



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LARISSA SANTANA BELIZÁRIO DUARTE

BIORREMEDIAÇÃO DE N-HEXADECANO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

FORTALEZA

2019

LARISSA SANTANA BELIZÁRIO DUARTE

BIORREMEDIAÇÃO DE N-HEXADECANO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA

2019

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)

D872b Duarte, Larissa Santana Belizário.
Biorremediação de n-hexadecano em sedimento de manguezal / Larissa Santana Belizário Duarte. – 2019.
67 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Biorremediação. 2. Imobilização celular. 3. Quitosana. 4. Hexadecano. I. Título.

CDD 661

LARISSA SANTANA BELIZÁRIO DUARTE

BIORREMEDIAÇÃO DE N-HEXADECANO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Ambiental.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Tallita Cruz Lopes Tavares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Liduina e Paulo César.

AGRADECIMENTOS

Ao divino e à natureza em sua perfeição.

Aos meus pais, Liduina e Paulo César, por todo o amor dedicado, cuidado e paciência, por tanto esforço empregado para que eu seguisse o caminho do bem.

A minha família, em especial meu irmão, Leandro, e minha prima, Fátima, por todo o apoio, compreensão e amor. Aos meus cachorros, Bruce e Bob, que me trazem tanta alegria.

Ao Davi, meu amor, por ser minha luz, meu amparo e meu porto seguro. Por todo o amor e apoio, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Profa. Vânia, pela orientação nesses dois anos, pela dedicação, esforço e compreensão, e pela confiança depositada em mim para a realização de tão lindo trabalho.

À minha coorientadora, Ma. Bella Giselly, sem a qual este trabalho não seria o mesmo, por tanta paciência e dedicação no ensino, por trazer tanta alegria a todos, pelas conversas e conselhos compartilhados e por todo o aprendizado, não só acadêmico, quanto pessoal. Gratidão.

À Profa. Daniele de Oliveira, por ter aceitado meu convite para participar da banca de avaliação, pelas aulas tão bem ministradas durante a graduação e por toda a simpatia.

À Dra. Tallita Lopes, por também ter aceitado meu convite para participar da banca de avaliação, pelo auxílio prestado durante a execução deste trabalho e pela sua gentileza.

À Profa. Denise Hissa, por sua prestatividade, cordialidade e gentileza.

À Mirella Leite, por todos os “*bonjour, xuxu*”, todas as conversas e conselhos preciosos, e por ser alegria e luz para todos no laboratório.

A todos os meus amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) e Laboratório de Recursos Genéticos (LaRGen): Andréa, Andreza, Bárbara, Brenda, Clauds, Cris, Daniel, Dias, Felipe, Gabi, Igor, João, Joel, Jonathan, Lara Old, Lara New, Liandra, Luzia, Malu, Melissa, Mirian, Samuel, Saulo e Vanessa. Obrigada por todo o carinho e amizade compartilhados no dia a dia, por toda a ajuda e companheirismo, por fazerem parte do melhor time que já se viu na história da Ciência. Sou grata a cada um por cada momento compartilhado.

Ao Sr. Valdenor, por toda a sua bondade de coração e cordialidade.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), na qual vivenciei tantos momentos inesquecíveis e por me proporcionar esta experiência.

A todo o corpo docente e administrativo do curso de Biotecnologia e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM).

À Fundação de Apoio a Serviços Técnicos, Ensino e Fomento a Pesquisas (ASTEF-UFC) pelo financiamento desta pesquisa.

Aos melhores amigos que alguém poderia ter: Amanda, Bruna, Cris, Lennon, Lucas, Mateus, Milena e Rhaynan. Por todos os momentos lindos, difíceis e improváveis compartilhados juntos, por todo o apoio mútuo, por serem luz em minha vida e sempre estarem presentes. Sou grata por compartilhar meu caminho com cada um.

Aos meus amigos que partilharam comigo essa jornada na Biotecnologia, em especial à Natália Cavalcante, por todo o companheirismo, apoio e amizade. Aos amigos da T6: Ariany Lima, Andressa Alexandre, Agna Tavares, João Neto, Bruno Pereira, Symon Simons, Patrícia Pontes, Germana Nogueira, Felipe de Castro, Davi de Castro. Vocês tornaram a caminhada muito mais leve e agradável durante todos esses anos.

Aos meus amigos Allan Maia, Karine Nunes e Ingrid Motta, pelo apoio, motivação e palavras de conforto e carinho. Aos meus amigos Igor Lúcio, Alyson Veras, Luan Lucas e William Cabral, pela amizade e companheirismo. Aos meus amigos de São Paulo, Muriel Batista, Daphiny Kunii, Lucas Félix e Felipe Matos, pelos momentos maravilhosos juntos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a formação deste trabalho, muito obrigada.

*“For long you live and high you fly
And smiles you’ll give and tears you’ll cry
All you touch and all you see
Is all your life will ever be.”*

Pink Floyd - Breathe

RESUMO

A contaminação de ambientes por petróleo e seus derivados tem sido um problema recorrente desde os primeiros acidentes de derramamento até os dias de hoje, principalmente porque atinge e prejudica ecossistemas costeiros como os manguezais, que são muito importantes ecologicamente. Esses contaminantes são altamente tóxicos, podendo persistir nesses locais por longos períodos de tempo, e sua remoção pode ser bastante complicada. Para sua descontaminação, muitas técnicas podem ser empregadas, e uma delas é a biorremediação por microrganismos imobilizados, que tem se destacado pela sua eficiência de degradação, bom custo-benefício, facilidade de aplicação e por ser ambientalmente adequada. O objetivo deste trabalho foi monitorar a biodegradação de n-hexadecano em microcosmos de sedimento de manguezal por um consórcio de duas estirpes de bactérias hidrocarbonoclásticas (*Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6) imobilizadas em esferas de quitosana, por meio de ensaios de análise da atividade desidrogenásica (ADH), além de avaliar os perfis das comunidades microbianas deste sedimento ao longo do experimento por PCR-DGGE. O experimento foi conduzido ao longo de 60 dias, com reforço do contaminante n-hexadecano no 30º dia. A biodegradação foi avaliada por mensuração da atividade desidrogenásica. As análises mostraram que os grupos que continham o consórcio imobilizado com hexadecano ou quitosana com hexadecano foram os que tiveram atividade desidrogenásica diferente da basal. O grupo tratado apenas com quitosana e hexadecano apresentou aumento da atividade apenas 3 dias após a recontaminação de hexadecano no 30º dia, chegando a apresentar uma quantidade de $41,49 \pm 9,47 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$ no 51º dia (T51), mantendo-se até o fim do experimento. Os grupos que continham consórcio imobilizado (com e sem surfactante) foram os que apresentaram as maiores taxas de atividade enzimática, cujo maior pico foi dado pelo grupo que continha o consórcio imobilizado com hexadecano, que foi de $86,70 \pm 10,8 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$. As comparações dos perfis gerados por eletroforese de grau desnaturante (DGGE) permitiram observar que houve uma seleção de organismos em cada um dos microcosmos após 60 dias de experimento. O produto aplicado neste trabalho possui relevância diante dos diversos casos de derramamento atuais, além de ser eficaz, biodegradável, seguro e poder ser reutilizado mesmo após recontaminação do ambiente.

Palavras-chave: Biorremediação. Imobilização celular. Quitosana. Hexadecano. DGGE.

ABSTRACT

Contamination of environments by oil and its derivatives has been a recurring problem from the first spill accidents to the present day, mainly because it affects and harms coastal ecosystems such as mangroves, which are very ecologically important. These contaminants are highly toxic and can persist in these locations for long periods of time, and their removal can be complicated. For its decontamination, many techniques can be employed, and one of them is the bioremediation by immobilized microorganisms, which has been outstanding for its degradation efficiency, good cost-benefit, ease of application and for being environmentally appropriate. The objective of this work was to monitor the biodegradation of n-hexadecane in mangrove sediment microcosms by a consortium of two strains of hydrocarbonoclastic bacteria (*Gordonia* sp. HEX 5 and *Micrococcus* sp. HEX 6) immobilized on chitosan spheres, by means of tests. dehydrogenase activity (ADH) analysis, besides evaluating the profiles of microbial communities of this soil during the PCR-DGGE experiment. The experiment was conducted over 60 days, with reinforcement of the n-hexadecane contaminant on the 30th day. Biodegradation was assessed by measuring dehydrogenase activity. The analyzes showed that the groups that contained the immobilized consortium with hexadecane or chitosan with hexadecane had different dehydrogenase activity than basal. The group treated only with chitosan and hexadecane showed increased activity only 3 days after hexadecane recontamination on day 30, reaching an amount of $41,49 \pm 9,47 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ on day 51 (T51), remaining until the end of the experiment. The groups that contained immobilized consortium (with and without surfactant) presented the highest rates of enzymatic activity, whose highest peak was given by the group containing the immobilized consortium with hexadecane, which was $86,70 \pm 10,8 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$. Comparisons of the profiles generated by denaturing grade electrophoresis (DGGE) showed that there was a selection of organisms in each microcosm after 60 days of experiment. The product applied in this work has relevance to the various current spill cases, besides being effective, biodegradable, safe and can be reused even after recontamination of the environment.

Keywords: Bioremediation. Cell immobilization. Chitosan. Hexadecane. DGGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frações variáveis de hidrocarbonetos de petróleo	19
Figura 2 – Mapa da distribuição de áreas de manguezais pelo mundo (destacadas em verde)	20
Figura 3 – Principais estratégias de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos	23
Figura 4 – Fatores que afetam a degradação de hidrocarbonetos de petróleo	24
Figura 5 – Vias de biodegradação de alcanos	25
Figura 6 – Diferentes métodos de imobilização celular	27
Figura 7 – Processo de obtenção de quitosana pela desacetilação da quitina	28
Figura 8 – Estruturas da molécula de quitosana em solução ácida e TPP	29
Figura 9 – Molécula surfactante com porção apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica) ..	31
Figura 10 – Ação de biosurfactante na biorremediação bacteriana de petróleo	32
Figura 11 – Imagem de satélite da área de proteção ambiental do rio Pacoti, compreendendo os pontos de coleta	34
Figura 12 – Aspecto dos pellets de <i>Gordonia</i> sp. HEX 5 (rosa) e <i>Micrococcus</i> sp. HEX 6 (amarela) após centrifugação	37
Figura 13 – Esquema representativo do desmonte realizado para cada condição do experimento em cada tempo de análise	40
Figura 14 – Reação de redução do sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio – TTC) em formazan (trifenilformazan – TPF), catalisada por desidrogenases	41
Figura 15 – Atividade desidrogenásica de sedimentos de manguezal imediatamente após a coleta	43
Figura 16 – Atividade desidrogenásica de sedimentos de manguezal recém-coletados expressa em concentração de TPF ($\mu\text{g TPF.g}^{-1}$)	44

