



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

BELLA GISELLY TORRES ALVES

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE HEXADECANO POR UM CONSÓRCIO
DE ACTINOBACTÉRIAS IMOBILIZADO EM QUITOSANA EM MICROCOSMOS DE
SEDIMENTOS DE MANGUEZAL POR MEDIDA DE ATIVIDADE
DESIDROGENÁSICA

FORTALEZA

2018

BELLA GISELLY TORRES ALVES

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE HEXADECANO POR UM CONSÓRCIO DE
ACTINOBACTÉRIAS IMOBILIZADO EM QUITOSANA EM MICROCOSMOS DE
SEDIMENTOS DE MANGUEZAL POR MEDIDA DE ATIVIDADE
DESIDROGENÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A477a Alves, Bella Giselly Torres.

Avaliação da biodegradação de hexadecano por um consórcio de actinobactérias imobilizado em quitosana em microcosmos de sedimentos de manguezal por medida de atividade desidrogenásica / Bella Giselly Torres Alves. – 2019.

79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Biorremediação . 2. Bioaumentação. 3. Alcano. 4. Gordonia . 5. Micrococcus. I. Título.

CDD 660.6

BELLA GISELLY TORRES ALVES

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE HEXADECANO POR UM CONSÓRCIO DE
ACTINOBACTÉRIAS IMOBILIZADO EM QUITOSANA EM MICROCOSMOS DE
SEDIMENTOS DE MANGUEZAL POR MEDIDA DE ATIVIDADE
DESIDROGENÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Emilio de Castro Miguel
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A Minha Família, por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de estar aqui, agora, contribuindo para um mundo melhor.

À minha Mãe Luzia Torres, por acreditar em mim e me apoiar em todos os sentidos da minha vida.

À minha irmã Raquel, por ser exemplo de pessoa e sempre me aconselhar no melhor caminho desde que eu era pequena.

À minha orientadora Vânia Melo, por todos os ensinamentos, conselhos, paciência, parceria e carinho ao longo desses 2 anos.

À minha amiga Mirella, por todo o apoio, correções, ajuda e amizade que vem desde a iniciação científica.

À professora Denise, pelos conselhos e por ser sempre prestativa no laboratório.

Aos meus companheiros do laboratório Samuel, Jonathan, Malu, Larissa, Gabi, Claudiane, João, Bárbara, Brenda e todos os outros que me ensinaram muito, ajudaram na bancada, foram companhia, conversa e riso que tornou a rotina no laboratório muito mais feliz.

Ao meu namorado Luiz, pelo apoio, encorajamento e parceria.

Ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, pelo desenvolvimento profissional obtido ao longo do mestrado.

Aos Prof Dra Denise e Prof Dr Emilio por aceitarem participar desta banca e pela contribuição dada neste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

- Isaac Newton

RESUMO

A contaminação por petróleo e seus derivados é um problema recorrente para os ecossistemas costeiros, como os manguezais. Dentre as técnicas de descontaminação, a biorremediação com microrganismos imobilizados se destaca pela proteção fornecida pela matriz aos microrganismos degradadores, além da facilidade de aplicação, transporte e armazenamento. O objetivo desse estudo foi analisar a biodegradação do n-hexadecano em microcosmos de sedimentos de manguezal por um consórcio de actinobactérias hidrocarbonoclásticas. Para isso, o consórcio composto por *Gordonia* sp. (Hex 5) e *Micrococcus* sp. (Hex 6), nas formas livre e imobilizado em esferas de quitosana, foi utilizado para degradar n-hexadecano em microcosmos durante 35 dias. A biodegradação foi monitorada por meio de contagens do número de células viáveis e medidas da atividade desidrogenásica (ADH). Também foram feitas pesquisa do gene *alk B*, que codifica uma enzima-chave na degradação do alcano, e avaliado a produção de biossurfactantes. As análises mostraram que o grupo tratado com o consórcio imobilizado apresentou um pico de ADH ($12 \pm 0,11 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) no sexto dia de experimento, acompanhado de um aumento de células viáveis que atingiu $6,4 \times 10^8$ UFC/g. O grupo não tratado manteve a ADH em torno de $0,41 \pm 0,05 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e contagem de viáveis em torno de $3,3 \times 10^7$ UFC/g. O grupo tratado apenas com quitosana apresentou a mais alta ADH no terceiro dia, evidenciando um efeito bioestimulante do microbioma autóctone do sedimento. O consórcio livre promoveu aumento da ADH e contagem de viáveis, porém significativamente menor do que o consórcio imobilizado. Ambas as culturas produziram biossurfactantes e o gene *alkB* foi detectado apenas em HEX 5. O produto desenvolvido neste estudo representa uma inovação para biorremediação de sedimentos contaminados com alcanos, com a vantagem de ser eficiente, de fácil manuseio, transporte, armazenamento, biodegradável e seguro para o meio ambiente.

Palavras-chave: Biorremediação. Bioaugmentação. Alcano. *Gordonia*. *Micrococcus*.

ABSTRACT

The contamination by oil and its derivatives is a recurrent problem for coastal ecosystems, such as mangroves. Among decontamination techniques, bioremediation with immobilized microorganisms stands out because of the protection conferred by the matrix to the degrading microorganisms, besides the easier application, transport and storage. The objective of this study was to analyze the biodegradation of hexadecane in a microcosm of mangrove sediment by a consortium of hydrocarbonoclastic actinobacteria. For that, the consortium composed by *Gordonia* sp. (Hex 5) and *Micrococcus* sp. (Hex 6), in free form and immobilized in chitosan spheres, was utilized to degrade hexadecane in a microcosm for 35 days. The biodegradation was monitored by counting of viable cells and measure of dehydrogenase activity (DHA). Furthermore, assays were performed to identify biosurfactants production and the *alkB* gene, that codes the alkane monooxygenase, a key enzyme to the pollutant degradation. The analysis showed that the group treated with the immobilized consortium presented high ADH ($12 \pm 0,11 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) in the sixth day, along with a spike in the viable cell count ($6,4 \times 10^8$ CFU/g). The untreated group held the ADH at $0,41 \pm 0,05 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ and the viable cell count at $3,3 \times 10^7$ CFU/g. The group treated only with chitosan presented its highest DHA in the third day, displaying a biostimulant effect of the sediment's autochthonous microbiome. The free consortium promoted a spike in the ADH and in the viable cell count albeit significantly lower than the immobilized consortium. Both cultures produced biosurfactants and only HEX 5 was detected to have de *alkB* gene. The product developed in this study represents an innovation for bioremediation of sediments contaminated with alkanes, with the advantage of being efficient, easy to use, transport, store and it is biodegradable and environment friendly.

Palavras-chave: Bioremediation. Bioaugmentation. Alkanes. *Gordonia*. *Micrococcus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa mundial das zonas de distribuição de manguezais e o número de espécies de mangue ao longo de cada região	20
Figura 2 - Fatores que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos.....	23
Figura 3 - Vias de biodegradação de n-alcanos.....	24
Figura 4 - Principais métodos de imobilização.....	28
Figura 5 - Estruturas dos monômeros componentes da quitina e da quitosana obtida pela desacetiação alcalina da quitina.....	30
Figura 6 - Imagem de satélite da área de proteção ambiental do Rio Pacoti, mostrando os pontos de coleta no manguezal.....	35
Figura 7 - (A)Aspecto das esferas de quitosana com consórcio de HEX 5 e HEX 6 imobilizado. (B)Macerado de esferas para realização de contagem de células viáveis.....	37
Figura 8 - Reação de redução do sal de tetrazólio (2,3,5 – trifênil cloreto de tetrazólio - TTC) em formazan (trifênil formazan - TPF) catalisada por desidrogenases.....	41
Figura 9 - Curva padrão preparada a partir de soluções de concentrações conhecidas de formazan e leitura da absorbância (Abs) a 485 nm.....	42
Figura 10 - Esquema representativo do desmonte realizado em cada condição nos tempos de experimento, realizados nos dias 0, 3, 6, 12, 21, 28 e 35.....	46
Figura 11 - Atividade desidrogenásica de cada ponto de coleta do sedimento de manguezal realizada em quadruplicata no tempo zero.....	48
Figura 12 - Fase log da curva de crescimento da cepa HEX 5 (<i>Gordonia</i> sp.) cultivada em meio mineral com adição de 2% de NaCl.....	49
Figura 13 - Fase log da curva de crescimento da cepa HEX 6 (<i>Micrococcus</i> sp.) cultivada em meio mineral com adição de 2% de NaCl.....	50

Figura 14 - Processo de produção de esferas de quitosana com 107 UFC/g de HEX 5 e HEX 6 imobilizadas e contagem de viáveis para quantificação da densidade de células viáveis imobilizadas.....	51
Figura 15 - Contagem de viáveis do macerado das esferas de quitosana com consórcio imobilizado.....	52
Figura 16 - Placas correspondentes a diluição 10 ⁻⁵ da contagem de viáveis das esferas produzidas com HEX 5 e HEX 6 imobilizadas realizada um mês após produção.....	53
Figura 17 - Curva de crescimento de HEX 5 e HEX 6 em meio mineral contendo n-hexadecano como única fonte de carbono.....	54
Figura 18 - Contagem de viáveis de HEX 5 e HEX 6 em diferentes momentos da curva de crescimento.....	55
Figura 19 - Detecção do gene <i>alkB</i> nas cepas HEX 5 e HEX 6.....	56
Figura 20 - Aspectos das emulsões produzidas pela cultura e pelo sobrenadante da cultura de HEX 5 após 48 h de cultivo.....	57
Figura 21 - Aspectos das emulsões produzidas pela cultura e pelo sobrenadante da cultura de HEX 6 após 72 h de cultivo.....	58
Figura 22 - Percentuais de emulsificações de querosene promovido pelas culturas e sobrenadantes das culturas de HEX 5 (48 h de cultivo) e HEX 6 (72 h de cultivo). Letras iguais significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de Tukey.....	59
Figura 23 - Medidas de tensão superficial promovida pelos sobrenadantes das culturas de HEX 5 e HEX 6. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.....	59
Figura 24 - Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g. g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) nos determinados tempos de análise.....	61
Figura 25 - Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g. g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) nos determinados tempos de análise.....	62

Figura 26 - Contagem de células viáveis totais nos microcosmos de sedimentos de manguezal nos determinados tempos de análise.....	63
Figura 27 - Contagem de bactérias viáveis totais nos microcosmos de sedimentos de manguezal contaminado com hexadecano (10 g/Kg) adicionado do consórcio HEX 5 e HEX 6 imobilizado em esferas de quitosana no tempo T3.....	64
Figura 28 - Contagem de bactérias viáveis totais nos microcosmos de sedimentos de manguezal contaminado com hexadecano (10 g/Kg) adicionado do consórcio HEX 5 e HEX 6 livre no tempo T3.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições experimentais dos microcosmos com sedimentos de manguezal.....	43
Tabela 2 - Composição dos microcosmos de sedimento de manguezal nas diferentes condições testadas nesse estudo.....	45
Tabela 3 - Composição dos sedimentos de manguezal utilizado neste trabalho.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Contaminação de solo por petróleo e seus derivados.....	18
2.2	Manguezal.....	19
2.3	Biorremediação e biodegradação.....	21
2.4	Gêneros <i>Gordonia</i> e <i>Micrococcus</i>	25
2.5	Imobilização.....	27
2.6	Surfactantes e biossurfactantes.....	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	Geral.....	33
3.2	Específicos.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Coleta e caracterização de sedimentos de manguezal.....	34
4.2	Imobilização do consórcio de bactérias e quantificação da densidade de células imobilizadas.....	35
4.3	Curva de crescimento em hexadecano.....	37
4.4	Extração do DNA genômico das cepas HEX 5 e HEX 6 para detecção do gene <i>alkB</i>	38
4.5	Avaliação da produção de compostos ativos de superfície.....	39
4.6	Determinação da viabilidade celular do consórcio imobilizado após 30 dias.....	40
4.7	Atividade desidrogenásica.....	40
4.8	Ensaio de biorremediação de sedimentos de manguezal realizado em microcosmos.....	43
5	RESULTADOS	47
5.1	Caracterização dos sedimentos.....	47
5.2	Densidade de células imobilizadas nas esferas de quitosana.....	48
5.3	Determinação da viabilidade celular do consórcio imobilizado após 30 dias.....	52
5.4	Curva de crescimento em n-hexadecano.....	53
5.5	Detecção do gene <i>alkB</i> nas bactérias do consórcio.....	55
5.6	Avaliação da produção de compostos ativos de superfície.....	56

5.7	Ensaio de biorremediação de sedimentos de manguezal realizado em microcosmos.....	60
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por petróleo e seus derivados é um problema que tem despertado enorme preocupação nos últimos anos devido aos recorrentes acidentes envolvendo derramamentos no meio ambiente. Os ecossistemas costeiros, como os manguezais, são bastante afetados por esse tipo de poluição ambiental. Dentre os diferentes tipos de poluição ambiental tem-se o solo e a água subterrânea contaminados com hidrocarbonetos.

Os manguezais são ecossistemas que ocorrem nas zonas de maré. Esses ambientes são muito importantes para a manutenção de diversos processos ecológicos e manutenção do equilíbrio ambiental. No entanto, esses ambientes têm sido degradados tanto pelo uso excessivo de seus recursos quanto por poluentes domésticos e industriais.

As técnicas de biorremediação têm emergido como alternativas de melhor custo benefício, ambientalmente amigáveis e eficientes na limpeza dos ambientes contaminados, em comparação aos tratamentos químicos e físicos convencionais. Dentre as estratégias existentes, destacam-se a bioaugmentação, que consiste na adição de microrganismos com características catabólicas específicas capazes de degradar o contaminante, e a bioestimulação, onde estimula-se a microbiota nativa para elevar as taxas de biodegradação no local da contaminação. É importante que em qualquer tentativa de aplicação de técnicas de biorremediação, se conheça a comunidade microbiana local, os contaminantes e as características ambientais da área contaminada.

Os microrganismos possuem uma diversa capacidade metabólica e são muito empregados em estratégias de biorremediação. Eles podem ser utilizados isolados ou em consórcios de forma a obter maior complementaridade metabólica para a biodegradação de poluentes. Além disso, podem ser utilizados imobilizados em matrizes biocompatíveis, o que pode conferir vantagens a esses microrganismos quando aplicados no ambiente.

Este trabalho teve por objetivo avaliar um produto que consiste de esferas de quitosana contendo um consórcio de duas actinobactérias previamente isoladas de sedimentos de manguezal contaminado por petróleo, visando a degradação de

hexadecano, principal fração de alcanos do petróleo. As duas estirpes de bactérias utilizadas neste estudo são não patogênicas e pertencem aos gêneros *Gordonia* e *Micrococcus*. Este produto poderá ser empregado em ambientes contaminados *in situ* e é uma alternativa inovadora de biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos alifáticos, pois utiliza microrganismos imobilizados em uma matriz de baixo custo, biodegradável, que possui resistência mecânica. Além disso, já foi mostrado que a quitosana é capaz de estimular a microbiota local, contribuindo para maior remoção do poluente. Portanto, esse produto atinge melhores resultados por associar duas técnicas de biorremediação: a bioaugmentação, através da adição de microrganismos degradadores; e a bioestimulação, promovida pela matriz polissacarídica de imobilização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação de solo por petróleo e seus derivados

A contaminação ambiental por petróleo é um problema que tem despertado enorme preocupação nos últimos anos devido aos recorrentes acidentes de derramamento de óleo. Isso é atribuído principalmente ao aumento no consumo global de petróleo como fonte de energia e de matéria-prima para refinarias e indústrias petroquímicas que produzem combustíveis e polímeros sintéticos (VARJANI E UPASANI, 2017).

Entre os diferentes tipos de poluição ambiental, o solo e a água subterrânea contaminados com hidrocarbonetos emergem como um dos problemas de poluição mais comuns. As principais fontes de contaminação do solo e de águas subterrâneas por hidrocarbonetos incluem poços de petróleo e gás, refinarias de petróleo, locais de produção de gás manufacturado, oficinas mecânicas e estações de serviço de abastecimento. Em muitos casos, a contaminação proveniente dessas fontes ocorre por longos períodos de tempo, causando várias décadas de contaminação do solo e das águas subterrâneas (AL-HAWASH *et al.*, 2018).

As quatro principais frações de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) são: alcanos, compostos aromáticos, compostos de nitrogênio-enxofre-oxigênio (NSO) e a fração de asfalto. A fração composta por alcanos, possui número de carbonos variando de 1 a 40, e podem ser compostos de cadeia linear ou ramificada. Os alcanos são principalmente hidrocarbonetos saturados como o hexadecano, por exemplo. Os compostos aromáticos contêm pelo menos um anel benzeno, essa fração pode variar de benzeno (um anel aromático) a estruturas aromáticas policíclicas multi-aneladas compostas de derivados de hidrocarbonetos de NSO. Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) são exemplos conhecidos de compostos aromáticos de anel único (ou mononucleares) e são constituintes essenciais da gasolina (VARJANI, 2017). A volatilidade e a solubilidade em água dos hidrocarbonetos de maior peso molecular são menores do que os hidrocarbonetos de baixo peso molecular e, portanto, a persistência relativa dos hidrocarbonetos de alto peso molecular no ambiente é maior (KHAN *et al.*, 2018).

De acordo com o relatório *Toxic Release Inventory* (EPA) (2005), a indústria de refino do petróleo é uma das dez principais fontes de liberação e emissão de produtos químicos tóxicos no meio ambiente. Entre os poluentes hidrocarbonetos de petróleo, dezesseis hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) estão listados como de alto risco devido à alta estabilidade e permanência no meio ambiente. Isso se tornou uma grande preocupação devido à toxicidade desses compostos a muitos seres vivos, causando desequilíbrio nos ecossistemas (HASANUZZAMAN *et al.*, 2007). Além disso, pode ocorrer a biomagnificação destes contaminantes ao longo da cadeia trófica o que pode acarretar diversos malefícios aos seres humanos devido à presença de componentes hematóxicos, carcinogênicos e teratogênicos (VARJANI E UPASANI, 2017).

Muitos acidentes de derramamento de petróleo que ocorrem ao redor do mundo afetam ecossistemas costeiros como dos manguezais, que sofrem efeitos letais e subletais devido a exposição ao óleo (KHAN *et al.*, 2018).

2.2 Manguezal

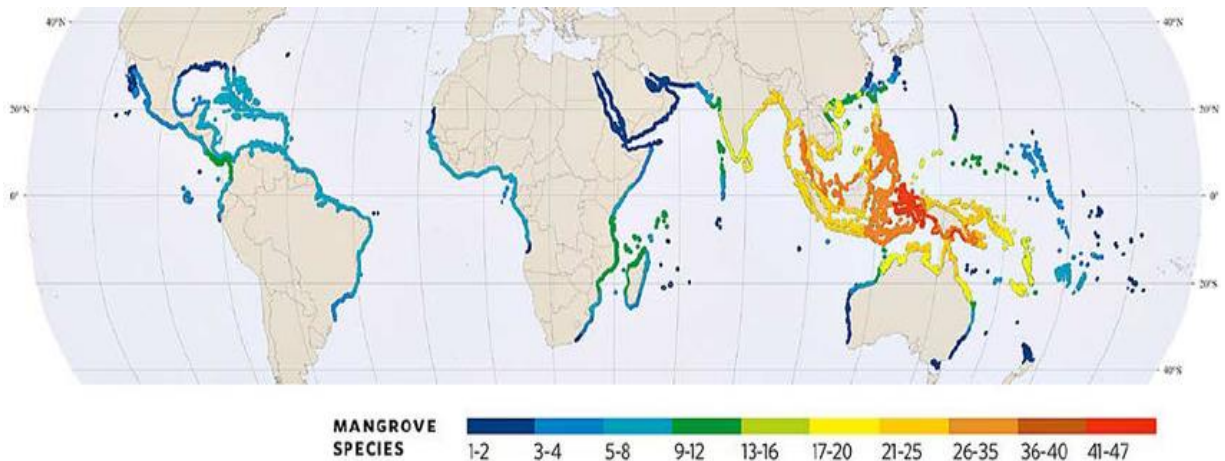
Os manguezais são ecossistemas costeiros, isto é, ocorrem nas zonas de maré. Formam-se em regiões de mistura de águas doces e salgadas, como estuários, baías e lagoas costeiras. Estes ambientes estão amplamente distribuídos no mundo, ocorrendo em zonas tropicais e subtropicais de 123 países (SPALDING *et al.*, 2010).

