

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
COORDENADORIA ESPECIAL DE OCEANOGRAFIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

Lisa Victória Melo Assunção

**Bioprospecção de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos Oriundos de
Solos contaminados por Biocombustíveis B20 E B100**

Florianópolis

2023

Lisa Victória Melo Assunção

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS
ORIUNDOS DE SOLOS CONTAMINADOS POR BIOCOMBUSTÍVEIS B20 E B100

Trabalho de Conclusão de Curso submetido
ao curso de Oceanografia do Centro de
Física e Matemática da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a obtenção do título de
Bacharela em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado
Duarte

Coorientador: Ms. João Paulo Silva Monteiro

Florianópolis

2023

Assunção, Lisa Victória Melo

Bioprospecção de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos Oriundos de Solos contaminados por Biocombustíveis B20 E B100 / Lisa Victória Melo Assunção ; orientador, Rubens Tadeu Delgado Duarte, coorientador, João Paulo Silva Monteiro, 2023.

59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Graduação em Oceanografia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Oceanografia. 2. Bioprospecção. 3. Biorremediação. 4. Biodiesel (B20 e B100). 5. Bactérias halotolerantes. I. Duarte, Rubens Tadeu Delgado. II. Monteiro, João Paulo Silva. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Oceanografia. IV. Título.

Lisa Victória Melo Assunção

Bioprospecção de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos Oriundos de Solos contaminados por Biocombustíveis B20 E B100

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bioprospecção de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos Oriundos de Solos contaminados por Biocombustíveis B20 E B100 e aprovado em sua forma final pelo Curso Oceanografia.

Florianópolis, 14 de junho de 2023.

Profa. Dra. Alessandra Larissa D' Oliveira Fonseca,
Coordenadora do Curso

Banca examinadora

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte
Orientador

Prof. Dr. Admir José Giachini
UFSC

Prof.^a Dr.^a Juliana Leonel
UFSC

Florianópolis, 2023.

Quero dedicar esta monografia ao meu amado pai, Francisco (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Lídia, por ser como um porto seguro pra mim. Por ser minha confidente, minha amiga, melhor abraço, melhor carinho. É um exemplo de pessoa. É amor, é ternura, é disciplina, é respeito. Eu sou a mulher mais grata do mundo por ter esse exemplo genuíno de amor em minha vida.

Ao meu pai, Anderson, que sempre luta para não expor seus sentimentos, mas que sempre os mostra da sua maneira. Me inspiro nele para construir minha vida. Eu consigo ver em seus olhos o quanto torce por mim e jamais esquecerei o quanto me apoiou quando tomei a decisão de partir pra tão longe de casa.

Ao meu pai, Francisco, por ser um exemplo de integridade, por ter sido forte até o fim e por ter dedicado sua vida aos seus cinco filhos. Guardo seu amor como o meu mais precioso tesouro.

À minha irmã, Raphaella, por ser meu maior exemplo de generosidade desde a infância. Obrigada por fazer de tudo para me dar uma atenção em meio a tantos afazeres de uma mãe empreendedora. Me sinto abraçada sempre que ouço sua voz doce e acolhedora.

Aos meus irmãos Paulo Victor, Gabriella e Carlos Eduardo, que depositam tanta confiança e amor em mim de forma que eu não sei reagir propriamente. Vocês são meu exemplo de força, esforço e dedicação. Aos meus sobrinhos, Gabriel, Frederico, Marina e Elisa, por serem o motivo de tanta alegria da nossa família.

À Clara Agostinho, minha melhor amiga que se tornou minha segunda família nos últimos anos. É lindo ver como nossa amizade permanece forte e leve como sempre foi. Amo você.

Às amigas que fiz durante meu período de graduação. Em especial à Bruna Hoff, Bruna C., Giulia, Julia, Malu, Júlio, Lucas, Henrique, Mateus, Tainá e Rafa. Afirmo com convicção que os momentos juntos a vocês me ajudaram a resgatar a felicidade e otimismo mesmo nos momentos mais caóticos. Agradeço também à Isabel, pelas conversas, risadas, conselhos e momentos que nos uniram e nos fizeram amadurecer ao longo desta jornada. Agradeço também ao meu companheiro, Arthur por se fazer presente nos momentos de insegurança e

ansiedade e por demonstrar tamanho carinho e afeto durante a etapa final deste trabalho..

Ao meu orientador Prof. Rubens Duarte por contribuir com ensinamentos e incentivos ao longo da minha graduação e durante a produção deste trabalho. Ao meu coorientador, João, por se disponibilizar para me ajudar com as metodologias, por me motivar a buscar conhecimento e por trazer bom humor aos meus dias no MIP.

Agradeço também aos docentes do curso de Oceanografia, por compartilharem experiências, conhecimento, e por lutarem pela construção de um curso que oferece educação qualificada aos futuros oceanógrafos.

Ao MEC por investir em embarcações científicas que proporcionaram experiências acadêmicas e profissionais das quais levarei para toda a vida. E por fim sou imensamente grata à Universidade Federal do Estado de Santa Catarina por oferecer oportunidades em diversas áreas do conhecimento e pelo investimento em educação pública, acessível e de qualidade.

RESUMO

Os possíveis danos causados pelo derramamento de combustíveis fósseis e biocombustíveis representam risco para áreas ecologicamente sensíveis. Regiões das águas marítimas ou interiores são definidas por ato do Poder Público, como áreas carentes de medidas especiais para a proteção e a preservação do meio ambiente, com relação à passagem de navios. Reconhecendo a necessidade de adotar métodos de remediação contra substâncias nocivas descarregadas em substratos e corpos d'água, o presente estudo buscou identificar, ao nível de gênero/espécie, doze bactérias com potencial biorremediador, que foram recuperadas da coleção de microrganismos do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA), as quais foram coletadas em um experimento de campo de liberação controlada de Biodiesel (B20 e B100). No presente trabalho, os isolados P10R14 e P10R16 foram identificados como pertencentes ao mesmo filotipo com base nos resultados da técnica de BOX-PCR. O sequenciamento do gene RNAr 16S foi empregado para a análise filogenética e classificação por gênero dos isolados. O efeito da salinização do ambiente foi investigado com o intuito de avaliar a aplicabilidade desses organismos em ambientes costeiros e oceânicos em períodos futuros, revelando uma resposta significativa em meios de cultura contendo de 0 a 10% de NaCl. Além disso, visando à aplicação em processos de biorremediação in situ, os isolados também foram submetidos a uma avaliação qualitativa de seu potencial de produção de biossurfactantes. Observou-se que o meio de cultura utilizado exerceu uma influência limitante na produção dessas substâncias de tensão superficial reduzida. A capacidade de adaptação dos isolados a ambientes extremos os torna excelentes candidatos a metodologias de biorremediação, no entanto a possível presença de espécies patogênicas demonstra necessidade de estudos que visam a mitigação de impactos na aplicação destes microrganismos em ambientes contaminados.

Palavras-chave: Bioprospecção. Biorremediação. Biodegradação. Bactérias halotolerantes. Biodiesel (B20 e B100). Gene RNAr 16S.

ABSTRACT

The possible damage caused by the spillage of fossil fuels and biofuels represents a risk to ecologically sensitive areas. The regions of maritime or internal waters are defined by the act of the Public Power, as areas lacking special facilities for the protection and preservation of the environment, with regard to the passage of ships. Recognizing the need to adopt remediation methods against harmful substances discharged into substrates and water bodies, the present study sought to identify, at the genus/species level, twelve bacteria with bioremediating potential, which were recovered from the collection of microorganisms at the Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA), which were collected in a field experiment of controlled release of Biodiesel (B20 and B100). In the present work, the P10R14 and P10R16 isolates were identified as belonging to the same phylotype based on the results of the BOX-PCR technique. Sequencing of the 16S rRNA gene was used for phylogenetic analysis and classification by genus of isolates. The effect of environmental salinization was investigated in order to evaluate the applicability of these organisms in coastal and oceanic environments in future periods, revealing a significant response in culture media containing 0 to 10% NaCl. Furthermore, with a view to application in in situ bioremediation processes, the isolates were also approved for a qualitative assessment of their potential to produce biosurfactants. Note that the culture medium used exerted a limiting influence on the production of these reduced surface tension substances. The ability of isolates to adapt to extreme environments makes them excellent candidates for bioremediation methodologies, however the possible presence of pathogenic species demonstrates the need for studies aimed at mitigating impacts in the application of these microorganisms in contaminated environments.

Keywords: Bioprospecting; Bioremediation; Biodegradation; Halophilic bacteria. Biodiesel (B20 and B100); 16S rRNA gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Localização do Núcleo Ressacada de Pesquisa em Meio Ambiente (REMA) na Ilha de Santa Catarina..... 21
- Figura 2.** Alinhamento no sentido 5' -3' de sequências do gene RNA 16S dos isolados P06R08, P06R10, P06R12, P10R13, P10R15, P10R16, P10R18, P10R19 e sequências referenciais..... 29
- Figura 3.** Frascos com isolados bacterianos em meios de cultura com NB em concentrações de NaCl em 0, 2, 5 e 10%. Incubados em Shaker (Tecnal: modelo te-421) a 28 °C a 130rpm..... 30
- Figura 4.** Imagens macroscópicas dos isolados bacterianos coletados nos poços de monitoramento, 05 e 10, no REMA..... 33
- Figura 5.** Isolados bacterianos após metodologia de Coloração de Gram. Imagens obtidas por meio de Microscopia Óptica no aumento de 1000x..... 34
- Quadro 1.** Caracterização Macroscópica e Microscópica dos isolados..... 35
- Figura 6.** Perfil de amplificação obtido por eletroforese em gel, a partir do método de amplificação BOX-PCR, dos isolados representantes dos 12 perfis. O marcador molecular é 1kb DNA ladder..... 36
- Figura 7.** Dendograma filogenético representando relações evolutivas entre os isolados nativos de poços de monitoramento contaminados com Biodiesel B20 e B100, identificados por meio de sequenciamento do gene RNAr 16S (5' - 3'). O método de construção foi calculado pelo algoritmo “maximum-likelihood estimation-MLE” com “bootstrap” de 1000 repetições..... 42
- Figura 8.** Frascos com inóculos após período de incubação em meio ágar nutriente com 0, 2, 5 e 10% de NaCl..... 43
- Figura 9.** Densidade óptica das amostras após o período de 5 dias de incubação em meio de cultura caldo nutriente com 0, 2, 5 e 10% de NaCl..... 44
- Figura 10.** Crescimento em placa de Petri, com ágar nutriente, da amostra P06R12 após estresse salino..... 45

Figura 11. Tensão Superficial nos frascos com meio MSM e Biodiesel comercial como fonte de carbono após 7 dias de incubação em Shaker. Controle = Frasco sem inóculo..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica e similaridade de isolados identificados por sequenciamento do gene RNAr 16S. N° de id. = Número de identificação no banco de dados do NCBI..... 38

Tabela 2. Valores de Absorbância quantificada em densidade óptica por Espectrofotometria. F1 = Frasco 1; F2 = Frasco 2; F3 = Frasco 3..... 37

Tabela 3. Dados de tensão superficial do meio de cultura líquido após inoculação em MSM. F1 = Frasco 1; F2 = Frasco 2; F3 = Frasco 3..... 49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

B100	Biodiesel Puro
B20	Combustível heterogêneo com 80% de diesel e 20% biodiesel de soja.
BH	Meio mineral Bushnell Haas
BLASTN	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
BTEX	A sigla corresponde aos compostos orgânicos voláteis Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
BTX	Apenas Benzeno, Tolueno e Xileno
DAM	Drenagem Ácida de Mina
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
GRAs	Genes Resistentes a Antibióticos
HCP	Hidrocarbonetos de Petróleo
MSM	Meio Salino Mínimo
NB	Nutrient Broth; Caldo Nutriente
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAHs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
REMA	Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente
RL	Ramnolipídeos
rpm	Rounds per minute; Voltas por minuto
TAE 1x	Tris acetato-EDTA
UFCs	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	ÁREA DE ESTUDO	21
3.2	ENRIQUECIMENTO DE AMOSTRAS	20
3.3	IDENTIFICAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS	23
3.3.1	Descrição Macroscópica de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)	23
3.3.2	Coloração De Gram	23
3.4	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS	24
3.4.1	Extração do DNA genômico	24
3.4.2	Quantificação do DNA genômico Extraído	25
3.4.3	Caracterização Molecular dos Isolados por BOX-PCR	25
3.4.4	Purificação do DNA genômico e amplificação do gene RNAr 16S	26
3.4.4	Sequenciamento e Análise do gene RNAr 16S	27
3.5	ENSAIO DE SELEÇÃO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES	29
3.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA E COLORAÇÃO DE GRAM	33

4.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	36
4.2.1	BOX-PCR	36
4.2.2	Sequenciamento do gene RNAr 16S	37
4.3	ENSAIO DE SELEÇÃO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES	43
4.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	45
4.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
5	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por combustíveis fósseis associada a atividades antrópicas e ao desenvolvimento industrial, estimula a exploração realizada pelo mercado petrolífero. No Brasil, a tendência anual prevê a expansão de áreas de exploração de reservas de petróleo. Segundo o Anuário Estatístico publicado em 2022 pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), em 2021 houve um aumento de 20,3% no reconhecimento de áreas de reservatórios avaliados que se estimam potencial comercial em comparação ao ano anterior (BRASIL, 2022).

