination on the microbial communities in soils of Trindade Island, our study is the first to show how sensitive is the marine microbial community surrounding the Trindade Island to hydrocarbon contamination.

4.7. Acknowledgments

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / CNPq) which provided all approvals and permits (project grant number 405544/2012-0 and authorization access to genetic resources process number 010645/2013-6), Brazilian Navy, FAPEMIG and CAPES.

4.8. References

Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 11:R106.

Atlas RM, Hazen TC (2011) Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. Environ Sci Technol 45:6709-6715.

Bachoon DS, Araujo MM, Hodson RE (2001) Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh microcosms. J Ind Microbiol Biot 27:72-79.

Barros JAL (1959) Relatório prévio sobre a expedição João Alberto à Ilha da Trindade. Rio de Janeiro. 75 p.

Beazley MJ, Martinez RJ, Rajan S, Powell J, Piceno YM, Tom LM, Andersen GL, Hazen TC, Van Nostrand JD, Zhou J, Mortazavi B, Sobecky PA (2012) Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the Deepwater Horizon oil spill. PLoS One. 7:e41305.

Bodour AA, Guerrero-Barajas C, Jiorle BV, Malcomson ME, Paull AK, Somogyi A, Trinh LN, Bates RB, Maier RM (2004) Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. Appl Environ Microbiol 70:114-120.

Boehm PD, Page DS, Burns WA, Bence AE, Mankiewicz PJ, Brown JS (2001) Resolving the origin of the petrogenic hydrocarbon background in Prince William Sound, Alaska. Environ Sci Technol 35:471–479

Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele JP (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by purê strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl Microbiol Biot 43:156-164.

Bouchez M, Rakatozafy H, Marchal R, Leveau JY, Vandecasteele JP (1999) Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. J Appl Microbiol 86:421-428.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods 7:335–336.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. P Natl Acad Sci USA 108(Supplement 1):4516–4522.

Chakraborty R, Borglin SE, Dubinsky EA, Andersen GL, Hazen TC (2012) Microbial response to the MC-252 oil and corexit 9500 in the Gulf of Mexico. Front Microbiol 3:357.

Chao A (1984) Nonparametric estimation of the numbers of classes in a population. Scandinavian J. Statistics 11:265–270.

Coulon F, McKew BA, Osborn AM, McGenity TJ, Timmis KN (2007) Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. Environ Microbiol 9:177–186.

Cui Z, Lai Q, Dong C, Shao Z (2008) Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bactéria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. Environ Microbiol 10:2138-2149.

Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Reich PB, Jeffries TC, Gaitan JJ, Encinar D, Berdugo M, Campbell CD, Singh BK (2016) Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. Nat Comm 7:10541.

Dubinsky EA, Conrad ME, Chakraborty R, Bill M, Borglin SE, Hollibaugh JT, Mason OU, Piceno YM, Reid FC, Stringfellow WT, Tom LM, Hazen TC, Andersen GL (2013) Succession of hydrocarbon-degrading bacteria in the aftermath of the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico. Environ Sci Technol Lett 47:10860-10867.

Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26:2460–2461.

Faith DP (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. Biol Conserv 61:1–10.

Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biometrika 40:237–264.

Grigalunas TA, Anderson RC, Brown GM, Congar R, Meade NF, Sorensen PE (1986) Estimating the Cost of Oil Spills : Lessons from the Amoco Cadiz Incident. Mar Resour Econ 2:239–263.

Gutierrez T, Green DH, Nichols PD, Whitman WB, Semple KT, Aitken MD (2013a) *Polycyclovorans algicola* gen. nov., sp. nov., an aromatic-hydrocarbon-degrading marine

bacterium found associated with laboratory cultures of marine phytoplankton. Appl Environ Microbiol 79:205-214.

Gutierrez T, Rhodes G, Mishamandani S, Berry D, Whitman WB, Nichols PD, Semple KT, Aitken MD (2014) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation of phytoplankton-associated *Arenibacter* spp. and description of *Arenibacter algicola* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. Appl Environ Microbiol 80:618-628.

Gutierrez T, Singleton DR, Aitken MD, Semple KT (2011) Stable isotope probing of an algal bloom to identify uncultivated members of the Rhodobacteraceae associated with low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. Appl Environ Microbiol 77:7856-7860.

Gutierrez T, Singleton DR, Berry D, Yang T, Aitken MD, Teske A (2013b) Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation DNA-SIP. ISME J 7:2091-2104.

Haldar S, Chatterjee S, Sugimoto N, Das S, Chowdhury N, Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S (2011) Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an *Artemia model*. Microbiology 157:179–188.

Hara A, Naik S, Syutsubo K, Misawa N, Smits THM, van Beilen JB, Harayama S (2004) Cloning and functional analysis of *alkB* genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2. Environ Microbiol 6:191-197.

Harayama S, Kasai Y, Hara A (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. Curr Opin Biotechnol 15:205–214.

Haritash AK, Kaushik CP (2009) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. J Hazard Mater 169:1-15.

Head IM, Jones DM, Roling WFM (2006) Marine microorgnaisms make a meal of oil. Nat Rev Microbiol 4:173-182.

Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, Keweloh H, de Bont JAM (1994) Mechanisms of resistence of whole cells to toxic organic solvents. Trends Microbiol 12:409-415.

Hemalatha S, Veeramanikandan P (2011) Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bactéria from petroleum contaminated sites. J Environ Protect 2:243-254.

Jin HM, Kim JM, Lee HJ, Madsen EL, Jeon CO (2012) *Alteromonas* as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil-contaminates coastal sediment. Environ Sci Technol 46:7731-7740.

Khan SA, Bibi N, Shrewani SK (2015) Isolation, screening and co-metabolism of policyclic aromatic hydrocarbons by soil bacteria. American-Eurasian J Agric & Environ Sci 15:800-812.

Kleindienst S, Paul JH, Joye SB (2015) Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. Nat Rev Microbiol 13:388-396.

Kostka JE, Prakash O, Overholt WA, Green SJ, Freyer G, Canion A, Delgardio J, Norton N, Hazen TC, Huettel M (2011) Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. Appl. Environ. Microbiol 77:7962-7974.

Liu Z, Liu J (2013) Evaluating bacterial community structures in oil collected from the sea surfasse and sediment in the northern Gulf of Mexico adter the Deepwater Horizon oil spill. Microbiologyopen 2:492-504.

Liu Z, Liu J, Zhu Q, Wu W (2012) The weathering of oil after the *Deepwater Horizon* oil spill: insights from the chemical composition of the oil from the sea surface, salt marshes and sediments. Environ Res Lett doi:10.1088/1748-9326/7/3/035302.

Liu CL, Wang WP, Wu YP, Zhou ZW, Lai QL, Shao ZZ (2011) Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. Environ Microbiol 13:1168-1178.

Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 71:8228–8235.

McGenity TJ, Folwell BD, McKew BA, Sanni GO (2012) Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. Aquat Biosyst 8:10.

Mehdinia A, Aghadadashi V, Fumani NS (2015) Origin, Distribution and Toxicological Potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments from the Bushehr Coast, The Persian Gulf. Mar Pollut Bull 90:334-338.

Melcher RJ, Apitz SE, Hemmingsen BB (2002) Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. Appl Environ Microbiol 68:2858-2868.

Meyers PA, Ishiwatari R (1993) Lacustrine organic geochemistry - an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. Org Geochem 20:867–900

Mishamandani S, Gutierrez T, Aitken MD (2014) DNA-based stable isotope probing coupled with cultivation methods implicates *Methylophaga* in hydrocarbon degradation. Fronti Microbiol 5:76.

Morais D, Pylro V, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR (2016) Responses of microbial community from tropical pristine coastal soil to crude oil contamination. PeerJ doi: 10.7717/peerj.1733.

Neff JM (1979) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological effects. In Barking, Essex, UK: Applied Science 262.

Pansiripat S, Pornsunthorntawee O, Rujiravanit R, Kitiyanan B, Somboonthanate P, Chavadej S (2010) Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa SP4 using sequencing batch reactors: effect of oil-to-glucose ratio. Biochem. Eng. J 49:185–191

Peterson CH, Rice SD, Short JW, Esler D, Bodkin JL, Ballachey BE, Irons DB (2003) Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. Science 302:2082–2086.

Pylro VS, Roesch LF, Ortega JM, Do Amaral AM, Tótola MR, Hirsch PR, Rosado AS, Góes-Neto A, Da Silva AL, Rosa CA, Morais DK, Andreote FD, Duarte GF, De Melo IS, Seldin L, Lambais MR, Hungria M, Peixoto RS, Kruger RH, Tsai SM, Azevedo V (2014) Brazilian microbiome project: revealing the unexplored microbial diversity—challenges and prospects. Microbial Ecol 67:237–241.

Qiao M, Wang C, Huang S, Wang D, Wang Z (2006) Composition, sources, and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. Environ Int 32:28–33.

Redmond LC, Valentine DL (2011) Natural gas and temperature structured a microbial community response to the Deepwater Horizon oil spill. Proc Natl Acad Sci U S A. 109:20292-20297.

Richard JY, Vogel TM (1999) Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. Int Biodeter Biodegr 44:93-100.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth JK (2010) edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140.

Rodrigues EM, Kalks KHM, Fernandes PL, Tótola MR 2015b. Bioremediation strategies of hydrocarbons and microbial diversity in the Trindade Island shoreline – Brazil. Mar Pollut Bull 101:517-525.

Rodrigues EM, Kalks KHM, Tótola MR 2015a. Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Islant, Brazil. J Environ Manage 156:15-22.

Rodrigues EM, Tótola MR (2015) Petroleum: from basic features to hydrocarbons bioremediation in oceans. OALib 2:1-17.

Belkin S, Stieber M, Frimmel FH, Abeliovich A, Werner P, Ulitzur, S (1994) Toxicity and genotoxicity enhancement during poly-cyclic aromatic hydrocarbon biodegradation Environ Toxicol Water Qual 9:303–309.

Samanta SK, Singh OV, Jain RK (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol 20:243-248.

Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen RIL (2001) Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorgnaisms to mammals. Environ Microbiol 3:81-91.

Silliman JE, Meyers PA, Eadie BJ (1998) Perylene: an indicator of alteration processes or precursor materials? Org Geochem 29:1737–1744.

Smith CB, Johnson CN, King GM (2012) Assessment of polyaromatic hydrocarbon degradation by potentially pathogenic environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates from coastal Louisiana, USA. Mar Pollut Bull 64:138-143.

Soares LC (1964) As Ilhas Oceanicas. In: Azevedo, A. (Ed.), Brasil, a terra e o homem, bases físicas. São Paulo, Companhia Editora Nacional 1:341-378.

Stagars MH, Ruff SE, Amann R, Knittel K (2015) High diversity of anaerobic alkane-degrading microbial communities in marine seep sediments based on (1-methylalkyl) succinate synthase genes. Front Microbiol 6:1511.

Sverdrup LE, Nielsen T, Krogh PH (2002) Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. Environ Sci Technol 36:2429–2435.

Tapilatu YH, Grossi V, Acquaviva M, Militin C, Bertrand JC, Cuny P (2010) Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from na uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). Extremophiles 14:225-231.

Teramoto M, Suzuki M, Okazaki F, Hatmanti A, Harayama S (2009) Oceanobacter-related bacteria are important for the degradation of petroleum aliphatic hydrocarbons in the tropical marine environment. Microbiology. 155:3362–3370.

Thompson FL, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Gullian M, Swings J (2003) *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov. isolated from aquatic animals and the marine environment. Int J Syst Evol Micr 53:1495-1501.

Valavanidis A, Vlachogianni TH, Triantafillaki S, Dassenakis M, Androutsos F, Scoullos M (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface seawater and in indigenous mussels (Mytilus galloprovincialis) from coastal areas of the Saronikos Gulf (Greece). Estuar Coast Shelf Sci 79:733–739.

Vila J, María Nieto J, Mertens J, Springael D, Grifoll M (2010) Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. FEMS Microbiol Ecol 73:349-362.

Vila J, Tauler M, Grifoll M (2015) Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. Curr Opin Biotech. 33:95-102.

Viñas M, Sabaté J, Espunnym MJ, Solanas AM (2005) Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. Appl Environ Microbiol 71:7008-7018.

Wang Y, Feng N, Li Q, Ding J, Zhan Y, Chang Y (2012) Isolation and characterization of bacteria associated with a syndrome disease of sea urchin*Strongylocentrotus intermedius* in North China. Aquacult Res 44:691–700

Wu Y, Zhang J, Mi T, Li B (2001) Occurrence of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the core sediments of the Yellow Sea. Mar Chem 76:1–15.

Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. Curr Opin Biotechnol 18:257-266.

Yan W, Chi JS, Wang ZY, Huang WX, Zhang G (2009) Spatial and temporal distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in sediments from Daya Bay, South China. Environ Pollut 30:1–8.

Zhang C, Zheng G (2003) Characterization and desorption kinetics of PAHs from contaminated sediment in Houston Ship Channel. Environmental Institute of Houston 2003 Annual Report 39–41.

Zhong Y, Luan T, Wang X, Lan C, Tam NFY (2007) Influence of growth médium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. Strain PheB4. Appl Microbiol Biot 75:175-186.

Zhu L, Yang X, Xue C, Chen Y, Qu L, Lu W (2012) Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. Bioresour Technol 117:208–213.

Zuloaga O, Prieto A, Usobiaga A, Sarkar SK, Chatterjee M, Bhattacharya BD, Bhattacharya A, Alam MDA, Satpathy KK (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbons in intertidal marine bivalves of Sunderban Mangrove Wetland, India: an approach to bioindicator species. Water Air Soil Pollut 201:305–318.

4.9. Supplementary Material

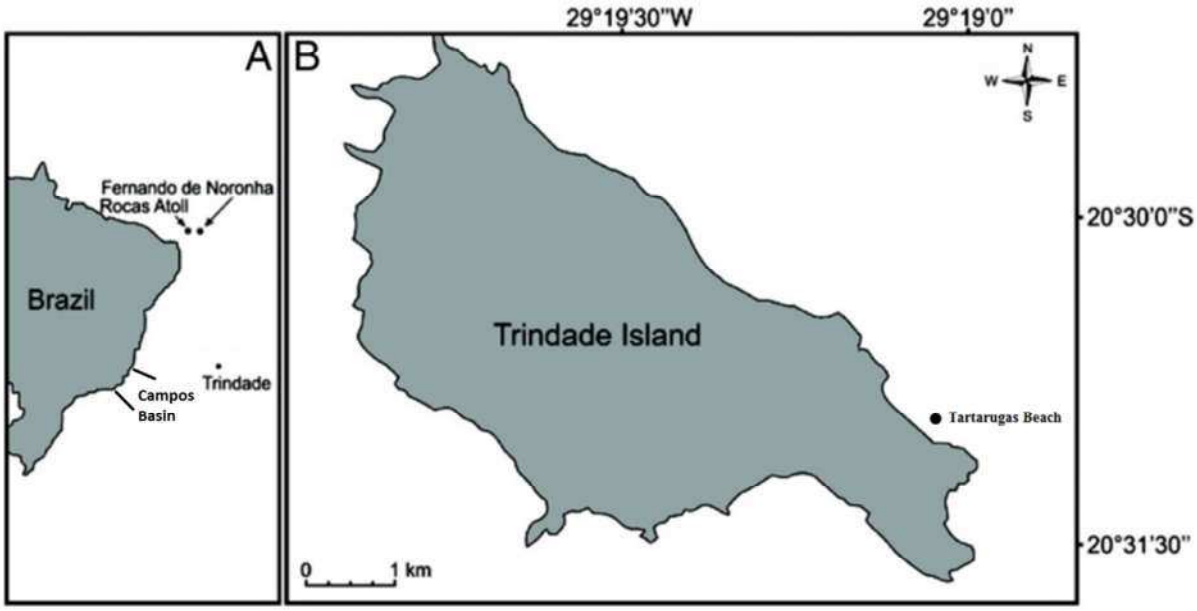


Figure S1. Geographical location of Trindade Island. A. The Brazilian coast and Atlantic Ocean with the Trindade Island and Campos Basin region. B. Trindade Island with localization of Tartarugas beach. Adapted (Rodrigues et al., 2015a).

Table S1. Number of quality filtered Ion Torrent PGM barcoded sequences

Treatments	16S rRNA gene
Control	55201
Control	58644
Control	31687
PHE	32113
PHE	37264
PHE	34938
OIL	12223
OIL	25782
OIL	74834
PHE+OIL	5647
PHE+OIL	8987
PHE+OIL	39184
PYR	35181
PYR	21992
PYR	38532
PHE+PYR	19756
PHE+PYR	21392
PHE+PYR	36125
FLU	18319
FLU	19339
FLU	34521
PHE+FLU	31763
PHE+FLU	36777
PHE+FLU	44107
HEX	13498
HEX	17541
HEX	25674
PHE+HEX	9951
PHE+HEX	11691
PHE+HEX	27610
Total	880273

Table S2. Statistical analysis of absolute abundance of bacterial taxa (OTU's) at family level in each treatment. The values on the same line, followed for a same letter are not significantly different under the EdgeR Fisher's exact test and $\alpha = 0.05$. p = phylum; f = family.