Figura 17 – Aspecto das colônias de HEX 5 (rosa) e HEX 6 (amarela) imobilizadas em esferas de quitosana	45
Figura 18 – Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g TPF.g}^{-1}$) nos determinados tempos de análise (agrupados por tratamento)	46
Figura 19 – Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g TPF.g}^{-1}$) nos determinados tempos de análise	49
Figura 20 – Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons dos microcosmos gerados por PCR-DGGE no tempo T12, usando índice de Jaccard	50
Figura 21 – Matriz de similaridade entre o número de UTOs presentes em cada grupo de tratamento dos microcosmos no tempo T12	51
Figura 22 – Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons dos microcosmos gerados por PCR-DGGE no tempo T30, usando índice de Jaccard	52
Figura 23 – Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons dos microcosmos gerados por PCR-DGGE no tempo T33, usando índice de Jaccard	53
Figura 24 – Diagrama de Venn relacionando a quantidade de UTOs presentes em cada microcosmos em T33	53
Figura 25 – Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons dos microcosmos gerados por PCR-DGGE no tempo T60, usando índice de Jaccard	55
Figura 26 – Matriz de similaridade entre o número de UTOs presentes em cada grupo de tratamento dos microcosmos no tempo T60	56
Figura 27 – <i>Heat-Map</i> dos perfis de amplicons dos microcosmos de sedimentos de manguezal gerados por PCR-DGGE	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais dos microcosmos de sedimento de manguezal	38
Tabela 2 – Composição dos microcosmos de manguezal nas diferentes condições testadas	39
Tabela 3 – Características do <i>pool</i> de sedimentos de manguezal utilizado nos microcosmos	43
Tabela 4 – Número total de UTOs detectadas nos microcosmos nos tempos T12, T30, T33 e T60	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Atividade da enzima desidrogenase
ANOVA	Análise de variância
ATGE	Ágar – Triptona – Glicose – Extrato de levedura
CMC	Concentração micelar crítica
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNER-ME	Departamento nacional de estradas de rodagem – método de ensaio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HP	Hidrocarbonetos de petróleo
LEMBIOTECH	Laboratório de ecologia microbiana e microbiologia
MOT	Matéria orgânica total
NBR	Norma brasileira regulamentar
PCR	Reação de polimerase em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
RNAr	Ácido ribonucleico ribossomal
TCA	Ácido tricarboxílico
TGE	Triptona – Glicose – Extrato de levedura
TPF	Trifenilformazan
TPP	Tripolifosfato de sódio
TTC	Cloreto de trifenil tetrazólio
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC	Unidades formadoras de colônia
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UTO	Unidade taxonômica operacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Contaminações de solo por petróleo e seus derivados	18
2.2	O ecossistema Manguezal	20
2.3	Biorremediação e biodegradação microbiana de hidrocarbonetos	21
2.4	Consórcios microbianos e imobilização celular	26
2.5	Gêneros <i>Gordonia</i> e <i>Micrococcus</i>	29
2.6	Biossurfactantes	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Coleta e caracterização do sedimento de manguezal	34
4.2	Imobilização do consórcio de bactérias em esferas de quitosana	35
4.3	Ensaio de biorremediação de sedimento de manguezal em microcosmos ...	38
4.4	Atividade desidrogenásica	40
4.5	Extração de DNA dos microcosmos	41
4.6	Análise das comunidades microbianas por PCR-DGGE	41
4.7	Análise dos dados	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Caracterização dos sedimentos	43
5.2	Densidade de células imobilizadas nas esferas de quitosana	44
5.3	Biorremediação de sedimentos de manguezal em microcosmos	45
5.4	Análise das comunidades microbianas por PCR-DGGE	49
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O uso do petróleo como fonte de energia e matéria-prima foi primordial para a humanidade no seu processo de desenvolvimento industrial, mas trouxe inúmeras consequências ambientais devido aos diversos acidentes de derramamento que ocorreram e ainda ocorrem durante as atividades ligadas à sua extração e refino (VILLELA *et al.*, 2019). Os ecossistemas costeiros, entre eles os manguezais, tem sofrido há anos com a poluição e o acúmulo de hidrocarbonetos de petróleo, principalmente em seus sedimentos e águas subterrâneas (SANTOS *et al.*, 2011).

Os manguezais são ambientes extremamente ricos e muito importantes para processos biológicos diversos, assim como para a manutenção do equilíbrio de ecossistemas que estão a eles relacionados (GIRI *et al.*, 2011; TIRALERDPANICH *et al.*, 2018). No entanto, esse bioma tem sido constantemente ameaçado devido às atividades antrópicas ao seu entorno, que acabam contaminando esses locais e ameaçando a sua biodiversidade. Um dos grandes problemas atuais consiste na poluição de manguezais por hidrocarbonetos de petróleo, que afetam esses ambientes e geram graves consequências negativas para esses ecossistemas (SANTOS *et al.*, 2011).

A biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos tem se mostrado efetiva devido ao seu melhor custo-benefício em comparação a tecnologias de remediação físicas e químicas, além de serem eficientes e ecologicamente adequadas (VILLELA *et al.*, 2019). Dentre as técnicas de atenuação de contaminantes *in situ* pelo uso de microrganismos, destacam-se a bioaugmentação, que consiste na adição de microrganismos capazes de degradar esses poluentes no ambiente, e a bioestimulação, na qual ocorre uma estimulação da microbiota nativa para que seja aumentado o seu potencial de degradação (SANTOS *et al.*, 2011).

O emprego de microrganismos em processos de biorremediação de hidrocarbonetos tem sido muito estudado devido à sua ampla diversidade metabólica e de degradação, sendo capazes de transformar compostos tóxicos em componentes menos nocivos ou atóxicos ao ambiente em que se encontram (SANTOS *et al.*, 2011; VILLELA *et al.*, 2019). Esses microrganismos podem ser empregados isolados ou em conjunto com outros, associados em consórcios, de modo a obter maior eficiência de degradação. A utilização de um consórcio microbiano apresenta maior eficiência na biodegradação de hidrocarbonetos, devido à maior complementaridade metabólica entre dois ou mais microrganismos envolvidos

no processo de degradação (AL-HAWASH *et al.*, 2018; DARVISHI *et al.*, 2011; KUMARI; REGAR; MANICKAM, 2018).

Para aplicação em biorremediação, o uso de microrganismos imobilizados em matrizes biocompatíveis confere vantagens como maior estabilidade celular e maior tolerância a altas concentrações de contaminante (PARTOVINIA; RASEKH, 2018; VARJANI; UPASANI, 2017). Dentre as principais matrizes de imobilização, a quitosana tem baixo custo e pode ser empregada *in situ*, isto é, diretamente no local da contaminação, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (ANGELIM *et al.*, 2013; HSIEH *et al.*, 2008).

Este trabalho, portanto, teve como objetivo avaliar a eficácia da biorremediação de sedimentos de manguezal contaminados com hexadecano por um consórcio de actinobactérias imobilizadas em esferas de quitosana. Além disso, também foi avaliada a influência do processo de biorremediação na microbiota nativa do sedimento, por meio de análises das comunidades por PCR-DGGE.

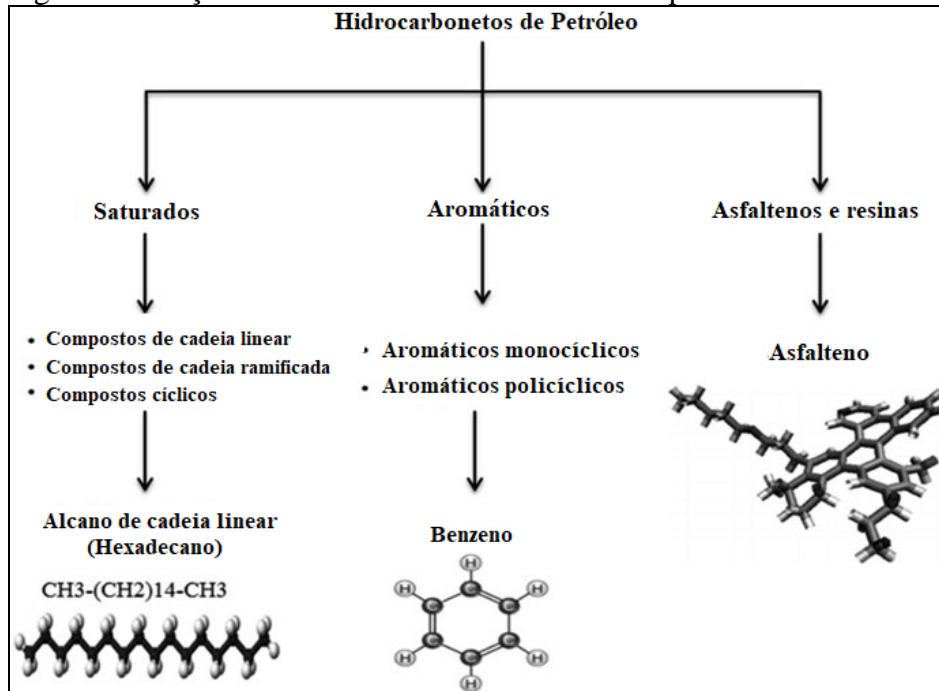
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminações de solo por petróleo e seus derivados

Nas últimas décadas, o desenvolvimento econômico mundial foi acompanhado de um crescimento global do consumo de petróleo e seus derivados, visto que os hidrocarbonetos de petróleo (HP) representam uma das principais fontes de energia e matéria-prima para a produção de diversos produtos como combustíveis, polímeros e petroquímicos (VARJANI; UPASANI, 2017). Embora tenha trazido grandes mudanças positivas, a exploração de combustíveis fósseis também foi responsável pelo surgimento de diversos problemas, destacando-se a contaminação ambiental em áreas de exploração e o risco iminente de derramamentos durante sua extração e, principalmente, transporte (VILLELA *et al.*, 2019). A indústria de refino de petróleo é considerada uma das dez principais fontes que liberam produtos químicos tóxicos para o meio ambiente, dentre eles os HP, que estão entre os principais poluentes ambientais gerados por essas atividades. Sejam esses danos gerados por derramamentos intencionais ou acidentais, eles afetam o ecossistema no local do derramamento e representam riscos diretos e indiretos à saúde das formas de vida desses locais (AL-HAWASH *et al.*, 2018; SAJNA *et al.*, 2015).

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos e hidrocarbonetos, que são classificados como poluentes prioritários e consistem principalmente de proporções variadas de carbono e hidrogênio. Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser divididos em quatro frações: os saturados (alifáticos), os aromáticos (hidrocarbonetos em anel), os asfaltenos e as resinas (Figura 1). Os hidrocarbonetos saturados não possuem ligações duplas entre carbonos e representam a maior porcentagem de composição do petróleo. Eles são classificados em cicloalcanos e alcanos (ou parafinas, como o hexadecano) (VARJANI, 2017).

Figura 1 – Frações variáveis de hidrocarbonetos de petróleo.



Fonte: adaptado de ABDEL-SHAIFY; MANSOUR, 2018.

Cada componente do petróleo tem um comportamento químico único que afeta a sua biodegradabilidade. As taxas de degradação dos HP por microrganismos seguem a seguinte ordem decrescente de susceptibilidade: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > alcanos cíclicos. Portanto, os compostos alifáticos são mais facilmente degradados por microrganismos, enquanto grandes cadeias carbônicas ramificadas possuem maior dificuldade de degradação e persistem no ambiente por mais tempo (AL-HAWASH *et al.*, 2018; LEAHY; COLWELL, 1990).