Atualmente os combustíveis de petróleo fornecem mais de 95% da energia de transporte do mundo, entretanto, se trata de um recurso finito. Estudos com biocombustíveis têm recebido atenção, pela percepção de que eles representam o único grande substituto de curto prazo para esses combustíveis. Os principais biocombustíveis atuais – etanol e biodiesel – têm a grande vantagem de serem facilmente integrados à vasta infraestrutura estabelecida para combustíveis derivados do petróleo (WORLDWATCH INSTITUTE, 2007). No Brasil, a introdução do biodiesel na matriz energética ocorreu em 2005 (BRASIL, 2005).

O biodiesel puro, produzido a partir de óleos vegetais, residuais e até restos de gorduras animais, como o sebo bovino, contém em sua composição a biomassa proveniente de matéria orgânica, e portanto se trata de uma fonte renovável com baixo impacto ambiental. A legislação atual propõe que uma parcela do biocombustível produzido seja adicionada ao combustível comercial de forma que este apresente menor impacto ambiental (BRASIL, 2014). No entanto, mesmo que biocombustíveis heterogêneos como o biodiesel B20 (mistura de 20% de biodiesel com 80% de diesel, em volume/volume) apresentem menor potencial de contaminação, a parcela de combustíveis fósseis contém hidrocarbonetos monoaromáticos como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), que são extremamente tóxicos à saúde humana e ambiental (SILVA, *et al.*, 2002). Estudos

com BTEX identificaram efeitos neurotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos não apenas para humanos, mas também para flora, fauna e outros organismos (FARHADIAN *et al.*, 2008; LEAHY *et al.*, 2003).

Neste cenário, derramamentos acidentais com quantidades significantes podem comprometer atividades metabólicas de organismos que vivem no solo e em recursos hídricos superficiais e subterrâneos. Um evento que exemplifica o impacto causado por componentes do petróleo ocorreu em agosto de 2019, na região Nordeste do Brasil, onde foram detectadas manchas de óleo que posteriormente foram identificadas como óleo bruto/petróleo. A contenção do espalhamento das manchas de óleo foi marcada pela participação da população local que teve contato direto com o material tóxico. Até novembro do mesmo ano, somente no estado de Pernambuco, foram notificados 149 casos de intoxicação aguda decorrentes da exposição por via cutânea e respiratória (CARMO *et al.*, 2020)

A contaminação em solo e águas subterrâneas pode criar fontes de poluição de águas superficiais (GOV.UK, 2017) e, assim, pode resultar em efeitos ecotoxicológicos em ecossistemas terrestres, subterrâneos e aquáticos (FENT, 2004). Durante etapas de produção, transporte e utilização de combustíveis, derramamentos acidentais provocam a contaminação de regiões já fragilizadas, como regiões litorâneas, oceânicas e águas subterrâneas, mesmo que o combustível em questão seja um composto biodegradável (PASQUALINO; MONTANÉ; SALVADÓ, 2006; SENDZIKIENE *et al.*, 2007; MARIANO *et al.*, 2008;).

A remediação do solo e dos recursos hídricos afetados por substâncias nocivas é hoje aplicada a fim de reduzir o teor contaminante a níveis seguros e compatíveis com a proteção à saúde humana; a tendência atual é que o processo seja conduzido preferencialmente *in situ*. Uma das alternativas de remediação, a biorremediação, se refere ao uso de microrganismos capazes de degradar resíduos provenientes de depósitos de lixo e solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, incluindo os PAHs e os BTEX (TAVARES, 2013). Bactérias são as principais candidatas para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (HCP),

pela capacidade de fácil adaptação, que as permitem sobreviver em ambientes diversos e extremos (DORTA, 2020) e pela possibilidade de produção de biossurfactantes (moléculas que facilitam a solubilização de substratos na água) por algumas espécies (BENTO *et al.*, 2008).

Os potenciais poluentes orgânicos apresentados possuem baixa solubilidade e alta tensão interfacial em água, fatores que diminuem a eficiência da remediação. A técnica de aplicação de surfactantes, nesse caso, provoca a solubilidade dos componentes do petróleo ou diminuem a tensão interfacial, promovendo a sua mobilização e degradação (BUENO, 2008). Os microrganismos podem, inclusive, sintetizar subprodutos metabólicos, denominados biossurfactantes, os quais possuem propriedades surfactantes, e vantagens sobre surfactantes de origem química (baixa toxicidade, biodegradabilidade, etc.) (WEI; CHOU; CHANG, 2005). Os biossurfactantes que compõem as micelas (aglomerado de moléculas tensoativas), atuam sobre HCPs, emulsificando-os, aumentando a sua solubilidade e consequentemente acelerando o processo de biodegradação.

A ausência de oxigênio também é um dos principais fatores limitantes dos processos de biodegradação de compostos monoaromáticos (VENOSA *et al.*, 2002), nesse sentido é importante ressaltar que ambientes contaminados por biocombustíveis possuem alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), podendo conduzir o sistema para condições fortemente anaeróbias (MACKAY, 2006). Em ambientes anaeróbios a degradação pode ocorrer, porém, de forma geralmente muito mais lenta com uma faixa catabólica mais estreita do que a biodegradação aeróbia (RAMOS, 2012).

Quando os processos naturais de atenuação são limitados pela disponibilidade de nutrientes e receptores de elétrons, tecnologias de remediação ativas são utilizadas (COSTA; NUNES; CORSEUIL, 2009). Tal limitação pode prolongar por muitos anos a biodegradação do poluente, havendo apenas mudanças pouco significativas em sua composição química (KERBER, 2020). Na presença de receptores de elétrons inorgânicos, como nitrato, sulfato, enxofre ou íons metálicos oxidados (como Fe(III)), a matéria orgânica será degradada com a produção de

dióxido de carbono, nitrogênio, sulfeto ou Fe(II) (CHIARANDA, 2011). Além de desempenhar um papel na diagênese da matéria orgânica natural, os redutores de Fe(III) estão potencialmente envolvidos na degradação de contaminantes orgânicos em sedimentos marinhos (SORENSEN *et al.*, 1981, LOVLEY *et al.*, 1998; THAMDRUP, 2000) e na remoção de contaminantes orgânicos de aquíferos poluídos (LOVLEY *et al.*, 1989). Projetos realizados em parceria com a PETROBRAS no Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente, REMA, avaliam em áreas experimentais o processo de ferroredução, correlacionado diretamente à biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo e ésteres do biodiesel. O diesel B20 e o diesel B100, biocombustível puro, são usados como contaminantes em estudos de biorremediação estimulada por meio do uso de óxido de ferro recuperado da Drenagem Ácida de Mina (DAM) (REMA, 2019).

A eficiência e velocidade com que os processos de remediação acontecem são, dentre outros fatores citados, resultado da diversidade microbiana do meio. Assim, determinar e quantificar as populações de microrganismos presentes nas áreas afetadas é um dos primeiros passos para assegurar-se que os processos de remediação, mediados pela microbiota, ocorrerão (DELLAGNEZZE *et al.*, 2018). A busca sistemática de genes, compostos naturais, designs e organismos inteiros na vida selvagem com potencial para desenvolvimento de produtos por observação biológica e métodos biofísicos, bioquímicos e genéticos, sem perturbar a natureza é denominada Bioprospecção (MATEO *et al.*, 2001).

A dispersão global de espécies ou linhagens microbianas ambientalmente relevantes em uma comunidade é frequentemente avaliada por métodos de “fingerprinting” molecular. A tecnologia de marcadores moleculares é uma ferramenta eficiente para a caracterização, gerenciamento de recursos genéticos, programas de melhoramento de culturas e avaliação da diversidade genética dentro e entre espécies (MATSUMURA *et al.*, 2015). Neste contexto, inclui-se a técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Esta técnica se baseia na amplificação seletiva de determinada região do DNA a partir de um primer, pedaço curto de DNA de fita simples, que atua como molde para a amplificação, e produz milhares de

cópias da molécula-alvo. O BOX-PCR é um método potencialmente capaz de pesquisar simultaneamente muitas regiões de DNA espalhadas no genoma bacteriano, visto que as sequências repetitivas “BOX” são intercaladas por todo o genoma, e como resultado, obtém-se uma estimativa da diversidade genética dentro dos isolados bacterianos.

Ecossistemas litorâneos são considerados vulneráveis à derramamentos de hidrocarbonetos de petróleo devido à facilidade de aderência do óleo ao sedimento, dessa forma, urge a necessidade de estudar técnicas de biorremediação nestes ambientes. Os microrganismos hábeis a colonizar substratos de biomas de transição (sedimentos de pradarias, manguezais, praias, estuários e dunas), com elevada concentração salina, são classificados como halófilos. Nesse grupo, microrganismos halotolerantes podem se propagar em meio salino com concentrações limitadas de NaCl, enquanto microrganismos halofílicos necessitam de um meio com altos níveis de sal para proliferação (Russel, 1989; Pinilla, 2016). Esse grupo de extremófilos é uma das principais comunidades microbianas que toleram altas concentrações de sal e são muito procurados por muitas indústrias por suas novas enzimas e produtos com aplicações potenciais mais amplas (VENTOSA *et al.*, 1998).

Dessa forma, este trabalho propõe a identificação de espécies bacterianas, halotolerantes, que possam ser aplicadas em estudos de biorremediação de biomas de transição.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar o potencial dos isolados bacterianos coletados em áreas que receberam a deposição de combustíveis contendo misturas de biodiesel (B20 e B100) visando aplicações em processos de biorremediação de ambientes costeiros.

2.2. Objetivos Específicos

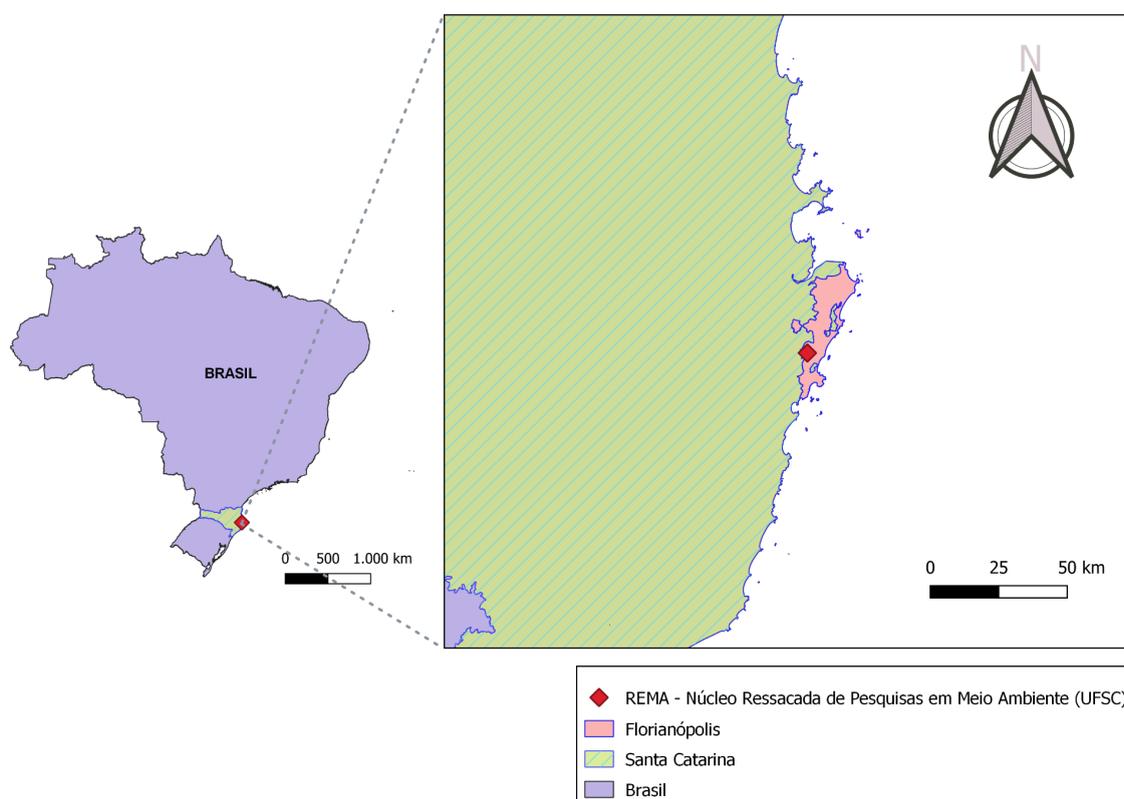
- Caracterizar a morfologia dos isolados bacterianos por meio da Coloração de Gram e análise por microscopia óptica visando a descrição e identificação das bactérias;
- Identificar molecularmente os isolados de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, coletadas em poços de monitoramento com misturas de biodiesel (B20 e B100) e correlacionar os organismos identificados à metodologia de biorremediação.
- Avaliar a tolerância dos isolados a diferentes concentrações de meios de cultura salinos com o intuito de avaliar a adaptação a ambientes hipersalinos;
- Avaliar a produção, qualitativa e quantitativa, de biossurfactantes em meio de cultura com óleo diesel.