Taxa	Control	Oil	PHE	PHE+OIL	PYR	PHE+PYR	FLU	PHE+FLU	HEX	PHE+HEX
p__Proteobacteria; f__Rhodobacteraceae	122732a	10998b	3185b	665b	2202b	1782b	4522b	7827b	5598b	972b
p__Cyanobacteria; f__Synechococcaceae	4960a	1b	13b	4b	1b	2b	2b	3b	0b	0b
p__Actinobacteria; f__OCS155	625a	3b	3b	1b	1b	1b	2b	1b	0b	1b
p__Proteobacteria; f__HTCC2089	466a	0b	0b	1b	0b	1b	0b	0b	0b	0b
p__Bacteroidetes; f__Flammeovirgaceae	371a	2b	23b	0b	12b	0b	15b	0b	141ab	2b
p__Proteobacteria; f__AEGEAN_112	308a	1b	1b	0b	0b	1b	0b	0b	0b	0b
p__Verrucomicrobia; f__Verrucomicrobiaceae	236a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	1b	0b
p__Bacteroidetes; f__NS9	230a	2b	45ab	0b	0b	5b	0b	1b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Pelagibacteraceae	441a	2b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Oceanospirillaceae	11b	26153a	7421a	2515a	15686a	16788a	5828a	28702a	2669a	4454a
p__Proteobacteria; f__Rhodospirillaceae	174a	10b	5b	0b	1b	12b	0b	0b	0b	1b
p__Proteobacteria; f__Piscirickettsiaceae	152a	1b	0b	0b	3b	5b	8b	14b	0b	1b
p__Proteobacteria; f__OM60	148a	1b	1b	0b	0b	43b	0b	13b	0b	182a
p__Proteobacteria; f__Nannocystaceae	0b	2175a	71ab	0b	319a	0b	314a	0b	746a	3b
p__SAR406; f__A714017	165a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__HTCC2188	56a	0b	110a	0b	76a	0b	0b	4b	1b	0b
p__Proteobacteria; f__Coxiellaceae	79a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Burkholderiaceae	45a	2b	2b	1b	1b	2b	2b	0b	4b	1b
p__Proteobacteria; f__Alcanivoracaceae	7b	6330a	1176a	14778a	1185a	4528a	4965a	2415a	6357a	7255a
p__Proteobacteria; f__Cohaesibacteraceae	1b	1503a	9ab	2906a	108a	3b	608a	3b	649a	0b
p__Actinobacteria; f__wb1_P06	33a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Verrucomicrobia; f__Puniceicoccaceae	35a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Ectothiorhodospiraceae	40a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Vibrionaceae	11b	5160a	436ab	20ab	163ab	71ab	164ab	180ab	22ab	7b
p__Proteobacteria; f__Thiohalorhabdaceae	19a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b

p__Bacteroidetes; f__Flavobacteriaceae	4926b	12242a	1097c	74c	2063c	114c	1233c	230c	20402a	3920bc
p__Cyanobacteria; f__Cyanobacteriaceae	84a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Fusobacteria; f__Fusobacteriaceae	9a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0	0b
p__Planctomycetes; f__Pirellulaceae	12a	7b	0b	0b	5b	0b	9ab	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Hyphomicrobiaceae	2b	1049a	479a	210a	860a	225a	5557a	179ab	397a	360a
p__Proteobacteria; f__S25_1238	12a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__OM27	9a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Planctomycetes; f__Phycisphaeraceae	0b	396a	45ab	0b	23ab	15ab	39ab	7ab	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Colwelliaceae	1b	231a	343a	266a	382a	169a	106a	423a	3b	133a
p__Euryarchaeota; f__Marine group II	7a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Euryarchaeota; f__Marine group III	6a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Bacteroidetes; f__Rhodothermaceae	2b	890a	1b	0b	870a	0b	1b	0b	135ab	0b
p__Proteobacteria; f__Bradyrhizobiaceae	8a	0b	0b	1b	0b	0b	1b	0b	0b	0b
p__Chlamydiae; f__Rhabdochlamydiaceae	5a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Bacteroidetes; f__[Balneolaceae]	0b	317ab	0b	0b	7ab	0b	0b	0b	975a	0b
p__Bacteroidetes; f__Marinilabiaceae	7a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Pseudomonadaceae	0b	2ab	64ab	251ab	1ab	404a	407a	402a	94ab	76ab
p__Verrucomicrobia; f__Opitutaceae	0b	445a	17ab	0b	8b	0b	128ab	4b	170a	0b
p__Proteobacteria; f__Oleiphilaceae	0b	1b	1b	0b	0b	0b	0b	2b	1472a	2906a
p__Proteobacteria; f__Phyllobacteriaceae	10b	1474a	448a	0b	68ab	0b	46ab	19ab	168ab	12ab
p__Proteobacteria; f__Bradyrhizobiaceae	8a	0b	0b	1b	0b	0b	1b	0b	0b	0b
p__Proteobacteria; f__Halomonadaceae	3166a	619ab	1b	0b	355ab	3b	2812ab	3b	0b	219ab
p__Proteobacteria; f__[Marinicellaceae]	0b	6	173	0	1	2	38	2	66	18
p__Proteobacteria; f__Enterobacteriaceae	6b	19	0	3	1	1	2	0	1	0
p__Proteobacteria; f__Sphingomonadaceae	5b	1b	1b	0b	287ab	13250a	1b	2b	1b	1b
p__Bacteroidetes; f__Cryomorphaceae	117a	457a	204ab	0b	2292a	0b	123ab	120ab	3093a	173ab
p__Proteobacteria; f__Pseudoalteromonadaceae	18b	1118a	390ab	136ab	1316	407ab	158ab	548ab	30ab	142ab
p__Proteobacteria; f__Shewanellaceae	35b	140a	22ab	8ab	38ab	6ab	17ab	31ab	25ab	18ab

p__Firmicutes; f__Alicyclobacillaceae	4b	20a	3b	2b	0b	2b	3b	3b	1b	0b
p__Proteobacteria; f__Desulfobulbaceae	5a	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b

Capítulo 5

Desenvolvimento e uso de emulsões W/O/W e bactérias hidrocarbonoclásticas autóctones para biodegradação de óleo cru em ambientes marinhos oligotróficos

Desenvolvimento e uso de emulsões W/O/W e bactérias hidrocarbonoclásticas autóctones para biodegradação de óleo cru em ambientes marinhos oligotróficos

Edmo Montes Rodrigues [a]#, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira[b], Dionéia Evangelista Cesar[c], Marcos Rogério Tótola[a]#

[a] Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade parar o Meio Ambiente, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[b] Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[c] Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microorganismos, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

Resumo

Emulsões W/O/W fertilizadas foram desenvolvidas a partir de água marinha, óleo Canola, surfactantes e sais inorgânicos como fontes de N, P e K. As emulsões foram empregadas em simulação de estratégias de biorremediação de hidrocarbonetos em água oceânica oligotrófica. As estratégias incluíram ainda bactérias hidrocarbonoclásticas *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1, ambas isoladas de água coletada nas adjacências da Ilha da Trindade, Brasil. Ao longo de 30 dias foi avaliada a emissão de CO_2 por microcosmos constituídos de água da zona litorânea da Ilha da Trindade, óleo cru e emulsões. Avaliou-se também a liberação de nutrientes inorgânicos contidos no interior das emulsões duplas para a fase aquosa e a estabilidade de tamanho das gotículas das emulsões. Os resultados mostraram que as emulsões W/O/W fertilizadas possuem potencial para aplicação em processos de

biorremediação de hidrocarbonetos em casos envolvendo o derramamento de óleo em águas oceânicas e que a utilização das espécies bacterianas citadas resulta em um efetivo aumento na atividade catabólica sobre os hidrocarbonetos no ambiente.

5.1. Introdução

Ambientes marinhos estão sujeitos a contaminações por diversos componentes químicos utilizados nas atividades humanas. Dentre os principais compostos que podem contaminar oceanos estão os hidrocarbonetos do petróleo, um dos mais prejudiciais poluentes orgânicos em ambientes marinhos, pois ocasionam uma série de problemas econômicos, sociais e ambientais (Grigalunas et al., 1986; Peterson et al., 2003; Rodrigues e Tótola, 2015). Acidentes envolvendo derramamento de hidrocarbonetos no mar causam grandes distúrbios na biota de forma imediata e, também, crônica, dada à recalcitrância de algumas moléculas de hidrocarbonetos (De la Huz et al., 2005; Lafon et al., 2006; Frantzen et al., 2015).

Para minimizar os impactos causados por esse tipo de acidente, várias tecnologias têm sido empregadas para remediar as áreas afetadas. Entretanto, estima-se que, com todos os esforços, ao menos cerca de 25% do óleo permaneçam no ambiente (Tate et al., 2011). As alternativas de remediação disponíveis hoje incluem tratamentos físicos, químicos e biológicos. Tratamentos físicos e químicos normalmente causam a dispersão do poluente e não sua efetiva remoção do ambiente (Bao et al., 2012). Comparado a métodos físicos e químicos, o tratamento biológico usando micro-organismos possui menor custo, alta eficiência e evita poluição secundária (Khan, et al., 2004; Bao et al., 2012). Entretanto, o emprego em conjunto de tecnologias de remediação pode surtir efeitos complementares (Harayama et al., 1999; Aburto-Medina et al., 2015; Rodrigues et al., 2015a). Os processos de remediação biológica *in situ* são classificados como atenuação natural, bioaumentação e bioestimulação (Yu et al., 2005). Embora tecnologias de biorremediação de hidrocarbonetos em solos e reatores sejam eficientes (Crawford e Rosenberg, 2012), existe ainda a necessidade de se desenvolverem tecnologias para acelerar a degradação de hidrocarbonetos no mar (Ron e Rosenberg, 2014).

Bactérias hidrocarbonoclásticas são micro-organismos ubíquos e, normalmente, ocorrem em pequenas proporções em ambientes não-contaminados, compreendendo menos de 0,1% da comunidade microbiana total (Atlas, 1981; Rosenberg, 2012; Ron e Rosenberg, 2014). Esse fato não é surpreendente, pois hidrocarbonetos são presentes na Terra há milhões de anos como resultado de vazamentos naturais de óleo e de sua síntese por plantas e animais (Fehler e Light, 1970; Sharkey, 1996; Prince, 2005). Entretanto, após eventos de contaminação, as populações hidrocarbonoclásticas podem atingir 100% da comunidade microbiana no local contaminado (Atlas, 1981). Os mecanismos de biodegradação de hidrocarbonetos dependem de vias metabólicas que convertem tais compostos orgânicos em moléculas que não apresentam toxicidade ou que sejam menos tóxicas no ambiente (Yu et al., 2005; Bak et al., 2015; Ladino-Orjuela et al., 2016).

A baixa solubilidade de hidrocarbonetos em água e o fato da degradação desses compostos envolver enzimas oxigenases ligadas à membrana, torna essencial o contato direto das células bacterianas com o contaminante (Ron e Rosenberg, 2014). Até então, mecanismos de adesão das células aos hidrocarbonetos (Southam et al., 2001; Abbasnezhad et al., 2011) e a emulsificação desses compostos (Ron e Rosenberg, 2002; Souza et al., 2014; Ghosh e Mukherji, 2016) tem sido propostas para aumentar o contato entre as células bacterianas e o contaminante, favorecendo assim sua biodegradação.

Nos oceanos, a biodegradação é limitada pela escassez de nutrientes inorgânicos, principalmente nitrogênio e fósforo. A bioestimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas em oceano contaminado por petróleo, por meio da adição de nutrientes inorgânicos, é dificultada pela dispersão desses compostos logo após sua inserção no mar (Rosenberg et al., 1996; Koren et al., 2003; Warr et al., 2013; Rodrigues et al., 2015a). Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de metodologias de biorremediação oceânica que possam efetivamente acelerar remoção de hidrocarbonetos do mar, sem que bactérias e/ou nutrientes adicionados no local contaminado se percam rapidamente após uma aplicação direta de agentes remediadores na pluma de contaminação.

Emulsões múltiplas água/óleo/água (W/O/W) são dispersões líquidas complexas, nas quais glóbulos de óleo que contêm gotículas aquosas são dispersos numa fase aquosa contínua (Leal-Calderon et al., 2012). Entre as características de tais emulsões, pode-se citar a alta capacidade de retenção de compostos hidrofílicos, sua capacidade para introduzir substâncias incompatíveis no mesmo sistema e proteção e liberação sustentada de substâncias químicas inicialmente aprisionadas nas gotículas internas. O uso de surfactantes capazes de proporcionar estabilidade da estrutura, sem que ocorra coalescência ou quiescência, pode proporcionar uma aplicação ambiental dessas emulsões, carreando na fase aquosa interna fertilizantes inorgânicos para sustentar o desenvolvimento de micro-organismos que possam metabolizar um contaminante orgânico hidrofóbico, ao qual irão se aderir os glóbulos de óleo.

O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver emulsões duplas W/O/W, contendo nutrientes inorgânicos na fase aquosa interna, para aplicação em manchas de óleo nos oceanos ou sobre áreas entre-marés contaminadas com óleo. Propomos, ainda, a inserção em conjunto de duas espécies de bactérias hidrocarbonoclásticas que possuem capacidade de adesão às moléculas de hidrocarbonetos, como forma de unir a bioestimulação e bioaumentação nos locais contaminados.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Materiais

Para produzir as emulsões, foi utilizada água do mar como fase aquosa. A coleta de água ocorreu na região costeira da Ilha da Trindade/Brasil, a cerca de 100 m de distância da praia das Tartarugas. Para a produção das emulsões, foram utilizados gelatina (porcine skin, type A, Bloom ~ 300) (Sigma-Aldrich); nutrientes inorgânicos NH_4NO_3 e K_2HPO_4 (Vetec Química Fina Ltda); óleo Canola (Bunge Alimentos S.A.); emulsificante polyglycerol polyricinoleate (Pgpr) (Dhaymer's - Química Fina) e, por fim, o surfactante coco glicosídeo (Fenchem Biotek LTD).

5.2.2. Produção das emulsões W/O/W

A fase aquosa interna (W_1) foi inicialmente produzida com a hidratação de 7,5 g L^{-1} da gelatina por 30 min a 65 °C e posterior adição dos nutrientes inorgânicos. A fase oleosa (O) contendo Pgpr 20 g L^{-1} foi agitada para homogeneização. Por fim, a fase aquosa externa (W_2) foi preparada adicionando-se coco glicosídeo 8,0 g L^{-1} à água do mar.

A emulsão dupla ($W_1/O/W_2$) foi preparada em dois diferentes estágios. Primeiramente, foi realizada a produção da emulsão water-in-oil (W_1/O) na proporção de 40 mL de fase aquosa interna (W_1) e 60 mL de fase oleosa. Após a solubilização da gelatina na fase aquosa interna, os nutrientes inorgânicos NH_4NO_3 e K_2HPO_4 foram adicionados lentamente. Então, W_1 e O foram unidas e submetidas a agitação em agitador do tipo Ultra-Turrax (YellowLine DI25 basic) a 24.000 rpm por 4 min. A emulsão resultante foi imediatamente resfriada a 4 °C em banho-maria para geleificar a gelatina presente na fase aquosa dispersa (W_1). No segundo estágio, a emulsão W_1/O permaneceu em temperatura ambiente por 1 h para melhorar a eficiência da emulsificação (Sapei et al., 2012). A emulsão dupla ($W_1/O/W_2$) foi preparada pela adição gradual de W_1/O (20% v/v) à fase aquosa externa (W_2), seguindo-se nova agitação a 20.000 rpm, por 2 min, e subsequente resfriamento a 4 °C, em banho-maria. Emulsões controle foram produzidas sem a adição dos nutrientes inorgânicos à fase aquosa interna. Para confirmar a produção das emulsões após os procedimentos realizados, foi realizada observação em lâmina em microscópio de campo claro.

5.2.3. Inoculantes microbianos e hidrofobicidade da superfície celular

Duas espécies bacterianas (*Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1) isoladas de biofilmes microbiano formados sobre cupons de acrílico contaminados com óleo cru e mantidos na região litorânea da ilha da Trindade, previamente caracterizadas como hidrocarbonoclásticas (Rodrigues et al., 2015a; Rodrigues et al., 2015b), foram selecionadas como inoculantes microbianos. As bactérias foram submetidas ao *microbial adhesion to hydrocarbons test* (MATH), de acordo com Sanin et al. (2003) com modificações. O cultivo das bactérias ocorreu em meio mineral Bushnell Haas (HIMEDIA) durante 96 h, 150 rpm e 30 °C,

contendo 0,5% (v/v) de hexadecano como única fonte de carbono e energia. Como controle, as bactérias foram cultivadas nas mesmas condições, apenas com a substituição do hexadecano por glicose no meio de cultivo. Para minimizar erros de leitura após o crescimento, as células foram lavadas com meio Bushnell Haas por duas vezes antes do teste MATH. Tubos de ensaio foram lavados com HCl 4% antes do experimento. Um volume de 5 mL de suspensão celular foi transferido para um tubo de ensaio de fundo redondo (15 x 100 mm). A densidade ótica (OD) foi determinada a 600 nm. Em seguida, 0,5 mL de n-hexadecano foi adicionado à suspensão, seguindo-se agitação vigorosa por 2 min. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 15 min e então foi realizada uma nova leitura da OD da fase aquosa a 600 nm. Os resultados, expressos em porcentagem, foram obtidos empregando-se a seguinte equação: Hydrophobicity (%) = 100 (1 - $OD_{final}/OD_{initial}$).