A poluição por hidrocarbonetos de petróleo, tem se tornado uma das preocupações globais mais recorrentes devido aos riscos que eles representam à saúde e ao equilíbrio dos ecossistemas (VARJANI; UPASANI, 2017). Entre os diferentes tipos de contaminação ambiental por HP, o solo e as águas subterrâneas estão entre os alvos mais comuns. Em muitos casos, a exposição desses ambientes a esses contaminantes pode ocorrer por longos períodos de tempo, fazendo com que esses locais sejam dominados pela fração recalcitrante dos hidrocarbonetos, que é altamente tóxica devido à presença de componentes hemotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos, e que não estão prontamente biodisponíveis para degradação, podendo permanecer por longas décadas sem serem completamente degradados (KHAN *et al.*, 2018).

Os ecossistemas costeiros, como os manguezais, são os mais afetados por derramamento de óleo no mar. Esses ambientes possuem alta sensibilidade aos episódios de

contaminação devido à grande capacidade de retenção de poluentes em seus sedimentos, o que ainda é favorecido pelo movimento das marés (SANTOS *et al.*, 2011).

2.2 O ecossistema Manguezal

Manguezais são considerados ecossistemas de transição, conectando ambientes marinhos a águas doces e terrestres. São muito característicos de regiões tropicais e subtropicais, ocupando cerca de 60 a 75% da costa desses locais. A maior extensão de manguezais é encontrada na Ásia (42%), seguida pela África (20%), América do Norte e Central (15%), Oceania (12%) e América do Sul (11%) (Figura 2). Aproximadamente 75% dos manguezais do mundo estão concentrados em apenas 15 países, sendo Indonésia, Austrália e Brasil os três primeiros que possuem a maior abundância desses biomas (GIRI *et al.*, 2011; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Figura 2 – Mapa da distribuição de áreas de manguezais pelo mundo (destacadas em verde).



Fonte: GIRI *et al.*, 2011.

Os manguezais são ambientes únicos e ricos em biodiversidade, caracterizados pelas suas condições de alta salinidade, alta temperatura, influência de marés, sedimentação e solos anaeróbicos lamacentos. Eles estão entre os ecossistemas mais produtivos e biologicamente importantes do mundo, pois servem de abrigo, alimentação e zonas de reprodução para crustáceos, moluscos, peixes de importância comercial e aves migratórias e residentes, além de serem fontes de alimentos e outros insumos para moradores das comunidades locais. Mesmo cobrindo uma pequena parte da superfície da Terra, os manguezais são responsáveis por sequestrar cerca de 22,8 milhões de toneladas métricas de carbono por ano, e sua vegetação nativa ajuda na estabilização da costa e na redução de impactos de desastres naturais, como tsunamis e furacões (GIRI *et al.*, 2011; TIRALERDPANICH *et al.*, 2018).

Além de sua particular importância para o ciclo biogeoquímico do carbono, as regiões de manguezais são ricas em matéria orgânica, proveniente de plantas, sedimentos e rios, além da ciclagem de nutrientes altamente eficiente promovida pela comunidade microbiana desses solos. Os detritos gerados nos manguezais são uma importante fonte de nutrientes tanto para os organismos desses locais, quanto para outras áreas costeiras. O mecanismo de reciclagem e conservação de nutrientes desses ambientes é observado principalmente pela estreita relação entre microrganismos e plantas. As comunidades microbianas transformam constantemente os nutrientes da vegetação morta em nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser utilizados pelas plantas que, por sua vez, atuam como fonte de alimento para esses microrganismos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; JENNERJAHN; ITTEKKOT, 2002).

Apesar de sua grande importância ecológica e econômica, os manguezais estão ameaçados pela ação humana. Geralmente, polos de atividades industriais estão localizados próximos a esses ambientes, o que faz com que esses habitats costeiros acabem sendo afetados pelas pressões populacionais e de desenvolvimento (GIRI *et al.*, 2011). Os mangues estão entre os principais locais para os quais os derramamentos de petróleo convergem, funcionando muitas vezes como depósitos de petróleo. Devido a esses problemas, esses ambientes sofrem bastante com a contaminação e o acúmulo de hidrocarbonetos de petróleo em seus sedimentos, que impactam fortemente esses ecossistemas (SANTOS *et al.*, 2011).

A degradação dos manguezais e seu conseqüente desaparecimento pode trazer danos irreparáveis aos ecossistemas marinhos, afetando inclusive a composição atmosférica e o clima. Os manguezais são, inclusive, considerados por alguns autores como locais que estão sob risco de desaparecimento da Terra. Essa ameaça demonstra a necessidade de métodos eficazes de conservação, proteção e recuperação para esses ambientes (GIRI *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011).

2.3 Biorremediação e biodegradação microbiana de hidrocarbonetos

A contaminação ambiental por hidrocarbonetos de petróleo é uma questão mundial que tem requerido o desenvolvimento de tecnologias de remediação inovadoras e econômicas. Atualmente são empregadas três principais estratégias para minimizar esse tipo de contaminação: métodos físicos/mecânicos, químicos e biológicos. As abordagens físicas se baseiam no uso de equipamentos e outros elementos em atividades de remoção de óleo, como lavagem, bombeamento e uso de materiais absorventes. Os métodos químicos, os mais

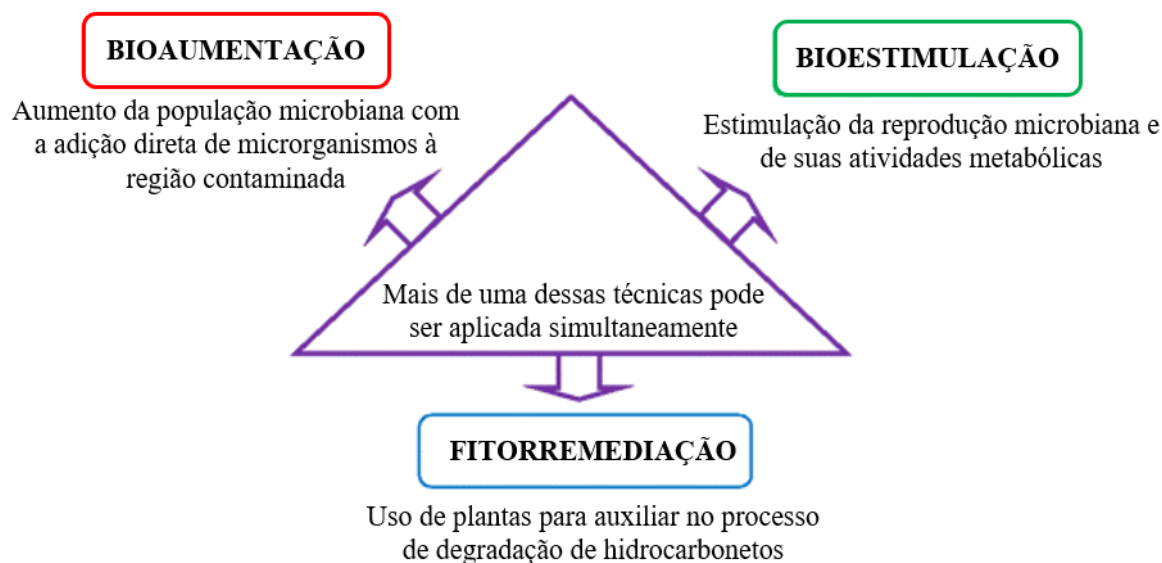
utilizados, fazem uso dos dispersantes para promover a quebra da tensão superficial entre óleo e água e formar gotículas menores de óleo. Devido à sua toxicidade, esses produtos químicos podem ser extremamente prejudiciais aos organismos. As técnicas de remediação biológica, por sua vez, baseiam-se na capacidade de organismos vivos e seus produtos de degradarem os contaminantes em formas menos tóxicas ou não tóxicas (VILLELA *et al.*, 2019).

Normalmente, quando um derramamento de óleo chega em áreas de manguezais, o uso dos métodos físicos e químicos acima mencionados acabam se tornando problemáticos, pois além de serem economicamente dispendiosos, causam efeitos colaterais que, aliados aos impactos do petróleo, podem ser ainda mais prejudiciais ao meio ambiente (ABDEL-SHAIFY; MANSOUR, 2018). Nesse contexto, é interessante o emprego de tecnologias de descontaminação ecológicas, eficientes e economicamente atraentes, e a biorremediação atende a esses requisitos (VILLELA *et al.*, 2019).

Dentre as estratégias de biorremediação de ambientes contaminados por HP, acredita-se que os principais processos para remoção eficiente desses contaminantes sejam a transformação e a degradação microbiana, visto que existem muitos microrganismos capazes de realizar a transformação desses poluentes em produtos menos tóxicos ou atóxicos, que são incorporados aos ciclos biogeoquímicos naturais. Esse processo resulta na mineralização completa desses compostos, assim como na formação de biomassa, e por causar um impacto mínimo ou nulo a esses ambientes, pode ser empregado nos mais diversos tipos de ecossistemas (SANTOS *et al.*, 2011; VILLELA *et al.*, 2019).

As técnicas de biorremediação podem ser aplicadas em solo, lodo e águas residuais, e são conduzidas de várias maneiras, sejam elas *in situ* (no local contaminado) ou *ex situ* (fora do local onde ocorreu a contaminação). Geralmente, as metodologias *in situ* são mais atraentes, pois apresentam menor custo de aplicação, visto que não ocorre a etapa de transporte de material contaminado e podem ser utilizadas em grandes áreas contaminadas. A atenuação *in situ* pode utilizar estratégias como a bioaugmentação e/ou bioestimulação (Figura 3) (QUINTELLA; MATA; LIMA, 2019; VARJANI, 2017).

Figura 3 – Principais estratégias de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos.