3. METODOLOGIA

3.1. Área de Estudo

Os isolados bacterianos utilizados para estudo foram coletados em áreas experimentais, monitoradas por projetos de pesquisa realizados na Fazenda Experimental da Ressacada em Florianópolis, Santa Catarina (Figura 1). Desde 1998, a área sediada para pesquisa em soluções ambientais é monitorada e administrada pelo Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA) vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Figura 1. Localização do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA) na Ilha de Santa Catarina.



Base de dados: Prefeitura de Florianópolis e IBGE; Datum: SIRGAS 2000 / UTM zone 22S

Fonte: A autora, 2023.

O terreno referente à área de estudo é localizado sob um terraço de construção marinha, dentro do domínio de planícies marinhas, que tem sua formação associada a variações da linha de costa a partir do Quaternário. Os depósitos sedimentares do ambiente possuem, portanto, correlação a processos de evolução morfodinâmica do litoral, e foram previamente descritos como: sedimentos marinhos litorâneos, sedimentos siltico-argilo-arenosos com matéria orgânica típicos de áreas de mangue, e sedimentos siltico-argilo-arenosos de lagunas e baías (REMA,2019).

O cenário de contaminação investigado pelo presente estudo corresponde à regiões contaminadas por Biodiesel B100 e B20, denominadas área experimental 06 e 10, respectivamente, as quais se diferenciam pelas características físico-químicas dos contaminantes aplicados, características geológicas, hidrogeologia e substrato bioestimulante adicionado.

3.2. Enriquecimento de Amostras

O poço denominado P06, contaminado em 2007 com 100 litros de biodiesel de soja, foi submetido a remediação intrínseca monitorada (ou atenuação natural monitorada), enquanto o poço P10, contaminado em 2014 com 100 litros de biodiesel B20 (20% de biodiesel e 80% de diesel v/v), foi submetido a remediação por bioestimulação combinada com óxido de ferro (Fe_2O_3).

A amostragem de solo foi conduzida no primeiro semestre de 2019 nos poços de monitoramento citados, o solo foi amostrado com o uso de trado com caneco, na exata profundidade onde foram liberados os combustíveis em estudo. No poço P5 o solo foi coletado em 1,5 metros de profundidade enquanto no poço P10 a coleta foi realizada a 1,8 metros de profundidade.

A partir da coleta de solo, foi aplicada a metodologia de enriquecimento em duas partes seguindo a metodologia descrita por Bushnell e Hass (1941). As amostras de 5 g foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyer (250 mL) com 100 mL do meio mineral Bushnell Haas (BH) composto de 1 g K_2HPO_4 ; 0,2 g MgSO_4 ;

1 g KH_2PO_4 ; 0,02 g CaCl_2 ; 1 g NH_4NO_3 e 0,05 g FeCl_2 para 1 Litro de água destilada. Em seguida, as amostras foram enriquecidas com 1% (v/v) de óleo diesel comercial previamente filtrado através de um filtro de tamanho de poro de 0,22 μm acoplado a uma seringa de 10 mL, como única fonte de carbono orgânico. Os frascos foram mantidos em agitador orbital TE-421 (TECNAL®) a 150 rpm e 28°C por 14 dias.

A partir dos resultados do ensaio de enriquecimento em meio mínimo, isolados bacterianos que apresentaram células viáveis foram selecionados para produção de cultura estoque visando a preservação da coleção de isolados bacterianos. As estirpes foram transferidas para microtubos (1,5 mL) contendo 800 μL da solução glicerol 15% e tampão PBS (8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 245 mg KH_2PO_4 e 1 L de H_2O destilada) e armazenados em freezer a -20 °C.

3.3. Identificação de Características Morfológicas dos isolados

3.3.1. Descrição Macroscópica de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Os isolados resgatados da coleção de isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura sólido Ágar Nutriente (NA). Em seguida, as placas foram incubadas em B.O.D EL202 (Eletro Lab®) a 28 °C \pm 2°C até o surgimento de unidades formadoras de colônia (UFC). Os isolados foram caracterizados quanto a textura e pigmentação da colônia.

3.3.2. Coloração de Gram

Com o intuito de contribuir para a identificação por gênero e espécie, as bactérias foram classificadas quanto ao tipo de parede bacteriana, como gram-positivas e gram-negativas, utilizando a técnica de coloração de Gram.

Para cada isolado bacteriano foi confeccionada uma lâmina para coloração de Gram. Inicialmente realizou-se o esfregaço com o material biológico e a lâmina foi fixada no fogo. Em seguida cobriu-se o esfregaço com violeta de metila por 60

segundos, dado este intervalo de tempo o corante foi escorrido e lavado em um filete de água corrente. Logo após, cobriu-se a lâmina com lugol por 60 segundos, repetindo a lavagem previamente descrita após o intervalo de tempo. Na sequência, cobriu-se a lâmina com agente descorante (etanol:acetona 1:1 v/v) por aproximadamente 15 segundos e repetiu-se a lavagem com filete de água. Após a lavagem, a lâmina preparada foi coberta por fucsina básica 0,1 a 0,2% ou (safranina) que agiu por 30 segundos, por fim, foi repetida a lavagem da lâmina.

Após a secagem da lâmina, com uma gota de óleo de imersão aplicada sobre a lâmina, foi efetuada a leitura em microscópio óptico (MICROSCÓPIO OLYMPUS BX41), disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). As células que apresentaram a cor rosada foram classificadas como gram-negativas, e por conseguinte, as células roxas como gram-positivas.

3.4. Caracterização Genética dos Isolados

3.4.1. Extração do DNA Genômico

O DNA total dos isolados foi extraído utilizando o método da fervura. Para tal, uma colônia do isolado foi retirada da cultura em meio sólido utilizando uma alça de platina esterilizada e transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 500 μ L de tampão fosfato salino (PBS; 8 g.L^{-1} de NaCl, 2 g.L^{-1} de KCl, 1,42 g.L^{-1} de Na_2HPO_4 , 0,24 g.L^{-1} de KH_2PO_4). Os tubos foram fechados, e em seguida submetidos a 4 ciclos de choque térmico, onde inicialmente serão inseridos em banho maria por 20 minutos a 85° C e em seguida serão resfriados a 4° C em banho de gelo.

Utilizou-se o kit DNeasy (Qiagen, Alemanha) para a extração do DNA genômico dos isolados bacterianos. O método se inicia com o isolamento das estirpes selecionadas em tubos de ensaio de 10 mL contendo 5 mL de caldo nutriente - NB (1 g extrato de carne; 2 g extrato de levedura; 5 g peptona; 5 g NaCl e 1 L de H_2O destilada). As culturas foram incubadas por 24 horas em agitador orbital

(180 rpm, 30 °C). Em seguida, cerca de 500 µL de suspensão celular foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL, e estes foram centrifugados em uma microcentrífuga (MiniSpin® series) por 2 min a 10.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 200 µL de tampão PBS (NaCl 8 g; KCl 0.2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g e 1 L de H₂O destilada, pH 7). As amostras foram homogeneizadas e encaminhadas para a extração de acordo com as instruções do kit. Após a extração, o DNA genômico total foi armazenado em freezer a - 20 °C.

3.4.2. Quantificação de DNA Genômico Extraído

O DNA genômico foi quantificado mediante a leitura em espectrofotômetro UV/Vis NanoVue Plus (GE®) nos comprimentos de onda 260/280 nm. Em adição, foi realizada a quantificação por eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v), com tampão TAE 50x (50 g de TRIS base, 57,1 mL de CH₃COOH, 100 ml de EDTA 0,5M pH 8, 1 L de H₂O destilada), diluído 1x antes do uso. Nessa metodologia, o marcador de peso molecular 1 kb (Ludwig®) foi utilizado como DNA padrão. A quantificação do DNA extraído foi determinada por leitura da intensidade de fluorescência das bandas coradas com GelRed® diluído 1x, comparando a fluorescência do DNA extraído dos isolados com a fluorescência do DNA padrão. Logo após a quantificação, os DNAs foram diluídos a uma concentração padrão de 5 ng.µL⁻¹ para uso nas etapas subsequentes.

3.4.3. Caracterização Molecular dos Isolados por BOX-PCR

Com o intuito de diferenciar os isolados geneticamente e identificar possíveis estirpes replicadas, foi realizada a amplificação da região repetitiva BOX do DNA cromossomal através da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase). Esta técnica de fingerprinting baseia-se na amplificação da região repetitiva BOX, a qual

ocorre na maioria dos microrganismos procariontes, sendo possível distinguir isolados quando o produto de PCR é analisado em gel de eletroforese.

Em microtubos foram adicionados os seguintes reagentes em uma solução que totaliza 25 μL com: 17,45 μL de água ultra pura; 2,5 μL de tampão para PCR; 1,9 μL de MgCl_2 ; 1,25 μL de dMSO; 0,59 μL de primer A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994); 0,2 μL de Taq DNA polymerase; e 1,0 μL do produto de extração de DNA (KERBER, 2020). A amplificação do material genético foi realizada em um Termociclador automático (Mastercycler personal, Eppendorf), inicialmente com 1 ciclo de 7 minutos a 94 °C (desnaturação inicial) seguido por 35 ciclos de: desnaturação à 94 °C por 1 minuto; anelamento a 53 °C por 1 minuto; extensão à 72 °C por 8 minutos; com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos (BENDIA *et al.*, 2018).

Após a amplificação, o produto resultante foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,2 % (m/v) preparado com solução tampão TAE 1X (Tris acetato-EDTA). A eletroforese foi realizada com voltagem de 3 volts.cm⁻¹, sendo o gel registrado por um fotodocumentador (ChemiDoc MP, BioRad).

3.4.4. Purificação do DNA genômico e amplificação do gene RNAr 16S

Com o objetivo de se obter melhores resultados nas amplificações, as amostras de DNA genômico dos isolados foram submetidas ao processo de purificação. O seguinte protocolo foi seguido: misturou-se 100 μL de DNA extraído à 200 μL de etanol (P.A.) gelado e 12 μL de NaCl 0,2 M, seguido de incubação em freezer a -20 °C por 12 horas. Após o intervalo prescrito, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado apropriadamente e em seguida adicionado 100 μL de etanol 70% (P.A.), seguido de centrifugação por 2 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o procedimento com etanol 70% foi repetido. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos foram deixados em repouso, com a tampa aberta, a fim de secar o excesso de etanol 70%.

Após a completa secagem dos tubos em temperatura ambiente, foram adicionados aos tubos 100 µL de água ultrapura estéril, estando o material pronto para as próximas etapas (GREEN & SAMBROOK, 2016).

O DNA purificado foi submetido à reação de PCR, a fim de amplificar o fragmento referente ao gene RNAr 16S, onde foram usados como primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (LANE *et al.*, 1991) e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (TURNER *et al.*, 1999). As reações foram preparadas no volume final de 25 µL, segundo a metodologia descrita por Turner *et al.* (1999). Cada uma das reações correspondia o volume de: 19,95 µL de água ultra pura; 2,5 µL de tampão para PCR; 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,25 µL de cada primer, ambos na concentração de 20 µM; 0,2 µL de cada dNTP 100 mM; 0,1 µL de Taq Polimerase 5 U/µL; 1 µL do produto de DNA purificado.

A amplificação foi realizada em Termociclador automático (Mastercycler personal, Eppendorf), com as seguintes etapas nos ciclos: 1 ciclo de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; e 35 ciclos de amplificação de 2 minutos, cada qual subdividido em: 15 segundos a 95 °C (desnaturação); 15 segundos a 54 °C (anelamento dos primers); e 90 segundos a 72 °C (elongamento) (DUARTE, 2010).

Após o término da reação de amplificação, os produtos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v), corados com GelRed® diluído 1x e fotografados utilizando fotodocumentador (ChemIDoc MP, BioRad). O material obtido após a amplificação também foi submetido a metodologia de purificação descrita no kit PCR Products Purification (Ludwig®). Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro UV/Vis e em gel de agarose 1,0 % (p/v).

3.4.5. Sequenciamento e Análise do gene RNAr 16S

Os produtos da PCR foram armazenados a - 20 °C e encaminhados para o sequenciamento de amplicons, esta parte da metodologia foi realizada por empresa terceirizada (Macrogen, Coréia do Sul). Após a obtenção das sequências do gene, o

processamento do resultado foi feito por meio de um conjunto de softwares de bioinformática.

Inicialmente, as sequências foram analisadas e corrigidas minuciosamente com o auxílio da ferramenta computacional BioEdit© versão 7.2. A fim de medir a qualidade da identificação dos nucleotídeos gerados pelo sequenciamento automatizado de DNA utilizamos o Phred score, índice de medida da qualidade de base no sequenciamento de DNA. Uma pontuação Phred de 20 indica a probabilidade de encontrar 1 chamada de base incorreta entre 100 bases. Em outras palavras, a precisão da chamada de base é de 99% (NEGI *et al.*, 2022). Assim, os nucleotídeos com Phred score inferior a 20 foram removidos manualmente em cada sequência. Os isolados com sequenciamentos rejeitados foram caracterizados somente quanto à morfologia celular, tipo de parede celular e quanto aos resultados da amplificação por BOX-PCR.