5.2.4. Estabilidade temporal das emulsões W/O/W

Em intervalos de cinco dias, durante 30 dias, foram capturadas fotomicrografias em microscópio óptico para a análise das gotículas de óleo presentes na fase aquosa contínua. As emulsões foram armazenadas em tubos de rosca e permaneceram sob agitação *end over end* em rotor com velocidade de 15 rpm, temperatura média de (21 ± 2) ºC e inclinação de 45 º. As análises das fotomicrografias foram realizadas com o software ImageJ (National Institutes of Health). Para cada tempo analisado foram utilizadas 5 imagens para análise do tamanho médio das gotículas, utilizando aproximadamente 40 gotículas/imagem.

5.2.5. Eficiência das emulsões e inoculantes na biodegradação de hidrocarbonetos

Para se avaliar a eficiência das emulsões em estimular a biodegradação de petróleo em águas oceânicas foram montados microcosmos no interior de frascos respirométricos, contendo 50 mL de água coletada a aproximadamente 100 m da costa da Ilha da Trindade. Os frascos foram acoplados a um respirômetro com fluxo de ar intermitente, dotado de um detector de dióxido de carbono por infravermelho (Sable Systems, Las Vegas, USA). No total, 13 tratamentos foram montados, sendo que seis deles continham petróleo a 1% (v/v). O petróleo

adicionado aos frascos foi previamente aquecido de forma gradual até 210 °C para eliminação de compostos voláteis.

Tabela 1. Descrição dos microcosmos utilizados no ensaio de biodegradação de petróleo utilizando emulsões W/O/W

Tratamento	Descrição
W	Água proveniente da costa da Ilha da Trindade
NF	Água + Emulsão não-fertilizada
FE	Água + Emulsão fertilizada
FER	Água + Emulsão fertilizada + *R. rhodochrous*
FEN	Água + Emulsão fertilizada + *N. farcinica*
FERN	Água + Emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* + *N. farcinica*
OCERN	Água + Componentes da emulsão (Óleo Canola, Nutrientes, Coco Glicosídeo, Pgpr) + *R. rhodochrous* + *N. farcinica*
P	Água + Petróleo
PNF	Água + Petróleo + Emulsão não-fertilizada
PFE	Água + Petróleo + Emulsão fertilizada
PFER	Água + Petróleo + Emulsão fertilizada + *R. rhodochrous*
PFEN	Água + Petróleo + Emulsão fertilizada + *N. farcinica*
PFERN	Água + Petróleo + Água + Emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* + *N. farcinica*

A quantidade de nutrientes inorgânicos foi adicionada nas emulsões duplas de tal forma que cada frasco respirométrico contendo petróleo continha uma razão aproximada de C:N:P igual a 100:10:1, enquanto nos tratamentos que não continham petróleo, tal razão foi de 100:20:2. A quantidade total de nitrogênio e fósforo adicionados na forma de NH_4NO_3 e K_2HPO_4 em cada microcosmo foi igual a 66,66 mg e 6,66 mg, respectivamente. A quantidade de óleo Canola, nutrientes e surfactantes adicionada ao tratamento OFRN foram as mesmas adicionadas na forma de emulsões nos tratamentos que as receberam.

As células de *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1 foram crescidas por 48 h a 30ºC e 150 rpm em caldo nutriente (Merck), centrifugadas e lavadas duas vezes para remoção de componentes do meio de cultivo. Células bacterianas foram adicionadas aos frascos respirométricos de forma a se obter concentração total de 1,0 x 10^6 céls/mL em cada microcosmo, sendo que nos tratamentos PFMRN e FMRN foram adicionadas 5,0 x 10^5 céls/mL de cada espécie bacteriana.

As emulsões produzidas foram adicionadas aos frascos dos respectivos tratamentos, bem como as células de *R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1. No interior de cada um dos frascos respirométricos foi colocada uma ponteira de pipeta P1000 (Kasvi) com a extremidade mais fina removida, para permitir acesso de uma pipeta de Pasteur ao fundo dos frascos. Os microcosmos foram incubados a 24 °C (temperatura média da água costeira da Ilha da Trindade) durante 30 dias, com intervalos de oxigenação direta na água de 5,9 h e injeção direta de ar durante 5 min com fluxo de 500 mL/min. Durante os primeiros 5 dias de experimento, metade do volume dos frascos foi substituído diariamente, coletando-se a fase aquosa inferior com uma pipeta de Pasteur de vidro inserida nas ponteiras. Do sexto até o 15° dia, a substituição da fase aquosa foi feita a cada 2 dias, e do 16º até o 30º dia, a substituição ocorreu a cada 3 dias. Esse procedimento foi adotado para simular o efeito da dissipação dos nutrientes minerais em água oceânica, caso os mesmos sejam aplicados numa forma que não os mantenha aderidos à fase oleosa superior. Nossa expectativa era de que, aplicando-se os nutrientes contidos na fase aquosa interna das emulsões, os mesmos permaneceriam na interface água/óleo estimulando a biodegradação Dessa maneira, a fase superior dos microcosmos onde se concentravam o petróleo e as emulsões foram mantidas. Para repor o volume retirado, água da costa da Ilha da Trindade foi armazenada a 4 °C e então o mesmo volume retirado era reposto durante as substituições. A análise respirométrica das atividade microbiana no interior dos frascos foi conduzida durante os 30 dias em que ocorreram as substituições de água.

5.2.6. Análises de Macronutrientes

Análises de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo total foram realizadas na água utilizada na montagem dos microcosmos e na fase aquosa coletada durante os 30 dias no tratamento com a emulsão fertilizada (Tratamento FM). O nitrogênio total foi quantificado pela metodologia de Kjeldahl, enquanto o fósforo total foi quantificado pelo método de Mehlich-1. O carbono orgânico foi mensurado utilizando-se um Total Organic Carbon Analyzer (TOC-L) (Shimadzu Corporation).

5.2.7. Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas usando o software "R". Os testes F e Shapiro-Wilks foram usados para testar a variância e a normalidade dos dados, respectivamente. Os dados considerados não-paramétricos foram então submetidos à comparação de médias pelo teste Wilcoxon a 5% de probabilidade.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Caracterização microscópica das emulsões W/O/W

Observações em microscópio óptico demonstraram a presença de gotículas de óleo de dimensões variáveis dispersas na fase aquosa externa (Fig. 1). O diâmetro das gotículas variou entre 0,16 e 111 μm (ver seção 3.4.). A presença de gotículas de óleo de diferentes tamanhos pode ser favorável ao processo de biorremediação, pois espera-se que emulsões contendo gotículas de menor tamanho possuam maior estabilidade. Desta maneira, especula-se que a liberação de nutrientes da fase aquosa interna das emulsões para estimular a biodegradação dos compostos hidrofóbicos ocorra de forma gradual e contínua.

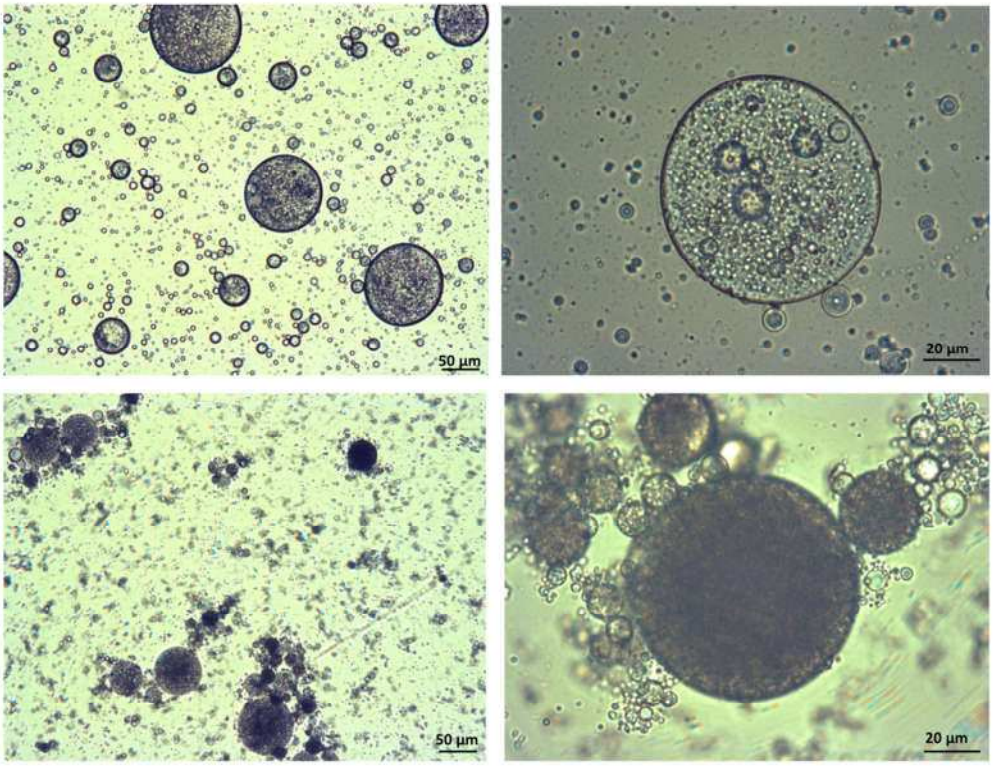


Figura 1. Emulsões W/O/W fertilizadas produzidas para utilização em biorremediação de óleo em ambientes aquáticos oligotróficos. A turbidez no interior de cada gotícula da emulsão varia de acordo com a quantidade de fase aquosa interna contida em seu interior. A coloração escura no interior das gotículas varia de acordo com a quantidade de fase aquosa interna nelas contidas.

Apesar do óleo Canola usado na produção das emulsões servir de fonte adicional de carbono no ambiente contaminado por hidrocarbonetos, tal composto é reconhecido como um dos óleos vegetais mais rapidamente degradados em ambientes marinhos (Al-Darbi et al., 2005). Desse modo, ele pode estimular um rápido crescimento de populações hidrocarbonoclásticas, estimulando a biodegradação de hidrocarbonetos aos quais as gotículas oleosas tendem a se aderir.

A escolha dos surfactantes utilizados se deu na síntese das emulsões e foi baseada no valor do balanço lipofílico-hidrofílico (HLB), que é caracterizado pela dominância relativa de grupos hidrofílicos sobre porções lipofílicas na molécula de surfactante. Esse atributo confere ao surfactante maior afinidade pela fração aquosa ou oleosa em emulsões. Surfactantes que

possuem uma maior porção lipofílica comparada à porção hidrofílica, cujo valor de HLB varia entre 3-6, são chamados de emulsificantes W/O (água em óleo) (Huibers e Shah, 1997), enquanto que surfactantes com maior porção hidrofílica, que apresentam valores de HLB entre 8-18, são classificados como emulsificantes de óleo em água (O/W) (Rosen, 1989). Durante a avaliação dos surfactantes para obtenção das emulsões, foi considerada a utilização do coco glicosídeo pois, apesar de não ser um surfactante proveniente de forma direta de um organismo vivo, ele é um surfactante da classe dos alquil poliglicosídios, que possuem propriedades não-iônicas e são prontamente biodegradáveis, pois sua síntese é realizada através de matérias-primas renováveis, como álcoois graxos e açúcares (Fukuda et al., 1993). No mesmo sentido, apesar de sintético, o Pgpr é utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica e não possui atividade tóxica para organismos vivos (Muschiolik, 2007), sendo ambos considerados *Generally Recognized as Safe* (GRAS). O surfactante coco glicosídeo possui cadeia hidrofílica maior que a lipofílica, apresentando valor HLB na faixa entre 8-18 e, portanto, possui maior afinidade pela fase aquosa. O surfactante Pgpr possui maior afinidade pela fração oleosa, garantida pela sua molécula com maior porção lipofílica, apresentando valor HLB na faixa de 3-6. A utilização dos surfactantes com alto e baixo HLB na fórmula das emulsões é responsável por garantir estabilidade ao produto final, visto que auxiliam tanto na estabilidade da fase aquosa interna quanto na estabilidade da fase oleosa, dispersa na fase aquosa externa.

Ao longo das últimas duas décadas, emulsões W/O/W revelaram-se materiais adequados para a encapsulação de vários compostos ativos, tais como hormônios (Cole e Whateley, 1997; Cournarie et al., 2004), esteróides (Laugel et al., 1998), analgésicos (Vlaia et al., 2009) e anti-sépticos (Tedajo et al., 2005), além de serem aplicáveis nas indústrias de cosméticos (Gallarate et al., 1999) e alimentícia, incluindo a encapsulação de vitaminas/minerais (Benichou et al., 2007; Nik et al., 2010; O'Regan e Mulvihill, 2010; Chengyu et al., 2016). Embora várias aplicações sejam possíveis para esse tipo de emulsão, não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando emulsões W/O/W fertilizadas como estratégia para liberação gradual de nutrientes em regiões de mar aberto ou mesmo em regiões litorâneas contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo. A utilização em campo dessas

emulsões pode ser uma alternativa viável à medida que, por conter uma porção oleosa, as gotículas adquirem afinidade pela camada de petróleo formada na superfície da água da região contaminada.

A limitação de nutrientes em ambientes marinhos pode limitar as taxas de biodegradação do óleo derramado (Atlas, 2011). Aplicando-se os nutrientes no interior das emulsões duplas, não ocorre perda imediata por dissolução na água, como ocorreria no caso de se aplicarem nutrientes solúveis não-encapsulados diretamente no local afetado. Portanto, caso os movimentos do mar carreiem a mancha de óleo para distintos lugares, por conta da afinidade com o contaminante, as emulsões podem acompanha-la. Dada a diferença de tamanho das gotículas hidrofóbicas obtidas com a metodologia utilizada, especula-se que as mesmas percam a estabilidade e se desfaçam em momentos diferentes, seja por fatores bióticos ou abióticos, o que proporciona uma liberação gradual e prolongada da fase aquosa contida no interior da fase oleosa, rica em nutrientes limitantes da biodegradação em águas oligotróficas. A liberação gradual desses nutrientes pode dar suporte contínuo ao desenvolvimento e atividade de espécies microbianas capazes de utilizar o contaminante como fonte de carbono e energia, propiciando sua biodegradação.

5.3.2. Hidrofobicidade da superfície celular

Para observar a capacidade de as culturas bacterianas adquirirem características hidrofóbicas, favorecendo sua adesão à camada de óleo em ambientes aquáticos contaminados com óleo cru, *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1 foram cultivadas durante 96 h em meio mineral contendo glicose ou hexadecano como fonte de carbono e, então, submetidas ao teste de *Microbial Adhesion to Hydrocarbons* (MATH) (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados de *Microbial Adhesion to Hydrocarbons* (MATH) obtidos após crescimento de *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1 em meio mineral contendo glicose ou hexadecano como única fonte de carbono e energia

Time (h)	MATH (%)			
	Glucose		Hexadecane	
	R. rhodochrous TRN7	*N. farcinica* TRH1	*R. rhodochrous* TRN7	*N. farcinica* TRH1
24	10	0	63	52
48	4	2	96	56
72	7	2	97	60
96	8	1	96	55

A tendência das culturas cultivadas em hexadecano se aderirem à fase hidrofóbica superior é visível mesmo no frasco de cultivo (Fig. 2).

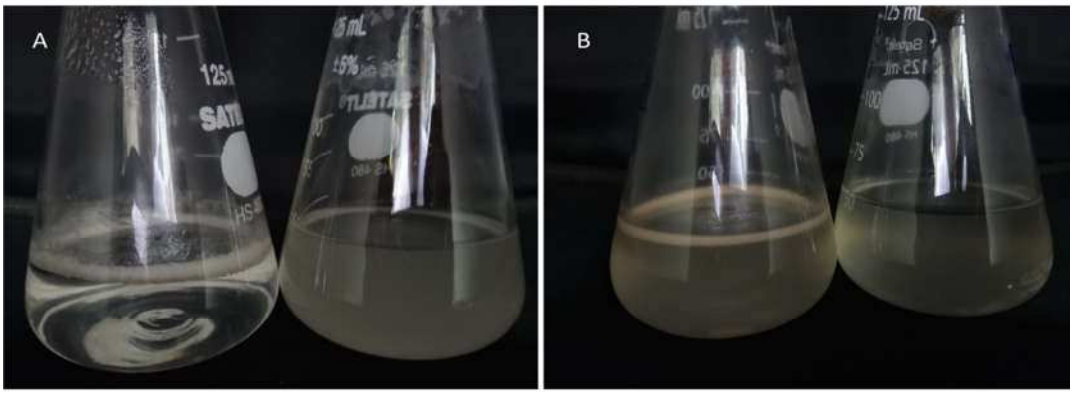


Figura 2. Culturas bacterianas após crescimento por 48 h em meio mineral Bushnell Haas com 0,5% (v/v) de hexadecano (frascos à esquerda) ou 0,5% (w/v) de glicose (frascos à direita) a 30 °C e 150 rpm. (A) Cultura de *Rhodococcus rhodochrous* TRN7. (B) Cultura de *Nocardia farcinica* TRH1. Os frascos mostrados permaneceram em repouso durante 5 min antes de serem fotografados. Observa-se a tendência de adesão das culturas à fase hidrofóbica superior quando cultivadas em hexadecano, indicando alta hidrofobicidade da superfície celular.