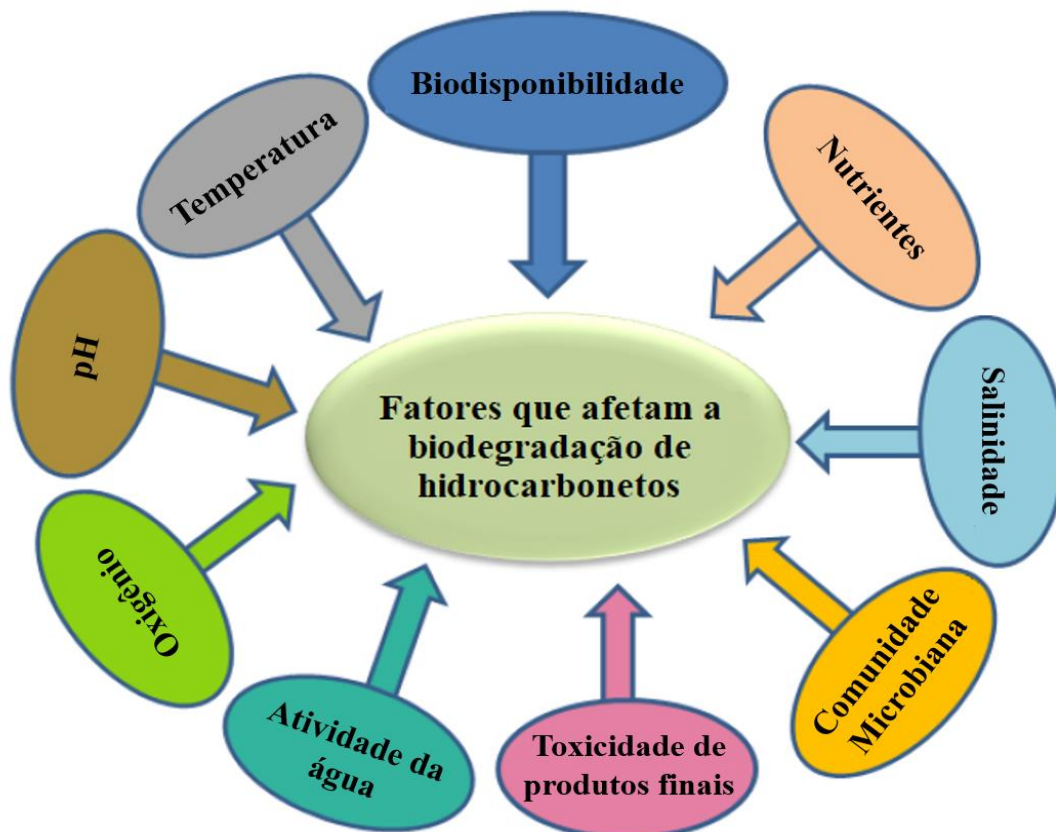


Fonte: adaptado de SANTOS *et al.*, 2011.

A bioaumentação consiste na seleção de microrganismos degradadores dos contaminantes e sua inoculação direta nos ambientes contaminados. Para este fim, podem ser utilizados microrganismos da comunidade nativa, bem como de outros locais ou mesmo linhagens geneticamente modificadas, empregando-os isolados ou associados em consórcios. A bioestimulação, por sua vez, consiste no fornecimento de nutrientes ou condições ao solo que estimulem a capacidade de degradação de contaminantes por parte da microbiota local (SANTOS *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2017). Alguns relatórios sugerem que o potencial de biodegradação de estirpes microbianas isoladas de ambientes contaminados com hidrocarbonetos é muito alto, porque essas bactérias podem ter se adaptado ao ambiente contaminado (SANTOS *et al.*, 2011). De fato, vários grupos bacterianos presentes em sedimentos de manguezal já são conhecidos por sua capacidade de degradar hidrocarbonetos, como *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia* e *Gordonia* (BRITO *et al.*, 2006).

O destino dos hidrocarbonetos de petróleo no ambiente pode ser determinado por diversos elementos, que incluem características do solo, propriedades químicas dos HP e fatores como nutrição, condições físicas, diversidade de comunidades microbianas envolvidas e biodisponibilidade de substratos, que desempenham um papel importante no processo de biodegradação desses compostos em solos e sistemas de água contaminados. A atividade microbiana, por sua vez, pode ser influenciada por diversos fatores, como temperatura, oxigênio, pH e nutrientes (Figura 4) (AL-HAWASH *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2018).

Figura 4 – Fatores que afetam a degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

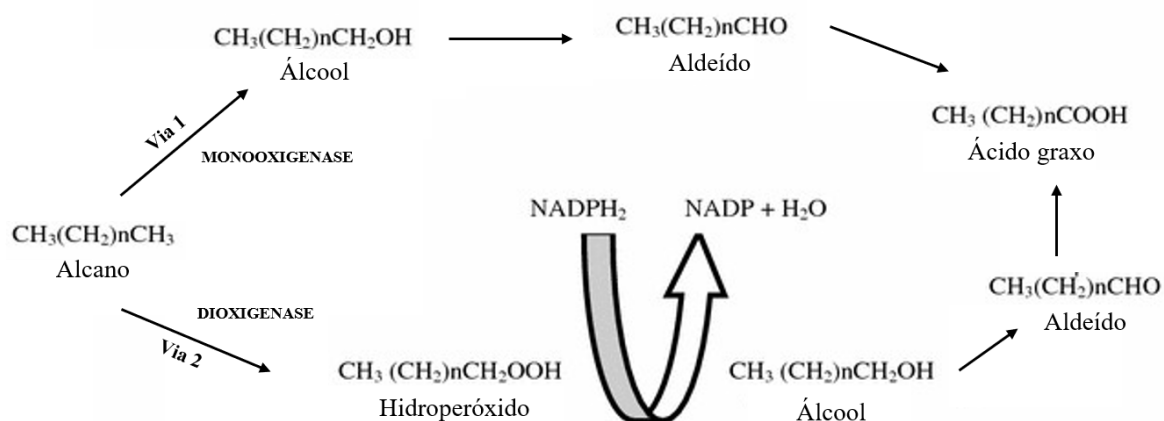


Fonte: adaptado de AL-HAWASH *et al.*, 2018.

A degradação rápida e completa da maioria dos contaminantes orgânicos ocorre em condições aeróbicas, resultando na formação de dióxido de carbono e água. Primeiramente, o requisito inicial para a degradação aeróbica de n-alcanos via bactérias é a existência de oxigênio dissolvido, visto que esse processo envolve enzimas que têm um requisito estrito de oxigênio molecular, as monooxigenases e dioxigenases. A via mais comum, específica para os n-alcanos, depende da ação das enzimas monooxigenases, que atacam o grupo metil terminal dos alcanos, formando um álcool primário, que é oxidado ao aldeído e ácido graxo correspondentes (Figura 5). Na segunda via de degradação, o grupo metil terminal é atacado por uma enzima dioxigenase, que promove a adição de dois átomos de oxigênio, formando então um peróxido, que é convertido em um ácido graxo. Ambas as vias de degradação resultam na produção de ácidos graxos, que são posteriormente metabolizados via β -oxidação, uma via catabólica comum encontrada na maioria das células vivas. Desse modo, esses contaminantes vão sendo passo a passo transformados em intermediários do metabolismo central, como acetil-coA e propionil-coA, que são posteriormente metabolizados pelo ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo TCA) em CO_2 e água. A biossíntese da biomassa celular ocorre a partir desses metabólitos de precursores centrais, como acetil-CoA, piruvato e succinato, e os

sacarídeos necessários para crescimento e outros processos de biossíntese são sintetizados via gliconeogênese (AL-HAWASH *et al.*, 2018; CHIKERE; OKPOKWASILI; CHIKERE, 2011).

Figura 5 – Vias de biodegradação de alcanos.



Fonte: adaptado de CHIKERE; OKPOKWASILI; CHIKERE, 2011.

Os métodos microbianos usados para monitorar e caracterizar a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo devem conter indicadores moleculares químicos, bioquímicos e microbiológicos. Abordagens como respirometria, contagem de células, avaliação da biomassa e de atividades enzimáticas são muito utilizadas no monitoramento da degradação biológica desses compostos (CHIKERE; OKPOKWASILI; CHIKERE, 2011). As enzimas podem ser consideradas indicadores efetivos das mudanças na qualidade do solo, e o estudo dessas atividades enzimáticas fornece informações sobre a liberação de nutrientes no solo por meio da degradação da matéria orgânica e da atividade microbiana, além de serem indicadores de mudança ecológica. A atividade da enzima desidrogenase (ADH), por ser um indicador de atividade microbiana geral, tem sido reconhecida como um importante indicador bioquímico do solo, sendo amplamente utilizada como método estimador da capacidade respiratória e oxidativa em solos (KUMAR; MAITI, 2015).

Outros mecanismos também estão implicados na degradação dos hidrocarbonetos, como a ligação de células microbianas a substratos e a produção ou adição de biossurfactantes. Os HP podem ser metabolizados seletivamente por uma estirpe individual ou por meio de um consórcio microbiano de bactérias do mesmo gênero ou gêneros diferentes (AL-HAWASH *et al.*, 2018).

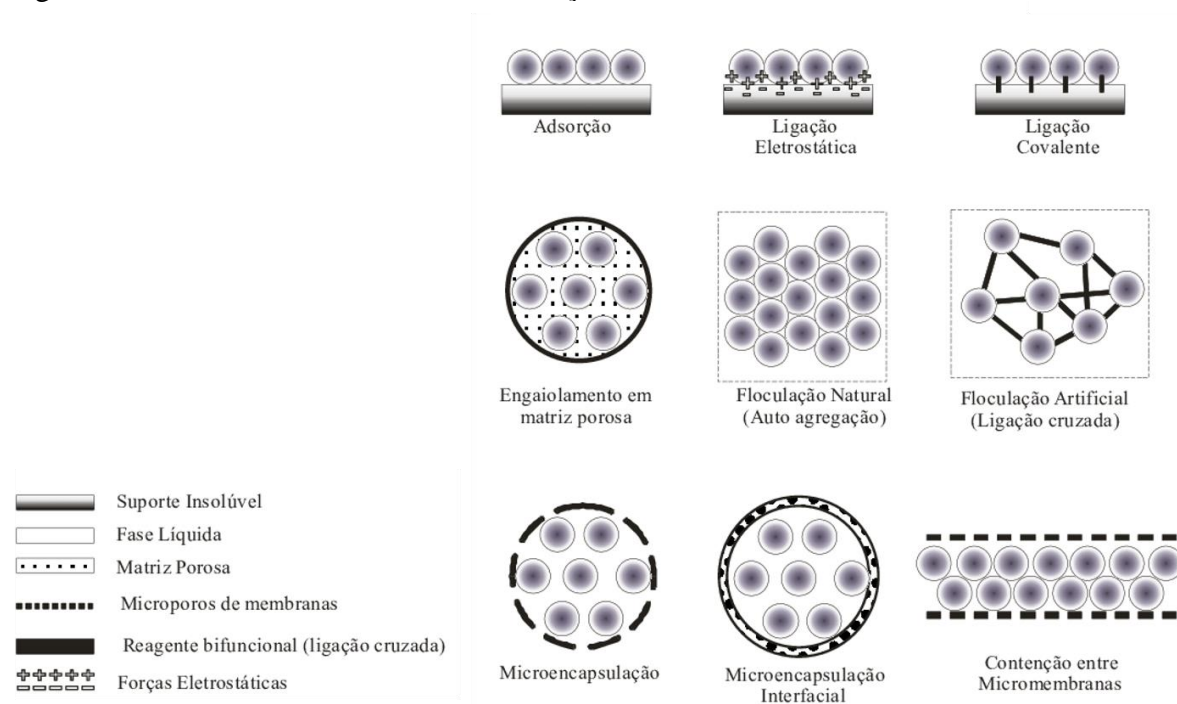
2.4 Consórcios microbianos e imobilização celular

Na biorremediação de locais contaminados por derramamentos de petróleo, a complexidade dos processos metabólicos necessários para degradar os hidrocarbonetos sugere que nenhum microrganismo específico, sozinho, os degrada completamente, sendo a biorremediação bem mais eficiente quando realizada por consórcios microbianos complexos (SANTOS *et al.*, 2011). Embora muitos estudos demonstrem a eficiência de estirpes individuais na degradação de HP, a combinação de diferentes mecanismos de atenuação pelo uso de consórcios tem sido considerada uma estratégia muito eficaz para degradação de petróleo, pois o sinergismo das atividades metabólicas dos diferentes microrganismos demonstram um potencial de degradação bem maior que o de culturas puras (AL-HAWASH *et al.*, 2018; DARVISHI *et al.*, 2011; KUMARI; REGAR; MANICKAM, 2018).

A remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos permanece desafiadora devido à sua baixa solubilidade, não polaridade e natureza hidrofóbica. Para aumentar a eficácia da biorremediação, várias técnicas de transferência de microrganismos para a área poluída foram estudadas, e uma das mais promissoras é a utilização de suportes para imobilizar células. Métodos de imobilização são amplamente empregados em casos de derramamentos de petróleo, utilizando microrganismos ou enzimas imobilizados, mantendo-os ativos e permitindo sua reutilização. Ainda que o uso de enzimas imobilizadas seja uma tecnologia relevante, a imobilização de células vivas, apesar da complexidade de manter a viabilidade celular, oferece a vantagem da eliminação do processo de purificação enzimática (PARTOVINIA; RASEKH, 2018; VARJANI; UPASANI, 2017).

Imobilização é um termo geral que descreve muitas formas diferentes de fixação ou aprisionamento celular, as quais incluem floculação, adsorção em superfícies, ligação covalente a transportadores, reticulação de células, encapsulamento em polímero-gel e aprisionamento/microencapsulação em matrizes (Figura 6) (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996). As células vivas imobilizadas podem oferecer muitas vantagens sobre a aplicação de células livres, como separação mais fácil, reutilização de microrganismos, impedimento da lavagem de células, garantia de maior concentração celular em pequenos volumes, incorporação de nutrientes e proteção contra agentes externos, como metabólitos tóxicos (PARTOVINIA; RASEKH, 2018; VARJANI; UPASANI, 2017).

Figura 6 – Diferentes métodos de imobilização celular.



Fonte: adaptado de COVIZZI *et al.*, 2007.

Dentre as diferentes técnicas de imobilização, o aprisionamento celular tem sido a mais amplamente utilizada para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Nessa técnica, os microrganismos ficam aprisionados em uma matriz polimérica porosa que permite a difusão de substratos e produtos entre eles e o meio, enquanto no encapsulamento as células ficam livres em solução, mas restritas por uma fina camada de matriz. As matrizes de aprisionamento são reconhecidas como mais duráveis que as de encapsulamento, sendo, portanto, mais adequadas para aplicações ambientais (PARTOVINIA; RASEKH, 2018).

Diversos polímeros podem ser utilizados como matrizes, sejam eles sintéticos ou naturais. Apesar dos polímeros sintéticos apresentarem maior resistência e durabilidade, é interessante a utilização de matrizes biodegradáveis para a introdução de microrganismos no meio ambiente. Dentre os polímeros naturais, o ágar, alginato, carragenana e quitosana estão entre os mais utilizados (PARTOVINIA; RASEKH, 2018).

A quitosana é um polímero natural não tóxico que pode ser obtido pela desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza e que é o principal componente de conchas de crustáceos, exoesqueletos de insetos e paredes celulares de fungos (Figura 7). Em países como o Brasil, a quitina é considerada um resíduo da indústria pesqueira, e seu uso para obtenção de quitosana fornece um destino a esse resíduo. A quitosana possui uma estrutura molecular composta principalmente de unidades de glucosamina contendo grupos hidroxil e amina, que a tornam capaz de se dissolver em

soluções ácidas fracas, formando um polímero catiônico (Figura 8-a). A quitosana é biocompatível, biodegradável e além disso, apresenta facilidade de uso e baixo custo. Devido a esses aspectos, ela atraiu grandes interesses científicos e industriais, com diversas aplicações biotecnológicas (ANGELIM *et al.*, 2013; HSIEH *et al.*, 2008).

Figura 7 – Processo de obtenção de quitosana pela desacetilação da quitina.

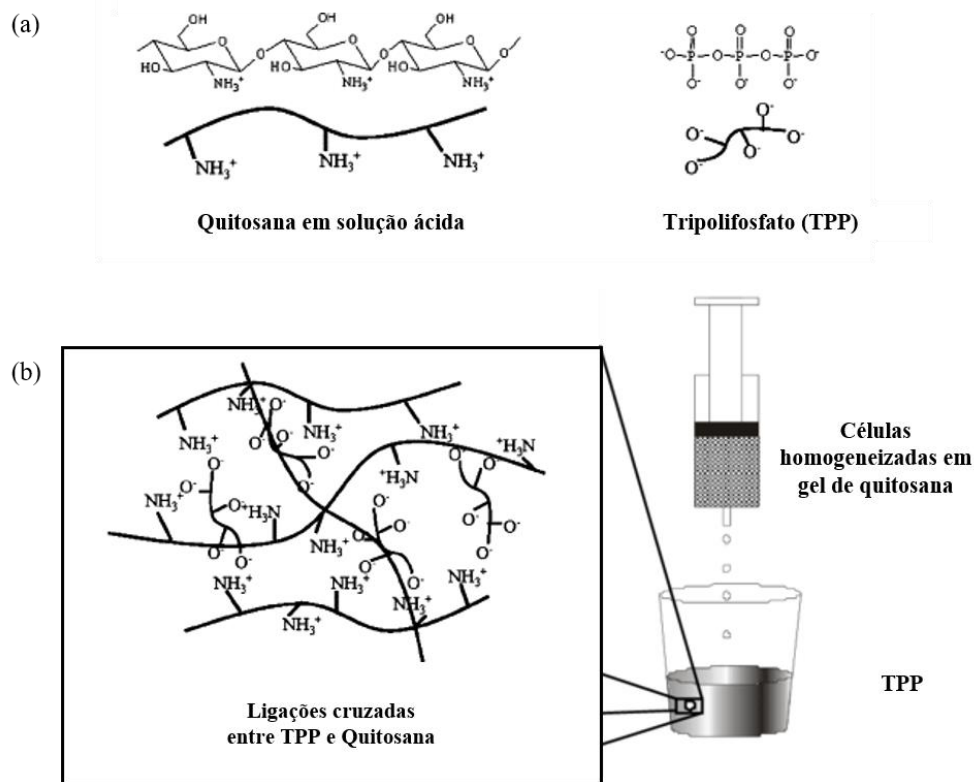


Fonte: adaptado de KUMAR, 2000.

A imobilização celular por aprisionamento em matriz de quitosana é realizada solubilizando o polímero em um ácido orgânico diluído, como ácido acético ou fórmico, para a formação de uma solução gelatinosa, que pode ser homogeneizada à biomassa microbiana antes da fase de coagulação (ANGELIM *et al.*, 2013). Nessa etapa, o gotejamento do gel de quitosana em solução de tripolifosfato de sódio (TPP) permite a formação de ligações cruzadas entre as cadeias de quitosana, o que permite o aprisionamento adequado das células nas esferas formadas durante a reticulação (Figura 8-b). A porosidade e resistência das esferas de quitosana contribuem para que ela seja utilizada como uma boa matriz de imobilização de culturas microbianas (KUMAR, 2000).

Apesar das vantagens conferidas pelo uso da quitosana como matriz de imobilização, ela está restrita apenas a determinadas estirpes microbianas, pois muitos estudos relatam a sua atividade antimicrobiana inerente, além da capacidade de alguns microrganismos de produzirem enzimas que degradam o polímero, como quitosanases (ANGELIM *et al.*, 2013).

Figura 8 – Estruturas da molécula de quitosana em solução ácida e TPP.



Fonte: adaptado de HSIEH *et al.*, 2008 e COVIZZI *et al.*, 2007.

Legenda: (a) Estrutura molecular de quitosana em solução ácida e de tripolifosfato (TPP). (b) Ligações cruzadas entre quitosana e TPP.

A quitosana como biopolímero é, portanto, muito bem aplicada para diversos fins ambientais, sendo um deles a biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Isso se dá principalmente ao fato da quitosana e seus derivados poderem ser utilizados em diversas formas, solúveis ou insolúveis, e através de diversos processos, além da sua grande capacidade de se ligar a uma gama de poluentes (MORIN-CRINI *et al.*, 2019).

2.5 Gêneros *Gordonia* e *Micrococcus*

O gênero *Gordonia* foi primeiramente descrito há cerca de 20 anos, e representa uma linhagem distinta na ordem Actinomycetales, família Gordoniaceae. Seus membros são caracterizados pela forma de bastonete, são gram-positivos, imóveis e não esporulados e geralmente apresentam colônias de pigmentação alaranjada. Bactérias desse gênero têm atraído crescente interesse ambiental, industrial, biotecnológico e médico durante os últimos anos, principalmente devido à sua capacidade de degradar, transformar e sintetizar compostos orgânicos que podem ser úteis a essas indústrias. Seus membros estão amplamente distribuídos na natureza, apresentando estirpes que já foram isoladas de diversos ambientes,

como solo e águas residuais contaminados, areias de estuário, rizosfera de mangues, poços de petróleo, biofiltros, lodo ativado e até de seres humanos. Eles apresentam a capacidade de sintetizar uma variedade de compostos, como agentes antimicrobianos, compostos neuroativos, metabólitos secundários como carotenóides, surfactantes e exopolissacarídeos, além de secretarem enzimas hidrolíticas extracelulares biotecnologicamente importantes (DRZYZGA, 2012; SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2018).

Muitas estirpes de *Gordonia* têm atraído interesse biotecnológico nos últimos anos devido à sua capacidade de degradar poluentes ambientais (como hidrocarbonetos de petróleo), compostos xenobióticos ou polímeros naturais de biodegradação lenta (como, por exemplo, a borracha), e diversos isolados já foram aplicados na biorremediação de diferentes ambientes, além da sua exploração em aplicações agrícolas associadas a plantas (DRZYZGA, 2012).

O gênero *Micrococcus*, pertencente à família Micrococcaceae, compreende um grupo de actinobactérias gram-positivas, imóveis, com células de formato esférico (cocos), dispostas em quartetos ou aglomerados irregulares e que geralmente apresentam coloração rosada ou amarelada. Os membros desse gênero são encontrados principalmente em pele de mamíferos, mas também já foram isolados de diversos ambientes, como solos, lamas estuarinas, águas, raízes de plantas, poeira e ar (KOCUR; KLOOS; SCHLEIFER, 2006).