Os segmentos resultantes foram comparados no banco de dados GenBank acessado através da ferramenta BLASTN 2.14. (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool - National Center for Biotechnology Information) a fim de avaliar a similaridade com espécies tipo cadastradas no sistema. Algumas espécies com sequências cadastradas no sistema foram selecionadas para uso como referência no processo descrito a seguir.

Os fragmentos das sequências dos produtos de PCR do gene RNAr 16S juntamente com as sequências de referência foram alinhados de maneira direcional no sentido 5' - 3' com uso do software ClustalW implementada no BioEdit. O alinhamento foi realizado de forma que as sequências tenham identidade onde ocorrem regiões preservadas, e gaps, onde há vazios entre as sequências, tal como é demonstrado na Figura 2.

Após o alinhamento, as sequências foram inseridas no software ARB Project (versão arb-7.0), para a construção da árvore filogenética. Ademais, com o objetivo de obter melhor representação da linhagem ancestral, foi adicionada a sequência raiz de uma espécie filogeneticamente distante aos grupos identificados. Utilizou-se o método de construção da árvore Maximum Likelihood (ML), que se trata de um

método discreto que busca dentro das árvores a mais verossímil de acordo com os dados fornecidos (sequências do alinhamento) e com base no modelo evolutivo. A leitura foi executada a partir da posição 61 a 470, totalizando 401 bases de nucleotídeos, considerando apenas posições com frequência acima de 70%. Mil repetições foram efetuadas com o objetivo de selecionar a melhor hipótese filogenética para representar as relações evolutivas entre os organismos.

Figura 2 - Alinhamento no sentido 5' -3' de sequências do gene RNA 16S dos isolados P06R08, P06R10, P06R12, P10R13, P10R15, P10R16, P10R18, P10R19 e sequências referenciais.



Fonte: Obtida pela autora em BioEdit© versão 7.2.

3.5. Ensaio de Seleção de Bactérias Halotolerantes

Para descobrir a condição de crescimento ideal em meio salino, visando a aplicação dos isolados em processos de biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, os isolados foram avaliados quanto ao limite de tolerância a ambientes salinos. A metodologia construída se baseou nos métodos descritos por Bakhshandeh *et al.* (2014), Donio *et al.* (2013), Khanghahi *et al.* (2020) e Sharma *et al.* (2016).

O ensaio foi conduzido em triplicata, tendo como controle o meio de cultura líquido Caldo Nutriente (Nutrient Broth - NB) sem inóculo. Devido à quantidade de amostras analisadas e a limitação dos equipamentos, optou-se por selecionar 6 isolados com características diversas para aplicar a metodologia. Os critérios de seleção tiveram como base os resultados do Teste de Gram; resultados da BOX-PCR, morfologia e arranjo das células e aparência macroscópica das colônias. Os isolados foram inoculados em meio de cultura sólido (Ágar Nutriente ISO) e após 2 dias de incubação à 28° C, com o auxílio de uma alça de platina, foram transferidos duas alçadas da cultura estoque para frascos Erlenmeyer contendo 45 mL de caldo nutriente - NB (KASVI®) com diferentes proporções de NaCl (0%, 2%, 5%, 10%). Após a inoculação em meio de cultura líquido, os frascos foram incubados em Shaker (Tecnal: modelo te-421) a 28 °C por um período de 5 dias a 130 rpm (Figura 3).

Figura 3 - Frascos com isolados bacterianos em meios de cultura com NB em concentrações de NaCl em 0, 2, 5 e 10%. Incubados em Shaker (Tecnal: modelo te-421) a 28 °C a 130rpm.



Fonte: A autora (2023)

O crescimento bacteriano foi acompanhado por meio da densidade óptica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro (HACH: modelo Dr 3900). As coletas para leitura de absorbância ocorreram após o período estipulado. Para avaliar se haveria crescimento das estirpes após estresse salino, as amostras nos frascos foram inoculadas em ágar nutriente sólido com auxílio de uma alça de platina esterilizada. Os isolados foram incubados por 5 dias e foi observado o crescimento qualitativo de UFCs nas placas.

3.6. Avaliação de produção de Biossurfactantes

Com base nos resultados obtidos pelo ensaio de halotolerância e em dados prévios não publicados, foram escolhidos cinco isolados (R9, R11, R14, R17 e R19) para serem avaliados quanto a produção de biossurfactantes, moléculas formadoras de emulsões em misturas de óleo e água que provocam a redução da tensão superficial de um fluido contaminado. O efeito destas moléculas anfipáticas de superfície ativa em contaminantes como os hidrocarbonetos de petróleo, contribui para a biodisponibilidade e posterior biodegradação destes contaminantes orgânicos. No presente contexto, o carbono é um hidrocarboneto insolúvel, dessa forma, os microrganismos difundem várias substâncias como biossurfactantes, enquanto algumas das leveduras e bactérias difundem biossurfactantes que podem emulsificar hidrocarbonetos no meio (KARLAPUDI *et al.*, 2018).

A metodologia utilizada para a avaliar a produção de biossurfactantes por microrganismos nativos da área contaminada por biodiesel se baseou no método descrito por Rehman *et al.* (2021). Inicialmente os isolados foram inoculados em frascos Erlenmeyer com 80 mL de meio salino mínimo (MSM) contendo a proporção de 7,6 g/L de Na_2HPO_4 ; 4,43 g/L de K_2HPO_4 ; 6 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,4 de MgSO_4 ; 0,4 g/L de CaCl_2 ; e 2 mL de elemento traço (solução com 20,1 g de EDTA (sal dissódico); 16 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,18 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,18 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1 L de H_2O destilada e 1 L de H_2O destilada). A produção de biossurfactantes geralmente requer a presença de fontes de carbono hidrofílicas e

oleosas/hidrocarbonetos miscíveis no meio de cultura (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011), portanto, o meio mínimo foi suplementado com 2% de óleo diesel comercial previamente filtrado. O ensaio foi realizado em triplicatas para os cinco isolados bacterianos e dois frascos sem inóculo foram utilizados como controle. Após a inoculação, os frascos foram incubados em Shaker (Tecnal: modelo te-421) a 28 °C por um período de 7 dias a 115 rpm.

O volume total de cada cultura foi transferido para tubos eppendorf de 1000 µL, em duplicata para cada frasco. O conteúdo de um eppendorf foi destinado a análise de densidade óptica a 600 nm por espectrofotometria enquanto o outro microtubo foi submetido a centrifugação em uma Microcentrífuga de laboratório (MiniSpin® series) durante quatro minutos a 3000 rpm (adaptado de PATOWARY *et al.*, 2016). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado para a realização dos testes descritos a seguir.

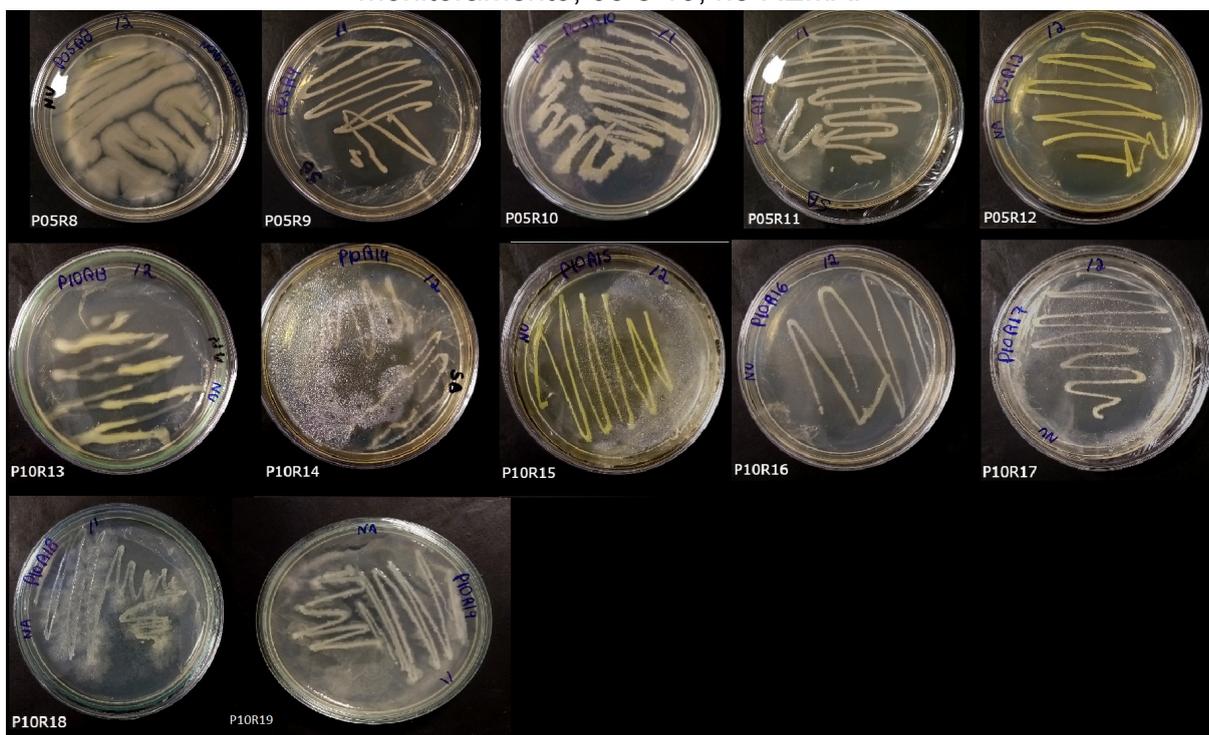
Utilizando o método da gota pendente, a tensão superficial das culturas (medida em mN.m^{-1} ; mili Newton por metro) foi medida utilizando um goniômetro (Ramé-Hart Instrument Co. Modelo 250-F1), os procedimentos foram realizados em triplicata à temperatura ambiente (25° C - 28° C). Em seguida, a tensão superficial foi analisada pelo Software DROP image Advanced (Ramé-Hart Instrument Co.). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada, e a seringa utilizada foi higienizada entre a coleta de amostras distintas, três vezes com água destilada, e duas vezes com a própria amostra a ser analisada, respectivamente. Aproximadamente 1 mL de amostra foi utilizado para leitura, sendo que a cada leitura o equipamento mediu a tensão superficial dez vezes, e o resultado final foi obtido através do cálculo da média obtida entre as dez medidas e os valores discrepantes foram desconsiderados através do teste Q.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características Morfológicas dos Isolados

Após a etapa de enriquecimento, 12 estirpes apresentaram colônias viáveis e foram nomeadas segundo: sua respectiva área experimental, P06 ou P10; o local de coleta, neste contexto a letra “R” representa a área de estudo Fazenda Experimental da Ressacada; e os últimos números representam as amostras de bactéria isoladas durante o estudo (Figura 4). Com o intuito de simplificar a identificação, ao longo dos resultados os isolados serão chamados por “R” e seu número representativo. Após a nomeação, as amostras isoladas em placas de Petri foram descritas segundo sua coloração e textura (Figura 4 e Quadro 1).