A comunidade do manguezal é composta por espécies de plantas, animais e microrganismos que possuem adaptações que possibilitam sua sobrevivência às condições variáveis de inundação e estresse salino impostas pelo regime das marés (MAITI E CHOWDHURY, 2013).

Manguezais são regiões de intensa ação de ciclos biogeoquímicos da matéria e desempenham importantes funções ecossistêmicas, além de apoiar redes alimentares complexas. Dentre essas funções destacam-se: proteção da linha de costeira; funcionamento como barreira mecânica à ação erosiva das ondas e marés; retenção de sedimentos carregados pelos rios, constituindo-se em uma área de

deposição natural; ação depuradora, funcionando como filtro biológico natural da matéria orgânica e área de retenção de metais pesados; área de concentração de nutrientes; área de reprodução, de abrigo e de alimentação de inúmeras espécies, área de renovação da biomassa costeira e estabilizador climático (ALVES, 2001).

Figura 1 - Mapa mundial das zonas de distribuição de manguezais e o número de espécies de mangue ao longo de cada região.



Fonte: (BORRELL, 2010)

Atualmente, a área de manguezal do mundo compreende cerca de 150.000 km², que é cerca de 50% da sua área histórica (MAITI; CHOWDHURY, 2013). A degradação desses ambientes tem ocorrido devido a grande pressão antrópica, culminando em desmatamento para usos de terra e usos urbanos. Nos remanescentes de manguezal, ainda ocorre degradação por uso acentuado de seus recursos (THOMAS *et al.*, 2017). A destruição dos manguezais é geralmente atribuída a decisões locais, forças de mercado, demanda industrial, expansão populacional ou impactos ambientais. Alguns dos principais impactos ambientais causados pela ação antrópica incluem: poluição térmica (vazão de água quente); despejo de resíduos de mineração e resíduos industriais; e derramamento de óleo proveniente da extração de petróleo. Embora existam esforços para diminuir essa perda, muitos dos recursos já foram perdidos de forma irreparável causando impactos ecológicos e econômicos consideráveis. Algumas iniciativas de conservação realizadas por países que possuem as maiores áreas de mangue do planeta, como Austrália (7%), Brasil (9%) e Indonésia (21%), incluem: reflorestamento, limpeza e remoção de poluentes (ALONGI, 2008; KLEKOWSKI *ET AL.*, 1994).

No Brasil, os manguezais são considerados “Área de Preservação Permanente” - APP e protegidos pela legislação nacional. Esse ecossistema está incluído em diversos dispositivos constitucionais (Constituição Federal de 1988, art. 225) e infra-constitucionais (Lei nº 6.938/81 – Lei da Política Nacional do Meio Ambiente; Lei nº 4.771/65 – Código Florestal; Lei nº 6.766/79 - Lei de Parcelamento do Solo; Lei Federal nº 9.605/98 – Lei de Crimes Ambientais; Lei Federal Nº 7.661/98 - Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro; CONAMA nº 04/1985).

Estudos mostram que solos com grande quantidade de matéria orgânica como do manguezal têm maior capacidade de retenção de poluentes devido à adsorção do poluente a matéria orgânica o que também acarreta em menor acessibilidade destes poluentes pelos microrganismos degradadores que possam estar presentes no solo (KHAN *et al.*, 2018). Tendo em vista a grande importância ecológica desses ambientes, é necessário investir no desenvolvimento de metodologias de mitigação dos danos causados por derramamento de contaminantes como o petróleo.

2.3 Biorremediação e biodegradação

A contaminação ambiental tem ocorrido lado a lado ao desenvolvimento das grandes cidades. Diversos são os resíduos oriundos das atividades humanas de produção e consumo de insumos em geral, causando desequilíbrios nos ecossistemas naturais e trazendo malefícios para a saúde humana. Isso tem causado muita preocupação e tem elevado o número de pesquisas que buscam formas de atenuar os danos causados pela poluição ambiental. Diante disso, as estratégias de biorremediação têm emergido como alternativa tecnológica e economicamente viável de remoção de contaminantes do meio ambiente (AL-HAWASH *et al.*, 2018).

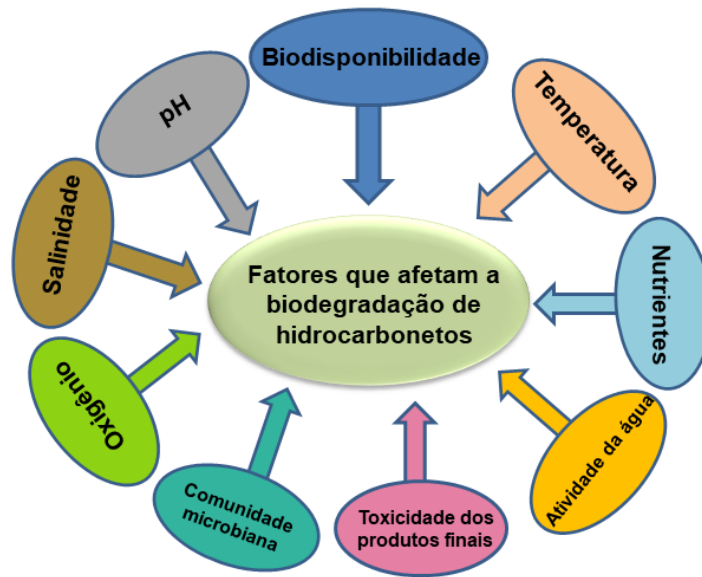
A biorremediação consiste na aplicação de organismos vivos, ou produtos do seu metabolismo no tratamento de ambientes contaminados (ADAMS *et al.*, 2015). Existem diferentes estratégias de biorremediação, e elas podem ser realizadas *in situ* (no local contaminado) ou *ex situ* (fora do local onde ocorreu a

contaminação). Dentre as estratégias *in situ*, podemos destacar: atenuação natural, técnica de *land farming* (aeração do solo), bioaumentação e bioestimulação. Dentre as estratégias *ex situ*, podemos citar a lavagem de solo contaminado com biosurfactantes, limpeza em biorreatores e tratamento em biopilhas (NWANKWEGU *et al.*, 2016).

As estratégias *in situ* possuem vantagens de terem menor custo pois não necessitam do transporte do material contaminado e podem ser aplicados a grandes áreas contaminadas. Dentre elas, a bioaumentação consiste na adição de microrganismos degradadores de poluentes a um ambiente contaminado. Muitas vezes esses microrganismos foram isolados de outros ambientes que também foram expostos a contaminantes, causando uma seleção de organismos capazes de viver nesses locais poluídos. Isso pôde ser constatado, por exemplo, em um estudo em que foi visto que em ambientes prístinos apenas 0,1% do microrganismos são capazes de degradar hidrocarbonetos, contudo esse número aumenta para 10% em locais poluídos com petróleo (VARJANI, 2017). A bioestimulação, por sua vez, consiste em adicionar nutrientes, oxigênio, aceptores de elétrons ou substratos que estimulem o metabolismo dos microrganismos do local contaminado, contribuindo para a degradação do contaminante, para a manutenção da atividade biológica e da ciclagem de nutrientes importantes realizada pelos microrganismos (ADAMS *et al.*, 2015).

Ambas as técnicas citadas têm como objetivo aumentar as taxas de biodegradação do contaminante. Esse é o processo primário envolvido nas estratégias de biorremediação, e para que alcance taxas elevadas é necessário que os microrganismos possuam capacidades catabólicas como indução de genes que codificam enzimas específicas que estejam envolvidas na clivagem dos contaminantes. Quando os microrganismos estão em condições ótimas, eles podem alcançar níveis elevados de biodegradação (VARJANI e UPASANI, 2017). A biodegradação de hidrocarbonetos é influenciada principalmente pela quantidade e pela natureza desses compostos presentes no ambiente. Além disso, muitos fatores ambientais também podem interferir nesse processo (**Figura 2**).

Figura 2 - Fatores que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos.

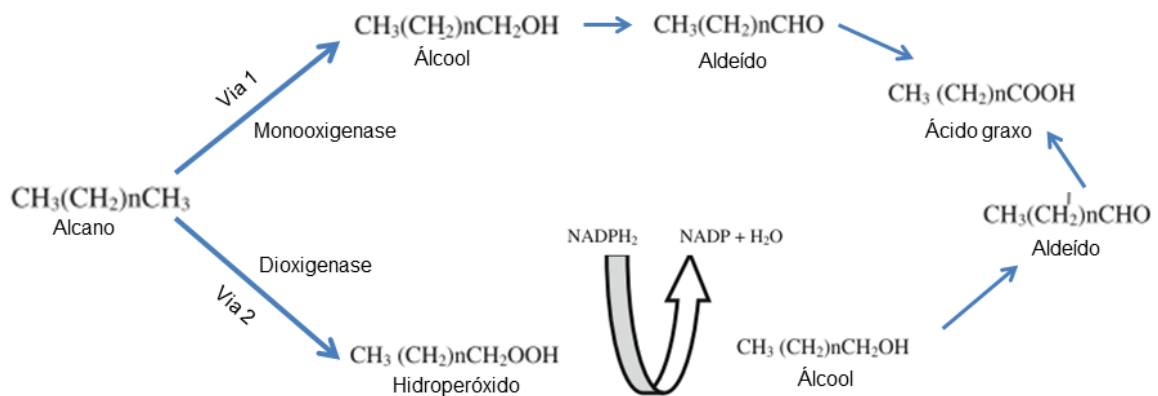


Fonte: Adaptado de Al-Hawash *et al.*, 2018.

Para alcanos de cadeias de comprimento médio e longo, os microrganismos podem acessar os hidrocarbonetos por meio da aderência de gotículas a superfície celular ou por acesso facilitado por biossurfactantes (CHIKERE, OKPOKWASILI e CHIKERE, 2011). Após a captação dos hidrocarbonetos, ocorre o primeiro ataque ao poluente no ambiente intracelular, por meio da oxidação e ativação. Esse passo inicial envolve enzimas que têm exigência estrita de oxigênio molecular, como por exemplo as monooxigenases ou dioxigenases. A via mais comum depende da ação das enzimas monooxigenases e é específica para n-alcanos. A monooxigenase ataca o grupo metila terminal onde um álcool primário é formado, o álcool é então oxidado ao correspondente aldeído e ácido graxo (**Figura 3**). Na segunda via, uma enzima dioxigenase atua no grupo metil terminal de um n-alcano, resultando na adição de dois átomos de oxigênio. Isso resulta na formação de um peróxido que é convertido em um ácido graxo. Os grupos de ácidos carboxílicos nos ácidos graxos resultantes de ambas as vias são então metabolizados via β -oxidação, uma via catabólica comum encontrada na maioria das células vivas, para formar acetil-CoA ou propionil-CoA [dependendo do número de átomos de carbono (pares ou ímpares) no n-alcano]. Essas vias de degradação transformam contaminantes orgânicos em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. A biossíntese da biomassa celular ocorre a partir dos

metabólitos dos precursores centrais, como o acetil-CoA, o piruvato e o succinato. Os sacarídeos necessários para diferentes processos de biossíntese e crescimento são sintetizados via gliconeogênese (AL-HAWASH *et al.*, 2018). Os hidrocarbonetos podem ser seletivamente metabolizados a partir de uma cepa individual de microrganismos ou de um consórcio microbiano de cepas pertencentes ao mesmo gênero ou a gêneros diferentes. Consórcios apresentam a vantagem de possuírem complementaridade metabólica para completa degradação de hidrocarbonetos se comparados ao uso de culturas puras (ANGELIM *et al.*, 2013).

Figura 3 - Vias de biodegradação de n-alcenos.



Fonte: Adaptado de Chikere, Okpokwasili e Chikere, 2011.

A avaliação das atividades biológicas do solo pode ser utilizada como instrumento para monitorar processos de biodegradação e descontaminação de ambientes contaminados. Investigações como a respiração do solo, biomassa, atividades enzimáticas e contagens de células microbianas podem fornecer informações sobre a presença de microrganismos viáveis, bem como sobre a intensidade, o tipo e a duração dos efeitos de poluentes na atividade metabólica do solo, sendo assim adequados para descrever o curso de experimentos de biorremediação. Dentre as diversas enzimas pesquisadas, a atividade da desidrogenase (ADH) tem sido reconhecida como um importante indicador bioquímico do solo, pois é um indicador da atividade microbiana geral. As desidrogenases desempenham papel fundamental durante a oxidação da matéria orgânica presente no solo, atuando na transferência de hidrogênio e elétrons entre os compostos orgânicos sujeitos a oxidação e seus receptores finais. Em

decorrência disso, o método vem sendo empregado como estimador da capacidade respiratória e oxidativa em sedimentos (VAN DER WAARDE *et al.*, 1995; MARGESIN, 1999; KUMAR, 2013).

2.4 Gêneros *Gordonia* e *Micrococcus*

As bactérias do gênero *Gordonia* foram primeiramente isoladas em 1971 a partir do solo. São caracterizadas como bactérias corineformes (pequenos bacilos), que apresentam colônias lisas, brilhantes, irregulares e em alguns casos podem apresentar aparência áspera. Além disso, podem apresentar coloração branca, amarela, laranja, vermelha ou rosa (TSUKAMURA, 1971). Atualmente o gênero compreende 19 espécies que podem ser encontradas na natureza de forma ubíqua. Esses microrganismos têm recebido especial atenção devido a capacidade de algumas cepas degradar derivados da borracha, poluentes ambientais ou outros polímeros naturais de degradação lenta. Por isso, são consideradas fortes candidatas para uso em processos de biodegradação e biorremediação. Além disso, devido à ampla variedade de compostos que podem ser metabolizados por essas bactérias e suas capacidades anabólicas, possuem grande potencial de uso também em biotecnologia industrial (JIN *et al.*, 2012; KOMA *et al.*, 2003; LINOS *et al.*, 2000).

Tratando-se de hidrocarbonetos, já foram isoladas diversas cepas de *Gordonia* capazes de transformar e ou degradar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos com diferentes substituintes e diferentes graus de ramificação (JACQUES *et al.*, 2008). A presença de ácidos micólicos na parede celular está associada a uma maior hidrofobicidade para melhor adesão superficial dos hidrocarbonetos e posteriormente sua captação. Em um estudo realizado com microrganismos isolados de solo contaminado com petróleo, cepas das espécies *G. hydrophobica* e *G. terrae* apresentaram grande capacidade de degradação de hidrocarbonetos (CHAILLAN *et al.*, 2004). Em outro trabalho que utilizou uma cepa de *Gordonia* juntamente com três cepas de *Rhodococcus* em uma estratégia de bioaugmentação para remoção de óleo combustível do solo, a cepa identificada como da espécie *G. polyisoprenivorans* foi capaz de degradar até 79% do óleo combustível a uma temperatura de 30°C, mantendo uma taxa de degradação de aproximadamente 65% até em baixas temperaturas de 10°C após 12 dias de

biodegradação (SHINTANI *et al.*, 2018). Também já foi identificada a presença de genes que codificam enzimas-chave envolvidas na biodegradação de alcanos, como a alcano hidroxilase, codificada pelo gene *alkB*, em algumas espécies de *Gordonia* (JURELEVICIUS *et al.*, 2013).

Muitas espécies de *Gordonia* têm sido isoladas do meio ambiente e não apresentam patogenicidade ao homem. Os raros casos de infecções humanas associadas a elas ocorreram em pacientes imunossuprimidos após doenças subjacentes, nas quais as infecções ocorreram apenas secundariamente. Além disso, essas infecções são bastante raras quando comparadas às infecções causadas por bactérias patogênicas oportunistas pertencentes a gêneros taxonomicamente relacionados, como *Rhodococcus* e *Nocardia* (ARENSKO; BRO; STEINBU, 2004).

O gênero *Micrococcus* foi descrito em 1872 por Cohn e é caracterizado por bactérias gram-positivas, aeróbias, catalase – positivas e quimiorganotróficas. Formam colônias em formato de cocos que podem estar agrupados em pares, quartetos ou pequenos grupos. Além disso, podem ser pigmentadas com coloração rósea ou amarela. As linhagens de *Micrococcus* já foram isoladas a partir de uma grande variedade de ambientes como solo, água doce e marinha, ar e também podem ser encontrados como parte da flora normal da pele de mamíferos (WIESER *et al.*, 2002).

Alguns microrganismos deste gênero tem mostrado potencial para uso em biotecnologia ambiental, o que já foi demonstrado em estudos em que isolados de *Micrococcus* sp. foram capazes de crescer utilizando como única fonte de carbono: petróleo, tolueno, o-xileno, octanol e n-tetradecano, e foram utilizados com mais 5 cepas de diferentes bactérias para degradar eficientemente hidrocarbonetos que estavam em solo contaminado. No mesmo estudo também foi mostrado que quando as bactérias autóctones do solo estavam presentes havia maior taxa de degradação de hidrocarbonetos (GHAZALI *et al.*, 2004). Uma cepa de *Micrococcus* isolada de solo de campos contaminados na Índia, foi capaz de crescer na presença de grande quantidades de arsênio (As) e arsênio oxidado (As(III) e As(V)) e tolerou a presença de outros metais pesados. Além disso, foi capaz de acumular grandes quantidades de As quando expostos a uma ampla gama de concentrações ambientalmente

relevantes de As inorgânico (PAUL *et al.*, 2018). Além disso, células de *M. luteus* foram capazes de absorver até 59 mg de Cu^{2+} /g de células secas a pH 6, por meio de mecanismo físico de biosorção, o que foi melhorado ao imobilizar células por encapsulamento em fibras eletromagnéticas, onde as células atingiram níveis de absorção de até 76 mg Cu^{2+} /g (LETNIK *et al.*, 2017). Em outro trabalho, *M. luteus* foi capaz de participar da degradação da piridina, um subproduto teratogênico do carvão, e utilizar esse substrato como única fonte de carbono. Para isso oxidou a piridina para obter energia e liberou nitrogênio contido no anel de piridina como amônio (SIMS; SOMMERS; KONOPKA, 1986). Uma pesquisa realizada na Índia para identificar bactérias capazes de degradar petróleo, identificou os seguintes gêneros: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* e *Nocardia* como os mais comuns degradadores encontrados no meio ambiente (ROY *et al.*, 2002).

O gênero *Micrococcus* não é considerado patogênico. Porém cepas de *Micrococcus* produziram pneumonia em um paciente com leucemia aguda e infecções cutâneas localizadas em pacientes imunocomprometidos com doença por HIV-1, o que mostra que podem causar infecções como oportunistas, nas quais as cepas só podem atuar como patógenos em pacientes já imunocomprometidos (NUÑEZ, 2014).

Os microrganismos utilizados neste estudo pertencem ao filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, ordem *Actinomycetales*. HEX 5 pertence a família *Gordoniaceae* e gênero *Gordonia*. HEX 6 pertence a família *Micrococcaceae* e gênero *Micrococcus*.

2.5 Imobilização

Muitas estratégias de biorremediação têm sido desenvolvidas para alcançar melhores taxas de degradação. Uma delas é a utilização de suportes de imobilização. A imobilização consiste no processo de retenção de células ou moléculas de interesse em suportes poliméricos (KAREL *et al.*, 1985). As técnicas de imobilização podem ser classificadas em quatro grupos com base em

mecanismos físicos: fixação ou adsorção em uma superfície sólida; inserção em uma matriz porosa por aprisionamento ou encapsulamento; proteção celular de uma barreira (mantendo as células dentro de uma membrana); e agregação como floculação ou reticulação (**Figura 4**).

Figura 4 - Principais métodos de imobilização.