Os resultados observados nos permitem sugerir que, após crescer em meio de cultivo contendo uma fonte de carbono hidrofóbica, ambas as espécies bacterianas apresentam potencial para serem inoculadas em ambientes contaminados com petróleo e seus derivados. Tal afirmativa é baseada na elevada afinidade das células por hidrocarbonetos. Após um acidente envolvendo derramamento de petróleo no mar, forma-se uma camada delgada de óleo na

superfície (Kingston, 2002). Considerando-se a capacidade de se aderirem aos hidrocarbonetos, células que exibem alta hidrofobicidade na superfície celular podem se mover da água para a interface com a fase orgânica apolar e, dessa forma, atuar na decomposição do contaminante (Kaczorek et al., 2008). A permanência das células na interface água/óleo aumenta a taxa de transporte de hidrocarbonetos da fase não aquosa para o interior celular, reduzindo a distância efetiva para a transferência de massa entre o micro-organismo e o substrato (Harms e Zehnder, 1995; Harms et al., 2010). A habilidade de micro-organismos degradarem hidrocarbonetos depende tanto da capacidade genética intrínseca quanto da capacidade de expressão da informação genética, bem como das propriedades de cada hidrocarboneto (Abbasnezhad et al., 2011). A adesão a superfícies hidrofóbicas é uma estratégia comum usada por micro-organismos para superar a limitada biodisponibilidade de hidrocarbonetos (Bouchez-Naïtali et al., 1999). Dada à plasticidade fenotípica, rápidas mudanças nas condições ambientais forçam modificações adaptativas em células bacterianas (Krasowska e Sigler, 2014).

O desenvolvimento de mecanismos adaptativos específicos para lidar com a toxicidade e baixa biodisponibilidade de substratos, como hidrocarbonetos com cadeias apolares, permite que muitas bactérias modifiquem a hidrofobicidade de suas superfícies celulares (Heipieper et al., 2010). A produção de biossurfactantes têm sido proposta como uma forma de se aumentar a hidrofobicidade celular. Al-Tahhan et al., (2000) observaram que a presença de ramnolipídeo em concentrações menores que a concentração micelar crítica induz a perda de lipopolissacarídeos da membrana externa em *Pseudomonas aeruginosa*, sendo este um provável mecanismo de aumento da hidrofobicidade da superfície celular. No mesmo sentido, Ghosh e Mukherji (2016) também utilizaram diferentes surfactantes para induzir o aumento da hidrofobicidade celular em *P. aeruginosa* crescendo em meio com pireno e observaram que a aderência aos cristais de pireno foi intensificada na presença de Tween 80. Ambas as bactérias utilizadas em nosso estudo apresentaram valores elevados de hidrofobicidade celular (estimada por MATH) sem a necessidade do uso de surfactantes, sendo essa uma característica desejável para sua aplicação em campo.

Bactérias Gram-positivas possuem envelopes hidrofóbicos e tendem a apresentar co-agregação quando cultivadas em meios contendo hidrocarbonetos (Carvalho et al., 2004). Essas estruturas e comportamento contribuem para que as células permaneçam tolerantes a solventes. Entretanto, outros fatores estão relacionados à adesão, incluindo cargas de superfície, composição da superfície das células e estruturas externas, idade das células e estado nutricional (Carvalho et al., 2004). Os biopolímeros encontrados na parte mais externa das células, (exopolissacarídeos), têm sido também relatados como capazes de auxiliar no aumento da biodisponibilidade de hidrocarbonetos de baixa solubilidade (Baldi et al., 1999; Baldi et al., 2003; Zhang et al., 2011). Especificamente para o gênero *Rhodococcus*, Rubtsova et al. (2012) sugeriram que os possíveis mecanismos que proporcionam a adesão de representantes desse gênero a hidrocarbonetos é a mudança no conteúdo de lipídios e, também, do potencial zeta das células na presença desses substratos.

A adesão microbiana a hidrocarbonetos é um mecanismo que favorece a biodegradação dessas moléculas. Entretanto, a capacidade de micro-organismos de permanecer em interface água/óleo não é limitada àquelas espécies capazes de degradar hidrocarbonetos (Abbasnezhad et al., 2011). Portanto, a possibilidade de espécies bacterianas exibirem não apenas características que permitem a adesão a moléculas de hidrocarbonetos, mas também capacidade de catabolizá-los, é um fator chave quando se pretende utilizá-las em processos de biorremediação de ambientes contaminados com óleo cru ou outros contaminantes hidrofóbicos. Tanto o isolado *R. rhodochrous* TRN7 quanto *N. farcinica* TRH1 foram previamente avaliados quanto a suas capacidades hidrocarbonoclásticas (Rodrigues et al., 2015a; Rodrigues et al., 2015b). Apesar da produção de biossurfactantes por micro-organismos auxiliar no aumento da biodisponibilidade de hidrocarbonetos e, consequentemente, aumentar a possibilidade de biodegradação, ambas as espécies utilizadas nesse estudo não são capazes de produzir essas biomoléculas (Rodrigues et al. 2015a). Contudo, isso não as impede de catabolizar hidrocarbonetos de baixa solubilidade, como por exemplo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, demonstrando que as mesmas fazem uso de mecanismos de obtenção do substrato hidrofóbico que independem da produção de biossurfactantes (e.g. adesão ao substrato). Isso é reforçado pela comparação dos tratamento

em que as células cresceram em meios contendo glicose ou hexadecano como fontes de carbono (Tabela 2).

5.3.3. Liberação de nutrientes pelas emulsões W/O/W fertilizadas

Dada a diferença potencial na estabilidade das gotículas de óleo da emulsão produzida, por conta da variação da sua dimensão, foi realizada uma quantificação de nitrogênio total e fósforo total (Fig. 3) liberados para a fase aquosa durante 30 dias de exposição das emulsões W/O/W fertilizadas, em frascos respirométricos, com substituição de metade do volume dos frascos em cada momento analisado.

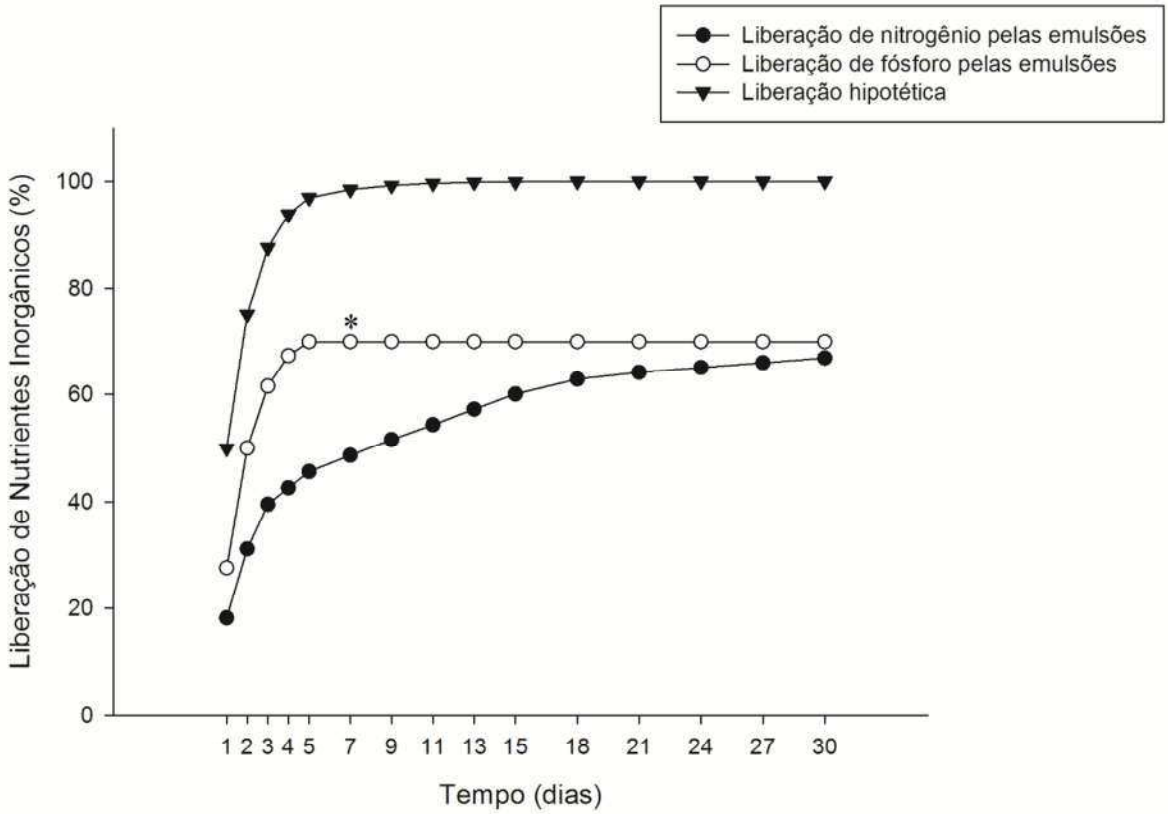


Figura 3. Nitrogênio e fósforo totais liberados ao longo de 30 dias de incubação das emulsões W/O/W em água litorânea da Ilha da Trindade contendo uma camada de óleo cru na superfície. A cada tempo amostrado, houve substituição de metade do volume da fase aquosa, pela mesma água empregada no início dos experimentos. *A partir do sétimo dia não foi possível quantificar o fósforo liberado no meio pela metodologia utilizada, portanto, considera-se que a liberação foi próxima a zero.

As curvas obtidas de liberação de nitrogênio e fósforo pelas emulsões foram plotadas em conjunto com uma curva hipotética, calculada com base na substituição temporal da água no experimento, carreando a cada substituição metade da quantidade total dos nutrientes disponíveis nos microcosmos, caso os mesmos tivessem sido aplicados diretamente na água.

Ao se comparar a curva de liberação de nitrogênio com a curva hipotética observa-se que desde o primeiro tempo analisado, a liberação de nutrientes pela emulsão W/O/W ocorre de maneira gradual, visto que as emulsões conseguem reter os nutrientes minerais em sua fase aquosa interna. Ao longo do tempo, destaca-se o período compreendido entre o quarto e o décimo oitavo dias, onde a curva de liberação de nitrogênio tem um comportamento praticamente linear. Após o 18º dia ocorre diminuição da taxa de liberação de nitrogênio por parte das emulsões, visto que muitas delas perdem estabilidade e se desfazem nos dias iniciais, permanecendo mais estáveis as gotículas de menor diâmetro e, portanto, com nutrientes aprisionados na fase aquosa interna. Ainda assim, a quantidade total de nitrogênio liberada até o 30º não chegou a 100% de todo o nitrogênio presente no interior das emulsões, indicando que a liberação de nutrientes é possível por mais de 30 dias.

Da mesma forma que como analisadas as perdas de nitrogênio, inicialmente observa-se uma perda menor de fósforo total pelas emulsões em comparação com a curva hipotética traçada. Após o quinto dia não foi possível quantificar o fósforo total liberado, pois a concentração estava abaixo do valor mínimo detectável pela técnica analítica utilizada.

Em ambientes marinhos, principalmente em regiões mais distantes da costa, quantidades de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, são limitantes para suportar o crescimento microbiano, principalmente quando o ambiente recebe uma alta carga de hidrocarbonetos proveniente de um derramamento de óleo (Das e Chandran, 2010). A liberação de nutrientes pelas emulsões permite que micro-organismos possam utilizá-los de forma a suportar seu metabolismo juntamente com o carbono contido nos hidrocarbonetos do petróleo e, assim, acelerar a eliminação do contaminante.

5.3.4. Estabilidade das emulsões W/O/W

Após permanecer por 30 dias em rotação, as emulsões foram avaliadas em 7 momentos a partir da sua produção em intervalos de 5 dias. A distribuição média de tamanhos ao longo do tempo é mostrada na Figura 4A. Observa-se que, até o 15º dia após a produção, o tamanho médio das emulsões aumenta aproximadamente 2 vezes, enquanto que, aos 30 dias, o tamanho médio aumenta por volta de 4 a 5 vezes. O aumento do tamanho médio das emulsões é esperado, visto que a desestabilização das gotículas, por exemplo, por coalescência, é algo esperado nesse tipo de sistema. A distribuição de tamanhos também sofre variações (Fig. 4B), o que comprova que a estabilidade das gotículas está diretamente relacionada ao tempo após a produção.

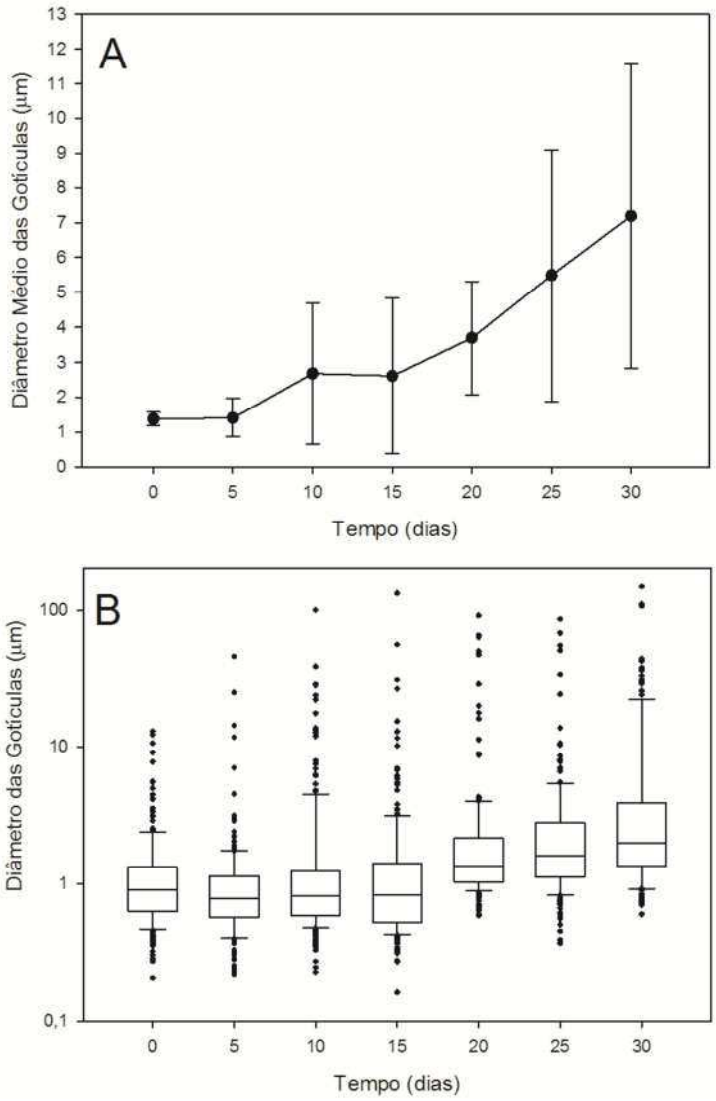


Figura 4. Estabilidade de tamanho das gotículas (n = 200) que compõe as emulsões W/O/W durante período de 30 dias, em intervalos de 5 dias. A. Tamanho médio das gotículas. B. Distribuição de tamanhos das gotículas.

A coalescência de gotículas após a produção das emulsões é um processo que resulta na formação de gotículas maiores e normalmente ocorre nesse tipo de produto (Garti, 1997). Embora tal processo seja esperado, Scherze et al. (2006) concluíram que a fase dispersa contendo NaCl dificulta a coalescência das gotículas de óleo. O uso de água do mar, portanto, foi essencial para proporcionar a estabilidade de tamanho durante o período analisado. A

concentração dos surfactantes utilizados é o parâmetro mais importante na formação e estabilidade das emulsões. O surfactante utilizado para a produção da emulsão primária (W/O) é fundamental para a estabilidade da emulsão W/O/W, visto que a fração de volume na emulsão primária altera as propriedades reológicas das emulsões W/O/W (Jiao e Burgess, 2003). O aumento da concentração do surfactante utilizado na produção da emulsão *oil-in-water* tende a reduzir a área interfacial entre a fase dispersa (*water-in-oil*) e a fase contínua (*water*). Isso produz um maior número de gotículas com redução no diâmetro, causando aumento na estabilidade da emulsão final formada (Kundu et al., 2013). Esse é mais um indicativo de que as emulsões W/O/W produzidas em nosso estudo tem potencial para serem aplicadas em ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, à medida que a coalescência entre gotículas da emulsão e o óleo contaminante no ambiente resulta na liberação gradual de nutrientes na interface água/óleo. A modificação das concentrações dos surfactantes usados durante a produção terá influência direta no tempo de estabilidade e tamanho das emulsões resultantes, possibilitando o uso para diferentes propósitos.

5.3.5. Ensaios de biorremediação utilizando emulsões W/O/W

A água utilizada tanto na produção das emulsões quanto nos microcosmos para ensaios de biorremediação continha inicialmente uma concentração de 1,12 mg/L de nitrogênio total e 29,98 mg/L de carbono orgânico. Não foi possível determinar o valor de fósforo total, pois a concentração do elemento na fase aquosa era menor que o limite de detecção da técnica analítica utilizada.