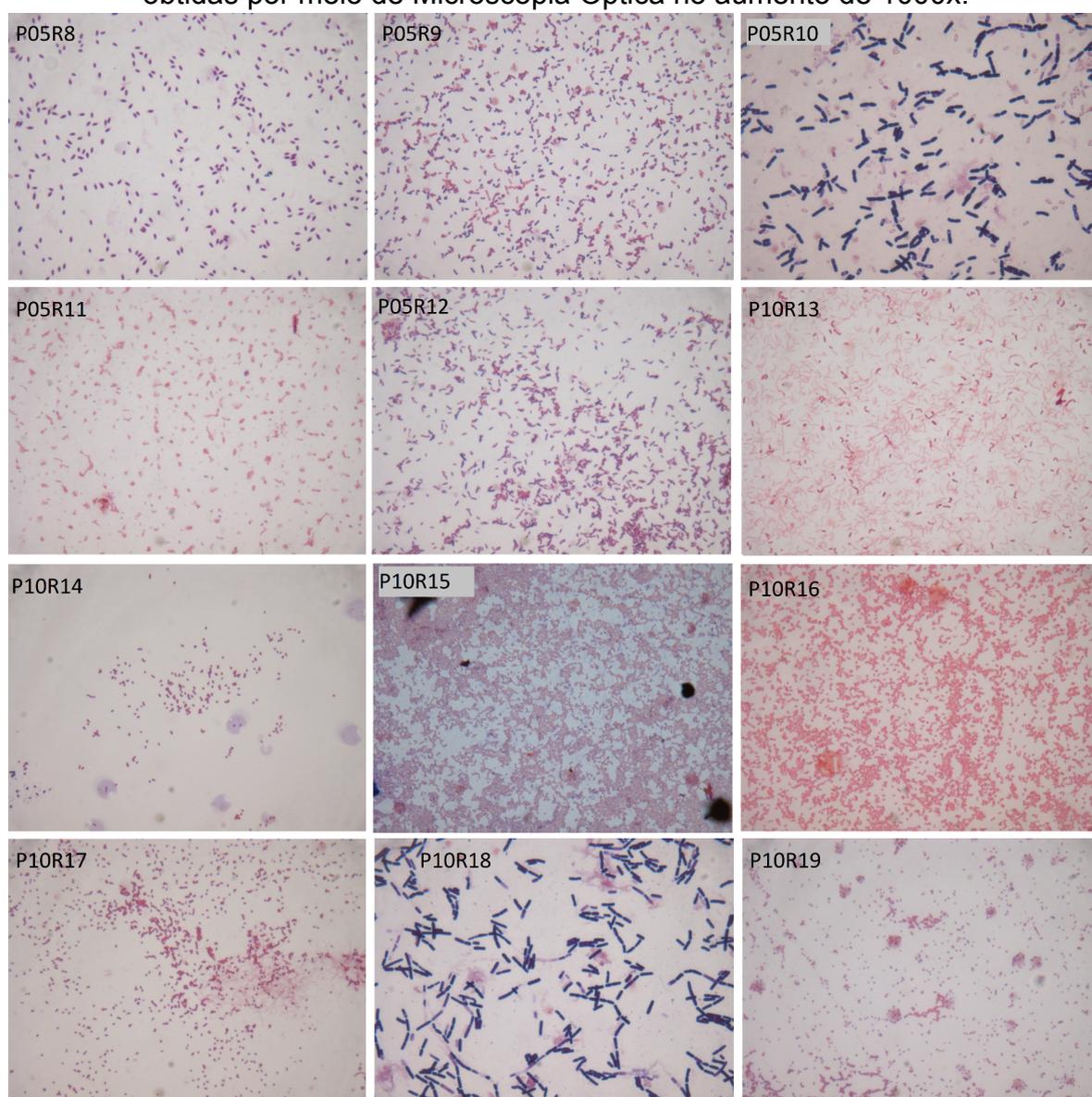
Figura 4 - Imagens macroscópicas dos isolados bacterianos coletados nos poços de monitoramento, 05 e 10, no REMA.



Fonte: A autora (2022)

A partir do método de coloração de Gram, realizou-se a associação de arranjos celulares à morfologia e característica Gram positiva ou negativa dos isolados (Quadro 1). Na figura 5 podem ser observadas imagens obtidas por meio de microscopia óptica. Não foi observado um padrão de morfologia ou coloração, o que indica que as bactérias com propriedades degradantes de hidrocarbonetos de biocombustíveis apresentam certa diversidade.

Figura 5 - Isolados bacterianos após metodologia de Coloração de Gram. Imagens obtidas por meio de Microscopia Óptica no aumento de 1000x.



Fonte: A autora (2023).

Quadro 1 - Caracterização Macroscópica, morfologia celular e composição da parede celular segundo a coloração de Gram.

Amostra	Observação Macroscópica		Teste de Gram
	Aparência da Colônia	Morfologia	Gram
R8	branca, opaca, fibrosa	bacilos	positivo
R9	amarela, brilhosa	bacilos	negativo
R10	branca, brilhosa, extremidade opaca	estreptobacilos	positivo
R11	branca, brilhosa	espiroquetas	negativo
R12	amarela / roxa	bacilos	negativo
R13	branca / gelatinosa	espiroquetas	negativo
R14	branca translúcida	cocobacilo	negativo
R15	amarela, brilhosa	bacilos	negativo
R16	branca translúcida	cocobacilo	negativo
R17	branca translúcida	estreptococos	negativo
R18	branca , opaca	estreptobacilos	positivo
R19	branca , brilhosa	bacilos	negativo

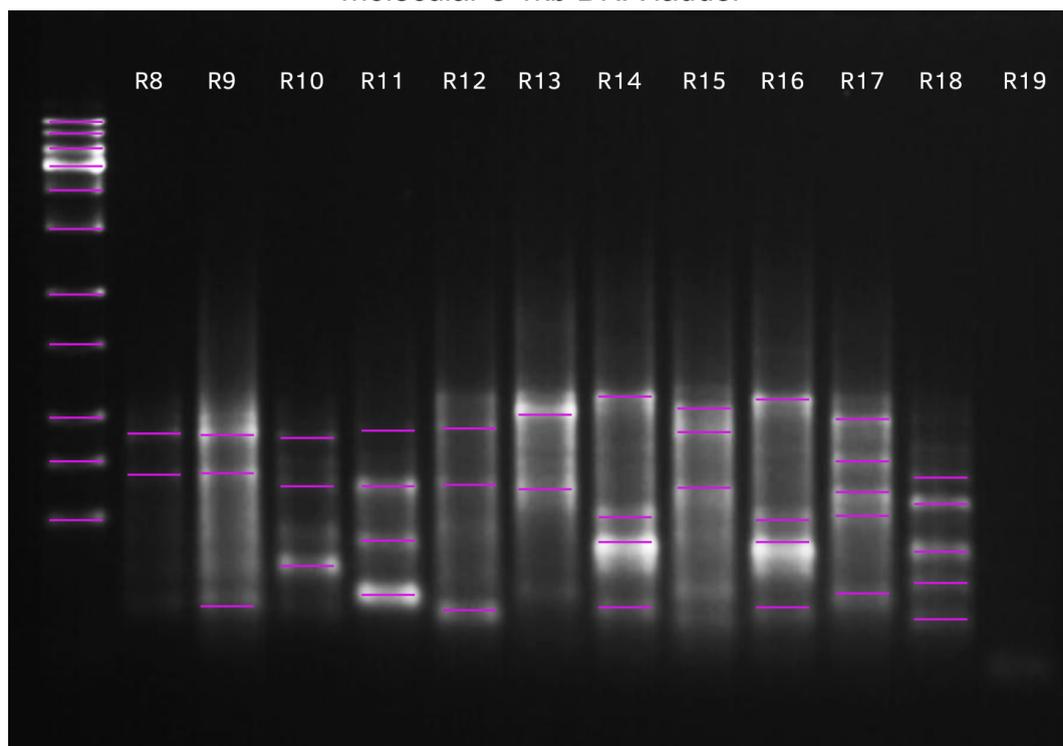
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.2. Caracterização Molecular

4.2.1. BOX-PCR

O produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose, com o marcador molecular DNA ladder 1kb. O resultado foi obtido pelo fotodocumentador ChemiDoc MP, BioRad (Figura 6). O perfil de bandas gerado permitiu identificar o fingerprinting de boa parte dos isolados, com exceção da amostra P10R19. Observou-se também, a semelhança genética entre os perfis que correspondem aos pares de isolados: P06R09 e P06R12, e P10R14 e P10R16.

Figura 6 - Perfil de amplificação obtido por eletroforese em gel, a partir do método de amplificação BOX-PCR, dos isolados representantes dos 12 perfis. O marcador molecular é 1kb DNA ladder



Fonte: A autora (2022)

A respeito dos isolados P10R14 e P10R16, não foi possível confirmar que os isolados são da mesma espécie pelo método de sequenciamento do gene RNAr 16s devido a imprecisão da sequência de DNA para o isolado P10R14,

entretanto estes têm alta semelhança confirmada por análise fenotípica e molecular. Os isolados P06R9 e P06R12, obtiveram semelhança no padrão de fingerprinting gerado em ágar de eletroforese, no próximo tópico conclui-se que se tratam de organismos do mesmo gênero.

4.2.2. Sequenciamento do gene RNAr 16s

O sequenciamento do segmento do gene RNAr 16s possibilitou a identificação genética de nove dos doze isolados (Tabela 1). Os resultados obtidos para os isolados P06R11, P10R14 e P10R17 não foram considerados devido à quantidade de erros e incertezas na identificação de nucleotídeos e consequentemente aos valores inferiores de Phred score. Estes foram caracterizados apenas por avaliação microscópica e coloração de Gram.

Tabela 1 - Classificação taxonômica e similaridade de isolados identificados por sequenciamento do gene RNAr 16S. N° de id. = Número de identificação no banco de dados do NCBI.

Grupo Filogenético	Identificação do isolado	Similaridade (%)	Espécie relacionada	N° de id.
<i>Bacillus</i> Cohn 1872	P06R8	99.58	<i>Bacillus</i> sp.	NR_152692
<i>Burkholderia</i> Burkholder, 1942 Yabuuchi, 1993	P06R9	98.46	<i>Burkholderia</i> sp.	NR_118057
<i>Bacillus</i> Cohn 1872	P06R10	99.38	<i>Bacillus</i> sp.	NR_152692
-	P06R11	-	-	-
<i>Burkholderia</i> Burkholder, 1942 Yabuuchi, 1993	P06R12	99.65	<i>Burkholderia</i> sp.	NR_118872
<i>Dyella</i> Xie and Yokota 2005	P10R13	99.10	<i>Dyella</i> sp.	NR_114075
-	P10R14	-	-	-
<i>Burkholderia</i> Burkholder, 1942 Yabuuchi, 1993	P10R15	96.72	<i>Burkholderia</i> sp.	NR_118057
<i>Paraburkholderia</i> Sawana et al. 2014	P10R16	96.83	<i>Paraburkholderia</i> sp.	NR_118080

Grupo Filogenético	Identificação do isolado	Similaridade (%)	Espécie relacionada	Nº de id.
-	P10R17	-	-	-
<i>Bacillus</i> Cohn 1872	P10R18	99.64	<i>Bacillus</i> sp.	NR_152692
<i>Serratia</i> Bizio 1823	P10R19	100	<i>Serratia</i> sp.	NR_113236

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Das nove bactérias com gene ribossomal 16S sequenciado, três obtiveram similaridade acima de 97% com o gênero *Bacillus*. Este resultado pode ser associado ao potencial de adaptação de microrganismos membros do gênero *Bacillus* a condições abióticas extremas, como temperatura, pH, radiação, dessecação, luz ultravioleta ou exposição a pesticidas (BAHADIR *et al.*, 2018). Além da capacidade de adaptação a condições ambientais adversas, recentes estudos indicam o potencial de membros do gênero *Bacillus* na biodegradação ou transformação de várias substâncias tóxicas como metais traços (ARORA, 2020), óleo Diesel (MEYER *et al.*, 2012), Methyl tertiary-butyl ether (D'ERRICO *et al.*, 2020) e hidrocarbonetos de petróleo (MOHANTY; MUKHERJI, 2011, ARORA *et al.*, 2016; SINGH; SINGH, 2016; XIAO *et al.*, 2017).

O gene RNAr 16s desempenha um importante papel na identificação molecular e taxonômica. No entanto, este método tem limitações quando aplicado a organismos do gênero *Bacillus*. Estudos revelam que os organismos do gênero *Bacillus* possuem diversas cópias do gene RNAr 16S, caracterizando-os dessa forma como espécies intimamente relacionadas com poucos nucleotídeos de diferença (PALYS *et al.*, 2000; MAUGHAN; AUWERA, 2011). A variação do número de cópias, principalmente em cepas com baixo número, pode ter resultado de sequenciamento incompleto do genoma e/ou sobreposição do mesmo gene 16S rRNA durante o *splicing* (LIU *et al.*, 2015). A divergência molecular insuficiente é, portanto, um fator limitante na determinação de espécies por sequenciamento do gene RNAr 16S. O uso subsequente de genes de manutenção que são essenciais e, portanto, não perdidos dos genomas, mas que evoluem mais rapidamente que o RNAr 16S, é útil para a classificação taxonômica.

Os isolados P065R9, P06R12 e P06R15, obtiveram alta similaridade genética com espécies do gênero *Burkholderia*. O gênero é considerado versátil por conseguir tolerar e decompor uma variedade de compostos aromáticos (monoaromáticos, policíclico aromático e heterocíclico). Associadas a esse grupo, algumas publicações investigam o seu desempenho a degradação de hidrocarbonetos de petróleo bruto, óleo diesel e biodiesel (CHAKRABORTY; MUKHERJI; MUKHERJI, 2010; REVATHY; JAYASRI; SUTHINDHIRAN, 2015; MOHAMMED; TAYEL; ELGUINDY, 2018). Além disso, o gênero *Burkholderia* têm sido utilizado em estudos de biorremediação como agente de degradação que atuam com o auxílio de surfactantes químicos que induzem a biodegradação (MOHANTY; MUKHERJI, 2007, 2011). As propriedades tensoativas e bom desempenho no aumento da solubilização de pesticidas, indicam que espécies do gênero, portanto, podem ser usadas como agentes solubilizantes para remediação ambiental e tratamento sinérgico com biorremediação de solo contaminado por pesticidas (WATTANAPHON *et al.*, 2008).