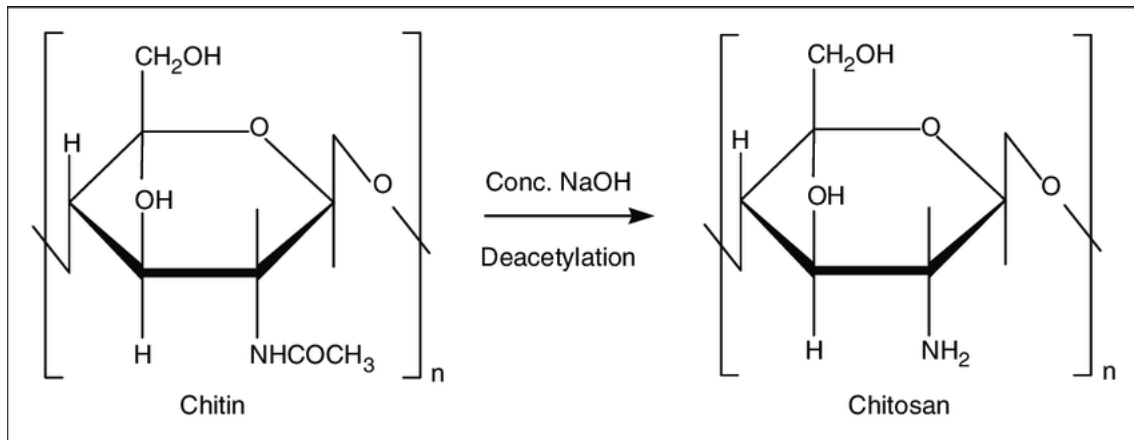
Fonte: Adaptado de BICKERSTAFF, 1997.

A imobilização por aprisionamento em matrizes porosas permite a difusão de substratos e produtos entre o meio e os microrganismos. No aprisionamento, as células ficam envoltas por uma camada de matriz de imobilização, enquanto no encapsulamento as células ficam livres em solução, mas restritas por uma camada fina de matriz. Muitas vezes o aprisionamento de células é reconhecido por ser mais durável do que o encapsulamento e, portanto, ser mais adequado para aplicações ambientais. As técnicas de aprisionamento podem ser categorizadas em gelificação ionotrópica de polímero poliônico por reticulação do polímero com cátions multivalentes (alginato e quitosana), gelificação induzida por temperatura (agarose), polimerização orgânica por reação química entre monômeros (poliacrilamida) e precipitação por separação de fases (poliestireno) (SIRIPATTANAKUL e KHAN, 2010). Para aplicações ambientais, os polímeros naturais como ágar, alginato, carragenina e quitosana são mais desejáveis.

Muitas vezes, essas matrizes de imobilização podem atuar como agentes de restauração e conservação do solo, contribuindo para manutenção do balanço hídrico, da atividade biológica (funcionando como bioestimulante), fornecendo matéria orgânica e aumentando a fertilidade do solo (NWANKWEGU *et al.*, 2016). Isso é muito relevante para a biorremediação, uma vez que esses fatores contribuem para aumentar a taxa de degradação. A fixação em uma superfície sólida, aprisionamento e / ou métodos de encapsulação tem sido amplamente aplicado para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo (PARTOVINIA e RASEKH, 2018).

Dentre essas matrizes, a quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, que por sua vez é o segundo polímero mais abundante na natureza (**Figura 5**). A quitina está presente nas carapaças de crustáceos, que são consideradas resíduos pela indústria de pesca. Portanto, a quitina pode ser obtida a partir desses resíduos de baixíssimo custo, e conseqüentemente a quitosana também, conferindo a essa matriz as vantagens de ser de baixo custo, de origem natural, biocompatível e biodegradável. Sua utilização fornece um destino a esse resíduo e reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (ANGELIM *et al.*, 2013). A quitosana possui uma estrutura molecular composta de grupos hidroxila (OH) e grupamentos amino (NH₂), sendo solúvel em meio ácido, formando um polímero catiônico, com protonação no grupo amino gerando o íon NH₃⁺, o que confere algumas vantagens na utilização da quitosana como suporte de aprisionamento de microrganismos. Hou *et al.* (2013) relataram que a interação de carga entre as superfícies bacterianas carregadas negativamente e a quitosana carregada positivamente facilita a ligação da célula à superfície da matriz.

Figura 5 - Estruturas dos monômeros componentes da quitina e da quitosana obtida pela desacetilação alcalina da quitina.



Fonte: (RINKI *et al.*, 2009).

Em se tratando de bioaumentação, o uso de microrganismos imobilizados em suportes poliméricos confere vantagens de sobrevivência das células a fatores abióticos como temperatura, pressão, pH e altas concentrações de sal. Além disso, confere uma vantagem de sobrevivência dessas células na competição com as células bacterianas autóctones de determinado local onde são inseridas. Por isso, a imobilização de microrganismos pode ser utilizada integrada à bioaumentação, com objetivo de aumentar sua eficácia.

2.6 Surfactantes e biosurfactantes

Compostos ativos de superfície ou surfactantes (**surface active agents**) são moléculas anfifílicas que possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial entre duas fases fluidas. São moléculas compostas por uma porção hidrofílica (solúvel em água) que pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica, e uma porção hidrofóbica que é uma cadeia hidrocarbonada (SANTOS *et al.*, 2016). Por isso, podem ter aplicações em diversos setores industriais como farmacêutico, cosmético, alimentício, têxtil, agroquímico, na recuperação avançada de petróleo e também na remediação de ambientes contaminados por substâncias hidrofóbicas (SINGH; HAMME; VAN; WARD, 2007). Por terem uma ampla gama de aplicações, são considerados um dos produtos químicos mais comercializados, porém, essas moléculas que são

sintetizadas quimicamente apresentam desvantagens em seu uso, dentre estas destacam-se a não-biodegradabilidade, a toxicidade ao meio ambiente e sua obtenção a partir de fontes não-renováveis (BANAT, 1995).

Os surfactantes de origem natural, conhecidos como biossurfactantes são moléculas produzidas por alguns organismos, como plantas e seres humanos, mas principalmente por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos. Geralmente, a porção hidrofílica dos biossurfactantes é constituída por aminoácidos ou peptídeos; ânions ou cátions; mono-, di- ou polissacarídeos; e a porção hidrofóbica é constituída de ácidos graxos saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Esses compostos apresentam várias vantagens em relação aos surfactantes produzidos quimicamente, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, baixa concentração micelar crítica, alta eficiência, diversidade estrutural e capacidade de agir em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade; além de serem obtidos a partir de fontes renováveis. Essas características fazem dos biossurfactantes uma alternativa potencial ao uso dos surfactantes sintéticos, pois assim como eles, essas moléculas apresentam diversas aplicações na indústria (AMANI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2016).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua origem microbiana e sua composição química. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, fosfolipídios, ácidos graxos, lipídios neutros, biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados. Os mais conhecidos são os glicolipídeos, que são constituídos de carboidrato ligado a uma cadeia longa de ácido alifático ou ácido hidroxialifático por meio de uma ligação éster. Dentre os glicolipídeos, os mais conhecidos e estudados são os ramnolipídeos, trehalolipídeos e soforolipídeos (JARVIS; JOHNSON, 1949).

Os ácidos graxos, fosfolipídeos e lipídeos neutros podem ser produzidos por bactérias e leveduras quando cultivadas em meio contendo n-alcenos. Seu balanço lipofílico-hirofílico (HLB) está relacionado ao comprimento da cadeia hidrocarbonada em sua estrutura e possuem uma alta capacidade surfactante em baixas concentrações. Já foi relatada a produção deste tipo de biossurfactante pelo fungo *Aspergillus spp.* e pela bactéria *Thiobacillus thiooxidans* (DESAI; BANAT, 1997). Os

biossurfactantes poliméricos são moléculas de alto peso molecular que normalmente contém polissacarídeo e proteína em sua estrutura e, em alguns casos, contém lipídeos. Os mais estudados são: emulsan, liposan, dispersan e manana-lipídeo-proteína que são conhecidos por sua alta capacidade de formar emulsões. Alguns microrganismos capazes de produzir esses compostos são *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter radioresistens*, *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida antarctica* (MUTHUSAMY *et al.*, 2008; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Biossurfactantes particulados são surfactantes que são particionados em vesículas que ficam aderidas à porção extracelular das membranas das células microbianas e auxiliam na captação de compostos hidrofóbicos (VIJAYAKUMA; SARAVANAN, 2015). Os lipopeptídeos e lipoproteínas são moléculas compostas de lipídeos ligados a uma cadeia peptídica e são conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana, além da sua poderosa atividade tensoativa. Dentre os lipopeptídeos, alguns dos mais estudados são surfactinas, iturinas, subtilisina e fengicinas. Eles são produzidos por fungos, leveduras e por diferentes gêneros de bactérias como *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, sendo os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* os quem têm recebido maior atenção devido à variedade de ambientes em que podem ser encontrados e por possuírem espécies não patogênicas. (MUTHUSAMY *et al.*, 2008).

As emulsões produzidas pelos biossurfactantes podem ser caracterizadas como pertencentes aos tipos I, II, III e IV, de acordo com Winsor (1954). O tipo I refere-se a sistemas de duas fases que correspondem a emulsões de óleo em água (O/A) coexistindo com uma fase de água. O tipo II, também bifásica, constitui-se de uma emulsão de água em óleo (A/O) coexistindo com excesso de óleo. O tipo III é formado quando o surfactante é concentrado na fase do meio e a emulsão coexiste com as fases de óleo e água formando um sistema trifásico. Já o tipo IV correspondente a uma região monofásica representada por uma emulsão homogênea (BELLOCQ *et al.*, 1984).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a biodegradação do n-hexadecano, um dos derivados do petróleo, em sedimentos de manguezal por um consórcio de bactérias imobilizado em esferas de quitosana visando sua aplicação em biorremediação.

3.2 Específicos

- Imobilizar um consórcio de bactérias isoladas de sedimento de manguezal em esferas de quitosana.

- Avaliar a eficácia da bioaugmentação com um consórcio de duas actinobactérias imobilizadas em esferas de quitosana ou livres em microcosmos de sedimentos de manguezal contaminado com n-hexadecano por meio de contagem de bactérias viáveis totais e mensuração da atividade desidrogenásica.

- Pesquisar a presença do gene *alkB* nas cepas do consórcio.

- Pesquisar se as bactérias do consórcio produzem biossurfactantes.

- Avaliar a influência da adição de quitosana na comunidade bacteriana de sedimentos de manguezal.

- Monitorar a viabilidade do produto após estocagem em refrigerador por um mês.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e caracterização de sedimentos de manguezal

Foram coletadas amostras do sedimento do manguezal localizado na Área de Proteção Ambiental do Rio Pacoti, em Fortaleza, Ceará. As amostras foram coletadas em três pontos, a uma profundidade de 20 cm, com distância de 100 m entre os pontos, ao longo de uma área com predominância de *Rhizophora mangle* (**Figura 6**). Os sedimentos foram coletados no dia 25 de junho de 2018, com a ajuda de cone cilíndrico de 30 cm de comprimento e 10 centímetros de largura, durante a maré baixa. Foi utilizado um aparelho de posicionamento global (GPSmap 76CSx, da marca GARMIN), para determinar a localização dos locais de amostragem ($W 38 24 54.029 S 3 49 17.940$; $W 38 24 57.924 S 3 49 18.264$; $W 38 25 1.400 S 3 49 19.000$). O sedimento foi armazenado em sacos plásticos e imediatamente transportado em isopor para o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembitech - UFC) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. No laboratório, foram realizadas análise de pH, salinidade e matéria orgânica total do solo. Além disso, foi determinada a atividade microbiana geral do solo através da atividade da enzima desidrogenase (ADH), método que tem sido reconhecido como um importante indicador bioquímico de qualidade do solo e é empregado como estimador da capacidade respiratória e oxidativa em sedimentos.

Para a determinação do pH, 15 g de solo homogeneizado foi centrifugado a 8000 g por 10 minutos. O líquido foi separado do sedimento e teve seu pH determinado através de pHmetro (Digimed pHmetro DM-22). Para determinação da salinidade foi utilizado refratômetro portátil da marca Biosystems. Para determinar o teor de matéria orgânica total (MOT) foram realizadas análises em triplicatas utilizando 0,5 g de sedimento previamente seco a 60 °C por 24 h. As amostras de sedimento foram pesadas em cadinhos limpos e secos, e, posteriormente, colocadas em mufla a 550 °C por 4 h para total combustão e determinação do peso residual. O cálculo da MOT foi realizado através da equação: $MOT (g/Kg) = [(Mi - Mf)/Mi]*100$, na qual MOT é a matéria orgânica total, Mf é a massa após a combustão e Mi a massa inicial (SCHULTE; HOPKINS, 1996).

Figura 6 - Imagem de satélite da área de proteção ambiental do Rio Pacoti, mostrando os pontos de coleta no manguezal.



O sedimento dos três pontos de coleta foi homogeneizado e peneirado para remoção de partículas, folhas e raízes, e então foi enviado para o Laboratório de Solos/Água do departamento de Solos da Universidade Federal do Ceará (UFC) onde foi feita análise da composição química e física.

4.2 Imobilização do consórcio de bactérias e quantificação da densidade de células imobilizadas

As estirpes de *Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6 utilizadas neste estudo foram provenientes de sedimentos do manguezal da baía de Todos os Santos, Bahia, isoladas de uma área próximo a refinaria da Petrobras cronicamente contaminada com óleo, pela técnica de enriquecimento em meio mineral contendo diferentes derivados do petróleo (ANGELIM, 2013). Essas e outros isolados do mesmo local estão armazenadas na coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech), do departamento de Biologia da UFC.

Inicialmente as cepas de bactérias foram reativadas em 5 mL de meio TGE (triptona, glucose e extrato de levedura) adicionado de 2% NaCl (TGE salino), sob agitação a 150 rpm por 24-48h. Após desenvolvimento das culturas, estas foram inoculadas em ATGE-salino (agar, triptona, glucose, extrato de levedura e NaCl) pela técnica de esgotamento em quadrantes para obtenção de colônias isoladas.

Após certificação da pureza das culturas, as colônias isoladas foram inoculadas em TGE-salino para obtenção de pré-inóculos.

Os pré-inóculos foram deixados sob agitação orbital a 150 rpm por 18-24 h, e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 600 nm. Para determinação da densidade celular, essas culturas foram diluídas nas proporções 1:2, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64 em TGE salino e tiveram as absorbâncias medidas novamente. As diluições 1:2, 1:8 e 1:64 foram escolhidas para realização da contagem de viáveis em placas. As culturas foram diluídas em solução de NaCl 0,9% até 10^{-6} e as diluições 10^{-4} a 10^{-6} foram plaqueadas em duplicata e incubadas em estufa a 30 °C. Após 48 h procedeu-se a contagem de colônias de cada diluição e essa informação foi usada para construção da curva de crescimento de cada cepa.

Para imobilização em quitosana, as cepas foram cultivadas em meio TGE-salino por 24 h, separadamente. Em seguida, as absorbâncias das culturas foram ajustadas para 0,1 a 600 nm e inoculadas em TGE-salino em Erlenmeyer na proporção de 1% v/v para produção de biomassa. Após 72 h de crescimento, a biomassa de cada cultura foi recuperada por centrifugação a 7000 x g por 10 minutos. Procedeu-se a determinação da densidade celular da biomassa que ficou em torno de 2×10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/ml. O precipitado de cada cultura foi lavado duas vezes com solução salina (NaCl 0,9% m/v) e posteriormente ressuspendido em 500 μ L de salina para serem homogeneizados com 100 mL do gel de quitosana previamente preparado, a fim de se obter uma densidade de células equivalente a 2×10^7 UFC/ mL.

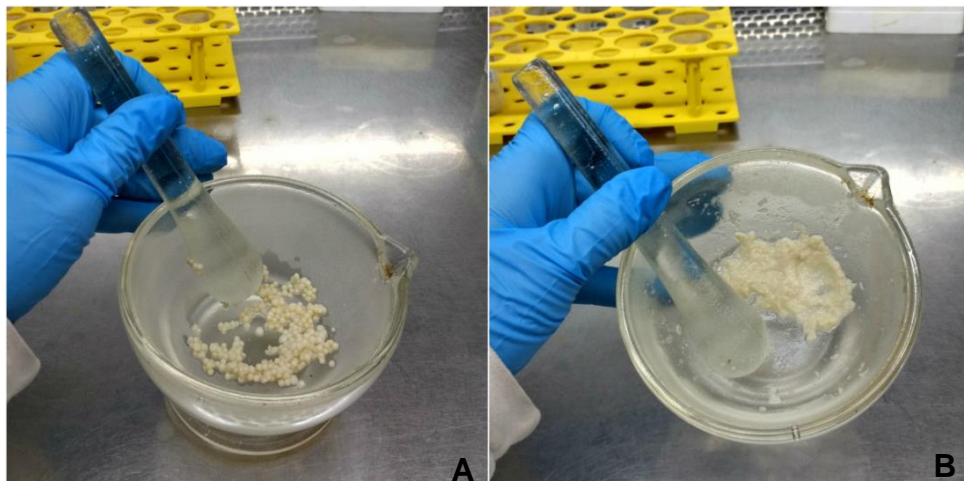
O gel de quitosana foi preparado dissolvendo-se o pó de quitosana na proporção 3% (m/v) por 3 h em uma solução de ácido acético 1% (v/v) pH 3. Posteriormente, esse gel foi deixado em repouso *overnight* para retirada de bolhas de ar. Em seguida, foram inoculados os 500 μ L de cada biomassa das linhagens identificadas como *Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6. Essa suspensão de gel e biomassa ficou sob agitação por 3 h até completa para homogeneização.

A solução de quitosana com microorganismos foi gotejada usando uma seringa, com agulha de 1,20 mm de espessura em 500 mL de solução de tripolifosfato (TPP) 1% (m/v), pH 9,0, para formação das esferas e aprisionamento das células bacterianas. As esferas permaneceram nessa solução por 2 h para consolidação das ligações cruzadas entre as cadeias de quitosana e,

posteriormente, foram lavadas três vezes em 200 mL de solução K_2HPO_4 0,15 M pH 8,0 (HSIEH *et al.*, 2008).

Uma massa de 4 g de esferas foi pesada e macerada para estimar o número de células viáveis aprisionadas nas esferas (**Figura 7**). O volume do macerado de esferas foi ajustado para 40 mL com solução de NaCl 0,9% (m/v). Diluições seriadas do macerado foram realizadas e plaqueadas em ATGE com 2% de NaCl para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e avaliação do processo de imobilização.

Figura 7 - (A) Aspecto das esferas de quitosana com consórcio de HEX 5 e HEX 6 imobilizado. (B) Macerado de esferas para realização de contagem de células viáveis.



4.3 Curva de crescimento em hexadecano

Para confirmar a capacidade das cepas HEX 5 e HEX 6 para utilizar n-hexadecano como única fonte de carbono, foram construídas curvas de crescimento em meio contendo esse alceno. Para isso, inicialmente foi preparado um pré-inóculo das cepas que cresceram isoladamente a 30 °C, 150 rpm por 18 h. Posteriormente, as bactérias foram inoculadas na proporção de 10% em meio-mineral contendo K_2HPO_4 (1,0 g); KH_2PO_4 (1,0 g); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,026 g), $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ (1,0 g) (Difco, Sparks, MD, EUA) por litro. O meio foi então foi

esterilizado a 110 °C por 10 min. Posteriormente, foi suplementado com uma solução de micronutrientes 0,1% (v/v) contendo EDTA (2,5 g); ZnSO₄.7H₂O (10,95 g); FeSO₄.7H₂O (5,0 g); MnSO₄.H₂O (1,54 g); CuSO₄.5H₂O (0,392 g); Co (NO₃)₂.6H₂O (0,25 g); Na₂B₄O₇.10H₂O (0,177 g) por litro que foi previamente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore, EUA). Foi então adicionado o hexadecano (Sigma-Aldrich), previamente filtrado em membrana de 0,22 µm, na concentração de 1% (v/v). A cada duas horas foram medidas as absorbâncias das culturas, e a cada seis horas foram retiradas alíquotas para contagem de viáveis.