Os ensaios de biorremediação realizados resultaram em uma grande variação de liberação total de CO_2 durante os 30 dias de experimento entre os tratamentos (Fig. 5). A simples adição de petróleo à água (tratamento P) não resultou em diferença significativa na liberação de CO_2 em relação ao tratamento controle (W). Entre os tratamentos que envolveram a utilização das emulsões W/O/W fertilizadas, o tratamento PFERN, que recebeu também as bactérias *R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1, mostrou a maior liberação de CO_2 (4857 μmol), seguido pelos tratamentos que receberam ambas as bactérias, porém separadamente. Os

tratamentos NF e PNF receberam apenas emulsões duplas W/O/W não fertilizadas. Ao compará-los com os que receberam as emulsões fertilizadas, existe uma grande diferença na emissão de CO_2, o que permite afirmar que a introdução de nutrientes inorgânicos no ambiente foi fundamental para suportar o metabolismo microbiano utilizando tanto o petróleo como o óleo Canola constituinte das emulsões como fonte de carbono e energia. Entre os tratamentos com uso apenas das emulsões fertilizadas contendo os isolados bacterianos avaliados (separadamente ou em conjunto), na ausência de petróleo (FER, FEN e FERN), não houve diferença significativa entre os valores registrados de acordo com o teste Wilcoxon a 5% de probabilidade. O oposto é verificado quando o petróleo está presente (PFER, PFMN e PFERN). Nesse caso, o tratamento PFERN apresenta liberação de CO_2 significativamente maior em relação aos demais. Tal fato nos permite sugerir que *R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1 não exercem efeitos antagonistas uma sobre a outra, podendo ambas serem empregadas em conjunto como estratégia de bioaumentação. Ao se compararem os resultados de respiração nos tratamentos FERN (3516 μmol de CO_2) e PFERN (4857 μmol de CO_2), observa-se que no tratamento com petróleo houve um aumento de quase 40% no valor total de CO_2 liberado. Portanto, a adição de petróleo ao microcosmo PFERN foi acompanhada por aumento significativo na atividade microbiana, resultado do catabolismo do contaminante. Esse efeito está ligado à introdução das bactérias hidrocarbonoclásticas nesse tratamento, visto que ao compará-lo com o tratamento PFE (3342 μmol de CO_2), onde bactérias não foram adicionadas, também observa-se uma diferença significativa.

Quando se faz a comparação entre os tratamentos sem e com petróleo na presença de emulsões W/O/W fertilizadas, observa-se um aumento na liberação de CO_2 próximo a 20%. O aumento é ainda mais significativo quando se comparam os tratamentos FERN/PFERN, nos quais estão presentes ambos os isolados bacterianos utilizados nesse estudo. Nesse caso, a diferença chega a quase 40%. Portanto, embora seja possível que as bactérias metabolizem preferencialmente o óleo Canola proveniente das emulsões, é comprovado que existe um aumento significativo da atividade bacteriana quando o petróleo está presente, indicando a sua

biodegradação, a qual é estimulada pelas emulsões fertilizadas contendo ou não os isolados bacterianos.

O tratamento OCERN foi pensado inicialmente como controle. Entretanto, pelo fato de o respirômetro injetar ar diretamente no meio aquoso dentro dos frascos, macro emulsões de água em óleo foram formadas, aprisionando, dessa maneira, nutrientes no interior das mesmas e inviabilizando o uso desse tratamento como controle. Nesse sentido, nota-se que até mesmo a formação de macro emulsões surte efeito na respiração dentro dos microcosmos (onde a única fonte de carbono disponível era o óleo Canola). Ainda assim, o uso de emulsões na ordem de micrômetros, resultando na liberação controlada de nutrientes essenciais, foi ainda mais eficiente.

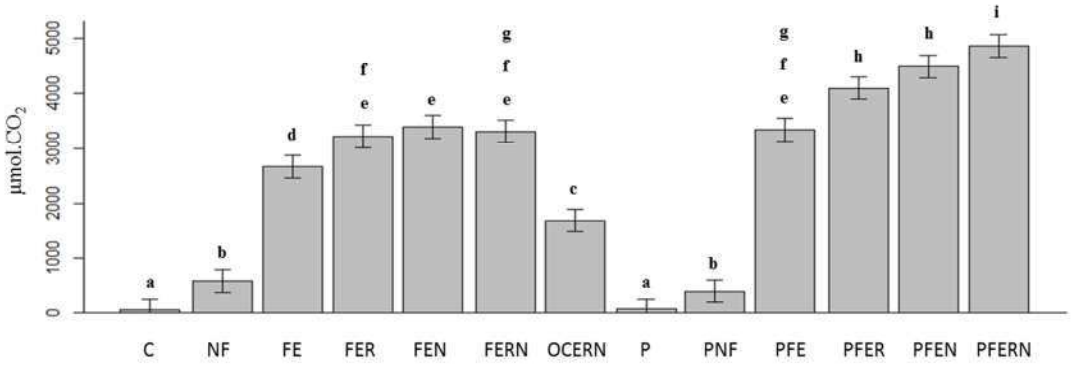


Figura 5. Dióxido de carbono liberado durante os 30 dias de incubação dos tratamentos simulando estratégias de biorremediação utilizando emulsões W/O/W e bactérias hidrocarbonoclásticas. C: controle (água coletada na região litorânea da Ilha da Trindade); NF: emulsão dupla não-fertilizada; FE: emulsão dupla fertilizada; FER: emulsão dupla fertilizada e *R. rhodochrous*; FEN: emulsão dupla fertilizada e *N. farcinica*; FERN: emulsão dupla fertilizada e *R. rhodochrous* e *N. farcinica*; OCERN: óleo Canola, surfactantes, NH_4NO_3 e K_2HPO_4, *R. rhodochrous* e *N. farcinica*; P: petróleo; PNF: petróleo mais emulsão dupla não-fertilizada; PFE: petróleo mais emulsão dupla fertilizada; PFER: petróleo mais emulsão dupla fertilizada e *R. rhodochrous*; PFEN: petróleo mais emulsão dupla fertilizada e *N. farcinica*; PFERN: petróleo mais emulsão dupla fertilizada, *R. rhodochrous* e *N. farcinica*.

A aplicação de macronutrientes inorgânicos como N, P e K é amplamente utilizada na bioestimulação em ambientes contaminados com hidrocarbonetos do petróleo (Prince, 1993; Swannell et al., 1996; Atlas e Hazen, 2011). Essa metodologia tem sido empregada com sucesso em solos contaminados com hidrocarbonetos (Xu e Lu, 2010; Al-Kindi e Aber, 2016; Al-Saleh e Hassan, 2016), pois os nutrientes adicionados nesse ambiente ali permanecem, a menos que

ocorra lixiviação ou carreamento por águas pluviais. A aplicação de nutrientes inorgânicos objetivando promover a bioestimulação em ambientes aquáticos oligotróficos tem como limitação a rápida dispersão dos compostos adicionados na água (Warr et al., 2013). Em estudos realizados após o acidente envolvendo o derramamento de óleo no Golfo do México, causado pela plataforma Deepwater Horizon em 2010, concluiu-se que a baixa concentração de fósforo na água foi um fator limitante para promover a remoção de parte do óleo por atenuação natural (Edwards et al., 2011). Algumas estratégias têm sido propostas para suportar a bioestimulação em águas oceânicas oligotróficas, como por exemplo o uso de flocos de argila mineral fertilizada na região afetada (Warr et al., 2013), utilização direta de ácido úrido e lecitina de soja (compostos de baixa solubilidade em água) (Nikolopoulou et al., 2007), bem como a utilização de fertilizantes oleofílicos, como o EAP Inipol 22, utilizado em regiões costeiras após o acidente com o Exxon Valdez no Alaska em 1989. A utilização dos flocos de argila mineral fertilizada proposta por Warr e colaboradores (2013) parece ser uma alternativa para bioestimular águas abertas. Entretanto, como ocorre a aplicação de flocos, a superfície de contato é reduzida, o que pode resultar em baixa efetividade em campo.

Tratando-se da aplicação de fertilizantes como o EAP Inipol 22, existem estudos contestando sua efetividade após ser aplicado no acidente do Exxon Valdez (Nikolopoulou e Kalogerakis, 2008), pois um componente em sua fórmula, o 2-butoxietanol é potencialmente tóxico para organismos vivos. Além disso, tratando-se do Inipol EAP 22, quando o produto entra em contato com a água ocorre quebra da emulsão, liberando toda a uréia na fase aquosa, que se perde rapidamente (Ron e Rosenberg, 2014). Dentre as alternativas citadas, o uso do ácido úrico como fonte de nitrogênio e da lecitina de soja como fonte de fósforo parecem ser a melhor alternativa até o momento. Nesse sentido, a emulsão dupla hidrofóbica fertilizada desenvolvida no presente trabalho é uma alternativa aos produtos atualmente disponíveis visando à bioestimulação. Nessa emulsão W/O/W, os nutrientes hidrossolúveis são carreados em gotículas de superfície hidrofóbica que tem afinidade pelos hidrocarbonetos e liberam os nutrientes de maneira gradual (Fig. 3). Os valores das taxas respiratórias (Fig. 6) obtidas durante

o experimento nos permitem sugerir que nenhum dos dois surfactantes, nas concentrações utilizadas apresenta toxicidade para os micro-organismos presentes nos microcosmos.

A análise temporal da atividade microbiana nos microcosmos (Fig. 6), demonstra que as menores taxas de emissão de CO_2 durante todo o experimento ocorreram nos tratamentos que continham apenas água ou água e emulsão W/O/W não-fertilizada, com e sem petróleo. Em determinados períodos são padrões semelhantes de aumento e redução na emissão de CO_2 nos microcosmos contendo emulsões W/O/W fertilizadas, por exemplo, entre o 11º e 13º dias, 14º e 17º e também entre o 20º e 27º dias. Esse fato é decorrente de uma falha momentânea do sistema de controle de temperatura dos microcosmos, ficando os mesmos sujeitos às oscilações ambientais de temperatura que refletiram nesse padrão de comportamento de aumento e redução de atividade respiratória em todos os microcosmos.

Ao se analisarem os resultados obtidos nos primeiros seis dias, observa-se que as taxas de emissão de CO_2 nos tratamentos com ausência de petróleo (Fig. 6A) são mais elevadas do que as dos mesmos tratamentos com petróleo (Fig. 6B). Tal diferença pode ser explicada pela ação tóxica de alguns hidrocarbonetos de petróleo sobre a comunidade microbiana da água e também sobre as bactérias hidrocarbonoclásticas adicionadas nos tratamentos com petróleo (Bartha, 1986; Leahy e Colwell, 1990; Whitehead, 2013; Mehdinia et al., 2015). Ao longo do tempo, a respiração aumenta substancialmente nos microcosmos contaminados com petróleo, atingindo um pico máximo acima de 10 μmol $CO_2.h^{-1}$ nos tratamentos que possuem petróleo e emulsão fertilizada inoculada com os isolados *R. rhodochrous* e *N. farcinica*. Isso se deve à adaptação das bactérias à presença de hidrocarbonetos potencialmente tóxicos e a utilização dos hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia, a qual envolve a ativação de genes e síntese de enzimas que atuam no catabolismo desses compostos (Habe e Omori, 2003; Tancsics et al., 2013; Lima-Morales et al., 2016).

Com o decorrer dos 30 dias, nota-se um decréscimo contínuo das taxas respiratórias nos microcosmos que não foram contaminados com petróleo, indicando que as fontes de carbono provenientes do óleo Canola estão se esgotando. Nos microcosmos que receberam petróleo, são observados três momentos de maior atividade respiratória, podendo o primeiro deles estar

relacionado à utilização dos hidrocarbonetos de petróleo mais lábeis e do óleo Canola. O declínio após esse primeiro momento pode estar relacionado ao esgotamento dessas frações mais lábeis, sendo, portanto, necessária uma nova adaptação e síntese de novas enzimas por parte das bactérias hidrocarbonoclásticas para atuar sobre frações de hidrocarbonetos ainda presentes no ambiente. Ocorre, então, um segundo momento de elevação da taxa respiratória. Após novo esgotamento dessas frações de hidrocarbonetos, ocorre um novo declínio e, após nova adaptação, há um terceiro período de aumento da taxa respiratória. Resultado semelhante foi obtido em experimentos anteriores utilizando apenas a bactéria *R. rhodochrous* TRN7 por Rodrigues et al. (2015a).

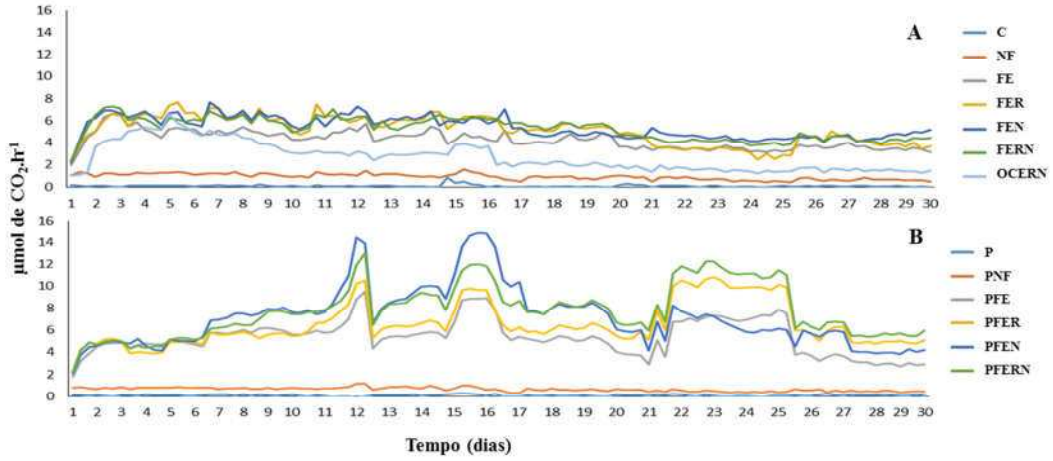


Figura 6. Análise temporal das taxas de emissão de CO_2 ao longo de 30 dias de incubação de microcosmos contendo água coletada na região litorânea da Ilha da Trindade adicionada de emulsões duplas (fontes de nutrientes), petróleo e isolados bacterianos hidrocarbonoclásticos. A: tratamentos sem adição de petróleo. B: tratamentos com adição de petróleo. C: controle (água coletada na região litorânea da Ilha da Trindade); NF: emulsão dupla não-fertilizada; FE: emulsão dupla fertilizada; FER: emulsão dupla fertilizada e *R. rhodochrous*; FEN: emulsão dupla fertilizada e *N. farcinica*; FERN: emulsão dupla fertilizada e *R. rhodochrous* e *N. farcinica*; OCERN: óleo Canola, surfactantes, NH_4NO_3 e K_2HPO_4, *R. rhodochrous* e *N. farcinica*; P: petróleo; PNF: petróleo mais emulsão dupla não-fertilizada; PFE: petróleo mais emulsão dupla fertilizada; PFER: petróleo mais emulsão dupla fertilizada e *R. rhodochrous*; PFEN: petróleo mais emulsão dupla fertilizada e *N. farcinica*; PFERN: petróleo mais emulsão dupla fertilizada, *R. rhodochrous* e *N. farcinica*.

Os resultados nos permitem afirmar que as bactérias hidrocarbonoclásticas empregadas exercem efeito significativo na biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo. Ao assumir características hidrofóbicas na superfície celular, quando crescendo em ambientes onde a fonte

de carbono é hidrofóbica (Fig. 2), as células não são perdidas durante os eventos de substituição de água (ver item 5.2.5), o que pode ser comprovado pelos valores das taxas respiratórias (Fig. 6). Portanto, ambas as bactérias tem potencial para serem utilizadas em operações de biorremediação baseada em bioaumentação, em especial quando se deseja estimular a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes de águas oceânicas abertas. O tratamento OCERN, contendo componentes livres (óleo canola, surfactantes, NH_4NO_3, K_2HPO_4, *R. rhodochrous* e *N. farcinica*), e não na forma de emulsão, resultou em menor liberação de CO_2 após 30 dias quando comparado aos demais tratamentos contendo as emulsões fertilizadas. Isso é uma mais uma evidência de que as emulsões duplas produzidas são eficientes na liberação gradual de nutrientes, de forma a proporcionar a manutenção da atividade microbiana durante o metabolismo dos compostos orgânicos hidrofóbicos.

A colonização inicial bacteriana de manchas de petróleo derramado no ambiente por bactérias provenientes de bioaumentação pode fazer com que o efeito de biodegradação do contaminante seja maximizado, à medida que essa colonização inicial dá suporte para que outras bactérias venham a se instalar no local (Alkatib et al., 2011; Rodrigues et al., 2015b). A sucessão ecológica microbiana na interface água/óleo nas regiões afetadas aumenta a possibilidade da colonização por novos micro-organismos hidrocarbonoclásticos, intensificando a eficiência de remoção do contaminante. Como sugerido anteriormente por Rodrigues et al. (2015b), o movimento das correntes marinhas carreia células microbianas de novas populações que, ao entrarem em contato com o óleo, podem utilizá-lo como substrato. Além disso, a transferência horizontal de genes é um possível mecanismo pelo qual bactérias hidrocarbonoclásticas usadas em processos de bioaumentação possam estimular a biodegradação, uma vez que seus genes responsáveis pelo catabolismo de contaminantes orgânicos sejam transferidos para outras populações de bactérias autóctones do ambiente contaminado, que assim adquirem a capacidade de degradação dos contaminantes (Habe e Omori, 2003).