Recentemente, revisões na taxonomia do gênero *Burkholderia* dividiram o grupo em *Burkholderia* e *Paraburkholderia* (SAWANA *et al.* 2015), desde então, cerca de setenta e quatro espécies foram reconhecidas e validadas como integrantes deste novo gênero. Algumas espécies passaram para o novo gênero, o que justifica a proximidade genética entre os isolados P10R15 e P10R16 (figura 7). Entretanto, esta alteração dificulta a identificação de estudos de biodegradação de poluentes orgânicos que antecedem o período de transição. No presente estudo, o isolado P10R16 obteve similaridade genética de 96,83% com algumas espécies do gênero *Paraburkholderia*. O gênero é composto principalmente por espécies promotoras de crescimento vegetal (SAWANA *et al.* 2015), que além de contribuir em processos de biocontrole, biofertilização e biorremediação, apresentam baixa capacidade de contaminação em humanos (DIAS *et al.*, 2019). A atividade de biorremediação deste grupo está associada à rizorremediação, fixação de nitrogênio em raízes de plantas, que contribui com a degradação de poluentes orgânicos no

solo próximo a raiz da planta, e à produção de ramnolipídeos (RL), compostos biossurfactantes (CAO *et al.*, 2021).

A amostra P10R13 obteve similaridade genética acima 97% com algumas espécies do gênero *Dyella*. Este grupo é composto por bactérias gram-negativas geralmente associadas ao solo. Pesquisas acerca da biorremediação em solos contaminados avaliam que espécies nativas do gênero *Dyella* contribuem para a biodegradação de compostos orgânicos e contribuem para a manutenção do ecossistema (ANDREOLLI *et al.*, 2015; MUANCHINDA *et al.*, 2013).

Com os resultados finais não foi possível discernir quais espécies foram isoladas a partir do experimento de bioprospecção. Fatores como: qualidade dos reagentes utilizados na amplificação da fita de RNA; tamanho do segmento de fita obtida por sequenciamento; condições térmicas e tempo em que as amostras de DNA purificados foram expostas durante o transporte para a empresa que realizou o sequenciamento, podem ter interferido na qualidade do sequenciamento final. Ainda assim, foi possível elaborar uma árvore filogenética que melhor representa as relações evolutivas entre os microrganismos em contexto (Figura 7).

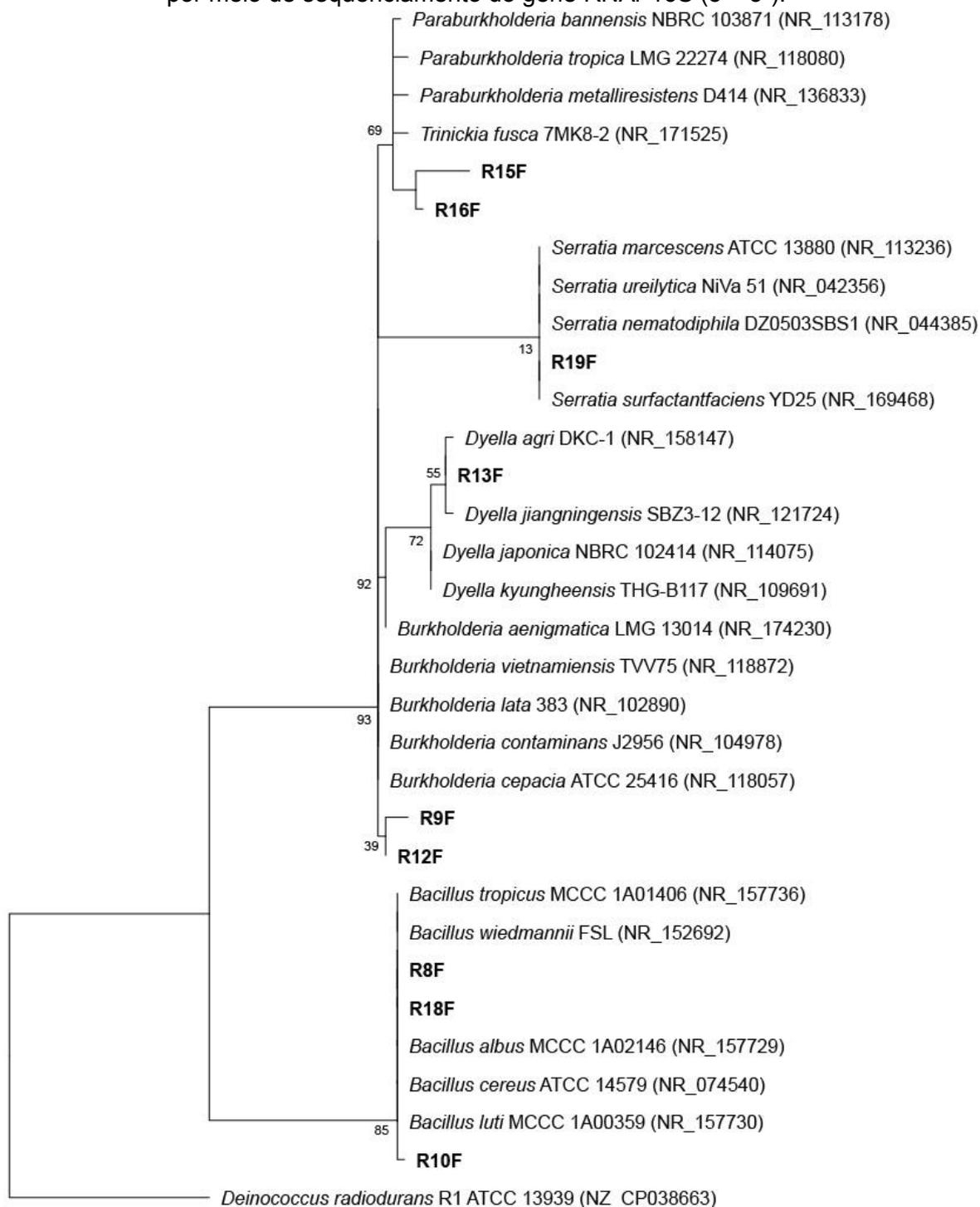
O padrão de distribuição na árvore filogenética da figura 7 mostra que a distância no sentido horizontal representa o grau de diferença entre as espécies. Essas se agregam aos grupos taxonômicos dos quais elas pertencem. Temos como espécie raiz, o *Deinococcus radiodurans*, sua parentalidade comum com os organismos é a mais antiga, e geneticamente apresenta maior diferença evolutiva entre as espécies. Da mesma forma observa-se que o gênero *Serratia* possui um ancestral comum mais recente.

Alguns isolados pertencentes aos gêneros identificados, como *Burkholderia* sp. e *Serratia* sp., podem apresentar riscos à saúde humana e à integridade ambiental. O estudo realizado por Cunningham (2020) enfatiza que áreas expostas a contaminantes comuns, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, resultam na seleção de Genes Resistentes a Antibióticos (GRAs). A transferência potencial de GRASs de bactérias comuns no meio ambiente para bactérias consideradas patógenos humanos pode ameaçar seriamente a eficácia da quimioterapia antibiótica,

representando um efeito deletério para a saúde pública (Pehrsson *et al.*, 2016). Portanto, o impacto sobre o ambiente deve ser estudado considerando a patogenicidade das espécies degradadoras e a transferência potencial de GRAs entre a microbiota local.

Tendo em vista os riscos citados diante da aplicação de espécies patogênicas ou de espécies com GRAs, técnicas de mitigação de impacto devem ser aplicadas visando evitar a contaminação pela microbiota introduzida. A opção mais segura seria a aplicação de biorremediação com espécies nativas, dessa forma, não haveria introdução de inóculo comercial com microrganismos migrantes e mecanismos de controle populacional no ecossistema vigente seriam agentes responsáveis pelo equilíbrio da teia trófica local (GROSSER; WARSHAWSKY; VESTAL, 1991). Um método alternativo, no caso de inviabilidade do uso de organismos nativos, é a elaboração de um consórcio de bactérias que realizam a biodegradação do poluente e não apresentam riscos para a fauna e flora local (ARULAZHAGAN; VASUDEVAN, 2009; GUO *et al.*, 2005; MEYER *et al.*, 2012). Em um artigo publicado por Liu *et al.* (2010), foi avaliada a biodegradação de benzeno por espécies isoladas do gênero *Bacillus* e por culturas mistas com diferentes espécies de *Bacillus* sp. Concluiu-se que as culturas mistas apresentaram mais eficiência do que os indivíduos isolados. Portanto, conjuntos de populações mistas com amplas capacidades enzimáticas gerais são necessários para energizar a taxa e a extensão da degradação de hidrocarbonetos de petróleo (MUKHERJEE; BORDOLOI 2011).

Figura 7 - Dendograma filogenético representando relações evolutivas entre os isolados nativos de poços de monitoramento contaminados por Biodiesel B20 e B100, identificados por meio de sequenciamento do gene RNAr 16S (5' - 3').



0.03

Fonte: A autora (2023).

4.3. Ensaio de Seleção de Bactérias Halotolerantes

Os dados de absorvância óptica foram obtidos a partir da leitura por espectrofotometria do conteúdo dos frascos após a inoculação (Figura 8). Os frascos não inoculados com as estirpes foram utilizados para calibrar o espectrofotômetro e dados discrepantes foram desconsiderados. Os valores obtidos foram representados graficamente na Figura 9.

Figura 8 - Frascos com inóculos após período de incubação em meio ágar nutriente com 0, 2, 5 e 10% de NaCl.



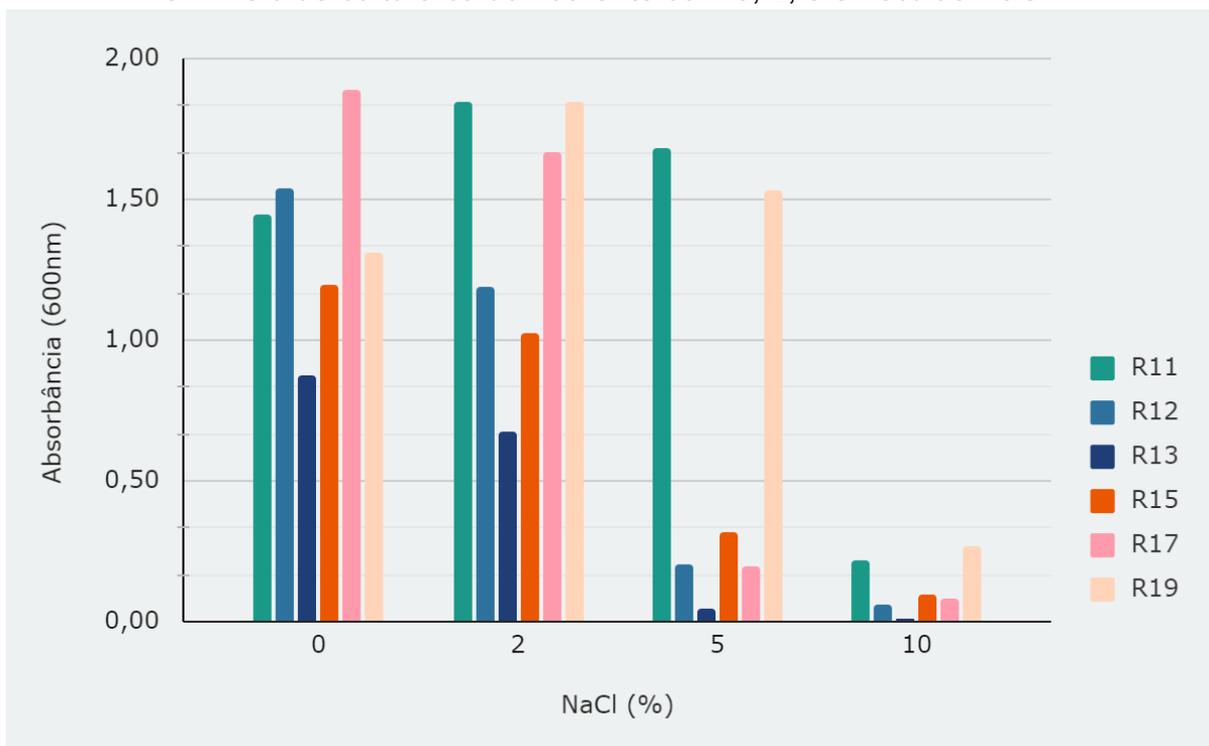
Fonte: A autora (2023).

Todos os isolados cresceram em meio com 10% de NaCl dissolvido, com destaque para os isolados P10R11 e P10R19 que obtiveram maior crescimento em comparação aos outros, os mesmos isolados apresentaram crescimento de biomassa maior no meio de cultura com 5% de NaCl, indicando preferência por um meio de cultura mais salino. Em geral foi observada a redução de biomassa produzida a medida que a aumentava concentração de NaCl na cultura, e por isso, os valores obtidos nos frascos com 10% de NaCl possuem menores valores de absorvância.

Referente ao plaqueamento para verificar o crescimento bacteriano após o estresse salino, todos os isolados conseguiram colonizar as placas com Ágar nutriente sólido. Os isolados R11, R13 e R19 apresentaram ótimo crescimento,

independente da salinidade em que foram submetidos. Nas placas com R15 e R17, por sua vez, foi observado que a quantidade de colônias reduziu significativamente à medida em que os isolados foram expostos a maiores salinidades.