4.4 Extração do DNA genômico das cepas HEX 5 e HEX 6 para detecção do gene *alkB*

Com o auxílio de uma alça de inoculação, transferiu-se uma massa de células provenientes de colônias puras de cada cepa para 400 µL de água estéril. Os inóculos foram aquecidos a 100 °C em banho seco durante 10 min. Após o aquecimento, os tubos foram transferidos imediatamente para o freezer a -80 °C por 5 min. Depois do resfriamento, as amostras foram centrifugadas à 12000 rpm por 15 min. Os sobrenadantes, contendo os DNAs, foram transferidos para outro tubo para aferir a qualidade e quantidade de DNA extraído em Nanodrop® ND-1000 a 260 nm (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA). Os DNAs também foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

O DNA total das cepas HEX 5 e HEX 6 foi submetido à amplificação do fragmento do gene *alkB* por reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR) usando os iniciadores *alkBF* (5'-ATC AAYRCVGCVCAYGARYTVGGBCACAAG-3') (SHEN et al., 2010) e *alkBR* (5'-SGGRTTCGCRTGRTGRTCRCTGTGNSGYTG-3') (SHEN et al., 2010). As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 µL contendo até 200 ng de DNA molde, 1 X de GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase. As PCRs foram realizadas em um termociclador programado para uma etapa de desnaturação inicial (5 min a 95 °C), seguido por 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s 60

°C e 60 s a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 7 min a 72 °C. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com SYBR® Safe DNA. A corrida eletroforética foi realizada utilizando o tampão de corrida Tris – Ácido – EDTA (TAE) 5X, composto por Tris-base 2 M, ácido acético 1 M, EDTA 50 mM, pH 8,0 com uma voltagem de 100 V por 25 min. Após a eletroforese, as bandas foram visualizadas utilizando-se um sistema de fotodocumentação ultravioleta (UVP).

4.5 Avaliação da produção de compostos ativos de superfície

A avaliação da produção de biosurfactantes pelas cepas HEX 5 e HEX 6 foi realizada pelo ensaio de atividade emulsificante (E24). Para isso, as cepas foram cultivadas em TGE-salino por 16 horas. Em seguida, as culturas tiveram suas absorbâncias ajustadas para 1,0 a 600 nm e foram inoculadas na proporção de 10% (v/v) em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral com a seguinte composição por litro: K₂HPO₄ (13,9 g); KH₂PO₄ (2,7 g); MgSO₄.7H₂O (0,2 g); NaCl (1,0 g), CaCl₂. 2 H₂O (0,026 g), (NH₄)₂SO₄ (2,0 g) (Difco, Sparks, MD, EUA) e extrato de levedura (0,5 g), previamente esterilizado por autoclavação. Esse meio mineral foi suplementado com a solução de micronutrientes na concentração de 0,1% (v/v) e de glicose 10% (m/v) como fonte de carbono. A solução de micronutrientes foi esterilizada por filtração utilizando membrana de 0,22 µm (Millipore, EUA). No meio de cultivo descrito foi utilizado uma relação carbono:nitrogênio de 30:1, visando uma maior produção de SACs (DARVISHI *et al.*, 2011). As culturas foram incubadas a 30 °C sob 150 rpm de agitação e crescidas por 24, 48 e 72 h. Após cada tempo de cultivo, as culturas foram analisadas quanto à produção de emulsificantes.

Os ensaios de emulsificações foram realizados misturando-se em tubos de ensaio 2 mL do sobrenadante da cultura e 2 mL de querosene. Os tubos foram agitados por 2 min em *vortex* e deixados em repouso por 24 h. Após esse período foi calculado o percentual de emulsificação (E24), definido como a razão entre o volume da camada emulsificada e o volume total do ensaio (IQBAL; KHALID; MALIK, 1995). Como controle negativo foram realizadas ensaios com a mesma metodologia utilizando-se o meio mineral de crescimento e querosene.

Além disso, foi realizado a análise da redução da tensão superficial da água, provocada pelos sobrenadantes das culturas de HEX 5 e HEX 6, com o uso de um tensiômetro Krüss (Hamburgo, Alemanha), modelo K20 utilizando o método do Anel Du Nöuy (du Nöuy, 1925). Nesse método se observa a resistência do anel de platina em romper a tensão de superfície do líquido testado. Para cada amostra foram necessários 30 mL dos sobrenadantes brutos livres de células. O tensiômetro foi previamente calibrado com água destilada (71 mN/m) e meio mineral estéril (60 mN/m), a 25 °C. Foram realizadas pelo menos 5 medições para cada amostra. Os valores foram expressos em porcentagem, de acordo com a fórmula:

$$TS = (TSi - TSf) / TSi \times 100$$

Onde:

TSi = Valor da tensão superficial do meio de cultura antes do inóculo, correspondente a 60 mN/m;

TSf = Valor da tensão superficial após cultivo de 48 h.

4.6 Determinação da viabilidade celular do consórcio imobilizado após 30 dias

A viabilidade do produto foi avaliada após estocagem por 30 dias em refrigerador a 8 °C. A cada 15-30 dias, 3 g de esferas de quitosana com o consórcio bacteriano imobilizado foram retiradas, maceradas utilizando um homogeneizador Potter e o volume complementado para 30 mL. Foram realizadas diluições seriadas e estimou-se a densidade celular por contagens de viáveis, como já descrito anteriormente. Todas as contagens foram realizadas em triplicadas.

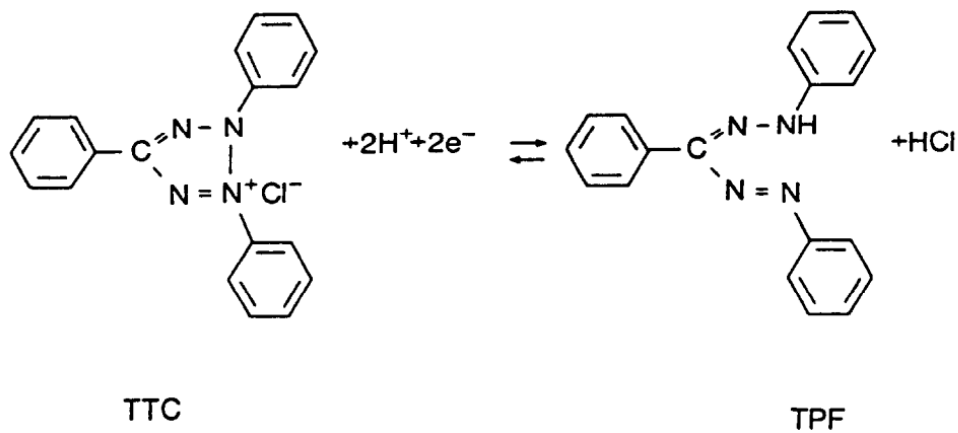
4.7 Atividade desidrogenásica

Para medir o estado metabólico e a taxa de respiração dos microorganismos nos microcosmos foi empregada a atividade desidrogenásica, DHA (do inglês, *DeHydrogenase Activity*), pelo método do sal de tetrazólio.

Ao final de cada período de tempo, foram adicionados aos microcosmos 5 mL de uma solução estéril 2% (m/v) de Cloreto de Trifenil tetrazólio (TTC) preparada

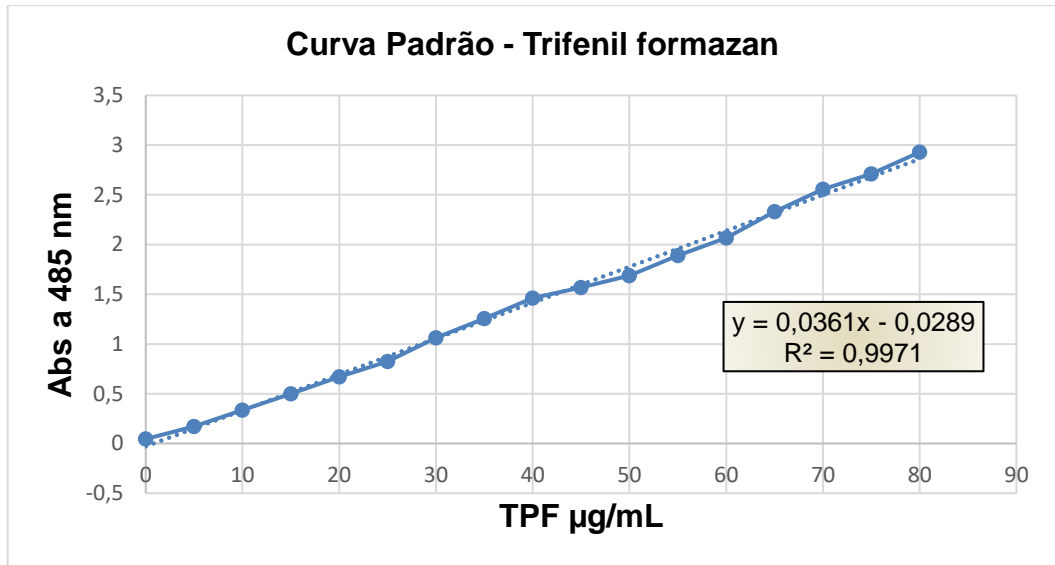
em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0. Os microcosmos foram incubados por 24h, protegidos da luz. Após o tempo de incubação o produto trifênil formazan (TPF) (**Figura 8**), possivelmente formado, foi extraído pela adição de 10 mL de acetona sob agitação em vortex por 5 segundos, seguido de centrifugação a 5000 g por 5 minutos para separação do sedimento e sobrenadante. O sobrenadante contendo o TPF foi recolhido e mensurado em espectrofotômetro a 485 nm. A concentração de Formazan foi determinada a partir de uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de formazan comercial, sendo a atividade expressa em massa de TPF (trifenilformazan) formada em função da massa de sedimento ($\mu\text{g TPF.g}^{-1}$) (**Figura 9**).

Figura 8 - Reação de redução do sal de tetrazólio (2,3,5 – trifênil cloreto de tetrazólio - TTC) em formazan (trifenil formazan - TPF) catalisada por desidrogenases.



Fonte: (CHANDER; BROOKES, 1991)

Figura 9 - Curva padrão preparada a partir de soluções de concentrações conhecidas de formazan e leitura da absorbância (Abs) a 485 nm.



4.8 Ensaio de biorremediação de sedimentos de manguezal realizado em microcosmos

Os microcosmos foram montados em tubos falcon de 50 mL. Em cada um deles foi pesado 2 g de sedimentos de manguezal recém coletado. Após pesagem dos sedimentos em condições adequadas, os tubos foram identificados e os microcosmos foram montados em cinco condições específicas como apresentadas a seguir:

Tabela 1 - Condições experimentais dos microcosmos com sedimentos de manguezal.

Condição	Composição
S	Sedimento
SH	Sedimento + hexadecano 10 g/kg
SCIH	Sedimento + hexadecano 10 g/kg + consórcio (10^7 UFC) imobilizado em esferas de quitosana
SQH	Sedimento + hexadecano 10 g/kg + esferas de quitosana sem microrganismos
SCLH	Sedimento + hexadecano 10 g/kg + consórcio (10^7 UFC/mL) livre

Fonte: Elaborada pela autora.

A condição **S** representa o controle negativo, ou seja, condição em que será avaliada apenas o sedimento do manguezal sem adição de componentes externos. A condição **SH** é a condição que terá o sedimento adicionado apenas do hexadecano na concentração de 10 g/Kg (ou 1%) com objetivo de avaliar a resposta da comunidade microbiana nativa à presença do contaminante. A condição **SCIH** consiste do sedimento, consórcio microbiano imobilizado em esferas de quitosana num total de 10^7 UFC/mL de cada microrganismo e hexadecano (10 g/kg). Este grupo pretende avaliar a influência da adição dos microrganismos imobilizados ao microcosmo. A condição **SQH** é constituída de sedimento, esferas de quitosana sem microrganismos e hexadecano (10 g/kg), que servirá para avaliar a influência da

quitosana sobre os microrganismos do sedimento. A condição **SCLH** é constituída de sedimento, células de HEX 5 e HEX 6 livres na concentração de 10^7 UFC/mL e hexadecano (10 g/kg), essa condição foi realizada com o objetivo de avaliar a influência apenas da adição dos microrganismos ao solo contaminado.

No microcosmo também foi adicionado um volume de água estéril com o objetivo de formar uma fina lâmina de água acima do sedimento para manter a umidade do sistema. O volume de água foi ajustado para cada condição de forma a não ultrapassar o volume final de 500 μ L. A composição de cada condição experimental encontra-se apresentada na **Tabela 2**.

Foram utilizados 245 microcosmos por experimento, os quais foram mantidos em temperatura constante e abertos somente dentro do fluxo laminar (Pa410, Pachane) para assegurar que não houvesse contaminação indesejada proveniente do ambiente. As amostragens foram realizadas nos dias 0, 3, 6, 12, 21, 28 e 35 após o início do experimento para realização dos ensaios de atividade enzimática e contagem de células viáveis, totalizando sete tempos de análises. Os dados das contagens foram expressos em escala logarítmica e submetidos à análise de variância pelo método de ANOVA com o pós-teste de *Tukey* utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*.

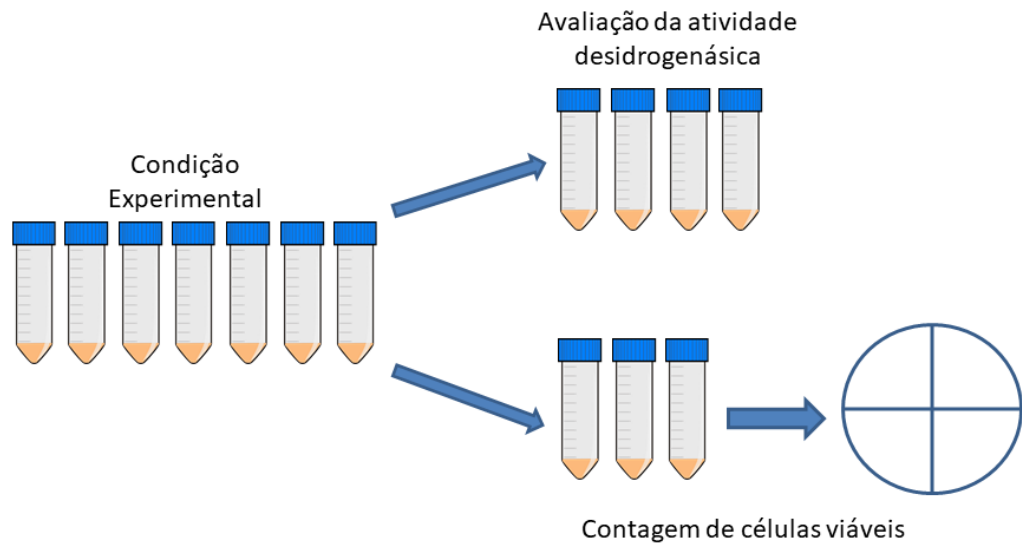
Tabela 2 - Composição dos microcosmos de sedimento de manguezal nas diferentes condições testadas nesse estudo.

Condição	Consórcio (10⁷ UFC)	Quitosana (esferas)	Hex 10 g/kg	Água (µL)
S	-	-	-	500 µL
SH	-	-	25,87 µl	474,13 µL
SCIH	179 mg de esferas (18 beads)	-	25,87 µl	474,13 µL
SQH	-	179 mg de esferas (18 beads)	25,87 µl	474,13 µL
SCLH	8 µl	-	25,87 µl	466,13 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

Cada tempo compreendeu sete microcosmos por condição: quatro para o teste da enzima desidrogenase e três para as contagens de células viáveis, totalizando 35 microcosmos por tempo de análise. Os microcosmos foram desmontados a cada tempo e os dados compilados em tabelas e gráficos. A **Figura 10** demonstra o esquema de desmonte realizado a cada tempo de análise por condição experimental.

Figura 10 - Esquema representativo do desmorte realizado em cada condição nos tempos de experimento, realizados nos dias 0, 3, 6, 12, 21, 28 e 35.



Fonte: Elaborado pela autora.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos sedimentos

O solo foi caracterizado como alcalino, salino-sódico (condutividade elétrica $\geq 4,0$ dS/m, pH $\approx 8,2$), com 1,2% de matéria orgânica (12 g/kg) e com teor de carbono em torno de 0,7 %. Na **Tabela 3** pode-se ver o resultado completo da análise do sedimento realizada pelo Laboratório de Solos/Água da UFC.

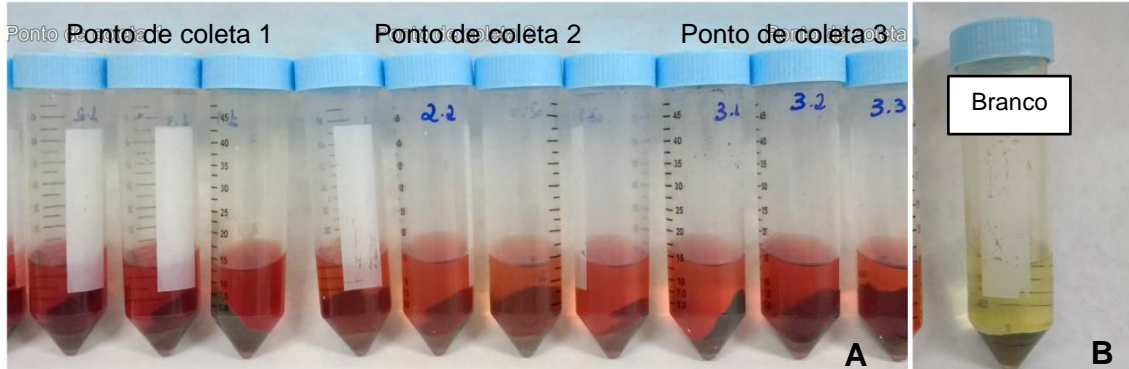
Tabela 3 - Composição do sedimento de manguezal utilizado neste trabalho.

Sedimento Manguezal		
pH	8,2	
C.E (dS/m)	8,0	
Complexo sortivo (cmol _c /Kg)	Ca ²⁺	15,60
	Mg ²⁺	2,30
	K ⁺	0,75
	S	36,5
	T	36,5
	V(%)	100
	PST	49
Na ⁺	17,89	
C (g/kg)	6,96	
N (g/kg)	0,72	
C/N	10	
M O (g/kg)	12,00	
P assimilável (g/kg)	34	
Salinidade	47	
Silte/Argila (%)	26,4	

C.E = Condutividade elétrica; **C/N** = razão carbono nitrogênio; **M O** = Matéria orgânica; **V%** = saturação por bases; **PST** = porcentagem de sódio trocável.

Para determinação da atividade desidrogenásica basal dos sedimentos foi realizado o ensaio com o sedimento recém-coletado. O ensaio foi realizado em quadruplicada com amostras dos três pontos coletados. A média de concentração de TPF produzido no ponto um foi $0,77 \mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, no ponto dois $0,75 \mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e do ponto três $0,81 \mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Essas concentrações refletem a atividade metabólica basal do sedimentos coletados e a média desses valores corresponde ao valor do tempo zero (**T0**).

Figura 11 - Atividade desidrogenásica de cada ponto de coleta do sedimento de manguezal realizada em quadruplicata no tempo zero.



(A) Atividade desidrogenásica de cada ponto de coleta do sedimento de manguezal
(B) Branco da atividade desidrogenásica, preparado com solo sem adição do substrato TTC.

5.2 Densidade de células imobilizadas nas esferas de quitosana

Para estimativa da densidade celular foram construídas curvas de crescimento de HEX 5 e HEX 6 (**Figuras 12 e 13**), relacionando contagens de viáveis com medidas de densidade óptica a 600 nm. As contagens de células viáveis realizada logo após a produção das esferas de quitosana revelou a presença de $1,6 \times 10^8$ UFC/g de HEX 6 e $2,5 \times 10^8$ UFC/g de HEX 5.

As esferas de quitosana de 2 mm de diâmetro, em média, foram carregadas com 2×10^7 UFC/g. Essa quantidade foi verificada por meio de contagem de células viáveis (**Figura 14 e Figura 15**).