5.4. Conclusão

Com os resultados obtidos, concluímos que o uso de emulsões W/O/W fertilizadas é uma alternativa para a bioestimulação em ambientes marinhos oligotróficos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. A liberação gradual de nutrientes provenientes da fase aquosa interna pode suportar prolongado crescimento microbiano na interface água/óleo e estimular assim a biodegradação dos hidrocarbonetos. No mesmo sentido, o uso das bactérias hidrocarbonoclásticas *R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1, ambas isoladas de água das adjacências da Ilha da Trindade, também é indicado para a bioaumentação em episódios de contaminação oceânica. Esses isolados bacterianos, além de degradarem diversas frações de hidrocarbonetos, respondem ao cultivo em substrato hidrofóbico com o aumento da hidrofobicidade da superfície celular, o que promove a adesão celular às moléculas hidrofóbicas dos hidrocarbonetos no ambiente aquático. Essa adesão ao substrato garante a manutenção das células inoculadas em contato com as moléculas dos contaminantes, favorecendo com isso a sua biodegradação.

5.5. Referências

Abbasnezhad H., Gray M., Foght J. M., 2011. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92, 653–675.

Aburto-Medina, A., Adetutu, E.M., Aleer, S., Weber, J., Patil, S.S., Sheppard, P.J., Ball, A.S., Juhasz, A.L., 2015. Comparison of indigenous and exogenous microbial populations during slurry phase biodegradation of long-term hydrocarbon-contaminated soil. Biodegradation 23, 813–822.

Al-Darbi, M.M.; Saeed, N.O.; Islam, M.R., 2005. Biodegradation of natural oils in seawater. Energ. Source. 27, 19-34.

Alkatib, M.A., Alam, M.D.Z., Muyibi, A.S., Husain, A.F., 2011. An isolated bacterial consortium for crude oil biodegradation. Afr. J. Biotechnol. doi: 10:18763–18767.

Al-Kindi, S., Abed, R.M.M., 2016. Comparing oil degradation efficiency and bacterial communities in contaminated soils subjected to biostimulation using diferente organic wastes. Water Air Soil Poll. 227, 36.

Al-Saleh, E., Hassan, A., 2016. Enhanced crude oil biodegradation in soil via biostimulation. Int. J. Phytoremed. doi: 10.1080/15226514.2016.1146223.

Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M., 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa: Effect on cell surfasse properties and interaction with hydrophobic substrates. App. Environ. Microbiol. 66, 3262-3268.

Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol. Rev. 45, 180–209.

Atlas, R.M., 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. Environ. Sci. Technol. 45, 6709-6715.

Atlas, R.M., Hazen, T.C., 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. Environ. Sci. Technol. 45, 6709–6715.

Bak, F., Bonnichsen, L., Jorgensen, N.O.G., Nicolaisen, M.H., Nybroe, O., 2015. The biosurfactants viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 1475–1483.

Baldi, F., Ivosevic, N., Minacci, A., Pepi, M., Rani, R., Svetlicic, V., Zutic, V., 1999. Adhesion of Acinetobacter venetianus to diesel fuel droplets studied with in situ electrochemical and molecular probes. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2041–2048.

Baldi, F., Pepi, M., Capone, A., della Giovampaola, C., Milanesi, C., Fani, R., Focarelli, R., 2003. Envelope glycosylation determined by lectins in microscopy sections of Acinetobacter venetianus induced by diesel fuel. Res. Microbiol. 154, 417–424.

Bao, M.T., Wang, L.N., Sun, P.Y., Cao, L.X., Zou, J., Li, Y.M., 2012. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. Mar. Pollut. Bull. 64, 1177–1185.

Bartha, R., 1986. Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation. Microbial Ecol. 12, 155-172.

Benichou, M., Aserin, A., Garti, N., 2007. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. Colloid. Surface. A. 294, 20-32.

Bouchez-Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., Vandecasteele, J.P., 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. J. Appl. Microbiol. 86, 421–428

Carvalho, C., da Cruz, A., Pons, M., Pinheiro, H., Cabral, J., da Fonseca, M., Ferreira, B.S., Fernandes, P., 2004. *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis*, and *Pseudomonas putida* behavior in the presence of organic solvents. Microsc. Res. Tech. 64, 215–222.

Chengyu, G., Caibiao, H., Chaolong, M., Qiao, F., Tingkang, X., Qiang, X. 2016. Development and characterization of solid lipid microparticles containing vitamin C for topical and cosmetic use. European Journal of Lipid Science and Technology. doi: 10.1002/ejlt.201500373

Cole, M.L., Whateley, T.L., 1997. Release rare profiles of theophylline and insulin from stable multiple W/O/W emulsions. J. Control. Release. 49, 51-58.

Cournarie, F., Savelli, M.P., Rosillio, V., Bretez, F., Vauthier, C., Grossiord, J.L., Seiller, M., 2004. Insulin-loaded W/O/W multiple emulsions: comparasion of the performances of systems prepared with medium-chain-triglycerides and fish oil. Eur. J. Pharm. Biopharm. 58, 477-482.

Crawford, R.L., Rosenberg, E. 2012. Bioremediation. In The prokaryotes, 4th ed.. Edited by Rosenberg E, DeLong E, Thompson F, Lorey S, Stackebrandt E.New York: Springer.

Das, N., Chandran, P. 2010. Microbial degradation of petróleo m hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnol. Res. Int. doi: 10.4061/2011/941810.

De la Huz, R., Lastra, M., Junoy, J., Castellanos, C., Vieitez, J.M., 2005. Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: preliminary study of the “Prestige” oil spill. Estuar. Coast. Shelf. Sci. 65, 19-29.

Edwards, B.R., Reddy, C.M., Camilli, R., Carmichael, C.A., Longnecker, K., Van Mooy, B.A.S., 2011. Rapid microbial respiration of oil from the Deepwater Horizon spill in offshore surface waters of the Gulf of Mexico. Environ. Res. Lett. doi:10.1088/1748-9326/6/3/035301.

Fehler, S.W.G., Light, R.J. 1970. Biosynthesis of hydrocarbons in Anabaena variabilis. Incorporation of [methyl-14C] and [methyl-2H] methionine into 7- and 8-methylheptadecane. Biochemistry-US. 9, 418-422.

Frantzen, M., Hansen, B.H., Geraudie, P., Palerud, J., Falk-Petersen, I-B., Olsen, G.H., Camus, L. 2015. Acute and long-term biological effects of mechanically and chemically dispersed oil on lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*). Mar. Environ. Res. 105, 8-19.

Fukuda, K., Soderman, O., Lindman, B., Shinoda, K., 1993. Microemulsions formed by alkyl polyglucosides and an alkyl glycerol ether. Langmuir. 9, 2921-2925.

Garti, N., 1997. Double emulsions - Scope, limitations and new achievements. Colloid. Surface. A, 123, 233-246.

Gallarate, M., Carlotti, M. E., Trotta, M., & Bovo, S., 1999. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. Int. J. Pharm. 188, 233-241.

Ghosh, I., Mukherji, S. 2016. Diverse effect of surfactants on pyrene biodegradation by a Pseudomonas strain utilizing pyrene by cell surfasse hydrophobicity induction. Int. Biodeter. Biodegr. 108, 67-75.

Grigalunas, T.A., Anderson, R.C., Brown, G.M., Congar, R., Meade, N.F., Sorensen, P.E., 1986. Estimating the cost of oil spills: lessons from the Amoco Cadiz incident. Mar. Resour. Econ. 2, 239–263.

Habe, H., Omori, T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci. Biotech Bioch. 67, 225-243.

Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., Shutsubo, K., 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1, 63–70.

Harms, H, Smith, K.E.C., Wick, L.Y., 2010. Chapter 45: microorganism hydrophobic compound interactions. In: Timmis KN (ed) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer, Berlin, pp 1479–1490

Harms, H., Zehnder, A.J.B., 1995. Bioavailability of sorbed 3- chlorodibenzofuran. Appl. Environ. Microbiol. 61, 27–33.

Heipieper, J., Cornelissen, S., Pepi M., 2010. Surface properties and cellular energetics of bacteria in response to the presence of hydrocarbons, inHandbook of Hydrocarbon and Lipid

Microbiology, ed Timmis K. N., editor. (Heidelberg, Berlin: Springer), 1615–1624 doi: 10.1007/978-3-540-77587-4_113.

Huibers, P.D.T., Shah, D.O., 1997. Evidence for synergism in nonionic surfactante mixtures: enhancement of solubilization in water-in-oil microemulsions. Langmuir. 13, 5762-5765.

Kaczorek, E., Chrzanowski, L., Pijanowska, A., Olszanowski, A., 2008.Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipids and saponins. Biores. Technol. 99, 4285–4291.

Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. J. Environ. Manag. 71, 95–122.

Kingston, P. F., 2002. Long-term Environmental Impact of Oil Spills. Spill Sci. Technol. B. 7, 53-61.

Koren, O., Knezevic, V., Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2003. Petroleum pollution bioremediation using water-insoluble uric acid as the nitrogen source. Appl. Environ. Microbial. 69, 6337-6339.

Krasowska, A., Sigler, K., 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? Front. Cell. Infect. Microbiol. 4, 112. doi: 10.3389/fcimb.2014.00112.

Kundu, P., Agrawal, A., Mateen, H., Mishra, I.M., 2013. Stability of oil-in-water macro-emulsion with anionic surfactant: effect of electrolytes and temperature. Chem. Eng. Sci. 102, 176-185.

Kiao, J., Burgess, D.J., 2003. Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. AAPPS. PharmSci. 5, E7.

Ladino-Orjuela, G., Gomes, E., Silva, R., Salt, C., Parsons, J.R., 2016. Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Ver. Environ. Contam. T. 237, 105-121.

Laugel, C., Baillet, A., Youenang, M.P., Marty, J.P., Ferrier, D., 1998. Oil-water-oil multiple emulsions for prolonged delivery of hydrocortisone after topical application: comparation with simple emulsions. Int. J. Pharm. 160, 109-117.

Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbiol. Rev. 54, 305-315.

Leal-Calderon, F., Homer, S., Goh, A., Lundin, L., 2012. W/O/W emulsions with high internal droplet volume fraction. Food Hydrocolloid. 27, 30-41.

Lima-Morales, D., Jáuregui, R., Camarinha-Silva, A., Geffers, R., Pieper, D.H., Vilchez-Vargas, R., 2016. Linking microbial community and catabolic gene structures during the

adaptation of three contaminated soils under continuous long term pollutant stress. Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.03482-15.

Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Kalogerakis, N., 2007. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. Desalination, 211, 286–295

Mehdinia, A., Aghadadashi, V. and Fumani, N.S., 2015. Origin, Distribution and Toxicological Potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments from the Bushehr Coast, The Persian Gulf. Mar. Pollut. Bull. 90, 334-338.

Muschiolik, G., 2007. Multiple emulsions for food use. Curr. Opin. Colloid In. 12, 213- 220.

Nik, A.M., Wright, A.J., Corredig, M., 2010. Interfacial design of protein-stabilized emulsions for optimal delivery of nutrients. Food Funct. 1, 141-148.

Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N., 2008. Enhanced Bioremediation of Crude Oil Utilizing Lipophilic Fertilizers Combined with Biosurfactants and Molasses. Mar. Pollut. Bull. 56, 1855-1861.

O'Regan, J., Mulvihill, D.M., 2010. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: encapsulation and stability. Food Res. Int. 43, 224-231.

Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E., Irons, D.B., 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. Science 302, 2082–2086.

Prince, R.C., 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments. CRC Cr. Ver. Microbiol. 19, 217–242.

Prince, R.C., 2005. The Microbiology of Marine Oil Spill Bioremediation, p. 317–336. In Ollivier, B, Magot, M (eds.), Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, D.C.

Rodrigues, E.M., Kalks, K.H.M., Fernandes, P.L., Tótola, M.R., 2015a. Bioremediation strategies of hydrocarbons and microbial diversity in the Trindade Island shoreline – Brazil. Mar. Pollut. Bull. 101, 517-525.

Rodrigues, E.M., Kalks, K.H.M., Tótola, M.R., 2015b. Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island. Braz. J. Environ. Manag. 156, 15–22.

Rodrigues, E.M., Tótola, M.R., 2015. Petroleum: from basic features to hydrocarbons bioremediation in oceans. OALib. 2, 1-17.

Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 249-252.

Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. Curr. Opin. Biotechnol. 27, 191-194.

Rosen, M. J., 1989. Surfactants and Interfacial Phenomena, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, pp 170-205.

Rosenberg, E., 2012. Chapter 5: The hydrocarbon-oxidizing bacteria. In The prokaryotes, 4th ed.. Edited by Rosenberg E, DeLong E, Thompson F, Lorey S, Stackebrandt E.New York: Springer.

Rosenberg, E., Legman, R., Kushmaro, A., Adler, E., Abir, H., Ron, E.Z., 1996. Oil bioremediation using insoluble nitrogen source. J. Biotechnol. 15, 273-278.

Rubtsova, E.V., Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., 2012. Effect of cultivation conditions on the adhesive activity of Rhocodoccus cells towards n-hexadecane. Appl. Biochem. Microbiol. 48, 452-459.

Sanin, S.L., Sanin, F.D., Bryers, J.D., 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. Process Biochem. 38, 909–914.

Sapei, L., Naqvi, M.A., Rousseau, D., 2012. Stability and release properties of double emulsions for food applications. Food Hydrocolloid. 27, 316-323.

Sharkey T.D., 1996. Isoprene synthesis by plants and animals. Endeavour 20, 74–78.

Scherze, I., Knoth, A., & Muschiolik, G., 2006. Effect of emulsification method on the properties of lecithin- and Pgpr-stabilized water-in-oil-emulsions. J Disper Sci Technol. 27, 427-434.

Southam, G., Whitney, M., Knickerbocker, C., 2001. Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: implications for bioremediation. Int. Biodeter. Biodegrad. 47, 197-201.

Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., Oliveira, R.P.S., 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. Int. Biodeterior. Biodegrad. 89, 88–94.

Swannell, R.P.J., Lee, K., Mcdonagh, M., 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. Microbiol. Rev. 60, 342–365.

Tancsics, A., Farkas, M., Szoboszlay, S., Szabo, I., Kukolya, J., Vajna, B., Kovacs, B., Benedek, T., Kriszt, B., 2013. One-year monitoring of meta-cleavage dioxygenase gene

expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily I.2.C extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. Syst. Appl. Microbiol. 36, 339-350.

Tate, P.T., Shin, W.S., Pardue, J.H., Jackson, W.A., 2011. Bioremediation of an experimental oil spill in a coastal Louisiana salt marsh. Water Air Soil Pollut. 223, 1115–1123.

Tedajo, G.M., Bouttier, S., Fourniat, J., Grossiord, J.L., Marty, J.P., Seiller, M., 2005. Release of antiseptics from the aqueous compartments of a W/O/W multiple emulsion. Int. J. Pharm. 288, 63-72.

Vlaia, L., Vlaia, V., Miclea, L. M., Olariu, I., Coneac, G., 2009. Topical W/O/W double emulsions of Piroxicam: in vitro drug release study. Farmacia, 57, 639-647.

Warr, L.N., Friese, A., Schwarz, F., Schauer, F., Portier, R.J., Basirico, L.M., Olson, G.M., 2013. Bioremediating oil spills in nutrient poor ocean water using fertilized clay mineral flakes: some experimental constraints. Biotechnol. Res. Int. doi:10.1155/2013/704806.

Whitehead, A., 2013. Interactions between Oil-Spill Pollutants and Natural Stressors Can Compound Ecotoxicological Effects. Integr. Comp. Biol. 53, 635-647.

Xu, Y., Lu, M., 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparasion of diferente biostimulation and bioaugmentation treatments. J. Hazard. Mater. 183, 395-401.

Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Mar. Pollut. Bull. 51, 1071–1077.

Zhang, Y., Wang, F., Yang, X., Gu, C., Kengara, F.O., Hong, Q., Lv, Z., Jiang, X., 2011. Extracellular polymeric substances enhanced mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons in the two-liquidphase system for biodegradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90, 1063–1071.