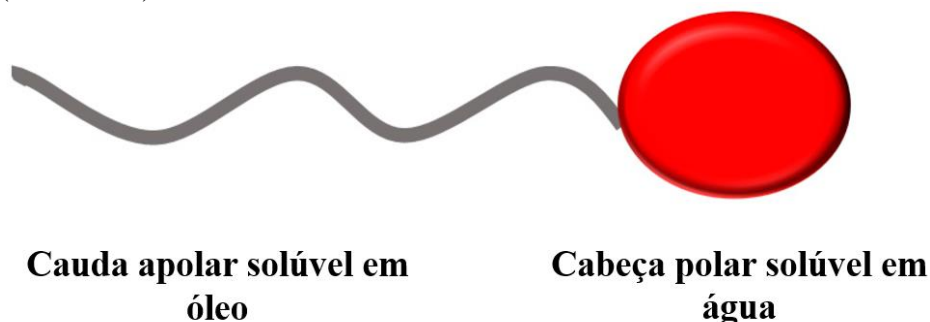
A disseminação desses organismos em diversos ambientes possibilitou o desenvolvimento de sistemas enzimáticos capazes de lidar com diferentes condições ambientais, o que os possibilitou a capacidade de utilizar uma ampla gama de substratos incomuns, como piridina, herbicidas, bifenilos clorados e óleos. Bactérias desse gênero estão entre as poucas que conseguem degradar hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa, e algumas espécies conseguem produzir biosurfactantes. Isso permite que esses microrganismos desempenhem papel importante na desintoxicação e biodegradação de hidrocarbonetos, sendo utilizados em estratégias de biorremediação de ambientes contaminados (ALSULAIMAN; NIZAM, 2018; KOCUR; KLOOS; SCHLEIFER, 2006; SANTHINI *et al.*, 2009).

2.6 Biosurfactantes

Surfactantes são moléculas de caráter anfipático, com porções hidrofílicas e hidrofóbicas, que aumentam a solubilidade de compostos hidrofóbicos, reduzindo assim as tensões superficiais entre interfaces com diferentes graus de polaridade, como óleo e água.

Essas moléculas possuem uma porção apolar, que é frequentemente uma cadeia de hidrocarbonetos, e uma porção polar, que pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não iônica ou anfotérica (Figura 9). Isso permite que eles desempenhem papel fundamental em processos de emulsificação, formação de espuma, detergência e dispersão, possuindo aplicabilidade em diversas indústrias e processos (SANTOS *et al.*, 2016).

Figura 9 – Molécula surfactante com porção apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica).



Fonte: adaptado de SANTOS *et al.*, 2016.

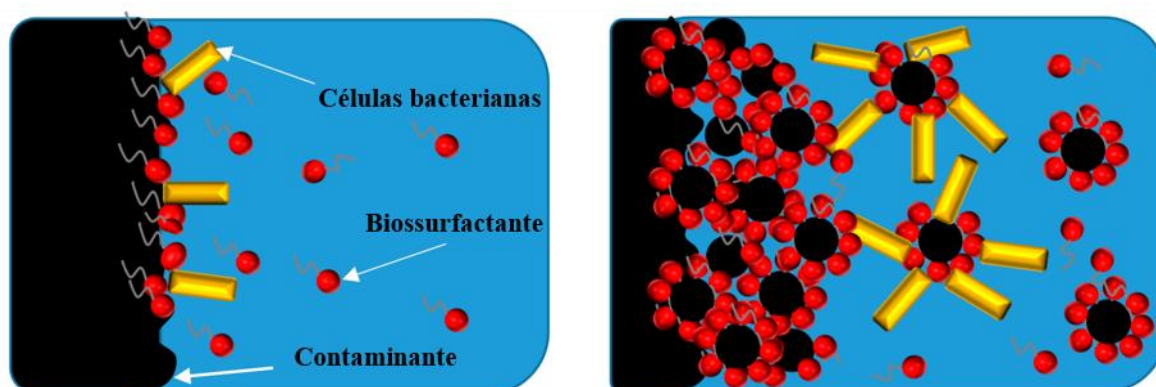
Os surfactantes de origem natural, ou biossurfactantes, são produzidos por organismos como plantas e animais, e também por diversos microrganismos. A produção dessas biomoléculas tem uma importância considerável para processos industriais sustentáveis, devido à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade. Isso contribuiu para o aumento de estudos científicos relacionados ao uso dessas moléculas em diversos campos ecologicamente relevantes, como a biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados. O uso de biossurfactantes surge, portanto, como uma alternativa segura para aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos, permitindo e facilitando sua assimilação e atenuação por parte de microrganismos (SANTOS *et al.*, 2016). Quando comparados aos surfactantes químicos e sintéticos, os biossurfactantes apresentam várias vantagens, que estão relacionadas à sua atividade superficial, tolerância a pH, temperatura e força iônica, além de biodegradabilidade, baixa toxicidade, capacidade emulsificante e desemulsificante e atividade antimicrobiana (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

A baixa solubilidade de hidrocarbonetos é o maior impedimento para sua biorremediação, e o uso de biossurfactantes é uma ferramenta poderosa para superar esse obstáculo, pois eles aumentam a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos através da sua solubilização/dessorção (SAJNA *et al.*, 2015). A biodegradação de hidrocarbonetos mediada por biossurfactantes ocorre através de dois mecanismos. O primeiro envolve um aumento na disponibilidade do substrato para microorganismos, por meio da redução da tensão superficial

entre a parede celular e as moléculas de hidrocarbonetos. O outro mecanismo envolve a interação entre o biossurfactante e a superfície celular, promovendo alterações na membrana que facilitam a adesão de hidrocarbonetos (aumento da hidrofobicidade) sem que haja danos à membrana. (SANTOS *et al.*, 2016).

O contato celular com os hidrocarbonetos é um passo crucial para sua biodegradação, visto que esse processo é frequentemente mediado por reações de oxidação catalisadas por oxigenases que estão associadas à superfície celular. O acesso das bactérias aos poluentes hidrofóbicos geralmente acontece pelo contato direto da célula com o hidrocarboneto ou por meio do acesso mediado por biossurfactantes, onde os hidrocarbonetos se encontram emulsionados (VARJANI; UPASANI, 2017). Quando atingem uma concentração micelar crítica (CMC), os surfactantes formam conjuntos moleculares organizados, conhecidos como “micelas”, que “cobrem” hidrocarbonetos hidrofóbicos como um envelope, de modo que o complexo completo seja transportado através da membrana celular, permitindo que o metabolismo ocorra dentro do citoplasma (Figura 10).

Figura 10 – Ação de biossurfactante na biorremediação bacteriana de petróleo.



Fonte: adaptado de SANTOS *et al.*, 2016.

A aplicação de biossurfactantes na biorremediação de solos tem sido extensivamente estudada, e várias pesquisas já demonstraram, portanto, sua eficácia em intensificar a biodegradação microbiana de hidrocarbonetos. Desse modo, sua aplicação tem se mostrado uma alternativa ambientalmente adequada para incrementar a atenuação desses contaminantes no meio ambiente (DE LA CUEVA *et al.*, 2016; FUENTES *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a degradação de hexadecano em microcosmos de sedimentos de manguezal por um consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas imobilizado em esferas de quitosana e verificar a influência desse processo na comunidade microbiana nativa.

3.2 Objetivos específicos

- Imobilizar um consórcio de bactérias isoladas de sedimentos de manguezal em esferas de quitosana.
- Avaliar a eficácia da bioaumentação e bioestimulação promovidas por um consórcio de duas actinobactérias imobilizadas em esferas de quitosana em microcosmos de sedimentos de manguezal contaminado com hexadecano por mensuração da atividade desidrogenásica ao longo de 60 dias.
- Verificar a resposta da comunidade microbiana dos microcosmos após um reforço da contaminação de hexadecano após 30 dias do primeiro derrame.
- Avaliar separadamente a influência do consórcio imobilizado, da matriz de quitosana, do hexadecano e da adição de biossurfactante sobre comunidade bacteriana de sedimentos de manguezal através de análise por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e caracterização do sedimento de manguezal

A coleta de sedimentos foi realizada no manguezal da Área de Proteção Ambiental do Rio Pacoti, em Fortaleza, Ceará. A coleta do material foi feita numa amostragem de três pontos (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), distantes 100 metros entre si, ao longo de uma área com predominância de *Rhizophora mangle*, cuja localização foi determinada com a utilização de um aparelho de posicionamento global (*Global Position System* – GPS) do modelo GPSmap 76CSx, marca GARMIN (Figura 11).

Figura 11 - Imagem de satélite da área de proteção ambiental do rio Pacoti, compreendendo os pontos de coleta.



Fonte: Google.

Os sedimentos foram coletados na manhã do dia 15 de maio de 2019, com o auxílio de um coletor cilíndrico de 30 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro. No momento da coleta, foi eliminada a camada superficial do solo, sendo recolhida a camada logo abaixo, correspondente à profundidade de 20 cm. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em isopor refrigerado para o Laboratório de Ecologia Microbiana e Microbiologia (LEMBIOTECH), localizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde foram realizadas análises de pH, salinidade, umidade e teor de matéria orgânica total. Além disso, foi determinada a atividade microbiana do sedimento por meio de ensaio de atividade da enzima desidrogenase (ADH), método proposto por CASIDA

(1977), que é reconhecido como sendo um importante indicador bioquímico de qualidade do solo por estimar a capacidade oxidativa e respiratória de sedimentos.

Primeiramente, foi feita uma homogeneização prévia dos sedimentos coletados, com o auxílio de uma peneira metálica de malha de 2,0 mm de diâmetro, para retirada de raízes de plantas, pequenos animais ou outros componentes que porventura estivessem presentes. Para as análises de pH e salinidade, 50 g de sedimento homogeneizado de cada amostra foram, então, submetidos a um processo de centrifugação a 9000 g, por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi empregado nas determinações de pH, por meio do uso de pHmetro de bancada (*Digimed* pHmetro DM-22), e de salinidade, utilizando refratômetro portátil (*Biosystems*).

Para a determinação da matéria orgânica total do sedimento (MOT) foram feitas análises em triplicata contendo 0,3 g de sedimento previamente seco a 100 °C por 24 h. As amostras foram pesadas em cadinhos limpos e secos e, posteriormente, levadas a forno mufla a 550 °C por um período de 4 h para total combustão e determinação do peso residual. O cálculo do teor de matéria orgânica (MOT) foi determinado em função da perda de massa do resíduo incinerado, levando em consideração o material perdido durante a queima, e foi obtido por meio da equação: $MOT (g/kg) = [(M_i - M_f)/M_i] \times 100$, onde MOT é a matéria orgânica total do solo, M_f é a massa após a combustão (g) e M_i , a massa inicial (g) (GOLDIN, 1987; RODELLA; ALCARDE, 1994).

A determinação da umidade do sedimento, por sua vez, foi feita seguindo a metodologia de acordo com a norma técnica DNER-ME 213/94 (BRASIL, 1994), na qual 3 g de sedimento foram pesados em triplicata e colocados em estufa a 100 °C por 24 h para total evaporação da água presente e, em seguida, mantidos em dessecador para subsequentes pesagens em balança analítica até que houvesse a estabilização do peso. O teor de umidade foi calculado de acordo com a equação: $H (\%) = [(M_u - M_s)/(M_u - M)] \times 100$, na qual H corresponde ao teor de umidade do solo (%), M_u , à massa úmida inicial mais a massa do recipiente (g), M_s , à massa do material seco mais a massa do recipiente (g), e M representa a massa do recipiente (g).