Figura 12 - Fase log da curva de crescimento da cepa HEX 5 (*Gordonia* sp.) cultivada em meio mineral com adição de 2% de NaCl.

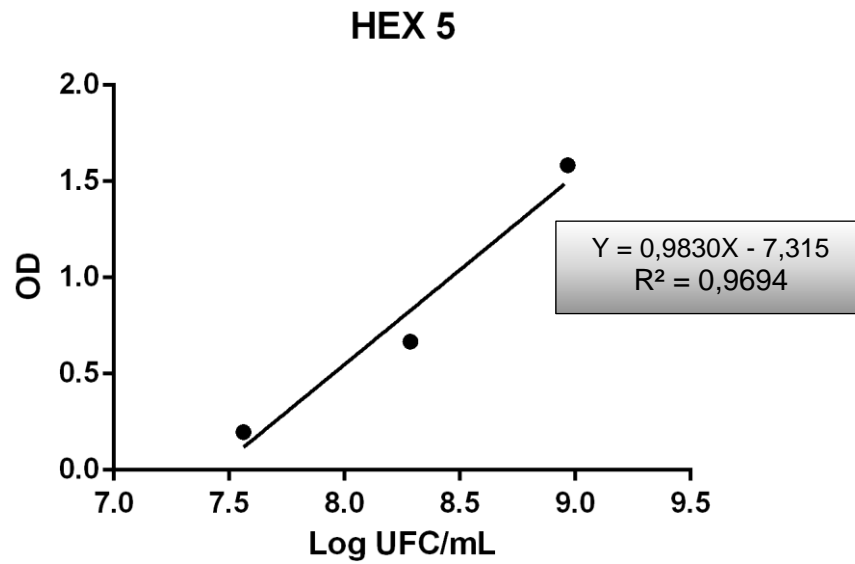


Figura 13 - Fase log da curva de crescimento da cepa HEX 6 (*Micrococcus* sp.) cultivada em meio mineral com adição de 2% de NaCl.

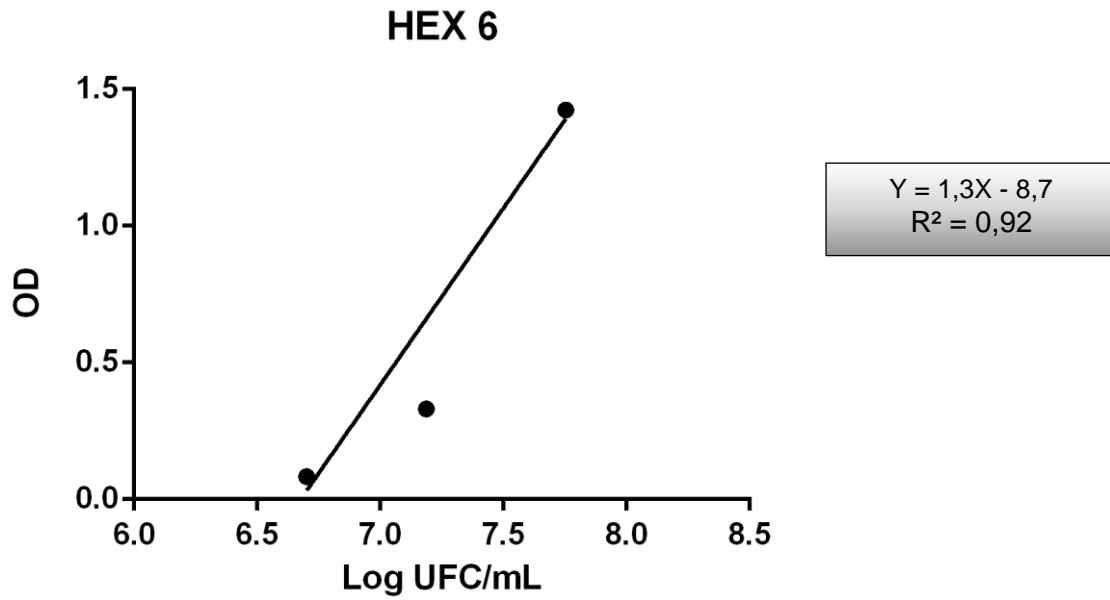
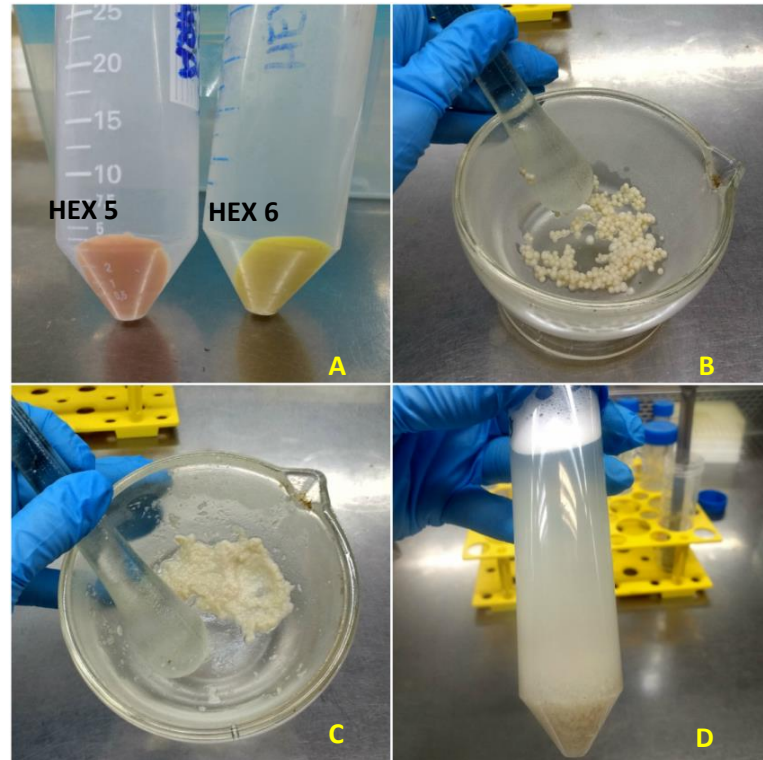
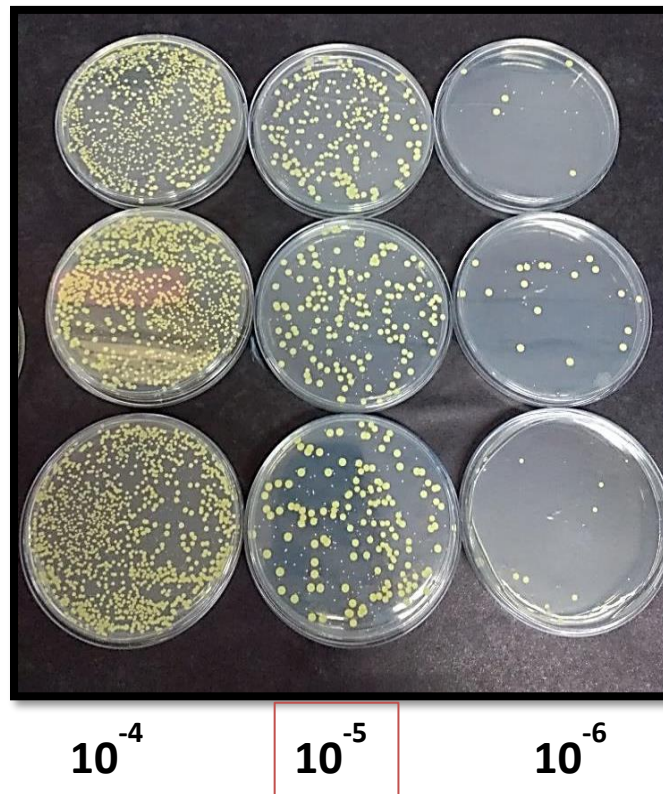


Figura 14 - Processo de produção de esferas de quitosana com 10^7 UFC/g de HEX 5 e HEX 6 imobilizadas e contagem de viáveis para quantificação da densidade de células viáveis imobilizadas.



(A) Biomassa microbiana das cepas HEX 5 (rosa) e HEX 6 (amarela). **(B)** Esferas de quitosana. **(C)** Esferas de quitosana maceradas. **(D)** Macerado de esferas de quitosana diluído 1:10 em salina 0,9% para realização de diluições seriadas e contagem de viáveis.

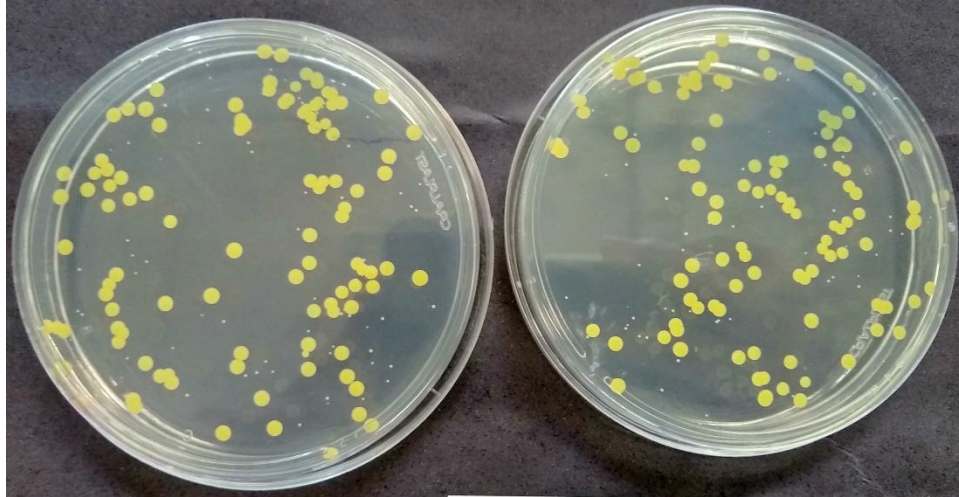
Figura 15 - Contagem de viáveis do macerado das esferas de quitosana com consórcio imobilizado.



5.3 Determinação da viabilidade celular do consórcio imobilizado após 30 dias

Após um mês de produção de esferas de quitosana foi realizada uma nova contagem de viáveis para verificar a viabilidade do produto armazenado a 8 °C. Foram detectadas $1,05 \times 10^8$ UFC/g de HEX 6 e $6,45 \times 10^7$ UFC/g de HEX 5 (**Figura 16**).

Lista 16 - Placas correspondentes a diluição 10^{-5} da contagem de viáveis das esferas produzidas com HEX 5 e HEX 6 imobilizadas realizada um mês após produção.



Colônias menores e rosadas correspondem as bactérias do gênero *Gordonia* sp. (HEX 5) e colônias maiores e amarelas correspondem as bactérias do gênero *Micrococcus* sp. (HEX 6)

5.4 Curva de crescimento em n-hexadecano

A curva de crescimento em hexadecano está mostrada na **Figura 17** e as placas de contagem de viáveis correspondentes a fase log de crescimento são mostradas na **Figura 18**. Ambas as cepas cresceram bem utilizando o hexadecano como única fonte de carbono, atingindo densidade óptica de até 2,2 (HEX 6) e 1,6 (HEX 5). É possível ver que a fase de adaptação (fase lag) foi mais longa para HEX 5 do que para HEX 6, que entrou na fase log de crescimento após 12 h de cultivo, enquanto a HEX 5 entrou na fase log após 22 h de cultivo. HEX 5 atingiu a fase estacionária após 52 h de cultivo, e a HEX 6 após 44 h de cultivo.

Figura 17 - Curva de crescimento de HEX 5 e HEX 6 em meio mineral contendo n-hexadecano como única fonte de carbono.

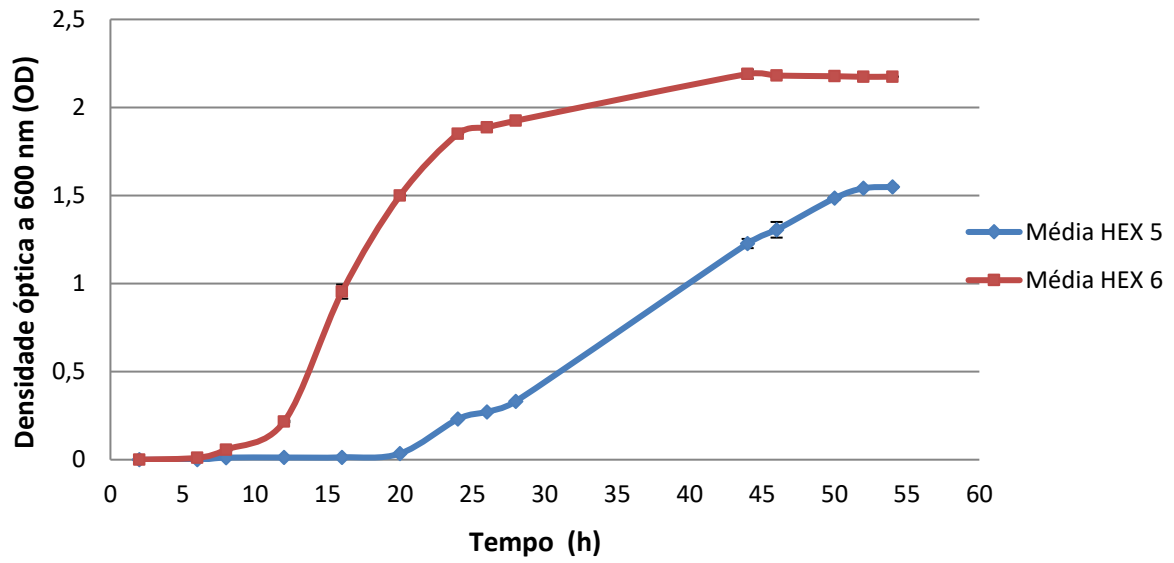
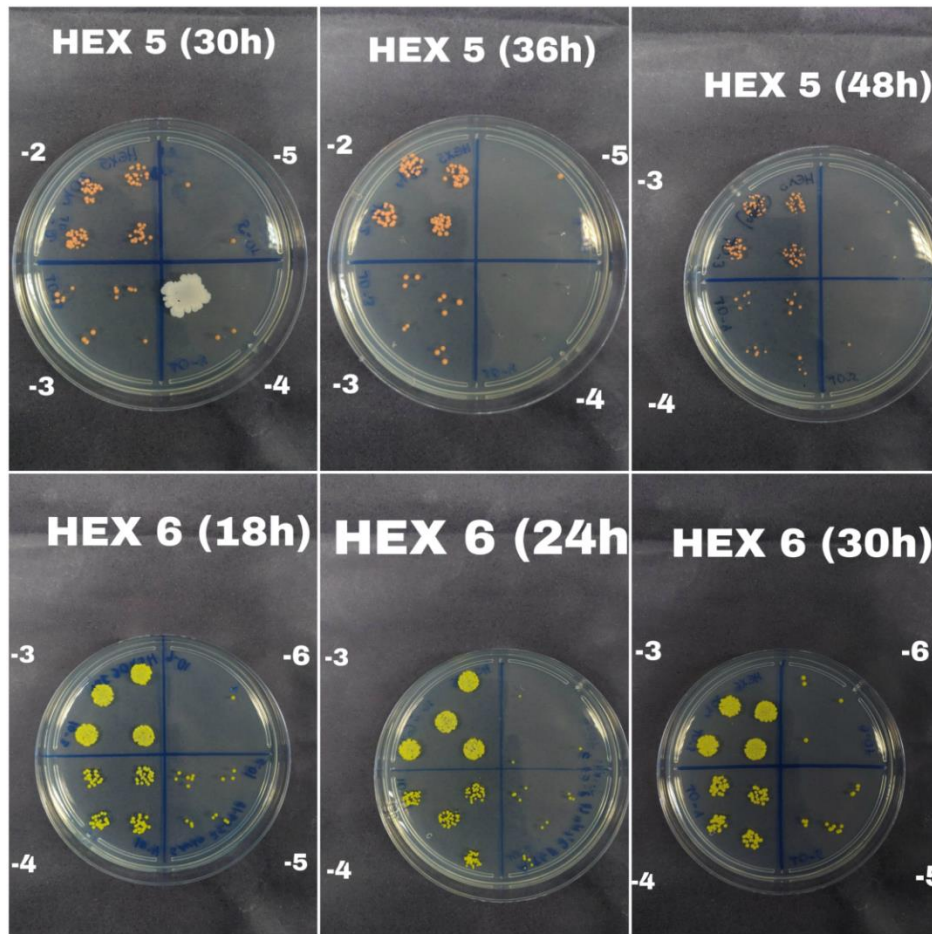


Figura 18 - Contagem de viáveis de HEX 5 e HEX 6 em diferentes momentos da curva de crescimento.

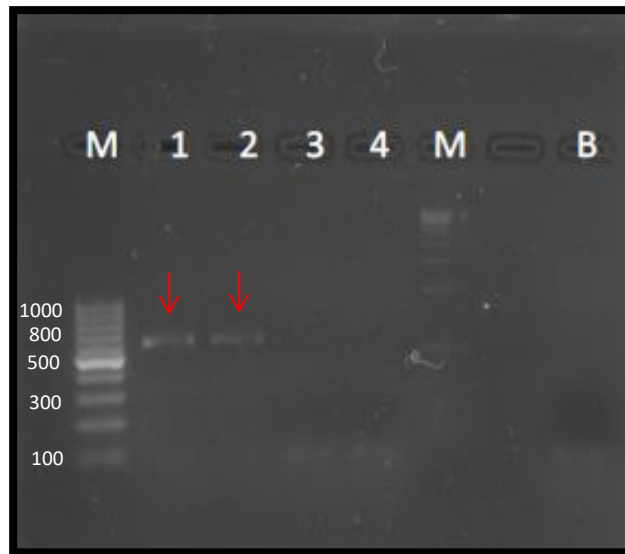


Acima de cada imagem é dado o tempo de crescimento, e ao lado das placas de cultivo está sendo mostrada a respectiva diluição.

5.5 Detecção do gene *alkB* nas bactérias do consórcio

A partir da eletroforese em gel de agarose 2% foi possível perceber que HEX 5 carrega o gene *alkB* que foi confirmado pela banda do fragmento de 558 pb detectada no gel de eletroforese. Não foi detectado a presença do gene *alkB* na cepa HEX 6.

Figura 19 - Detecção do gene *alkB* nas cepas HEX 5 e HEX 6.