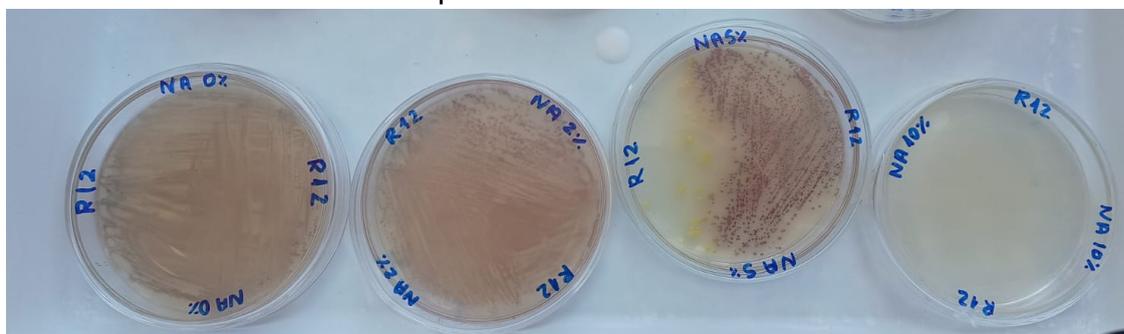
Figura 9 - Densidade óptica das amostras após o período de 5 dias de incubação em meio de cultura caldo nutriente com 0, 2, 5 e 10% de NaCl.



Fonte: A autora (2023)

O isolado P06R12 apresentou crescimento em todas as placas mas observou-se alteração na coloração das colônias, as amostras com 0 e 2% de NaCl apresentaram coloração roxa, enquanto a amostra com 5% de NaCl apresentou colônias amarelas e roxas. Na placa com isolados submetidos a meio de cultura com 10% de NaCl não foi observado crescimento macroscópico de unidades formadoras de colônias (Figura 10).

Figura 10 - Crescimento em placa de Petri, com ágar nutriente, da amostra P06R12 após estresse salino.



Fonte: A autora (2023)

A densidade óptica, no entanto, é um método que possui limitações, pois é um método que pode medir a biomassa no conteúdo do meio de cultura, entretanto, não é possível garantir que as células ali representadas estão ativas. A diferença no tamanho celular dos organismos e a presença de organismos mortos podem interferir no resultado obtido, portanto também é incerto usar a absorvância para comparar o crescimento celular no meio salino.

Coligando os resultados obtidos à área de extração das espécies, os indivíduos isolados são nativos de solos em zonas de transição, caracterizadas por solos alagadiços e de alta salinidade devido à proximidade ao mar. Todos os isolados foram capazes de colonizar o meio de cultura com 0, 2, 5 e 10% de NaCl, portanto, pode-se relacionar o desenvolvimento destes microrganismos nas diferentes concentrações de NaCl à dinâmica química da zona de mangue, que sofre influências marinhas e terrestres simultaneamente e que conseqüentemente, possui frequente variação nas propriedades físico-químicas do solo.

4.4. Avaliação da Produção de Biossurfactantes

A partir dos valores obtidos por espectrofotometria, que indicam neste contexto, o crescimento celular no meio de cultura MSM suplementado com 2% de óleo Diesel, a densidade óptica é consideravelmente superior nos frascos

correspondentes aos isolados P06R9, P10R17 e P10R19 (Tabela 3). Em oposição, os frascos com a amostra P06R11 e P10R14 apresentaram menor absorvância.

Tabela 2 - Valores de Absorvância quantificada em densidade óptica por Espectrofotometria. F1 = Frasco 1; F2 = Frasco 2; F3 = Frasco 3.

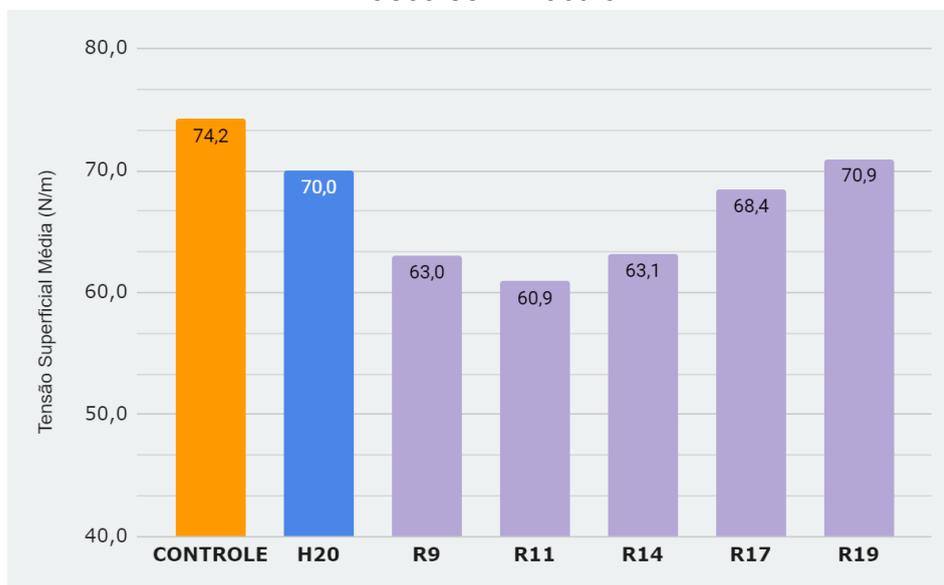
Frascos	Absorvância (600nm)				
	R9	R11	R14	R17	R19
F1	2,300	0,130	0,172	2,328	2,283
F2	2,211	0,105	0,307	2,388	2,120
F3	2,168	0,220	0,139	2,352	2,067

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Os resultados da leitura da tensão superficial (Tabela 4), entretanto, mostraram que o isolado P06R11 obteve melhores resultados alcançando uma média de tensão superficial de 60,91 N/m. Não foi possível, identificar a espécie deste isolado por meio dos métodos moleculares utilizados neste estudo, mas é concebível afirmar que o microrganismo em estudo foi capaz de utilizar a fonte de carbono para produzir biossurfactantes, sem que fosse necessária grande produção de biomassa. Não foi observado um padrão de valores para redução da tensão superficial, cada isolado mostrou ter diferentes reações diante das condições de inoculação, essa variação reflete a resposta dos isolados ao meio de cultivo. No estudo de Cao *et al.* (2021) a biossíntese de Ramnolipídeos por *Paraburkholderia* sp. foi quantificada a partir da utilização de diferentes fontes de carbono por subprodutos de biodiesel. Os microrganismos tiveram diferentes padrões de metabolismo diante desta variável, o que indica que as fontes de carbono interferem no metabolismo dos microrganismos.

Dentre os isolados utilizados para o ensaio não foi selecionado nenhum do grupo *Burkholderia*, mas vale ressaltar que este gênero também tem o potencial de produzir biossurfactantes e comprovou-se que espécies do gênero tem bom desempenho na biossíntese deste componente e um meio MSM utilizando diesel como fonte de carbono (MOHAMMED; TAYEL; ELGUINDY, 2018).

Figura 11 - Tensão Superficial nos frascos com meio MSM e Biodiesel comercial como fonte de carbono após 7 dias de incubação em Shaker. Controle = Frasco sem inóculo.



Fonte: A autora (2023)

O valor médio de 70,95 N/m de tensão superficial para o isolado P10R19, que corresponde a *Serratia* sp., foi a menor redução por biossurfactantes, o resultado pode indicar que o meio de cultura MSM com 2% de diesel não é consentâneo para a produção de biossurfactantes, visto que outras produções científicas demonstram alta redução na tensão superficial por biossurfactantes produzidos por *Serratia* sp. diante de óleos vegetais (ARAÚJO *et al.*, 2019; FERRAZ; ARAÚJO; PASTORE, 2002) e meio de ágar peptona/glicerol (PG) (MATSUYAMA *et al.*, 1986), como fontes nutricionais.

Tabela 3 - Dados de tensão superficial do meio de cultura líquido após inoculação em MSM. F1 = Frasco 1; F2 = Frasco 2; F3 = Frasco 3.

Frascos	TENSÃO SUPERFICIAL (N/m)						
	CONTROLE	H2O	R9	R11	R14	R17	R19
F1	74,72	70,50	58,46	57,71	62,55	67,78	70,43
	74,72	70,00	61,80	60,23	62,12	67,99	68,64
	73,27	70,00	72,90	62,19	61,17	-	69,94
	73,29	-	-	-	-	-	-
F2	73,71	-	62,86	59,01	62,69	66,54	69,94
	76,27	-	65,73	60,36	65,07	68,69	72,00
	71,11	-	67,03	62,36	-	69,68	71,80
	75,24	-	-	-	-	68,11	68,97
F3	-	-	57,89	60,34	62,20	69,12	72,50
	-	-	61,39	63,58	63,53	69,78	72,64
	-	-	59,34	62,44	65,63	68,06	72,62
MÉDIA	74,04	70,17	63,04	60,91	63,12	68,42	70,95

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

O resultado de densidade óptica e tensão superficial está correlacionado ao tipo de composto sintetizado pelas bactérias. Contudo, as propriedades dos compostos biossurfactantes produzidos dependem não só da origem microbiana (DESAI; BANAT, 1997), mas também são influenciadas pela natureza das fontes de carbono, nitrogênio e elementos minerais, que determinam a sua composição química e estrutural (Luna *et al.* 2011; Gomes & Nitschke 2012).

4.5. Considerações Finais

O principal interesse dos estudos com microrganismos degradadores de hidrocarbonetos oriundos de combustíveis é descobrir a capacidade metabólica dos microrganismos de mineralizar ou transformar contaminantes orgânicos em substâncias menos nocivas que possam ser integradas nos ciclos biogeoquímicos naturais. Contudo, quando se trata do ambiente costeiro ou marinho, condições físico-químicas se tornam um fator limitante nas tecnologias de biorremediação. O estudo com bactérias nativas de ambientes costeiros como manguezais, dunas,

costões rochosos e marismas, contribui para a identificação de organismos que conseguem promover a remediação de poluentes ao mesmo tempo que conseguem suportar os estresses ambientais. Os gêneros identificados por este trabalho são majoritariamente provenientes de solo, apresentam boa adaptação diante das diferentes condições aos quais foram submetidos e portanto, são fortes candidatos para integrar ao grupo de espécies utilizadas em tecnologias de biorremediação.

5. CONCLUSÃO

Diante das respostas dos microrganismos estudados neste trabalho é possível certificar que as bactérias se mostram seres versáteis, de fácil adaptação em condições distintas, e a investigação de suas vias metabólicas para consumir compostos orgânicos e inorgânicos é necessária para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação de baixo impacto ambiental (SILVA *et al.* 2014). Como citado anteriormente, o manejo com espécies nativas é uma opção segura para o equilíbrio ecossistêmico, além de ser um método de baixo custo. A aplicação desses organismos deve ser feita mediante a estudos que reconheçam o poluente orgânico, interações biológicas e características físicas e químicas do ambiente, pois as respostas metabólicas dependem dos parâmetros ambientais para demonstrarem eficiência.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLLI, Marco et al. Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: a comparative study. **Journal Of Environmental Management**, [S.L.], v. 153, n. 1, p. 121-131, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.007>.
- ARAÚJO, Hélvia W. C. et al. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 1-13, 4 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0>. Acesso em: 27 maio 2023.
- ARORA, Pankaj Kumar. Bacilli-Mediated Degradation of Xenobiotic Compounds and Heavy Metals. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 8, p. 1-28, 9 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.570307>. Acesso em: 09 maio 2023.
- ARULAZHAGAN, P.; VASUDEVAN, N.. Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 256-262, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.09.017>. Acesso em: 20 de maio de 2023.
- BAHADIR, Pinar Sözer et al. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal Of Botany**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 183-196, 20 mar. 2018. The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK-ULAKBIM) - DIGITAL COMMONS JOURNALS. <http://dx.doi.org/10.3906/bot-1706-51>. Acesso em: 13 maio 2023.
- BAKHSHANDEH, E. et al. Phosphate solubilization potential and modeling of stress tolerance of rhizobacteria from rice paddy soil in northern Iran. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 2437-2447, 4 jun. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-014-1669-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-014-1669-1>. Acesso em: 22 set. 2022.
- BENDIA, A. G. et al. Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. **Extremophiles**, v. 22, p. 917 - 929, 2018.
- BENTO, F. M. et al. Biossurfactantes. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. 2ª edição revista e ampliada. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 151-184.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP. Ministério de Minas e Energia. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2022**. Rio de Janeiro: Ano: 2006. 266 p. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2022#Apresenta%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em: 04 jun. 2023.

BRASIL. (2005) Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF: Imprensa Oficial.

BRASIL. Lei Nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências.. Brasília, DF: **Diário Oficial da União**, 2014.

BUENO, Silva M. **Bactérias Produtoras De Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização E Comportamento Num Sistema Modelo**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de M Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2008. Cap. 3. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100904/bueno_sm_dr_sjrp.pdf?sequence=1. Acesso em: 31 mar. 2022.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The Utilization of Certain Hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, [S.L.],v. 41, n. 5, 653–673, Maio, 1941. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374727/>.

CAO, Jia et al. Genome, metabolic pathways and characteristics of cometabolism of dibenzothiophene and the biodiesel byproduct glycerol in *Paraburkholderia* sp. C3. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 326, n. 124699, p. 1-8, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124699>.