Anexo 1

Depósito – Pedido de Patente: Emulsões duplas fertilizadas hidrofóbicas e uso destas

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

08/03/2016 870160008135
08:18
00.000.2.2.16.0024772.0

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 005074 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Viçosa
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 25944455000196
Nacionalidade: Brasileira
Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.
Cidade: Vicosa
Estado: MG
CEP: 36570-000
País: Brasil
Telefone: (31) 3899 1421
Fax: (31) 3899 2148
Email: propriedadeintelectual@ufv.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS E USO DESTAS

Resumo: A presente invenção refere-se a emulsões duplas compostas por água/óleo/água (W1/O/W2), compreendendo nutrientes inorgânicos, gelatina, óleo vegetal e surfactantes, para aplicação em águas oceânicas contaminadas por moléculas orgânicas hidrofóbicas, como hidrocarbonetos do petróleo. A composição e o uso do produto descrito podem se tornar uma alternativa para ajudar na mitigação dos impactos ambientais causados por derramamentos de petróleo no mar.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: MARCOS ROGÉRIO TÓTOLA
CPF: 42575443687
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Condomínio Monte Verde, 52; Bairro Quinta dos Guimarães
Cidade: Viçosa
Estado: MG
CEP: 36570-000
País: BRASIL
Telefone: (31) 389 92968
Fax:
Email: totolaufv@gmail.com

Inventor 2 de 3

Nome: EDMO MONTES RODRIGUES
CPF: 08726215616
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins
Endereço: Rua Murilo Rodrigues Pinto, 91, Bairro Praça da Bandeira
Cidade: Leopoldina
Estado: MG
CEP: 36700-000
País: BRASIL
Telefone: (32) 344 13319
Fax:
Email: edmomontes@yahoo.com.br

Inventor 3 de 3

Nome: ALVARO VIANNA NOVAES DE CARVALHO TEIXEIRA

CPF: 91726778649

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Papa João XXIII 205/306, Bloco 3, Bairro Lourdes

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36570-000

País: BRASIL

Telefone: (31) 992 323107

Fax:

Email: alvaro@ufv.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante pgto.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Resumo	RESUMO.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

☑ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

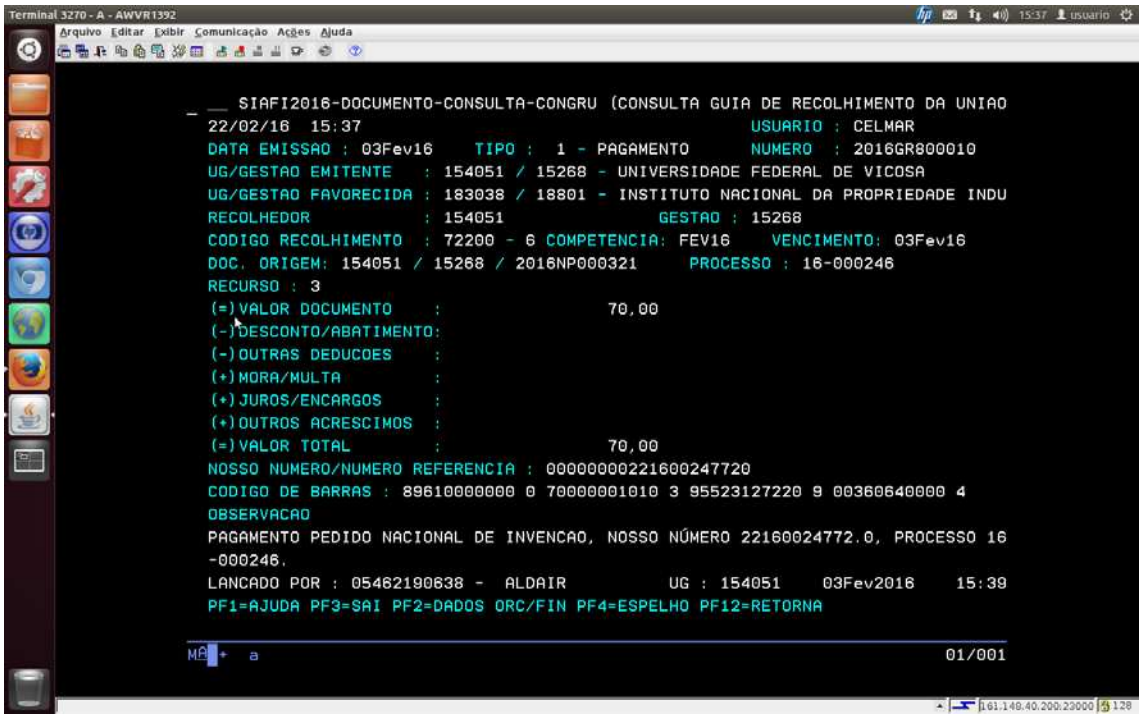
Declaração de veracidade

☑ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Obrigado por acessar o Peticionamento Eletrônico

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Este pedido foi enviado pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 08/03/2016 às 08:18


Terminal 3270 - A - AWVR1392
Arquivo Editar Exibir Comunicação Ações Ajuda
SIAFI2016-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
22/02/16 15:37 USUARIO : CELMAR
DATA EMISSAO : 03Fev16 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2016GR800010
UG/GESTAO EMITENTE : 154051 / 15268 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 154051 GESTAO : 15268
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: FEV16 VENCIMENTO: 03Fev16
DOC. ORIGEM: 154051 / 15268 / 2016NP000321 PROCESSO : 16-000246
RECURSO : 3
(=)VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-)DESCONTO/ABATIMENTO:
(-)OUTRAS DEDUCOES :
(+)MORA/MULTA :
(+)JUROS/ENCARGOS :
(+)OUTROS ACRESCIMOS :
(=)VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 000000002216002477 20
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
PAGAMENTO PEDIDO NACIONAL DE INVENCAO, NOSSO NÚMERO 22160024772.0, PROCESSO 16
-000246.
LANCADO POR : 05462190838 - ALDAIR UG : 154051 03Fev2016 15:39
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA
MA + a
01/001

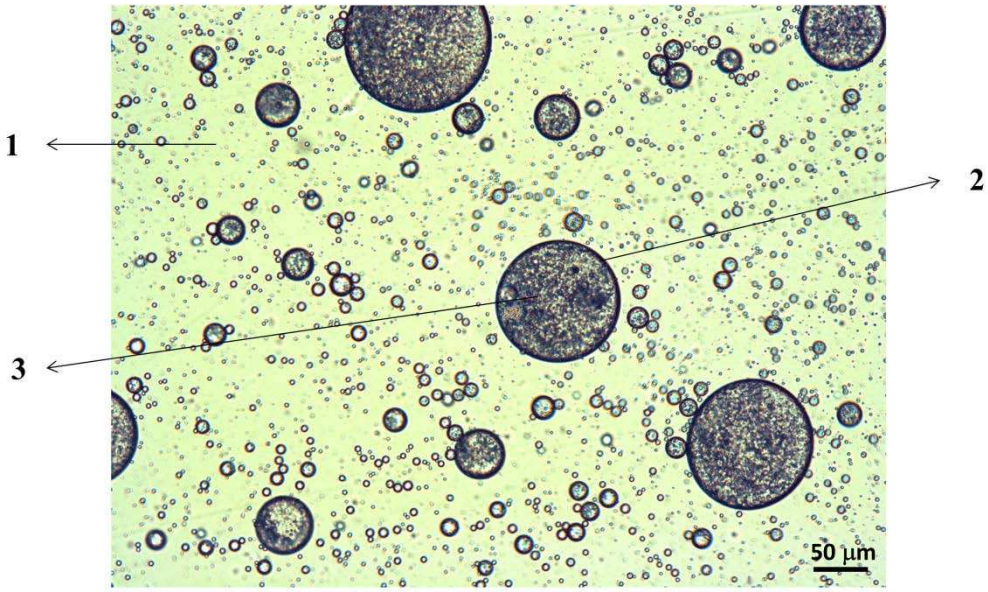


Figura 1

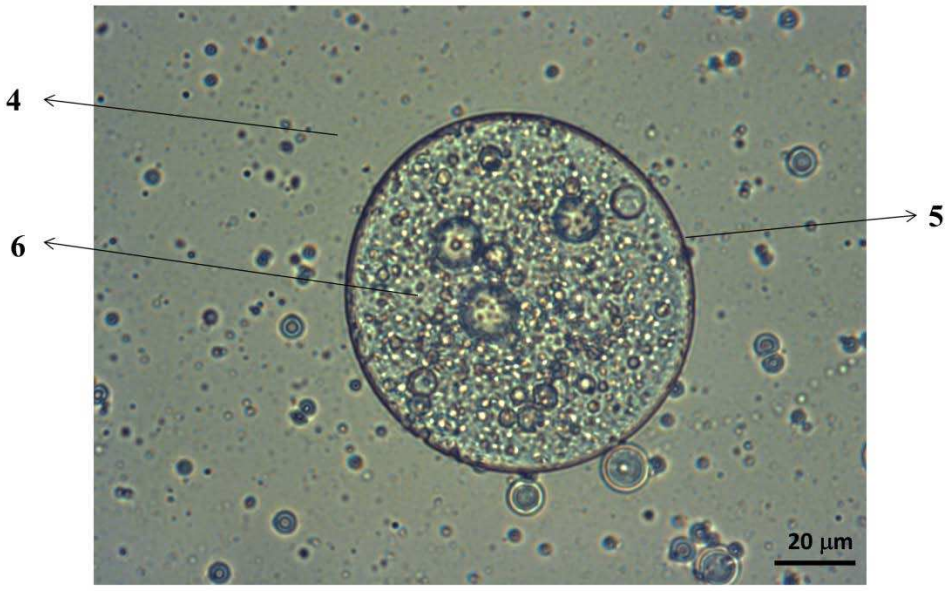


Figura 2

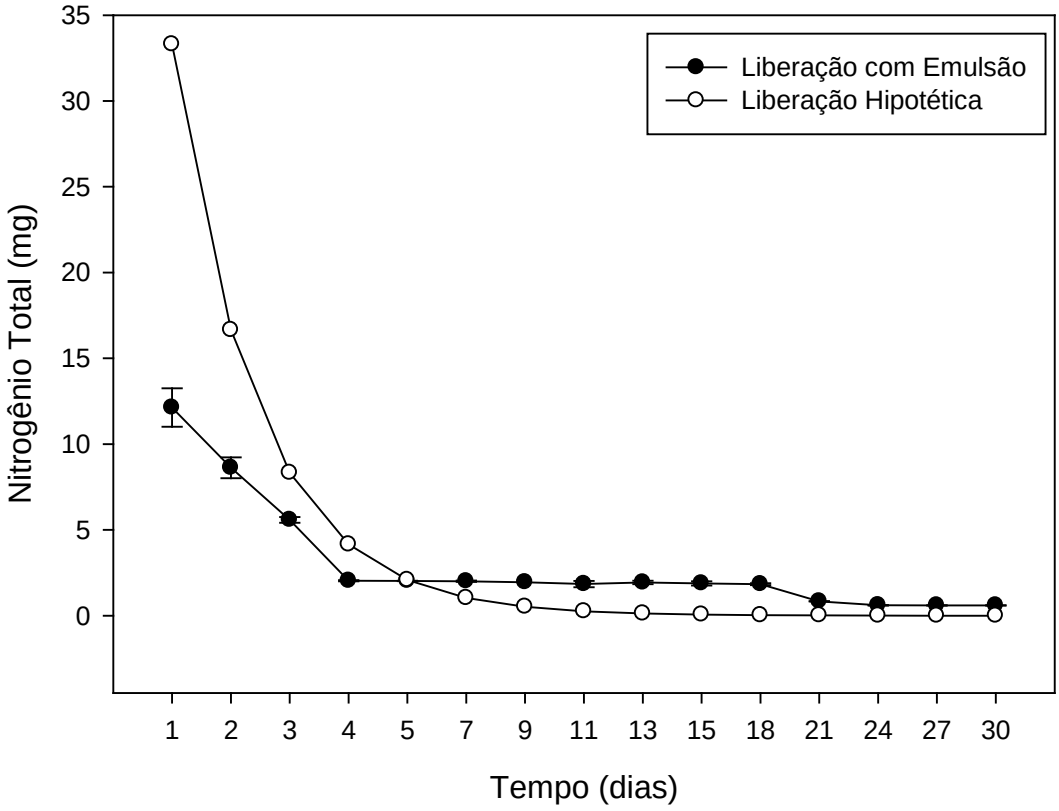

Liberação com Emulsão
Liberação Hipotética
Nitrogênio Total (mg)
Tempo (dias)
35
30
25
20
15
10
5
0
1
2
3
4
5
7
9
11
13
15
18
21
24
27
30

Figura 3

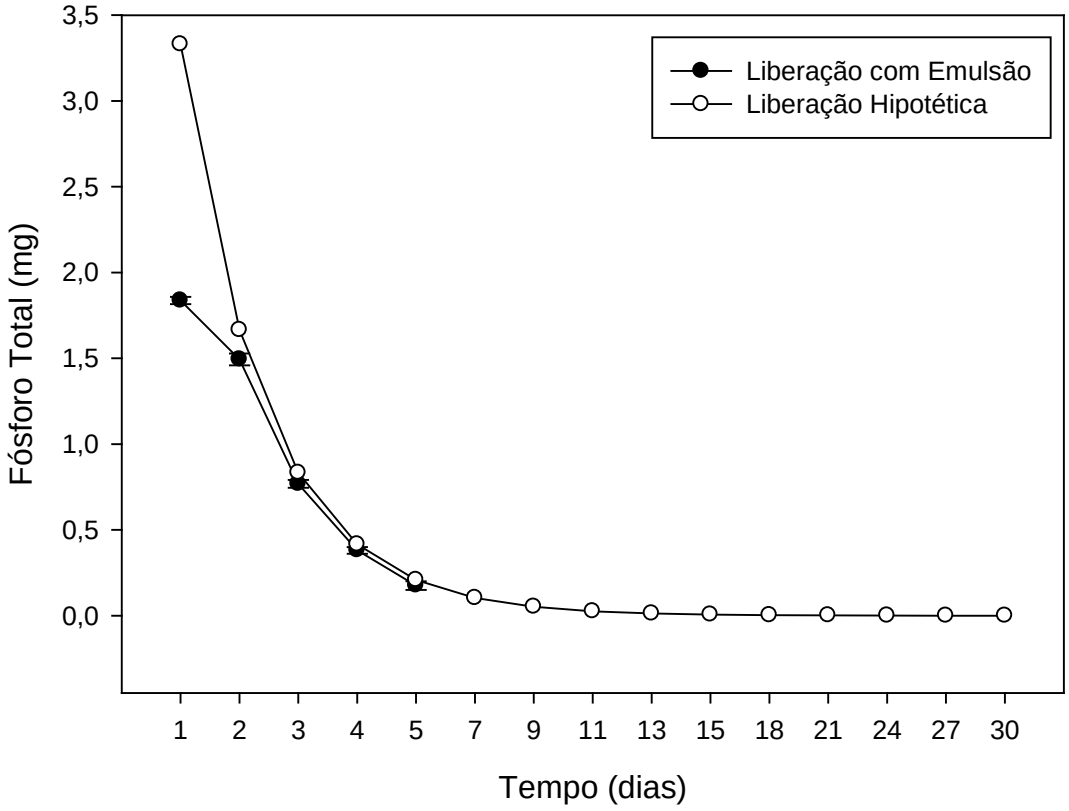

3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Fósforo Total (mg)
Liberação com Emulsão
Liberação Hipotética
1
2
3
4
5
7
9
11
13
15
18
21
24
27
30
Tempo (dias)

Figura 4

REIVINDICAÇÕES

1. EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS caracterizadas por compreenderem uma fase aquosa interna (W_1), uma fase oleosa (O) e uma fase aquosa externa (W_2).

2. EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pela fase aquosa interna (W_1) compreender de 0,1 a 10% (p/v) de gelatina, com porcentagem proteica entre 70 e 90%, hidratada com água salinizada, com concentração de cloreto de sódio (NaCl) entre 3,4 e 3,7% (m/v), solubilizada em temperatura entre 60 e 85 ºC, e um ou mais sais inorgânicos, que contenham nitrogênio, fósforo e/ou potássio em sua composição, em concentrações nas quais sejam solúveis no volume de fase aquosa interna utilizado.

3. EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pela fase oleosa (O) compreender um óleo vegetal que seja líquido em temperatura entre 15 e 30 ºC, e um surfactante de valor HLB entre 3 e 6, numa concentração entre 1 e 6% (v/v).

4. EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pela fase aquosa externa (W_2) compreender água salinizada, com concentração de cloreto de sódio (NaCl) entre 3,4 e 3,7% (m/v), e um surfactante de valor HLB entre 8 e 18, numa concentração entre 0,5 e 1,0% (v/v).

5. EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizadas pela emulsão água em óleo (W_1/O) compreender de 0,1 a 40% (v/v) de fase aquosa interna (W_1) e de 60 a 99,9% de fase oleosa (O).

6. EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizadas pela emulsão dupla (W_1/O/W_2) compreender de 0,1 a 20% (v/v) de W_1/O e de 80 a 99,9% (v/v) de fase aquosa externa (W_2).

7. USO DAS EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS, definidas nas reivindicações 1 a 6, caracterizadas por serem para a remediação biológica de águas oceânicas contaminadas com moléculas orgânicas hidrofóbicas.

EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS E USO DESTAS

Campo Técnico da Invenção

[1] A presente invenção refere-se a emulsões duplas compostas por água/óleo/água ($W_1/O/W_2$), contendo nutrientes inorgânicos, para aplicação em águas oceânicas contaminadas por moléculas orgânicas hidrofóbicas, como hidrocarbonetos do petróleo. O produto é de interesse de empresas que atuam na área de biorremediação ambiental e indústrias, à medida que estas demandem parte do orçamento para aplicações ambientais.