4.2 Imobilização do consórcio de bactérias em esferas de quitosana

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

gênero *Micrococcus*. Ambas foram isoladas por ANGELIM (2012) de uma área de manguezal cronicamente contaminada por petróleo e derivados, localizada na Baía de Todos-os-Santos (Bahia), próximo a uma refinaria de petróleo, utilizando a técnica de enriquecimento em meio mineral contendo derivados de petróleo. Essas bactérias, assim como outras isoladas do mesmo local, estavam armazenadas na coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Microbiologia (LEMBIOTECH), do departamento de Biologia da UFC, e foram reativadas em 5 mL de meio TGE (Tryptona – Glicose – Extrato de levedura) adicionado de 2% de NaCl, sob agitação de 150 rpm, a 30 °C, por um período de 24 a 48 h.

Após a verificação do desenvolvimento das culturas, estas foram inoculadas em placas contendo meio ATGE (Ágar – Tryptona – Glicose – Extrato de levedura) com 2% de NaCl, por meio da técnica de esgotamento em quadrantes, para a obtenção de culturas isoladas. Certificada a pureza das culturas, as mesmas foram inoculadas em meio TGE com 2% de NaCl para a obtenção de pré-inóculos, nas mesmas condições de agitação e temperatura anteriores, por um período de 16-18 h. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro, a 600 nm, para a determinação e ajuste da densidade celular.

Para a imobilização em quitosana, as absorbâncias das culturas foram ajustadas para uma densidade celular de $0,15 \pm 0,02$, a 600 nm, e inoculadas em erlenmeyers contendo meio TGE com 2% de NaCl, numa proporção de 1% v/v. As culturas ficaram sob agitação de 150 rpm, a 30 °C. Após 72 h de crescimento, procedeu-se um ajuste de modo que a quantidade de células utilizada para inocular o gel de quitosana fosse correspondente a 2×10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC). A biomassa de cada cultura foi recuperada por centrifugação a 9000 g, por 10 minutos, e submetida a um processo de lavagem com solução salina de NaCl 0,9% (m/v) seguido de centrifugação a 9000 g, por 5 minutos (Figura 12). Esse processo de lavagem foi repetido duas vezes e o precipitado de cada cultura foi ressuspensionado com 1500 µL de solução salina 0,9% para serem homogeneizados a 97 mL do gel de quitosana 3% (m/v) previamente preparado, de modo a se obter uma densidade celular de 2×10^7 UFC/mL do gel.

Figura 12 – Aspecto dos *pellets* de *Gordonia* sp. HEX 5 (rosa) e *Micrococcus* sp. HEX 6 (amarela) após centrifugação.



Fonte: elaborada pela autora.

O processo de preparação do gel de quitosana se deu por meio da dissolução de 3 g do pó de quitosana em 100 mL de ácido acético 1% (v/v), pH 3,0. Após 3 h de homogeneização para total dissolução da quitosana, o gel foi deixado em repouso *overnight* para retirada de bolhas de ar e, posteriormente, inoculado com as biomassas de *Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6, conforme descrito anteriormente. Após inoculado, o gel permaneceu sob agitação durante 3 h até completa homogeneização, e foi em seguida gotejada, com o auxílio de uma seringa com agulha de 1,20 mm de diâmetro, em 500 mL de solução de tripolifosfato (TPP) 1% (m/v), pH 9,0, para a formação das esferas e aprisionamento das células bacterianas. As esferas foram mantidas nessa solução por 2 h, para formação das ligações cruzadas entre as cadeias de quitosana e, posteriormente, lavadas três vezes e armazenadas em solução de K_2HPO_4 0,15 M, pH 8,0.

Para estimar a viabilidade das células aprisionadas nas esferas, uma quantidade de 4 g foi pesada, macerada e diluída em 40 mL de solução salina 0,9% (m/v). A partir daí, foram feitas diluições seriadas e plaqueamento em meio ATGE com 2% de NaCl para avaliação do processo de imobilização por meio de contagem de viáveis em placa.

4.3 Ensaio de biorremediação de sedimento de manguezal em microcosmos

Os microcosmos foram montados em tubos falcon estéreis de 50 mL, cada um contendo o equivalente a 2 g de sedimento de manguezal recém-coletado. Foram utilizados os sedimentos homogeneizados dos pontos de coleta 1 e 2. Os tubos foram devidamente identificados e etiquetados conforme os tempos de análise e os 7 grupos de tratamento, descritos na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1 – Condições experimentais dos microcosmos de sedimento de manguezal.

Condição	Composição
S	Sedimento
SQ	Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos
SH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg)
SQH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg) + esferas de quitosana sem microrganismos
SSH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg) + biossurfactante
SCH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg) + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC)
SCSH	Sedimento + hexadecano (10 g/kg) + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante

Fonte: elaborada pela autora.

O grupo **S** representou um controle negativo, no qual foi avaliado apenas o sedimento de manguezal sem adição de nenhum componente externo. A condição **SQ**, por sua vez, continha apenas sedimento e esferas de quitosana sem microrganismo algum, de modo a avaliar apenas o efeito da quitosana na comunidade microbiana nativa, enquanto o grupo **SH**, contendo sedimento adicionado de hexadecano (10 g/kg), tinha como objetivo avaliar a resposta dessa comunidade à presença apenas do contaminante. O grupo **SQH**, que compreendia o sedimento adicionado de hexadecano (10 g/kg) e esferas de quitosana sem microrganismos, foi empregado com o intuito de observar se a quitosana teria algum efeito sobre a microbiota nativa com relação à degradação de hexadecano. O grupo **SSH** era constituído de sedimento e hexadecano (10 g/kg) acrescidos de uma quantidade de biossurfactante produzido no próprio laboratório, numa concentração equivalente a duas vezes sua própria concentração micelar crítica (CMC), com o intuito de avaliar o seu efeito sobre a

degradação do contaminante. Os dois últimos grupos, **SCH** e **SCSH**, ambos continham sedimento, hexadecano (10 g/kg) e esferas de quitosana com consórcio imobilizado num total de 10^7 UFC de cada microrganismo, e ambos tinham como objetivo analisar a degradação do poluente pelo consórcio imobilizado, no entanto, o grupo **SCSH** estava acrescido de biossurfactante, de modo a observar se a adição desse composto facilitaria a degradação.

Em todos os tubos dos microcosmos foi adicionada uma quantidade de água estéril com o propósito de formar uma fina lâmina de água sobre os sedimentos e manter a umidade do sistema. O volume de água utilizado foi ajustado para cada condição, de modo que não ultrapassasse o volume final correspondente a 500 μ L. A composição de cada condição experimental aplicada neste experimento está disposta conforme a Tabela 2:

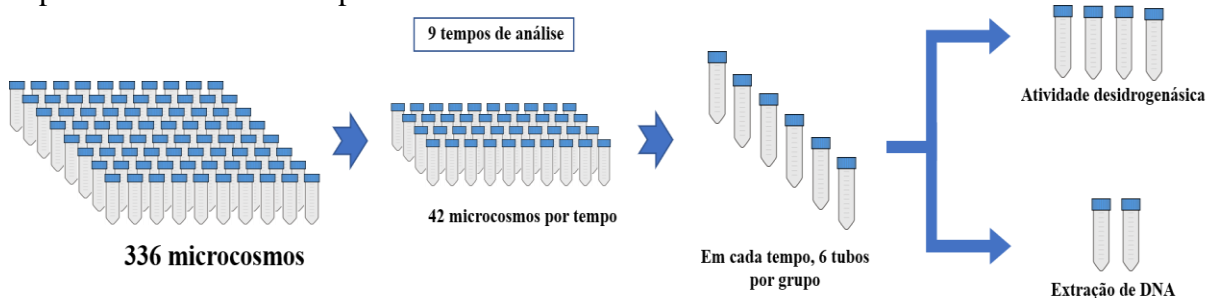
Tabela 2 – Composição dos microcosmos de manguezal nas diferentes condições testadas.

	S	SH	SQ	SQH	SCH	SCSH	SSH
Sedimento (g)	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Beads com Consórcio (10^7 UFC)	—	—	—	—	179 mg (18 beads)	179 mg (18 beads)	—
Quitosana (esferas)	—	—	179 mg (18 beads)	179 mg (18 beads)	—	—	—
Hexadecano (10 g/kg)	—	25,87 μ L	—	25,87 μ L	25,87 μ L	25,87 μ L	25,87 μ L
Surfactante (μL)	—	—	—	—	—	474,13 μ L	474,13 μ L
Água (μL)	500 μ L	474,13 μ L	500 μ L	474,13 μ L	474,13 μ L	—	—

Fonte: elaborada pela autora.

No total, foram utilizados 336 microcosmos, pois cada tempo de análise compreendeu 6 microcosmos por condição, dos quais 4 foram utilizados no teste da atividade desidrogenásica e 2 foram armazenados sob refrigeração para extração de DNA para PCR-DGGE, totalizando 42 microcosmos por tempo. Os microcosmos foram desmontados em cada tempo conforme a Figura 13, e tiveram seus dados reunidos e posteriormente compilados em tabelas e gráficos por meio do programa *GraphPad Prism 6.0*.

Figura 13 – Esquema representativo do desmonte realizado para cada condição do experimento em cada tempo de análise.



Fonte: elaborada pela autora.

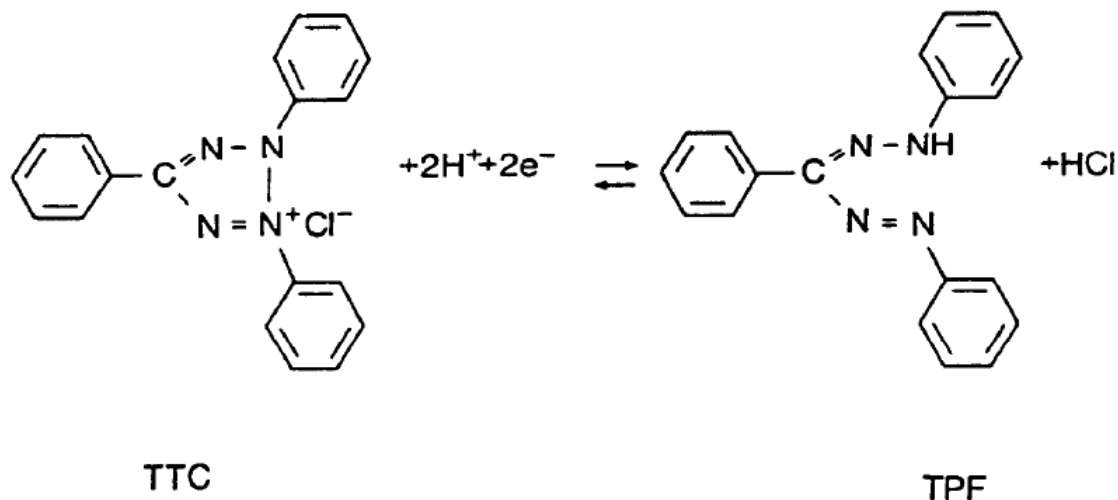
As amostragens foram realizadas nos tempos de 0, 3, 12, 21, 30, 33, 42, 51 e 60 dias e, decorridos 30 dias de experimento, houve um reforço do contaminante hexadecano, na mesma proporção de 10 g/kg, em todas as replicatas dos grupos que continham hexadecano em sua montagem (SQH, SCH, SSH e SCSH).