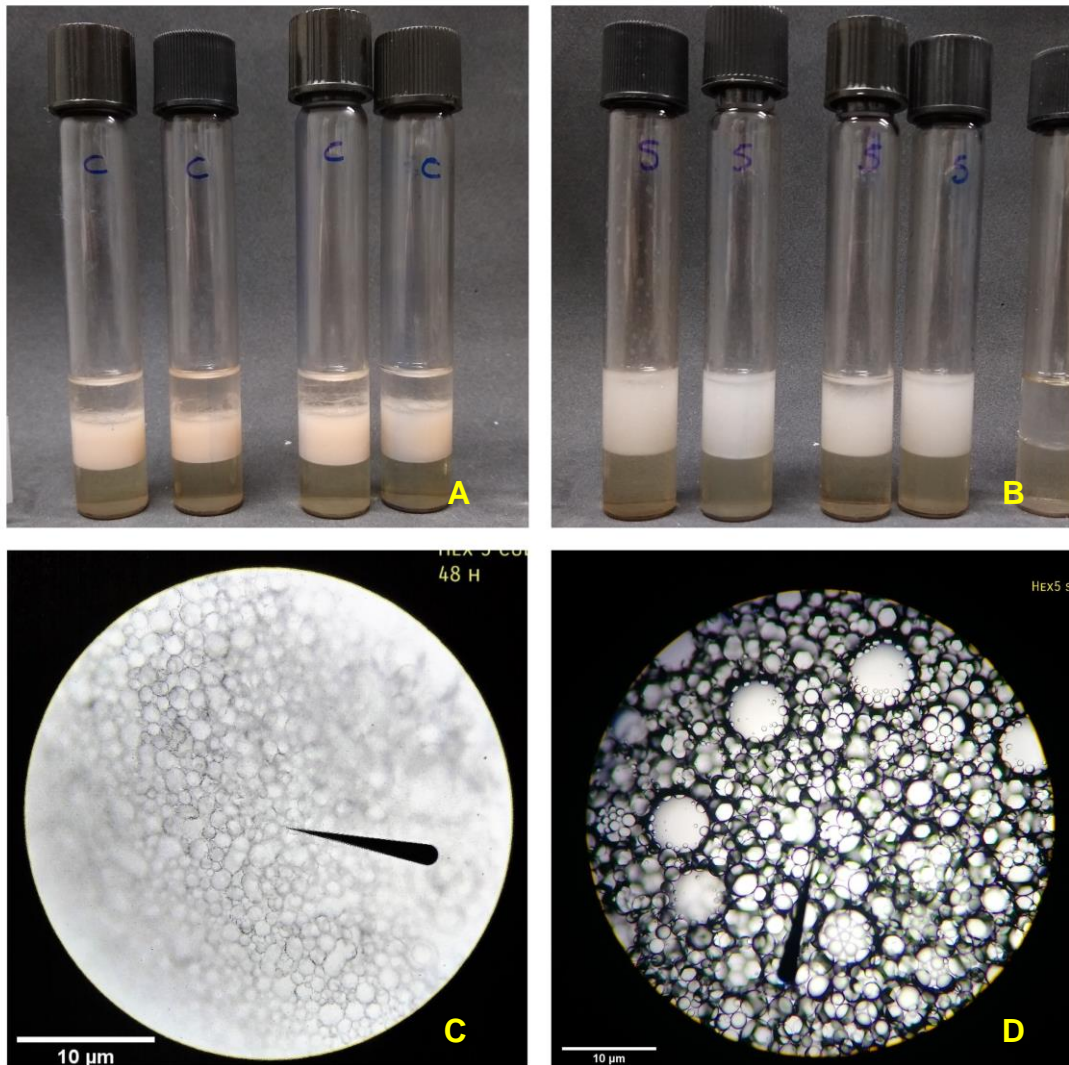
HEX 5 (raias 1 e 2) e HEX 6 (raias 3 e 4).

5.6 Avaliação da produção de compostos ativos de superfície

A cepa HEX 5 foi capaz de produzir surfactante apenas após 48 h de cultivo. A cultura (**Figura 20 - A**) de HEX 5 foi capaz de produzir emulsões do tipo água/óleo (A/O), onde foi possível visualizar com a ajuda de um microscópio óptico no aumento de 40x, gotículas pequenas e estáveis (**Figura 20 - C**). O índice de emulsificação promovido pela cultura de HEX 5 foi em média 32%. Também foi detectado emulsificação no sobrenadante livre de células de HEX 5, com numerosas gotículas (**Figura 20 - D**) e índice de emulsificação médio de 50% (**Figura 20 - B**).

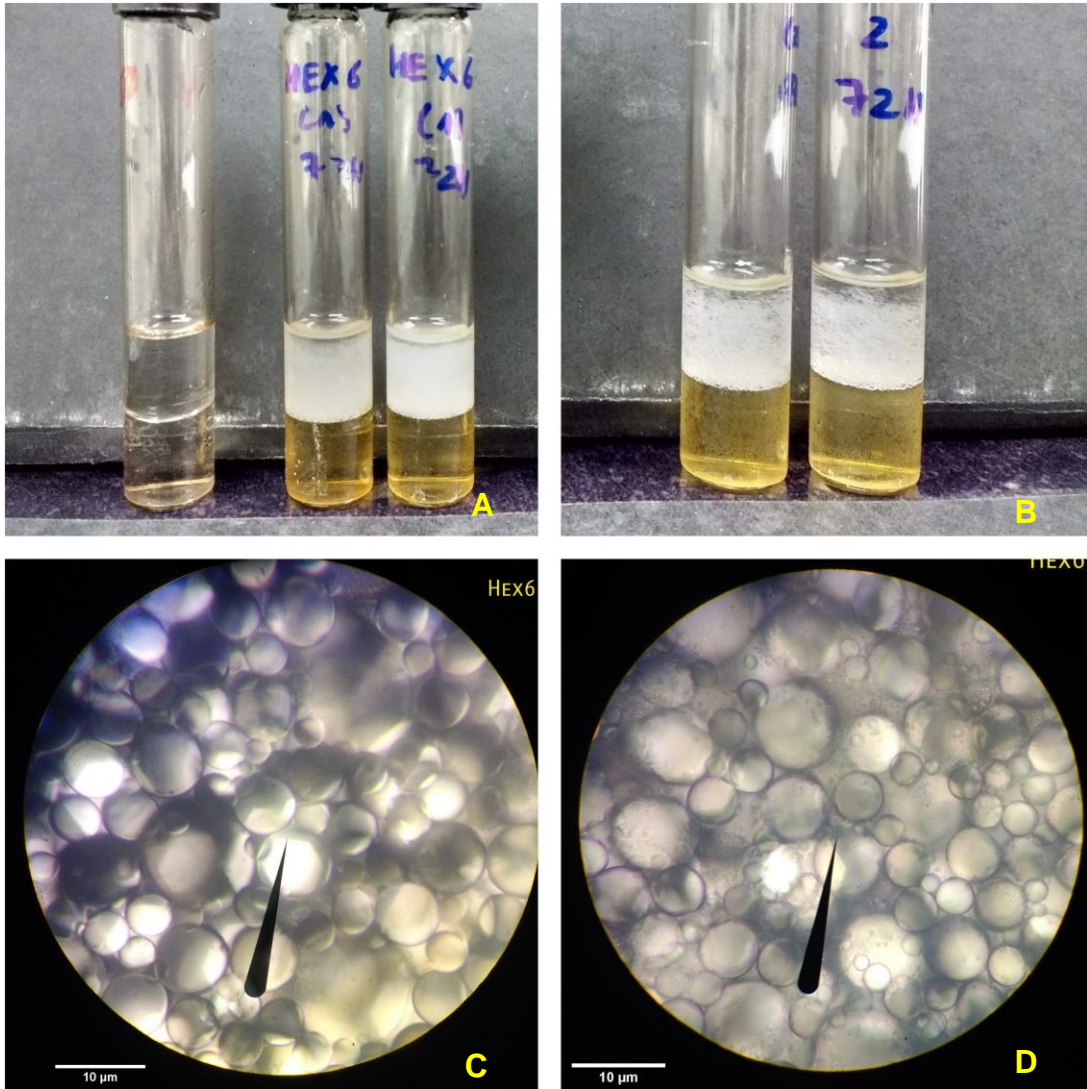
A cepa HEX 6, por sua vez, teve uma discreta produção de surfactante apenas após 72 h de cultivo, com produção de emulsões do tipo A/O. As gotículas produzidas foram grandes e de baixa estabilidade tanto para a cultura como para o sobrenadante (**Figura 21 - C e D**). O índice de emulsificação médio da cultura foi 32% (**Figura 21 - A**) e do sobrenadante foi 28% (**Figura 21 - B**).

Figura 20 - Aspectos das emulsões produzidas pela cultura e pelo sobrenadante da cultura de HEX 5 após 48 h de cultivo.



Aspecto das emulsões produzidas pela cultura **(A)** e pelo sobrenadante **(B)** de HEX 5. **(C e D)** Aspecto das micelas da emulsão A/O produzidas pela cultura e pelo sobrenadante da cultura, respectivamente, de HEX 5 visualizada em microscópio óptico em objetiva de aumento de 40x.

Figura 21 - Aspectos das emulsões produzidas pela cultura e pelo sobrenadante da cultura de HEX 6 após 72 h de cultivo.



Aspecto das emulsões produzidas pela cultura **(A)** e pelo sobrenadante **(B)** de HEX 6. **(C e D)** Aspecto das micelas da emulsão A/O produzidas pela cultura e pelo sobrenadante da cultura, respectivamente, de HEX 6 visualizada em microscópio óptico em objetiva de aumento de 40x.

Os sobrenadantes das culturas também foram analisados quanto à capacidade de redução da tensão superficial. O sobrenadante do cultivo de 72 h de HEX 6 promoveu redução da tensão da água de $70,7 \pm 0,05$ para a $58,1 \pm 0,5$. Já o sobrenadante de cultivo de 48 h de HEX 5 foi capaz de reduzir a tensão da água para $51,3 \pm 0,24$.

Nas **Figuras 22** e **23**, letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.

Figura 22 - Percentuais de emulsificações de querosene promovido pelas culturas e sobrenadantes das culturas de HEX 5 (48 h de cultivo) e HEX 6 (72 h de cultivo).

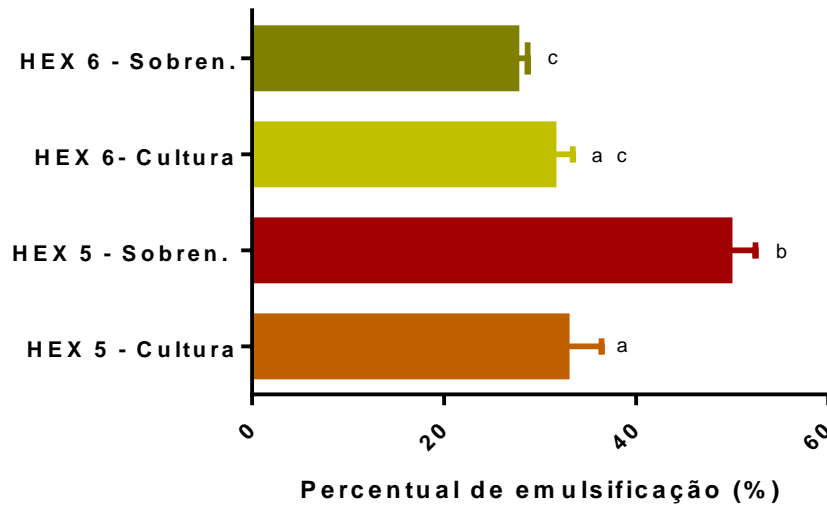
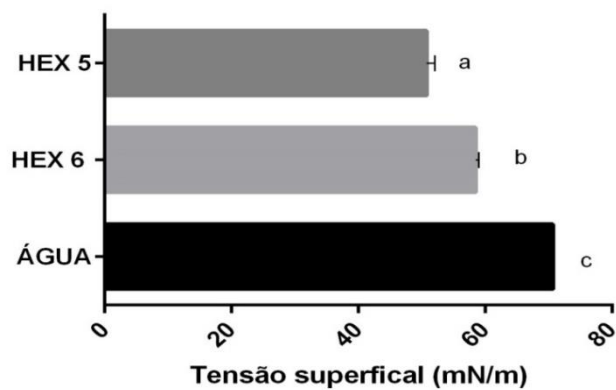


Figura 23 - Medidas de tensão superficial promovida pelos sobrenadantes das culturas de HEX 5 e HEX 6.



5.7 Ensaio de biorremediação de sedimentos de manguezal realizado em microcosmos

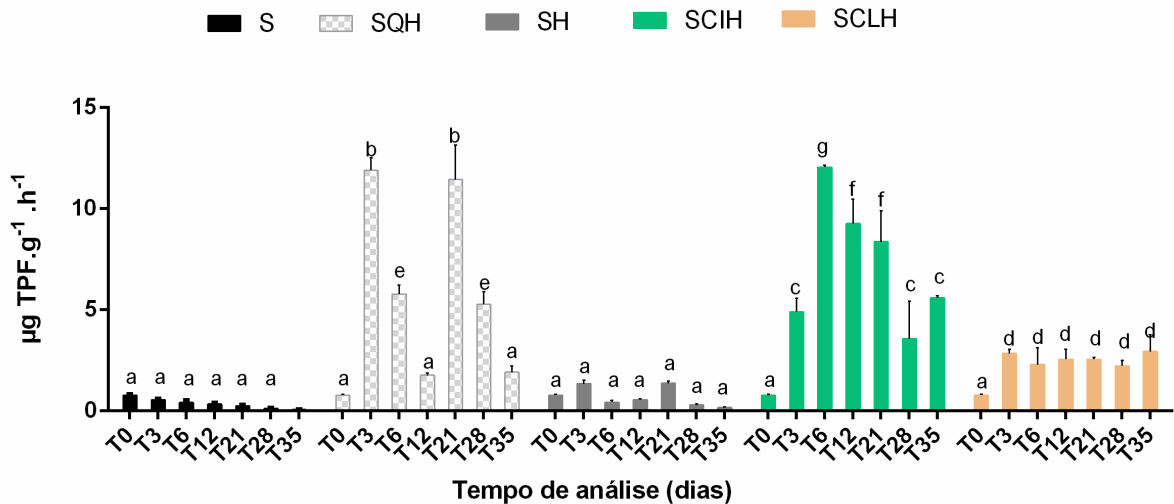
Os resultados da medida de atividade metabólica, expressa por atividade desidrogenásica, nos microcosmos dos diferentes grupos estão apresentados nas **Figuras 24 e 25**.

Como é possível observar na **Figura 24**, o grupo controle, **S** não apresentou variação significativa de atividade desidrogenásica ao longo dos 35 dias de experimento. O grupo **SH** também teve sua atividade desidrogenásica constante ao longo dos 35 dias de experimento, não apresentando diferenças significativas entre os valores medidos nos tempos de análise.

O grupo **SQH** apresentou um pico de atividade desidrogenásica no **T3**, atingindo uma média de 11,91 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ produzido. Esse valor cai para 1,75 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no 12º dia de experimento (**T12**) e volta a subir no **T21**, atingindo 11,41 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nos últimos dias de experimento esse valor cai, atingindo, em **T35**, valor estatisticamente igual ao valor de **T0**.

O grupo **SCIH** gerou um pico em T3 com valor de atividade desidrogenásica significativamente diferente de T0. Em T6 a atividade enzimática atinge seu máximo, com a produção média de 12 μg de TPF. A atividade enzimática continua alta em T12 e T21 e sem diferença significativa entre si, caindo em T28, e permanecendo baixa em T35, com valores similares a T3. O grupo **SCLH** apresentou um aumento de atividade enzimática em T3 (3 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), valor que se mantém aproximadamente constante até o fim dos 35 dias de experimento.

Figura 24 - Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) nos determinados tempos de análise.



Nesta análise foi realizada uma comparação entre os diferentes tempos dentro de um mesmo grupo (intra-grupo). Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes (intra-grupo) segundo análise de variância pelo método de ANOVA com o pós-teste de *Tukey* utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

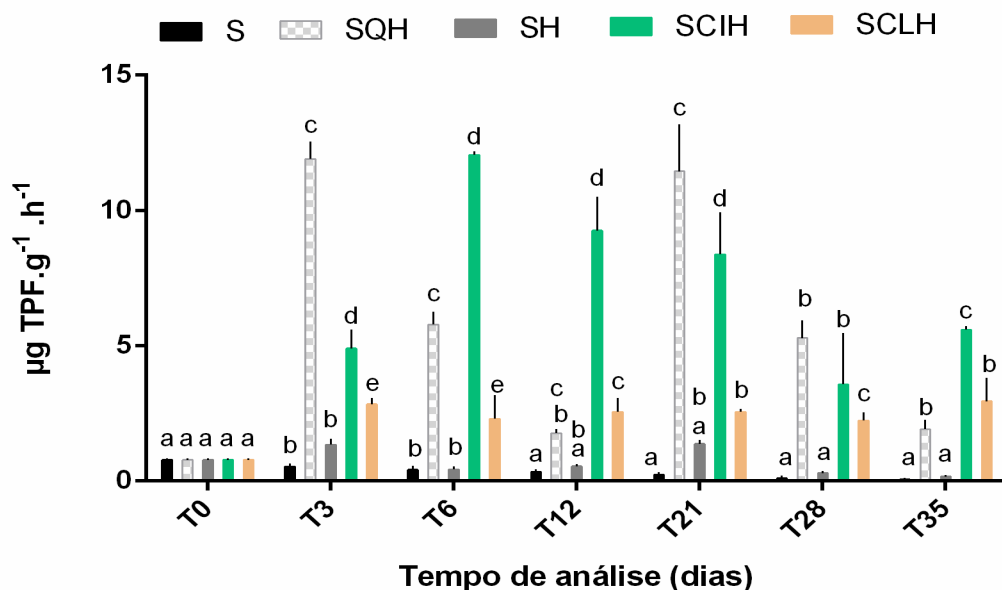
Na **Figura 25** podemos visualizar as principais diferenças entre os grupos em cada tempo de análise. **T0** representa a atividade metabólica basal do sedimento, antes da adição de cada tratamento aos microcosmos. Portanto, como foi utilizado o mesmo sedimento para a montagem do experimento, não há diferenças significativas entre os grupos nesse tempo de análise.

Em **T3**, é possível ver que **SQH** apresenta um pico de atividade metabólica significativamente diferente do grupo controle **S** e dos outros grupos, indicando que a quitosana adicionada estimula a microbiota autóctone do solo logo no início do experimento. O grupo **SH** não apresentou aumento significativo em sua atividade metabólica quando comparado ao controle **S**, mostrando que a microbiota autóctone não responde a esse poluente. Já os grupos **SCIH** e **SCLH** apresentaram aumento e foram significativamente diferentes dos outros grupos analisados. Porém, **SCIH** apresentou maior atividade enzimática ($5 \mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) do que o grupo **SCLH** ($3 \mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Em **T6**, os grupos **SQ** e **SCIH** apresentaram os valores mais altos e significativamente diferentes dos outros grupos, sendo o maior valor referente ao grupo **SCIH**. Os grupos **S** e **SH** permaneceram com valores próximos a atividade metabólica basal do solo até o final o experimento. O grupo **SCLH** ficou com valor em torno de 2,29 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, terceiro valor mais alto neste tempo de análise. Esse padrão se mantém em **T12**, porém o grupo **SQ** apresenta uma queda em sua atividade metabólica atingindo média de 1,75 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, sem diferença estatística com o grupo **SCLH**, com média de 22,5 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Em **T21**, há uma mudança significativa e o grupo **SQH** atinge um novo pico de atividade metabólica em torno de 11,5 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, já o grupo tratado com o consórcio imobilizado tem valores em torno de 8 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Em **T28**, os valores dos grupos **SQH** e **SCIH** permanecem significativamente diferentes dos demais e similares entre si. Já em **T35**, a atividade metabólica do grupo **SQH** cai para 1,8 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto do grupo **SCIH** permanece em torno de 5,6 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Os grupos **S** e **SH** apresentam valores baixos (em torno de 0,4 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e sem diferenças estatísticas entre si. E o grupo **SCLH** mantém atividade metabólica similar aos outros tempos de análise desse mesmo grupo, em torno de 2,5 $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

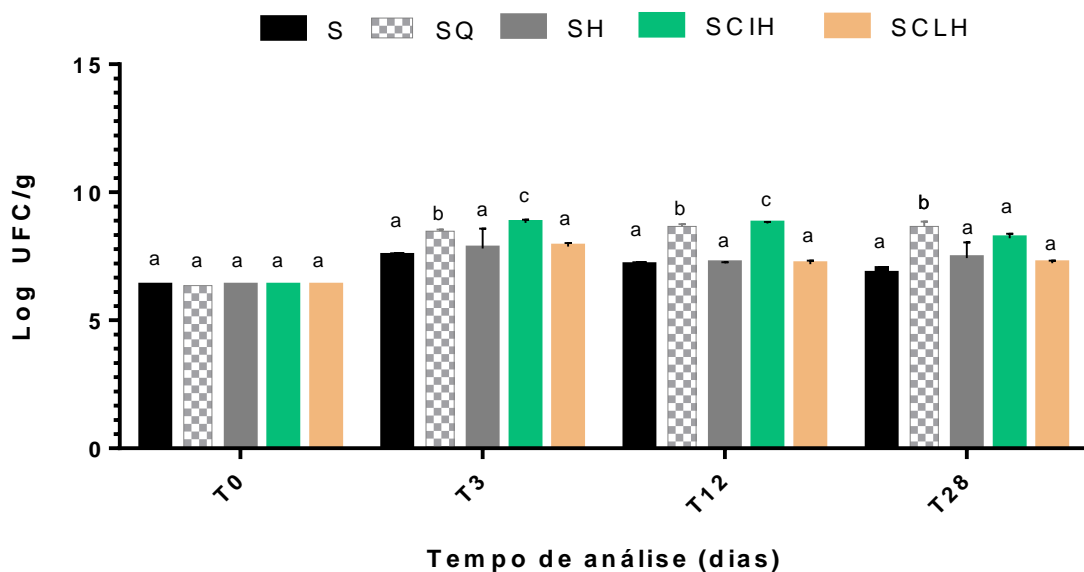
Figura 25 - Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) nos determinados tempos de análise.