CARMO, E. H.; TEIXEIRA, M. G.. Desastres tecnológicos e emergências de saúde pública: o caso do derramamento de óleo no litoral do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. 2020, v. 36, n. 2 [Acessado 29 Setembro 2022] , e00234419. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0102-311X00234419>>. Epub 31 Jan 2020. ISSN 1678-4464. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00234419>.

CHAKRABORTY, Sinjini; MUKHERJI, Soumyo; MUKHERJI, Suparna. Surface hydrophobicity of petroleum hydrocarbon degrading *Burkholderia* strains and their interactions with NAPLs and surfaces. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 101-108, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.02.019>.

CHIARANDA, H. S.. **Alterações biogeoquímicas em águas subterrâneas impactadas por biodiesel de soja e misturas de diesel/biodiesel (B20).**

Orientador: Prof. Dr. Henry X. Corseuil. 2011. 191 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

DELLAGNEZZE, B. M., GOMES M. B., OLIVEIRA V. M. Microbes and Petroleum Bioremediation. In: Kumar V., Kumar M., Prasad R. (ed.) **Microbial Action on Hydrocarbons**. Singapore: Springer, 2019 p. 97–123.

DOI:10.1007/978-981-13-1840-5_5.

D'ERRICO, Giada et al. Methyl t-butyl ether-degrading bacteria for bioremediation and biocontrol purposes. *Plos One*, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 228-936, 21 fev. 2020. Public Library of Science (PLoS). DOI: //doi.org/10.1371/journal.pone.0228936. Acesso em: 10 maio 2023.

DESAI, J D; BANAT, I M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 47-64, mar. 1997. American Society for Microbiology.

<http://dx.doi.org/10.1128/membr.61.1.47-64.1997>.

DIAS, Graciela M. et al. Comparative genomics of *Paraburkholderia kururiensis* and its potential in bioremediation, biofertilization, and biocontrol of plant pathogens.

Microbiologyopen, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 1-16, 27 fev. 2019. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.801>.

DORTA, D. et al. Bactérias Isoladas de Sedimento de Manguezal com Potencial de Biorremediação de Contaminações Causadas por Produtos Derivados de Petróleo. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 34, Dezembro, 2020. DOI:

https://doi.org/10.18677/EnciBio_2020D6.

DUARTE. R. T. D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e permafrost polares.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 201p., 2010.

FAJARDO-CAVAZOS, P.; WAYNE N. Bacillus Endospores Isolated from Granite: Close Molecular Relationships to Globally Distributed Bacillus Spp. from Endolithic and Extreme Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, Abril 2006, S. 2856–63. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2856-2863.2006>.

FARHADIAN, Mehrdad et al. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 99, n. 13, p. 5296-5308,

set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.025>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.025>. Acesso em: 12 out. 2022.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, [S.L.], v. 205, n. 3, p. 223-240, 15 dez. 2004. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.060>. Acesso em: 16 fev. 2022.

FERRAZ, Cristina; ARÃOJO, Álvaro A. de; PASTORE, Gláucia M.. The Influence of Vegetable Oils on Biosurfactant Production by *Serratia marcescens*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 98-100, n. 1-9, p. 841-848, mar. 2002. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1385/abab:98-100:1-9:841>. Acesso em 27 maio de 2023.

FERRIS, Mike J. et al. Cyanobacterial Ecotypes in Different Optical Microenvironments of a 68°C Hot Spring Mat Community Revealed by 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region Variation. **Applied and Environmental Microbiology**, Bd. 69, Nr. 5, Maio 2003, S. 2893–98. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2893-2898.2003>.

GOMES, Milene Zezzi do Valle; NITSCHKE, Marcia. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 441-447, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.025>.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Precipitation of DNA with Ethanol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor Protocols**, p. 1116 – 1120, 2016. DOI: 10.1101/pdb.prot093377

GROSSER, R J; WARSHAWSKY, D; VESTAL, J R. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 12, p. 3462-3469, dez. 1991. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.57.12.3462-3469.1991>.

GUO, C.L. et al. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 51, n. 8-12, p. 1054-1061, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.012>.

HE, Fanglian. E. coli Genomic DNA Extraction. **Bio-Protocol**, [S.L.], v. 1, n. 14, p. 101-104, 20 jul. 2011. Bio-Protocol, LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21769/bioprotoc.97>.

KARLAPUDI, Abraham Peele et al. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. **Petroleum**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 241-249, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>.

KHANGHAHI, Mohammad Y. et al. Isolation of Bacteria with Potential Plant-Promoting Traits and Optimization of Their Growth Conditions. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 78, n. 2, p. 464-478, 23 dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-020-02303-w>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-020-02303-w>. Acesso em: 21 set. 2022.

KERBER, Sheila. S. **Prospecção de bactérias com potencial na biorremediação de áreas contaminadas com BTX (benzeno, tolueno e xileno)**. Orientador: Prof. Dr. Admir José Giachini. 2020. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020. Cap. 3.

LANE, D. J. et al. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M., (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: **John Wiley and Sons**, p. 115-175, 1991.

LIU, Jiann-Hong et al. Biodegradation of benzene by pure and mixed cultures of *Bacillus* spp. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 1557-1567, 23 fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0331-9>.

LIU, Yang et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-11, 16 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep14082>.

LOVLEY, D. R. et al. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. **Nature**, [S.L.], v. 339, p. 297-299, maio, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1038/339297a0>

LOVLEY, D. R. et al. Humic Substances as a Mediator for Microbially Catalyzed Metal Reduction. **Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 152-157, maio 1998. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-401x\(199805\)26:33.0.co;2-d](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-401x(199805)26:33.0.co;2-d). Acesso em: 09 mar. 2022.

LUNA, Juliana et al. Properties of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Chemical Engineering Transactions**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 67-72, jun. 2012. AIDIC: Italian Association of Chemical Engineering. <http://dx.doi.org/10.3303/CET1227012>.

MACKAY, Douglas M. et al. Impact of ethanol on the natural attenuation of benzene, toluene, and o-xylene in a normally sulfate-reducing aquifer. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 19, p. 6123-6130, 2006. DOI: 10.1021/es060505a.

MAKKAR, Randhir s; CAMEOTRA, Swaranjit s; BANAT, Ibrahim M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Amb Express**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 5-24, mar. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>.

MARIANO, Adriano Pinto *et al.* Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal Of Biotechnology**. [S.L.], p. 1323-1328. 02 maio de 2008. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJB>. Acesso em: 14 fev. 2022.

MATEO, Nicola´s *et al.* Bioprospecting: a tool for survival and a source of inspiration and innovation. In: MATEO, Nicola´s *et al.* **Encyclopedia of Biodiversity**. [S.L.]: Academic Press, 2001. p. 471-488.

MATSUYAMA, Tohey *et al.* Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. **Microbiology**, [S.L.], v. 132, n. 4, p. 865-875, abril 1986. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-132-4-865>. Acesso em: 27 maio de 2023.

MEYER, Daniel Derrossi *et al.* Capability of a selected bacterial consortium for degrading diesel/biodiesel blends (B20): enzyme and biosurfactant production. **Journal Of Environmental Science And Health, Part A**, [S.L.], v. 47, n. 12, p. 1776-1784, 4 jul. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2012.689227>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/10934529.2012.689227?src=getftr>. Acesso em: 09 maio 2023.

MOHAMMED, A.B. Abeer; TAYEL, Ahmed A.; ELGUINDY, Nihal M.. Production of new rhamnolipids Rha C16-C16 by *Burkholderia* sp. through biodegradation of diesel and biodiesel. **Beni-Suef University Journal Of Basic And Applied Sciences**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 492-498, dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.05.003>. Acesso em: 24 maio 2023.

MOHANTY, Gita; MUKHERJI, Suparna. Effect of an emulsifying surfactant on diesel degradation by cultures exhibiting inducible cell surface hydrophobicity. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, [S.L.], v. 82, n. 11, p. 1004-1011, 18 abr. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1753>.

MOHANTY, Sagarika; MUKHERJI, Suparna. Alteration in cell surface properties of *Burkholderia* spp. during surfactant-aided biodegradation of petroleum hydrocarbons. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 193-204, 17 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3703-7>. Acesso em: 09 maio 2023.

MUANGCHINDA, C. et al. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 114, n. 5, p. 1311-1324, 1 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12128>.

MUKHERJEE, Ashis K.; BORDOLOI, Naba K.. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 471-478, 12 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-010-0391-2>.

NEGI, Ankita et al. **Applications and challenges of microarray and RNA-sequencing. Bioinformatics**, [S.L.], v. 1, n. 6, p. 91-103, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-89775-4.00016-x>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/phred-quality-score#:~:text=Phred%20quality%20score%20is%20used,the%20base%20call%20is%2099%25..> Acesso em: 23 mar. 2023.

NGUYEN-PHAN, Thuy-Duong et al. Adsorption of benzene onto mesoporous silicates modified by titanium. **Research On Chemical Intermediates**, [S.L.], v. 34, n. 8-9, p. 743-753, ago. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03036933>. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03036933>. Acesso em: 12 out. 2022.

PALYS, Thomas et al. Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two bacillus species. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 1021-1028, 1 maio 2000. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-3-1021>.

PASQUALINO, J; MONTANE, D; SALVADO, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass And Bioenergy**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 874-879, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.03.002>.

PATOWARY, Kaustuvmani et al. Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, n. 1092, 14 jul. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>.

PINILLA, Maria Paula Parada. **Caracterização de bactérias halotolerantes isoladas do bioma caatinga e avaliação da produção de biopolímeros**. 2016. 115 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-19052017-103842/pt-br.php#:~:te>

xt=Dentro%20deste%20grupo%20encontram%20se,toleram%20altas%20concentra%C3%A7%C3%B5es%20de%20NaCl. Acesso em: 05 mar. 2023.

PROUDY, I., u. a. „Genotypic Characterization of Enterobacter Sakazakii Isolates by PFGE, BOX-PCR and Sequencing of the FliC Gene“. **Journal of Applied Microbiology**, Bd. 0, Nr. 0, September 2007, S. 070915213557008-??? DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03526.x>.

RAMOS, D.T., da Silva, M.L.B., Chiaranda, H.S. et al. Biostimulation of anaerobic BTEX biodegradation under fermentative methanogenic conditions at source-zone groundwater contaminated with a biodiesel blend (B20). **Biodegradation** 24, 333–341 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9589-y>

REHMAN, Ramla et al. Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma* sp. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 418, n. 2021, p. 126-276, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126276>.

REMA. **Desenvolvimento De Protocolos De Remediação De Áreas Contaminadas E De Descomissionamento De Áreas Recuperadas** - Estudo Piloto Fazenda Experimental Ressacada. Florianópolis: UFSC, 2019. 93 p. (Relatório Técnico)

REMA (Florianópolis-SC). Núcleo Ressacada de Pesquisa em Meio Ambiente. **Biorremediação de áreas contaminadas**. 2019. Ferrorredução. Disponível em: <https://rema.ufsc.br/portfolio/biorremediacao-de-areas-contaminadas/>. Acesso em: 01 mar. 2022.

RUSSELL, Nicholas J.. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Journal Of Bioenergetics And Biomembranes**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 93-113, fev. 1989. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00762214>.

SAWANA, Amandeep et al. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers In Genetics**, [S.L.], v. 5, n. 429, p. 1-22, 19 dez. 2014. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>. Acesso em: 26 maio de 2023

SENDZIKIENE, E. Biodegradability of biodiesel fuel of animal and vegetable origin. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, [S.L.], v. 109, n. 5, p. 493-497, maio, 2007. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200600243>.

SHARMA, Sandeep; KULKARNI, Jayant; JHA, Bhavanath. Halotolerant Rhizobacteria Promote Growth and Enhance Salinity Tolerance in Peanut. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, 13 out. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01600>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01600>. Acesso em: 22 set. 2022.

SINGH, Baljinder; SINGH, Kashmir. Bacillus: as bioremediator agent of major environmental pollutants. **Bacilli And Agrobiotechnology**, [S.L.], p. 35-55, 2016. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_2.

SORENSEN, J. et al. Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 42(1), p. 5-11, 1981. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243952/>.

TAVARES, Silvio. Técnicas de remediação. In: TAVARES, Silvio. Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados: conceitos básicos e fundamentos. Joinville: **Embrapa**, 2013.p.(61)-(90). Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/983651>. Acesso em: 17 jan. 2022.

TURNER, S. et al. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327 – 338, 1999.

VENOSA, A. D. et al. Bioremediation and biorestitution of a crude oil-contaminated freshwater wetland on the St. Lawrence river. **Bioremediation Journal**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 261–281, 2002.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Method Mol Cell Biol** 5, 25–40, 1994.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid Production by Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 Originating from Petrochemical Wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

WORLDWATCH INSTITUTE. (2007) **Biofuels for transport: global potential and implications for sustainable energy and agriculture**. 1 ed. Londres: Ed. Earthscan. 452 p.

XIAO, Wendan et al. Isolation and characterization of chromium(VI)-reducing *Bacillus* sp. FY1 and *Arthrobacter* sp. WZ2 and their bioremediation potential. *Bioremediation Journal*, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 100-108, 21 fev. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10889868.2017.1282939>.