Estado da Técnica

[2] O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, portanto, uma rica fonte de carbono, e um dos principais contaminantes que causam problemas ambientais quando ocorrem acidentes envolvendo derramamento em águas oceânicas.

[3] Micro-organismos são ubíquos e possuem capacidade de metabolizar os hidrocarbonetos que compõe o petróleo. Embora a biodegradação desse contaminante em águas oceânicas seja possível, existem fatores limitantes à manutenção do metabolismo microbiano, principalmente quando em regiões distantes da costa, que corresponde a nutrientes inorgânicos, principalmente nitrogênio e fósforo.

[4] Emulsões duplas consistem em uma emulsão água em óleo dispersa como gotículas dentro de uma fase aquosa. Devido à presença da fase oleosa entre duas fases aquosas, a fase aquosa interna fornece potencial para o encapsulamento e liberação gradual de compostos químicos e bioativos. São estruturas com diâmetro na escala de micrômetros, que por possuírem uma porção oleosa as conferem hidrofobicidade superficial. Tal característica possibilita que essas micro estruturas tenham afinidade com moléculas orgânicas hidrofóbicas, como hidrocarbonetos. Ao serem aplicadas diretamente em uma região oceânica contaminada por petróleo e/ou derivados e pobre em nutrientes, as emulsões duplas fertilizadas permanecem na interface água/petróleo devido à afinidade hidrofóbica com o contaminante e pela sua menor densidade que a da água.

[5] Emulsões e micro emulsões já possuem aplicações em fármacos e cosméticos, por possuírem a capacidade de liberar gradualmente o seu conteúdo interno (Vlaia, L., Vlaia, V., Miclea, L. M., Olariu, I., & Coneac, G. 2009. Topical W/O/W double emulsions of Piroxicam: in vitro drug release study. Farmacia, 57(5), 639-647; Gallarate, M., Carlotti, M. E., Trotta, M., & Bovo, S. 1999. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. International Journal of Pharmaceutics, 188(2), 233e241.; Chengyu, G., Caibiao, H., Chaolong, M., Qiao, F., Tingkang, X., Qiang, X. 2016. Development and characterization of solid lipid microparticles containing vitamin C for topical and cosmetic use. European Journal of Lipid Science and Technology. doi: 10.1002/ejlt.201500373).

[6] O uso de emulsões é também realidade como metodologia para proceder com a recuperação avançada de petróleo, como descrito nos documentos de patente US 3,994,342 (1976), US 4,008,769 (1977) e C10802390-5 (2010), utilizando diferentes compostos para sua produção.

[7] O documento PI 0016281-7 (2000) descreve uma micro emulsão à base de misturas de ácidos, tensoativos, co-solvente, solvente e oxidante para a limpeza de resíduos de óleo e de lama de perfuração de poços.

[8] O documento PI 0605007-7 (2000) descreve uma composição para a remediação de solos e resíduos contaminados por hidrocarbonetos de alto peso molecular, entretanto, tal invenção não leva em consideração a remediação utilizando a capacidade metabólica de micro-organismos com capacidade de degradar o contaminante. Portanto, ocorre apenas a remoção de frações de hidrocarbonetos do solo contaminado.

[9] O documento US 5,543,073 (1996) descreve a composição de uma emulsão para promover a limpeza de ambientes contaminados. Ao empregar surfactantes, um eletrólito e co-surfactantes em sua composição, essa emulsão propicia principalmente maior solubilização de compostos hidrofóbicos e não sua efetiva remoção do ambiente.

[10] O documento US 6,806,078 (2004) descreve o uso de emulsões para promover a remediação biológica de águas subterrâneas em condições de anaerobiose contaminadas por compostos orgânicos halogenados e inorgânicos

que podem ser biodegradados ou imobilizados por micro-organismos anaeróbicos. No mesmo sentido, a patente WO 02/36498 (2002) descreve um método para a remediação de aquíferos e águas subterrâneas contaminadas por compostos orgânicos halogenados, alguns inorgânicos e metais pesados e radionuclídeos ao aplicar um óleo inócuo na forma de emulsão, preferencialmente com um emulsificante alimentício natural.

[11] Por fim, o documento US 2012/0094360 (2012) descreve uma metodologia para bioremediar ambientes aquáticos contaminados com petróleo a partir da modificação estrutural da proteína caseína, tornando-a semi-insolúvel e incorporando micro-organismos nessa estrutura. Entretanto, para águas oceânicas abertas, essas estruturas seriam perdidas por conta da dispersão no mar, visto que sua superfície de contato não possui afinidade pelo petróleo.

[12] A aplicação das emulsões duplas fertilizadas hidrofóbicas em águas oceânicas contaminadas por moléculas orgânicas hidrofóbicas dará suporte à biodegradação do contaminante por parte de micro-organismos presentes no local ou mesmo micro-organismos que, com já conhecida capacidade de degradar hidrocarbonetos, sejam adicionados ao local contaminado.

[13] A superfície das emulsões, objeto do presente pedido de patente, é composta por óleo vegetal, o que lhes confere característica hidrofóbica, que por sua vez, tem afinidade por moléculas orgânicas hidrofóbicas, além de sua menor densidade que a da água, possibilitando sua permanência na superfície da água, onde permanece uma delgada camada do contaminante. Desta maneira, as emulsões permanecem na interface água/petróleo e não são perdidas no ambiente. À medida que as emulsões perdem estabilidade e são degradadas naturalmente por fatores físicos, químicos e biológicos, a porção aquosa interna, contendo nutrientes inorgânicos, é liberada, dando suporte ao metabolismo de micro-organismos utilizando tais nutrientes (contendo nitrogênio, fósforo e potássio) juntamente com o petróleo, fonte de carbono. Desta maneira, com a permanência da liberação gradual da fase aquosa interna das emulsões, o metabolismo microbiano pode ser suportado por um maior tempo, quando comparado à aplicação de tais nutrientes diretamente no mar, que seriam rapidamente perdidos.

Descrição das Figuras

[14] A Figura 1 é uma fotomicroscopia em microscópio de luz, onde são mostradas algumas partículas de emulsões dispersas na fase aquosa externa. A parede de cada uma das gotículas dispersas é composta de óleo de canola, e no interior, compreendendo a fase aquosa interna, estão contidas gotículas menores, estabilizadas pela gelatina, de forma que é proporcionada maior estabilidade ao sistema. Na imagem é possível notar que existem partículas de distintos tamanhos, sendo que as partículas menores possuem maior estabilidade, enquanto as maiores, menor estabilidade. A diferença entre os tamanhos das emulsões é desejável, à medida que diferentes tamanhos possibilitarão uma liberação gradual da fase aquosa interna contendo nutrientes inorgânicos.

[15] Na Figura 2, também uma fotomicroscopia em microscópio de luz, é mostrada em detalhes e de maneira mais clara a estrutura de uma gotícula da emulsão. As gotículas que compõe a fase aquosa interna das emulsões ficam dispostas no interior da gotícula composta por óleo de canola.

[16] A Figura 3 é um gráfico com resultados provenientes de um experimento envolvendo o emprego das emulsões duplas. Nela é mostrada a liberação gradual (ao longo de 30 dias) de compostos nitrogenados adicionados na fase aquosa interna das emulsões duplas. É feita uma comparação com valores hipotéticos, calculados caso os nutrientes fossem adicionados na forma pura no meio líquido o qual as emulsões se encontram.

[17] A Figura 4 é um gráfico com resultados provenientes de um experimento envolvendo o emprego das emulsões duplas. Nela é mostrada a liberação gradual (ao longo de 30 dias) de compostos fosfatados adicionados na fase aquosa interna das emulsões duplas. É feita uma comparação com valores hipotéticos, calculados caso os nutrientes fossem adicionados na forma pura no meio líquido o qual as emulsões se encontram.

Descrição detalhada da invenção

[18] Para produzir as emulsões, foi utilizada água salinizada (entre 3,4 e 3,7% de NaCl m/v) como fase aquosa. É necessária também a utilização de gelatina com porcentagem proteica entre 70 e 90%, bem como sais inorgânicos

que sejam fontes de nitrogênio, fósforo e potássio. A utilização de óleo vegetal também é necessária, com exceção de óleos vegetais com possibilidade de mudanças de estado físico a temperatura ambiente, ou seja, deve-se utilizar óleos vegetais que sejam líquidos em temperaturas entre 15 e 30 ºC. Para proporcionar estabilidade ao produto, faz-se necessária ainda a utilização de um surfactante de valor de balanço hidrofílico-lipofílico (valor HLB) entre 8 e 18, bem como um surfactante de valor HLB entre 3 e 6.

[19] A fase aquosa interna (item 3 da Figura 1, item 6 da Figura 2) é inicialmente produzida com a hidratação em água salinizada de 0,1 a 10% (p/v) de gelatina até sua completa solubilização, em temperatura entre 60 e 85 ºC. Após tal procedimento, adiciona-se os nutrientes inorgânicos.

[20] À fase oleosa, composta pelo óleo vegetal, (item 2 da Figura 1, item 5 da Figura 2) deve-se adicionar um surfactante de valor HLB entre 3 e 6, numa concentração entre 1 e 6% (v/v), seguido de homogeneização.

[21] Por fim, a fase aquosa externa (item 1 da Figura 1, item 4 da Figura 2) é composta por um surfactante de valor HLB entre 8 e 18, numa concentração entre 0,5 e 1,0% (v/v), em água salinizada.

[22] A emulsão dupla ($W_1/O/W_2$) é preparada em dois diferentes estágios. Primeiramente, é realizada a produção da emulsão água em óleo (W_1/O), contendo um volume entre 0,1 e 40% (v/v) de fase aquosa interna (W_1) e um volume entre 60% e 99,9% (v/v) de fase oleosa. Após a solubilização da gelatina na fase aquosa interna, os nutrientes inorgânicos devem ser adicionados lentamente em quantidades que sejam solúveis no volume de fase aquosa interna utilizada. Então, W_1 e O devem ser unidas e submetidas à agitação em agitador do tipo Ultra-Turrax entre 24000 e 27000 rpm, entre 2 e 4 min. A emulsão resultante deve ser imediatamente resfriada em banho-maria entre 0 e 4 ºC para gelificar a gelatina presente na fase aquosa dispersa.

[23] No segundo estágio, a emulsão W_1/O permanece em temperatura ambiente (24 a 26 ºC) para melhorar a eficiência da emulsificação.

[24] A emulsão dupla ($W_1/O/W_2$) finalmente é preparada pela adição gradual de W_1/O (de 0,1 até 20% v/v) à fase aquosa externa (W_2), seguido por

nova agitação em agitador do tipo Ultra-Turrax entre 10000 e 20000 rpm, por até 2 min e subsequente resfriamento entre 0 e 4 ºC em banho-maria.

[25] Após o cálculo da estimativa da quantidade de moléculas orgânicas hidrofóbicas (contaminante) presente no ambiente a ser remediado, bem como da quantidade de carbono presente no volume do óleo vegetal a ser adicionado na forma de fase oleosa da emulsão, deve-se levar em conta a quantidade de nitrogênio, fósforo e potássio contido nas emulsões, de forma que seja possível se estabelecer uma razão C:N igual ou menor que 10:1, C:P igual ou menor que 100:1 e C:K igual ou menor que 1000:1.

[26] A aplicação do produto em campo deve ser planejada, de forma que preferencialmente ocorra por uma aeronave contendo um pulverizador acoplado. Tal pulverizador deve proporcionar a liberação de gotas grossas, com diâmetro acima de 300 µm para não romper fisicamente as emulsões de maior diâmetro.

Experimento de Demonstração

[27] Em triplicata, em frascos respirométricos de vidro foram adicionados 50 mL de água marinha oligotrófica (3,7 g/L de NaCl) e também as emulsões duplas, onde NH_4NO_3 e K_2HPO_4 foram as fontes de nitrogênio, fósforo e potássio de tal forma que a quantidade desses elementos em cada frasco fosse de 66,66 mg de nitrogênio, 6,66 mg de fósforo e 240 mg de potássio. As emulsões foram produzidas utilizando-se 0,75% de gelatina para solidificar a fase aquosa interna e como fase oleosa foi utilizado óleo de canola. O surfactante de baixo valor HLB utilizado foi o polirricinoleato de poliglicerol (Pgpr) a 2% e o de alto valor HLB foi o coco glicosídeo a 0,8%.

[28] O volume de água do mar utilizado em cada frasco continha nitrogênio total igual a 0,056 mg em cada um deles. A quantidade de fósforo total foi mais baixa que o limite de detecção da técnica de quantificação utilizada. No interior de cada um dos frascos respirométricos foi colocada uma ponteira de pipeta P1000 para permitir acesso à parte inferior dos frascos.

[29] A temperatura foi mantida constante em 24 ºC durante 30 dias. Para permitir movimentação dentro do sistema, a cada 5,9 h ocorreu injeção direta de ar no interior da solução aquosa com duração de 5 min, com fluxo de ar igual a 500 mL/min. Durante os primeiros 5 dias de experimento, metade do volume dos

frascos foi substituído diariamente. O mesmo volume foi substituído do sexto até o 15º dia a cada 2 dias, sendo que do 16º até o 30º dia, a substituição ocorreu a cada 3 dias. Para retirar metade do volume de cada um dos microcosmos, uma micropipeta de vidro era inserida no interior das ponteiras de pipeta P1000 existente nos frascos, de forma que o fundo dos microcosmos se tornou acessível. Desta maneira, a parte superior dos microcosmos não sofria distúrbios, pois é onde se concentravam as emulsões duplas, devido à sua menor densidade em relação à água. Para repor o volume retirado, a mesma água do início do experimento foi armazenada a 4 ºC e então o mesmo volume retirado, era reposto durante as substituições.

[30] Os volumes obtidos em cada tempo de coleta foram armazenados a 4 ºC e após o término dos experimentos foram submetidos à análises de nitrogênio e fósforo total. Os procedimentos de quantificação de nitrogênio e fósforo foram realizados no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa/Brasil, onde o nitrogênio total foi quantificado pela metodologia de Kjeldahl, enquanto o fósforo total foi quantificado usando ensaios espectrofotométricos. Os resultados do experimento são mostrados graficamente nas Figuras 3 e 4.

Conclusão

[31] A composição e o uso do produto descrito podem se tornar uma alternativa para ajudar na mitigação dos impactos ambientais causados por derramamentos de moléculas orgânicas hidrofóbicas, como hidrocarbonetos do petróleo, no mar. A maneira simples e de baixo custo de produzir as emulsões duplas fertilizadas podem se tornar atrativa para as empresas que atuam na área de biorremediação ambiental.

RESUMO

EMULSÕES DUPLAS FERTILIZADAS HIDROFÓBICAS E USO DESTAS. A presente invenção refere-se a emulsões duplas compostas por água/óleo/água (W_1/O/W_2), compreendendo nutrientes inorgânicos, gelatina, óleo vegetal e surfactantes, para aplicação em águas oceânicas contaminadas por moléculas orgânicas hidrofóbicas, como hidrocarbonetos do petróleo. A composição e o uso do produto descrito podem se tornar uma alternativa para ajudar na mitigação dos impactos ambientais causados por derramamentos de petróleo no mar.

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

Nossos estudos foram pioneiros ao mostrar que representantes bacterianos presentem na costa da Ilha da Trindade, ambiente considerado pristino, possuem capacidade metabólica de proporcionar a degradação de hidrocarbonetos do petróleo. Os *Genome Announcement*s publicados darão suporte ao melhor entendimento do metabolismo de *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1, bem como ajudará a verificar as características genômicas que são desejáveis durante seu uso em processos de biorremediação de hidrocarbonetos. As vias biossintéticas encontradas também podem ser um ponto de partida para o estudo dessas bactérias em outras aplicações biotecnológicas, como biodegradação de agrotóxicos e produção de biocombustíveis

A microbiota do entorno da Ilha da Trindade não apresentou, de acordo com as condições impostas, capacidade de promover a cooxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos quando outro PAH foi disponibilizado no ambiente. Embora a contaminação por hidrocarbonetos resulte em considerável mudança na estrutura da comunidade bacteriana e na diminuição da diversidade beta, a variação em sua estrutura entre os tratamentos contaminados foi de apenas alguns taxa, considerando a beta diversidade. Este trabalho reforça a importância de minimizar os riscos e consequências de derramamentos de óleo próximo a ilhas oceânicas, visto que a comunidade microbiana é a base para toda a teia trófica do ambiente. Micro-organismos isolados desse tipo de ambiente tem potencial biotecnológico para a biodegradação de hidrocarbonetos.

O uso de emulsões W/O/W fertilizadas são uma alternativa para a bioestimulação em ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. A liberação gradual de nutrientes provenientes da fase aquosa interna pode dar suporte durante alguns dias ao crescimento microbiano na interface água/óleo e auxiliar na biodegradação dos hidrocarbonetos. No mesmo sentido, as bactérias hidrocarbonoclásticas utilizadas como inóculos são indicadas para promover a bioaumentação em episódios de contaminação oceânica. Esses isolados, além de degradarem frações de hidrocarbonetos, o fazem com eficiência à medida que aumentam a hidrofobicidade da superfície celular, o que promove a adesão celular ao substrato hidrofóbico.