Nesta análise foi realizada comparação entre os diferentes grupos em cada um dos tempos. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes (inter-grupo) em um determinado tempo segundo análise de variância pelo método de ANOVA com o pós-teste de Tukey utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Os resultados das contagens de células viáveis totais nos diferentes tempos de experimento estão representados na **Figura 26**. **T0** é a contagem de células viáveis realizada com os sedimentos do manguezal logo após a coleta e antes da adição tratamentos, e corresponde ao valor de $2,3 \times 10^6$ UFC/g. Os grupos **S**, **SH** e **SCLH** não apresentaram diferenças estatísticas entre si na contagem de viáveis realizada em **T3**, **T12** e **T28**, mantendo o número aproximadamente constante. Os grupos **SQH** e **SCIH** tiveram aumento significativo na contagem de células viáveis totais já no tempo **T3**, sendo o aumento mais significativo alcançado pelo grupo **SCIH**. **SQH** e **SCIH** tiveram valores de contagem de viáveis igual a $3,0 \times 10^8$ UFC/g e $6,5 \times 10^8$ UFC/g respectivamente. Valores que permaneceram estatisticamente maiores do que o controle em **T12**. No entanto, em **T28** o grupo **SCIH** tem uma redução na contagem de viáveis para $1,7 \times 10^8$ UFC/g, valor ainda significativamente mais alto do que o encontrado em **T0**. O grupo **SQH** tem o número da contagem de viáveis ainda alto em **T28** em torno de $4,9 \times 10^8$ UFC/g.

Figura 26 - Contagem de células viáveis totais nos microcosmos de sedimentos de manguezal nos determinados tempos de análise.



Foram realizadas análises nos tempos 0, 3, 12, 28 dias após o início do experimento. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes em cada tempo segundo análise de variância pelo método de ANOVA com o pós-teste de *Tukey* utilizando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

As placas das contagens de viáveis dos grupos **SCIH** e **SCLH** estão mostradas nas **Figuras 27** e **28**, onde é possível visualizar as colônias de coloração amarela que são características da cepa HEX 6 (*Micrococcus* sp.) e colônias menores e rosadas características da cepa HEX 5 (*Gordonia* sp.).

Figura 27 - Contagem de bactérias viáveis totais nos microcosmos de sedimentos de manguezal contaminado com hexadecano (10 g/Kg) adicionado do consórcio HEX 5 e HEX 6 imobilizado em esferas de quitosana no tempo T3.

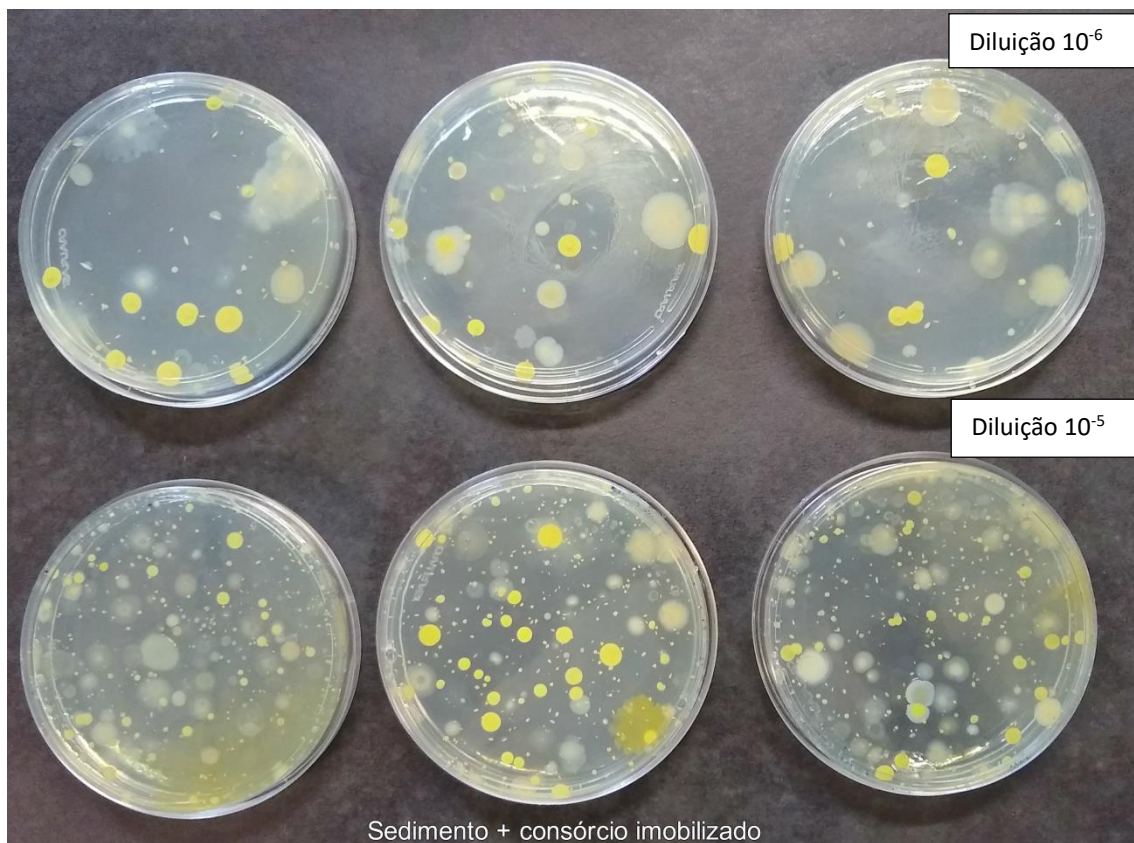
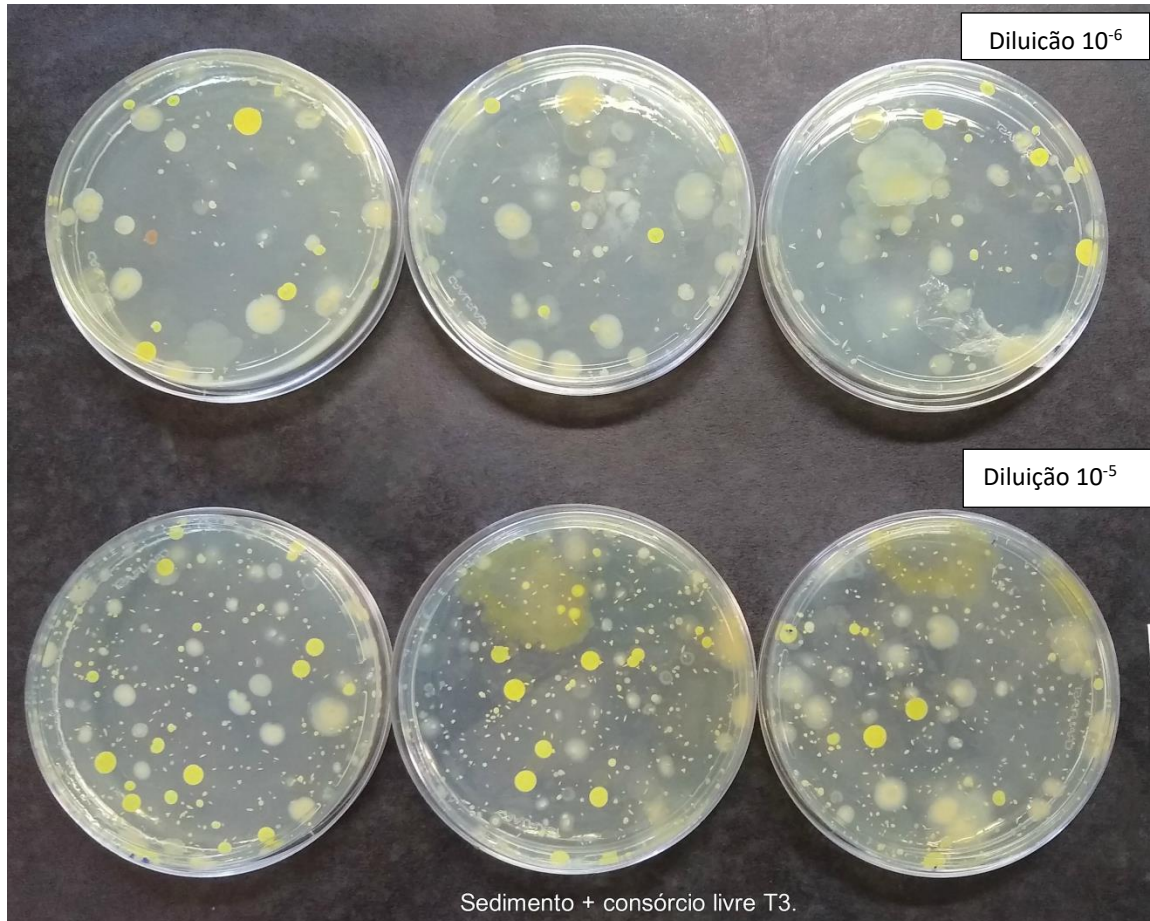


Figura 28 - Contagem de bactérias viáveis totais nos microcosmos de sedimentos de manguezal contaminado com hexadecano (10 g/Kg) adicionado do consórcio HEX 5 e HEX 6 livre no tempo T3.



6 DISCUSSÃO

A composição do sedimento de manguezal é um fator-chave que influencia a interação entre a microbiota autóctone e o poluente, assim como a interação do poluente com próprio sedimento. Todas essas interações podem afetar a taxa de biodegradação e o sucesso da biorremediação. Além disso, características físico-químicas dos sedimentos como textura, pH, temperatura, permeabilidade, capacidade de retenção de água, teor de oxigênio e teor de nutrientes contribuem para o grau de toxicidade intrínseca do poluente e devem ser avaliados antes da escolha do processo de biorremediação (MOYO *et al.*, 2014).

Os sedimentos utilizados neste estudo são salinos, ricos em argila e em matéria orgânica e possuem pH alcalino. A granulometria fina, contendo silte e argila, indica uma propensão natural para reter contaminantes. O tamanho dos grãos é um fator importante na acumulação dos nutrientes, pois as frações mais finas possuem uma alta capacidade de retenção de compostos orgânicos devido à maior área de superfície. O transporte e a distribuição de água, nutrientes e oxigênio são dificultados em sedimentos com baixa permeabilidade, particularmente naqueles que contém argila. Além disso, a maior quantidade de matéria orgânica pode influenciar na disponibilidade de poluentes aos microrganismos degradadores (MALETIC *et al.*, 2013). Por outro lado, os minerais de argila tendem a reter o contaminante em um determinado local, o que impede a dispersão para outros locais e pode favorecer um maior tempo de contato dos microrganismos com o poluente, possibilitando sua degradação (MOYO *et al.*, 2014). O pH alcalino deve-se a influência dos constantes períodos de inundação com água do mar. Por ser um ambiente que fica na interseção entre o rio e mar, tem-se um solo salino e com alta condutividade elétrica. As condições encontradas nesse manguezal assemelham-se a condições de outros manguezais encontrados no estado Ceará, como de Icapuí, Malcozinhado, Curu e Mundaú (BONFIM, 2011).

Considerando as características peculiares dos sedimentos de manguezais, é relevante se testar a tecnologia de biorremediação pretendida em microcosmos antes de qualquer aplicação a campo.

Neste estudo foi feita uma simulação de biorremediação de sedimentos de manguezal contaminado com hexadecano em microcosmos para testar a eficiência da bioaugmentação utilizando um consórcio de duas actinobactérias na forma imobilizado em esferas de quitosana e como células livres. As estirpes de bactérias do consórcio formado por *Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6, são hidrocarbonocásticas, ou seja, são capazes de crescer utilizando hidrocarbonetos, no caso, n-hexadecano, como única fonte de carbono, como ratificado neste estudo. Várias espécies de *Gordonia* e *Micrococcus* já foram relatadas como degradadoras de diversos compostos tóxicos, dentre eles hidrocarbonetos. Isso endossa a investigação do potencial dessas cepas para biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e derivados (ARENKO; BRO; STEINBU, 2004; KUMMER; SCHUMANN; STACKEBRANDT, 2018; WIESER *et al.*, 2002).

A degradação de alcanos por microrganismos ambientais empregam diversas vias, onde diferentes sistemas enzimáticos são responsáveis pela ativação dos alcanos em condições aeróbias e anaeróbias. Em condições aeróbias, o oxigênio atua como receptor final de elétrons, enquanto em condições anaeróbias, atuam como receptores o nitrito e o sulfato (JIN *et al.*, 2013). O sistema enzimático alcano hidroxilase (AlkB) tem sido utilizado como um biomarcador para estudos de abundância de diversidade de bactérias degradadoras de alcanos. A pesquisa do gene *alkB* neste estudo confirmou que apenas HEX 5 carrega esse gene, o que prova o potencial de pelo menos um dos membros do consórcio para fazer o ataque inicial desse contaminante.

Experimentos anteriores também revelaram a presença desse gene em 17 cepas de *Gordonia* que foram isoladas de diferentes tipos de ambientes (SHEN, 2010).

Todavia, como HEX 6 se desenvolve em meio mineral contendo hexadecano como única fonte de carbono, como confirmado neste estudo, é razoável supor que deva utilizar outro sistema enzimático de oxidação de alcanos. Em adição, deve-se enfatizar que mesmo as proteínas AlkB compartilhando uma homologia de sequência considerável, as sequências nucleotídicas que codificam o gene *alkB* podem variar bastante nas bactérias. Além disso, o gene *alkB* foi detectado pela primeira vez no gênero *Micrococcus* (HEX 6) somente recentemente (SUN *et al.*, 2014), evidenciando que ainda há muito a ser estudado sobre a presença desse

gene em *Micrococcus*. A diversidade de genes *alkB* caracterizadas até agora representa uma pequena fração da diversidade encontrada em ambientes naturais.

Na última década, o sequenciamento metagenômico revelou que a diversidade de sequências enzimáticas é muito maior do que se supunha anteriormente com base em dados genômicos funcionais. Assim, muitos genes que codificam enzimas podem não ser capturados com conjuntos de *primers* convencionais (UFARTÉ *et al.*, 2015). A amplificação do gene *alkB* utilizando apenas um par de iniciadores, como foi realizado neste estudo, para amostras de DNA de solos limita a gama de detecção deste gene. Jurelevicius e colaboradores, em 2013, mostraram que se pode perder cerca de 30% ou mais na detecção de bactérias que degradam alcanos, sugerindo utilizar uma combinação de iniciadores para o gene *alkB* (CAPPELLETTI *et al.*, 2011; JURELEVICIUS *et al.*, 2013).

As estirpes HEX 5 e HEX 6 produziram emulsões do tipo água/óleo, gerando gotículas e promovendo a pseudo-solubilização de querosene em água. O sobrenadante de HEX 5 promoveu maior emulsão do querosene do que o sobrenadante de HEX 6. Várias estirpes de *Gordonia* já foram confirmadas como produtoras de biossurfactantes, já tendo registro da aplicação com êxito na remediação de derramamento de óleo em ambiente marinho, no qual promoveu ação dispersante de óleo na água do mar e também remoção de óleo da superfície de areia de praia (SAEKI *et al.*, 2009).

Além da atividade emulsificante, os sobrenadantes de HEX 5 e HEX 6 reduziram a tensão superficial da água, confirmando o potencial tensoativo dessas estirpes. Muitos contaminantes tendem a se ligar às partículas de solo e possuem baixa solubilidade, caso do hexadecano ($C_{16}H_{34}$) que possui solubilidade muito baixa, 0,00628 (STROUD *et al.*, 2007), o que pode dificultar a captação dessas moléculas pelos microrganismos. Os biossurfactantes produzidos por essas estirpes podem melhorar a captação de compostos hidrofóbicos como os alcanos através da produção de compostos que reduzam a tensão superficial entre as fases fluidas e que emulsionam os hidrocarbonetos, aumentando a superfície de contato das gotas de óleo com a superfície bacteriana. Além disso, os biossurfactantes contribuem para maior mobilidade dos microrganismos na matriz do solo. De modo geral, os biossurfactantes podem melhorar a remoção de alcanos e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de solos contaminados (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SINGH; HAMME; VAN; WARD, 2007).

A atividade desidrogenase é comumente utilizada como indicador da qualidade do solo, por refletir a atividade oxidativa da comunidade bentônica, sendo uma medida simples e rápida de avaliar a influência de contaminantes no solo (TAM, 1998). Os resultados encontrados neste estudo foram interpretados a partir de comparações com os grupos controles.

Em um estudo realizado por Gouda *et al.*, 2007, a adição de bactérias do gênero *Gordonia* em solo contaminado com querosene alcançou taxas de degradação de 77% em apenas 7 dias de experimento em microcosmos, também foi possível verificar a degradação de até 86% de querosene em 21 dias de experimento com consórcio composto de *Gordonia* sp. e *Pseudomonas* sp.

As análises mostraram que a atividade desidrogenase basal dos sedimentos analisados neste estudo gira em torno de $0,776 \mu\text{g TFP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Ou seja, qualquer aumento desse valor pode ser interpretado como resposta da comunidade a um desafio externo. A atividade metabólica basal do solo depende do tipo de solo e das condições a que ele está submetido. Solos sob cultivo intensivo podem apresentar atividade da desidrogenase basal em torno de $0,89 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (BONANOMI, 2011). Solos de áreas poluídas por metais pesados podem apresentar ADH em torno de $2,9 \pm 0,1 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, esse mesmo solo teve sua atividade desidrogenásica aumentada para $53 \pm 0,5 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ quando submetido a processo de recuperação, e esse mesmo solo em área não poluída apresenta ADH de aproximadamente $71,4 \pm 0,5 \mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, indicando que solos recuperados podem apresentar maiores ADH, provavelmente devido a maior atuação dos microrganismos na ciclagem de nutrientes presentes no solo. Portanto, solos que apresentam algum tipo de estresse ou poluição apresentam menor ADH (HINOJOSA, 2008).

Em experimentos com solos contaminados com óleo, um aumento na atividade desidrogenase é atribuído à adaptação e reprodução dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (NWANKWEGU *et al.*, 2016). Pesquisas também indicam que ambientes cronicamente contaminados promovem uma seleção de microrganismos capazes de viver na presença de poluentes, aumentando em até 10% o número de microrganismos capazes de degradar esses compostos (VARJANI, 2017). Portanto, o aumento do número de células e o aumento da atividade enzimática em decorrência da introdução de um contaminante são sugestivos da ocorrência de biodegradação.

A fim de aumentar a eficiência da biorremediação, a imobilização das células em um suporte compatível ajuda a manter a viabilidade celular e atividade microbiana por um maior período de tempo, por restringir a competição direta com a microbiota autóctone (PARTOVINIA; RASEKH, 2018). Isto foi aplicado neste estudo, através da imobilização em esferas de quitosana, polissacarídeo proveniente da quitina e, portanto, biocompatível com sedimentos de manguezais e com a microbiota nativa, já adaptada a presença de grandes quantidades de quitina de crustáceos, abundantes nesses ecossistemas. A quitosana é usualmente susceptível a um grande número de enzimas, incluindo as específicas (quitosanases) e não específicas (carbohidrolases, proteases, lipases, entre outras). Quitosanases são produzidas por microrganismos, onde possuem um importante papel na nutrição e defesa. Quitosanases de origem bacteriana já foram descritas em diversos gêneros como *Bacillus* sp., *Serratia* sp., *Janthinobacterium* sp. e *Paenibacillus* sp (JOHNSEN *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2014; TAKASUKA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011; ZITOUNI *et al.*, 2013).

As análises mostraram que o microcosmo controle **S** manteve sua atividade metabólica basal durante todo o período do experimento, evidenciando que a comunidade microbiana estava ativa, porém sem mudanças, uma vez que não houve adição de nenhum elemento externo. O mesmo pôde ser observado no grupo **SH**, no qual mesmo após a adição do contaminante hexadecano na concentração de 10 g/Kg não promoveu alterações significativas na taxa metabólica dos microrganismos do solo, indicando que na presença apenas do contaminante, as bactérias não foram estimuladas a degradar o hexadecano. Inclusive, esses dois grupos, não apresentam diferenças significativas entre si ao longo de todo o período do experimento. Já no grupo **SQH**, foi possível ver um pico de atividade metabólica já no terceiro dia de experimento (**T3**). Além disso, nesse mesmo tempo já não era possível visualizar as esferas dentro dos microcosmos, indicando que elas foram biodegradadas. Isso pode ter ocorrido porque os microrganismos nativos já são adaptados a quitosana, já que é oriunda da quitina presente nas carapaças de crustáceos, animais abundantes no manguezal. Por ser facilmente biodegradada a quitosana funcionou como bioestimulador da microbiota nativa, sendo uma fonte de carbono orgânico que gerou expressiva alteração nas taxas metabólicas dos

microrganismos (KIM; RAJAPAKSE, 2005). Em um estudo realizado com solos contaminados com querosene e diesel, a bioestimulação da microbiota nativa do solo recém contaminado apresentou ADH de 20-40% mais elevada (ALRUMMAN, 2015).

A alta atividade metabólica do grupo **SQH** manteve-se no sexto dia de experimento (**T6**), e caiu a níveis basais no **T12**, que pode indicar que os microrganismos envolvidos na degradação da quitosana tiveram seus metabolismos reduzidos e geraram subprodutos que estimularam outros microrganismos do solo a atuarem, levando a mais um pico de atividade metabólica no dia 21 (**T21**), então a microbiota foi voltando ao estado basal, o que pode ser observado pela gradativa queda de atividade metabólica observada do dia 28 ao dia 35, onde a concentração de TPF gerado chegou a ficar sem diferença estatística quando comparado com o valor de **T0**. Em estudos prévios realizados com microcosmos, a atividade de desidrogenase do solo aumentou imediatamente após a contaminação de óleo em solos bioestimulados, mas declinaram com a diminuição do conteúdo de hidrocarbonetos. ADH do solo mostrou-se descontínua, especialmente durante as primeiras semanas (MARGESIN, 2000). Em outro estudo, a adição de agentes bioestimulantes como glicose e extrato de levedura provocou aumento significativo na ADH do solo (KUMAR, 2015).

No grupo **SCLH** é possível visualizar que a adição do consórcio promoveu um aumento na atividade metabólica, porém não tão expressiva quanto do grupo contendo consórcio imobilizado (**SCIH**). Esse aumento ocorreu devido ao aumento de microrganismos dentro do microcosmo e pela ação dos microrganismos adicionados. A ADH se manteve mais alta que a atividade metabólica basal, até mesmo no final dos 35 dias de experimento, indicando que o consórcio se manteve ativo até o final do experimento.

Sabemos que HEX 5 produz biosurfactantes após 48 h e que HEX 6 produz biosurfactantes após 72 h, portanto, em **T3**, esses compostos já devem estar presentes no microcosmo facilitando a captação do contaminante e contribuindo para sua degradação e conseqüentemente para um aumento da taxa metabólica. Similarmente, a adição de biosurfactantes promoveu aumento da solubilidade aparente do hexadecano, melhorando sua biodegradação. (BEAL; BETTS, 2000).

Em outros estudos, microrganismos capazes de produzir biossurfactantes são estimulados a produzi-los quando estão na presença de hidrocarbonetos no meio, com o objetivo de solubilizar e mobilizar o hidrocarboneto facilitando sua captação e aumentando a taxa de degradação (GHRIBI; MNIF, 2015).

O grupo **SCIH**, por sua vez apresentou pico de ADH no 3^o dia, sendo esta atividade máxima no 6^o dia. Em **T6** há um pico de atividade metabólica maior do que o observado no grupo **SQH**, o que pode indicar que nesse período o consórcio já se estabeleceu no microcosmo e começou a degradar o hexadecano enquanto as bactérias nativas do solo se mantiveram utilizando a quitosana como fonte de carbono, sendo bioestimuladas. A atividade metabólica do consórcio somada a atividade das bactérias nativas após sofrerem bioestímulo da quitosana podem ter gerado o pico de produção de TPF no tempo 6. Um estudo realizado com solo contaminado com diesel (5 g/Kg) mostrou um aumento da desidrogenase do solo foi relacionado ao aumento da degradação e reprodução dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (MARGESIN, 2000). Em **T3**, pode ter ocorrido uma competição entre os microrganismos adicionados e os microrganismos autóctones, o que acabou sendo refletido na ADH. Em **T6**, o consórcio adicionado conseguiu se estabelecer na comunidade e teve maior taxa metabólica. Na contagem de viáveis realizada em **T3 (Figura 26)**, há diferença estatística entre o número de unidades formadoras de colônia encontrado no grupo **SCIH** e **SQ**, provando que apesar de em T3 a ADH não ter sido tão alta quanto em **SQ**, o grupo **SCIH** tem número de células significativamente maior, ou seja, a adição do consórcio promoveu o aumento de UFC que só foi refletido em ADH em **T6**, após o consórcio atingir um equilíbrio com a comunidade nativa e assim, alcançarem taxas metabólicas elevadas.

Em **T12** a atividade metabólica de **SCIH** tem uma leve queda, mantendo-se significativamente mais alta do que o grupo tratado apenas pela adição de quitosana sem consórcio. Essa alta atividade metabólica é mantida até mesmo no dia 21 (**T21**), o que pode indicar que os subprodutos da degradação do hidrocarboneto podem estar sendo fonte de carbono para outros microrganismos, mantendo as taxas metabólicas elevadas. Além disso, há também os subprodutos da degradação da quitosana estimulando os microrganismos não degradadores de hidrocarbonetos. Em um estudo realizado com bactérias imobilizadas em pó de

casca de amendoim para limpeza de solo contaminado com óleo, a ADH foi significativamente mais alta do que a do grupo tratado apenas com as bactérias livres, ou seja, a atividade da desidrogenase no solo foi notavelmente aumentada pela aplicação de um suporte transportador de células. A biodegradação foi aumentada com cultura bacteriana livre (21%), mas alcançou taxas mais altas (61%) pela aplicação das bactérias imobilizadas (XU, 2010).

É importante comparar os grupos **SQH** e **SCIH** em **T21**, nesse período a atividade metabólica do grupo **SQH** supera a do grupo tratado com o consórcio, isso pode ter ocorrido devido a perda de células viáveis do consórcio após o restabelecimento da comunidade microbiana nativa do solo, levando a níveis de atividade metabólica cada vez mais semelhantes ao do início do experimento. A atividade metabólica do grupo tratado com consórcio cai ainda mais em **T28** e se mantém estável até **T35**. Ensaios realizados em microcosmos testando o efeito de consórcios bacterianos demonstram a prevalência da bioaugmentação quando comparada a atenuação natural e o bioestímulo. Resultados obtidos com outro consórcio demonstraram degradação da fração mais leve dos componentes do diesel (C12-C23) concentrando-se nos primeiros 14 dias de experimento e maior aumento da DHA em condições de bioaugmentação (BENTO, 2005).

O grupo **SQH**, teve um pico de atividade metabólica em T3 e apresentou aumento significativo no número de células viáveis, o que indica que a quitosana estimulou as bactérias do solo aumentando a sua taxa metabólica e sua reprodução. Ainda assim, esse aumento no número de células foi menor do que o observado no grupo que houve bioaugmentação e bioestimulação pela adição do consórcio imobilizado (**SCIH**). Em experimentos realizados em microcosmos com solo contaminado com hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), houve aumento no número de células no grupo tratado por bioestimulação, porém o aumento verificado no grupo tratado com bioestimulação e bioaugmentação foi ainda mais significativo, que atingiu taxa de 75 % de remoção de TPH de solo (ROY, 2018). Sun *et al* (2012) também encontrou resultados melhores na aplicação da combinação das técnicas de bioestimulação e bioaugmentação que proporcionaram significativa melhora na remoção de hidrocarbonetos quando comparado ao uso dessas técnicas separadamente.

Os grupos **S**, **SH** e **SCLH** não apresentaram diferenças no número de células viáveis entre si, e não apresentaram diferenças estatísticas quando

comparadas ao número de células presentes em **T0**. Foi anteriormente relatado que a matéria orgânica presente no solo protege os microrganismos contra o efeito tóxico dos hidrocarbonetos, contribuindo para a manutenção o número e células viáveis presentes no solo não tratado mesmo após a adição do poluente (LABUD, 2007). Em outro estudo realizado em microcosmos para avaliar a degradação de inseticidas, foi visto que o número de células viáveis da microbiota nativa do solo na presença desses compostos manteve-se aproximadamente constante ao longo de 12 dias de experimento (CARACCIOLO, 2002). Apesar da adição de células ao grupo **SCLH**, provavelmente a competição entre as bactérias nativas e as bactérias que foram adicionadas ao solo manteve o número de células sem diferença estatística com o controle **S** e **SH**, mas a maior ADH encontrada nesse grupo indica a presença de microrganismos mais ativos metabolicamente do que os que estão nos grupos controle **S** e **SH**, provavelmente esses microrganismos correspondem a HEX 5 e HEX 6 adicionadas na forma livre que estão atuando na degradação do hexadecano. Pesquisas de alfa diversidade realizada em experimentos de biorremediação de solo mostraram que, na presença do contaminante, há uma tendência de prevalência dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, destacando assim a presença de um núcleo composto por uma população hidrocarbonoclástica central dentro da comunidade nativa, o que poderia ser instigado favoravelmente com tratamentos para fins de biorremediação (ROY, 2018).

Em **T12**, o grupo **SQH** apresentou uma queda em sua atividade metabólica, porém o número de células se manteve em **T12**. Apesar de não estarem com taxas metabólicas elevadas, essas células se mantêm em **T28**, indicando que a quitosana promoveu bioestímulo com êxito às bactérias nativas do solo do manguezal.

Uma pesquisa realizada com solo contaminado com fenantreno mostrou que a presença de outras fontes de carbono no solo não interferiu na degradação do fenantreno pelos microrganismos (PATEL; PATEL; MADAMWAR, 2013). Corroborando a hipótese de que uso da quitosana como suporte de imobilização bioestimula os microrganismos e não interfere na biodegradação do contaminante. Além disso, em estudos prévios realizados por Angelim (2013) foi comprovado que as bactérias utilizadas nesse consórcio (HEX 5 e HEX 6) não são capazes de

degradar quitosana, o que garante uma maior durabilidade do produto, bem como o uso de outras fontes de carbono por essas bactérias.

No grupo tratado com consórcio, também há uma manutenção de um alto número de células viáveis em **T12**, devido à inclusão de novas células ao meio e devido ao estímulo propiciado pela quitosana aos microrganismos. Porém esse número cai em **T28** provavelmente pelo restabelecimento da comunidade microbiana nativa do solo e queda na população de microrganismos do consórcio que foi adicionado.

7 CONCLUSÃO

O consórcio formado pelas actinobactérias *Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6 foi aprisionado com sucesso em esferas de de 2 mm de quitosana, gerando um biopoduto com características mecânicas e funcionais promissoras para utilização na biorremediação *in situ* ou *ex situ* de sedimentos de manguezal contaminados com n-hexadecano.

A matriz de quitosana forneceu vantagens ao consórcio imobilizado em comparação ao uso do consórcio livre, e atuou como bioestimulador do microbioma do solo. Portanto, esse produto possui propriedades para aplicação em processos de bioaumentação e bioestimulação de solos contaminados com hidrocarbonetos.

O consórcio imobilizado em esferas de quitosana mostrou-se mais eficaz em degradar hexadecano em sedimentos de manguezal contaminado com esse poluente do que o consórcio livre, pois teve maior taxa metabólica ao longo do experimento, bem como maior número de contagem de viáveis, indicando a presença de mais microrganismos atuando na biodegradação. Esse produto é uma nova opção de tecnologia de biorremediação, com as vantagens de fácil manejo, fácil armazenamento e durabilidade (30 dias), transporte e aplicação.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. O. *et al.* Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 28–39, 2015.
- AL-HAWASH, A. B. *et al.* Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, [s.l.], v. 44, n. 2, p. 71–76, 2018.
- ALONGI, D. M. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, [s.l.], v. 76, n. 1, p. 1–13, 2008.
- ALVES, J. R. P. **Manguezais educar para proteger**. [s.l.], p. 96, 2001.
- AMANI, H. *et al.* Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [s.l.], v. 75, n. 1, p. 209–214, 2010.
- ANGELIM, A. L. *et al.* An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of environmental management**, [s.l.], v. 127, n. October, p. 10–7, 2013.
- ARENSKÖTTER, Matthias; BRÖKER, Daniel; STEINBÜCHEL, Alexander. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. **Appl. Environ. Microbiology**, [s.l.], v. 70, n. 6, p. 3195-3204, 2004.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 1–12, 1995.
- BEAL, R.; BETTS, W. B. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 89, n. 1, p. 158-168, 2000.
- ADHIKARI, D. *et al.* Development of an efficient bioremediation system for petroleum hydrocarbon contaminated soils based on hydrocarbon degrading bacteria and organic material control. **Austin Journal Biotechnology & Bioengineering**, [s.l.], v. 2, p. 1048, 2015.
- CAPPELLETTI, M. *et al.* Analyses of both the *alkB* Gene transcriptional start site and *alkB* promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. Strain BCP1 grown on n-Alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 5, p. 1619–1627, 2011.
- CARACCILO, Barra *et al.* Microbial degradation of two carbamate insecticides and their main metabolites in soil. **Chemistry and Ecology**, [s.l.], v. 18, n. 3-4, p. 245-255, 2002.
- CHAILLAN, F. *et al.* Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, [s.l.], v. 155, n.

7, p. 587–595, 2004.

CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C.; CHIKERE, B. O. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. **3 Biotech**, v. 1, n. 3, p. 117–138, 2011.

DE, U.; RC, P. **Oil Spills in Mangroves**. [s.l.: s.n.].

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s.l.], v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

GHAZALI, F. M. *et al.* Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s.l.], v. 54, n. 1, p. 61–67, 2004.

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Degradation of long-chain n-alkanes (C36 and C40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 40–43, 2007.

HSIEH, F. M.; HUANG, C.; LIN, T. F.; CHEN, Y. M.; LIN, J. C. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 43, p. 83–92, 2008.

JACQUES, R. J. S. *et al.* Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 7, p. 2637–2643, 2008.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 71, n. 12, p. 4124–4126, 1949.

JI, Y. *et al.* Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 4, n. March, p. 58, 2013.

JIN, D. *et al.* Biodegradation of di-n-butyl phthalate by an isolated *Gordonia* sp. strain QH-11: Genetic identification and degradation kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 221–222, p. 80–85, 2012.

JURELEVICIUS, D. *et al.* The Use of a Combination of alkB Primers to Better Characterize the Distribution of Alkane-Degrading Bacteria. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

KAREL, STEVEN F; LIBICKI, SHARI B; ROBERTSON, C. R. THE IMMOBILIZATION OF WHOLE CELLS: ENGINEERING PRINCIPLES. **Chemical Engineering Science**, [s.l.], v. 40, n. 8, p. 1321–1354, 1985.

KHAN, M. A. I. *et al.* Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. **Chemosphere**, [s.l.], v. 212, p. 755–767, 2018.

KLEKOWSKI, E. J. *et al.* Petroleum pollution and mutation in mangroves. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 166–169, 1994.

KOMA, D. *et al.* Degradation of Car Engine Base Oil by *Rhodococcus* sp. NDKK48

and *Gordonia* sp. NDKY76A. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s.l.], v. 67, n. 7, p. 1590–1593, 2003.

KUMMER, C.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E. tar-contaminated soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s.l.], n. 1 999, p. 1513–1522, 2018.

LETNIK, I. *et al.* Biosorption of copper from aqueous environments by *Micrococcus luteus* in cell suspension and when encapsulated. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s.l.], v. 116, p. 64–72, 2017.

LINOS, A. *et al.* Rubbers by Distinct Actinomycetes : Microbial Strategies and Detailed Surface Analysis Biodegradation of cis -1 , 4-Polyisoprene Rubbers by Distinct Actinomycetes : Microbial Strategies and Detailed Surface Analysis. **Applied and environmental microbiology**, [s.l.], v. 66, n. 4, p. 1639Linosa, A., Berekaa, M. M., Reichelt, R., Kelle, 2000.

MAITI, S. K.; CHOWDHURY, A. Effects of Anthropogenic Pollution on Mangrove Biodiversity: A Review. **Journal of Environmental Protection**, [s.l.], v. 2013, n. December, p. 1428–1434, 2013.

MOYO, F. *et al.* Sorption of hydrophobic organic compounds on natural sorbents and organoclays from aqueous and non-aqueous solutions: A mini-review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 5020–5048, 2014.

MNIF, Inès; GHRIBI, Dhouha. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Peptide Science**, [s.l.], v. 104, n. 3, p. 129-147, 2015.

MUTHUSAMY, K. *et al.* Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Curr Sci**, [s.l.], v. 94, n. 6, p. 736–774, 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NUÑEZ, M. *Micrococcus*. **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**, [s.l.], v. 2, p. 627–633, 2014.

NWANKWEGU, A. S. *et al.* Reclamation of DPK hydrocarbon polluted agricultural soil using a selected bulking agent. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 172, p. 136–142, 2016.

PARTOVINIA, A.; RASEKH, B. Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 1–38, 2018.

PATEL, Vilas; PATEL, Janki; MADAMWAR, Datta. Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. **Marine pollution bulletin**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 199-207, 2013.

PAUL, T. *et al.* Arsenic Bioremediation Potential of Arsenite-Oxidizing *Micrococcus* sp. KUMAs15 Isolated from Contaminated Soil. **Pedosphere**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.

299–310, 2018.

ROY, A. *et al.* Bioresource Technology Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 253, n. November 2017, p. 22–32, 2018.

ROY, S. *et al.* Survey of petroleum- degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 18, n. 6, p. 575–581, 2002.

SAEKI, H. *et al.* Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 2, p. 572–577, 2009.

SANTOS, D. *et al.* Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SHEN, F. T. *et al.* Molecular detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene from *Gordonia* spp. **Systematic and Applied Microbiology**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 53–59, 2010.

SHINTANI, M. *et al.* Biodegradation of A-fuel oil in soil samples with bacterial mixtures of *Rhodococcus* and *Gordonia* strains under low temperature conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s.l.] v. 127, n. 2, p. 197-200, 2019.

SIMS, G. K.; SOMMERS, L. E.; KONOPKA, A. Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 51, n. 5, p. 963–968, 1986.

SINGH, A.; HAMME, J. D. VAN; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

SIRIPATTANAKUL, Sumana; KHAN, Eakalak. Fundamentals and applications of entrapped cell bioaugmentation for contaminant removal. In: **Emerging Environmental Technologies, Volume II**. Springer, Dordrecht, 2010. p. 147-169.

SUN, Guang-Dong *et al.* Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. **Journal of hazardous materials**, [s.l.], v. 233, p. 72-78, 2012.

TAM, N. F. Y. Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 102, p. 233–242, 1998.

THOMAS, N. *et al.* Distribution and drivers of global mangrove forest change, 1996-2010. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 1–14, 2017.

TSUKAMURA, M. Proposal of a new genus, *Gordona*, for slightly acid-fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil. **Journal of General Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 1, p. 15–26, 1971.

UFARTE, Lisa *et al.* Metagenomics for the discovery of pollutant degrading enzymes.

Biotechnology advances, [s.l.], v. 33, n. 8, p. 1845-1854, 2015.

VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 223, p. 277-286, 2017

VARJANI, Sunita J.; UPASANI, Vivek N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 120, p. 71-83, 2017.

VIJAYAKUMA, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. **Research Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 181–192, 2015.

WIESER, M. *et al.* Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos *et al.* 1974). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 2, p. 629–637, 2002.

WU, Manli *et al.* Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. **Environmental pollution**, [s.l.], v. 223, p. 657-664, 2017.