4.4 Atividade desidrogenásica

Para avaliar o estado metabólico e a taxa de respiração dos microrganismos, foi empregado o ensaio de atividade da enzima desidrogenase, seguindo a metodologia proposta por CASIDA (1977), que foi utilizada tanto nos ensaios de caracterização dos sedimentos logo após a coleta, quanto nos microcosmos ao final de cada tempo de análise.

Foram adicionados aos microcosmos 5 mL de uma solução estéril de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC), na concentração de 2% (m/v), preparada em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0. Os microcosmos foram incubados por 24 h, abrigados da luz e, após o tempo de incubação, foi feita a extração do produto possivelmente formado – trifetilformazan (TPF) (Figura 14). Para a extração, foi realizada a adição de 10 mL de acetona, seguido de agitação em vórtex por 10 segundos, repouso por 20 minutos e novamente agitação em vórtex. Posteriormente, foi feita a centrifugação a 5000 g, por 5 minutos, para separação de sedimento e sobrenadante. O sobrenadante contendo o TPF foi coletado e submetido a análise em espectrofotômetro a 485 nm. A concentração de formazan foi determinada com base em uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de formazan comercial (ALVES, 2018), sendo a atividade expressa em massa de TPF (trifenilformazan) formado em função da massa de sedimento ($\mu\text{g TPF.g}^{-1}$).

Figura 14 – Reação de redução do sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio – TTC) em formazan (trifenilformazan – TPF), catalisada por desidrogenases.



Fonte: CHANDER; BROOKES, 1991.

4.5 Extração de DNA dos microcosmos

Para cada tempo de análise do experimento, foi realizada uma extração de DNA genômico total dos microcosmos, em duplicata, utilizando o kit comercial *DNeasy PowerSoil Kit* (MO BIO, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Os *pools* de DNA extraídos das amostras foram quantificados em um espectrofotômetro (NanoDrop) e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

4.6 Análise das comunidades por PCR-DGGE

Para a análise das comunidades por DGGE, foram selecionadas as amostras correspondentes aos tempos em que a atividade desidrogenásica foi mais significativa (T12, T30, T33 e T60). Além disso, em cada gel também foi aplicada a amostra correspondente ao T0, para comparação da comunidade nativa inicial do sedimento com as comunidades encontradas em cada tempo de análise.

Para isso, todas as amostras selecionadas foram submetidas a uma PCR para amplificação da região hipervariável V3 do RNAr 16s (ØVREÅS *et al.*, 1997). A reação foi realizada utilizando os iniciadores 338F GC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA 3') e 518R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'), específicos para o domínio Bacteria. A amplificação foi realizada em um

termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Alemanha) nas seguintes condições: 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; com um período final de 5 minutos de extensão a 72 °C. As reações foram realizadas para 30 µL, e foram ajustados 0,5 pMol de cada um dos iniciadores, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 5 U de polimerase, 6 µL de tampão 5x Go Taq (Promega, EUA), 10 ng de DNA (volume variável, dependendo da concentração da amostra) e água Mili-Q ultrapura para PCR suficiente para completar os 30 µL totais da reação.

Os produtos da PCR foram observados em gel de agarose 2% corados com *SYBR SAFE* (Invitrogen, EUA) em tampão TAE 0,5 x (200 mM de Tris base, 100 mM de ácido acético glacial, 5 mM de EDTA e pH 8,0), utilizando um sistema de foto-documentação ultravioleta. Um marcador de 100 pares de base foi utilizado como padrão para o tamanho de DNA. Os produtos foram separados por gel de eletroforese de gradiente desnaturante (DGGE).

Os géis de acrilamida/bis-acrilamida a 8% foram preparados para um gradiente desnaturante de 30% a 65%, usando uma solução 100% desnaturante (ureia 7 M e formamida a 40%) e uma solução a 0% (sem ureia e sem formamida). A eletroforese correu nas condições de 130 V e 60 °C por 16h, em TAE 0,5 x (200 mM de Tris base, 100 mM de ácido acético glacial, 5 mM de EDTA e pH 8,0), num sistema *DCode* (BioRad, EUA). Após a corrida, o gel foi corado com *SYBR GREEN I* (Invitrogen, EUA) e fotografado com um sistema de foto-documentação ultravioleta.

4.7 Análise dos dados

As análises dos dados e todos os gráficos obtidos neste trabalho foram feitos utilizando o programa *GraphPad Prism 6.0*. Os géis de DGGE foram normalizados e analisados com o auxílio do programa *BioNumerics* (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), que gerou matrizes de abundância e presença/ausência. Posteriormente, as matrizes foram utilizadas para gerar agrupamentos hierárquicos, calculados pela distância de Jaccard, com o método de agrupamento UPGMA.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos sedimentos

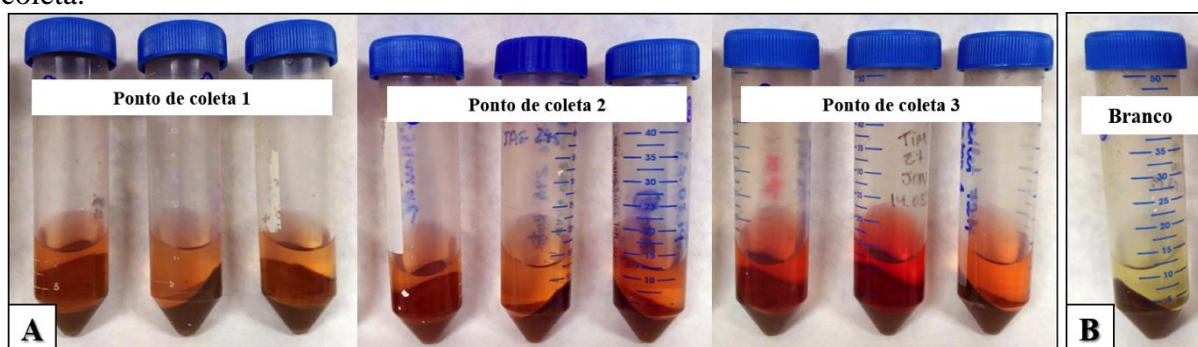
A Tabela 3 apresenta os valores de pH, salinidade, matéria orgânica e percentual de umidade dos sedimentos utilizados nos microcosmos.

Tabela 3 – Características do *pool* de sedimentos de manguezal utilizado nos microcosmos.

Sedimento de manguezal	
pH	6,47 ± 0,09
Salinidade	30 ± 7,21
Matéria Orgânica (g/kg)	2,864 ± 0,28
Umidade (%)	20,85 ± 0,68

A atividade metabólica basal dos sedimentos recém-coletados (T0) foi verificada pela medida da atividade desidrogenásica. A Figura 15 mostra os resultados da atividade enzimática basal das triplicatas de sedimentos de cada um dos 3 pontos de coleta no manguezal.

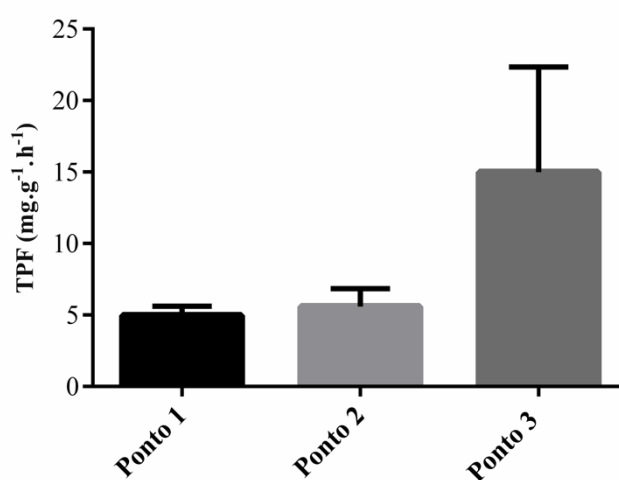
Figura 15 – Atividade desidrogenásica de sedimentos de manguezal imediatamente após a coleta.



Legenda: (A) Atividade desidrogenásica dos três pontos de coleta de sedimento. (B) Branco da atividade desidrogenásica, preparado sem adição de TTC.

A atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF (trifenilformazan) variou de 4,97 $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$, no ponto 1, a 14,99 $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$, no ponto 3 (Figura 16). Devido a essa diferença considerável de atividade do sedimento do ponto 3 em relação aos outros, foram escolhidos os pontos de coleta 1 e 2 para a montagem dos microcosmos,

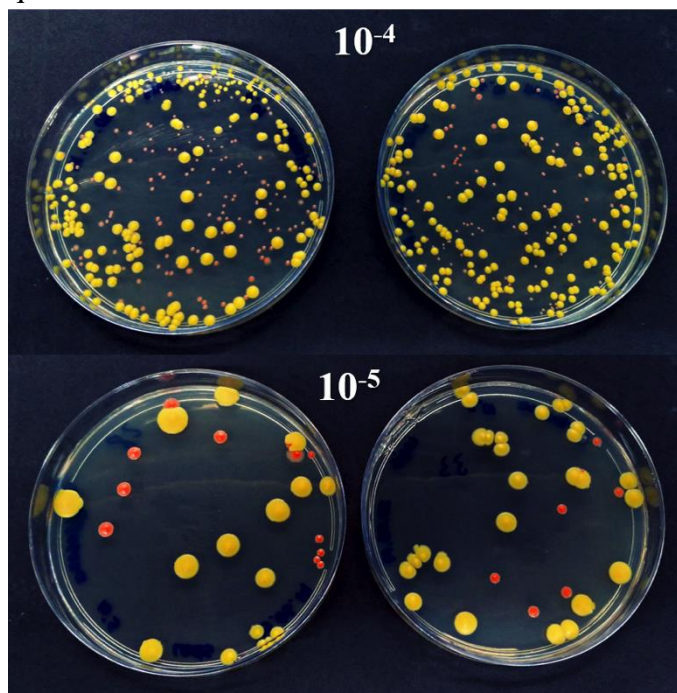
Figura 16 – Atividade desidrogenásica de sedimentos de manguezal recém-coletados expressa em concentração de TPF ($\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$).



5.2 Densidade de células imobilizadas nas esferas de quitosana

A eficiência da imobilização do consórcio de bactérias em quitosana e a viabilidade de cada estirpe de actinobactéria foi verificada pela contagem de células viáveis. Uma semana após o processo de imobilização celular, as esferas foram maceradas, submetidas a diluição seriada e inoculadas em placas de meio ATGE. Após o período de incubação constatou-se a viabilidade do consórcio pelo crescimento das colônias características de cada estirpe (Figura 17) e eficiência pelas contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas, que foi, respectivamente, de $1,32\times 10^8$ UFC/g de HEX 5 e $2,45\times 10^8$ UFC/g de HEX 6.

Figura 17 – Aspecto das colônias de HEX 5 (rosa) e HEX 6 (amarela) immobilizadas em esferas de quitosana.



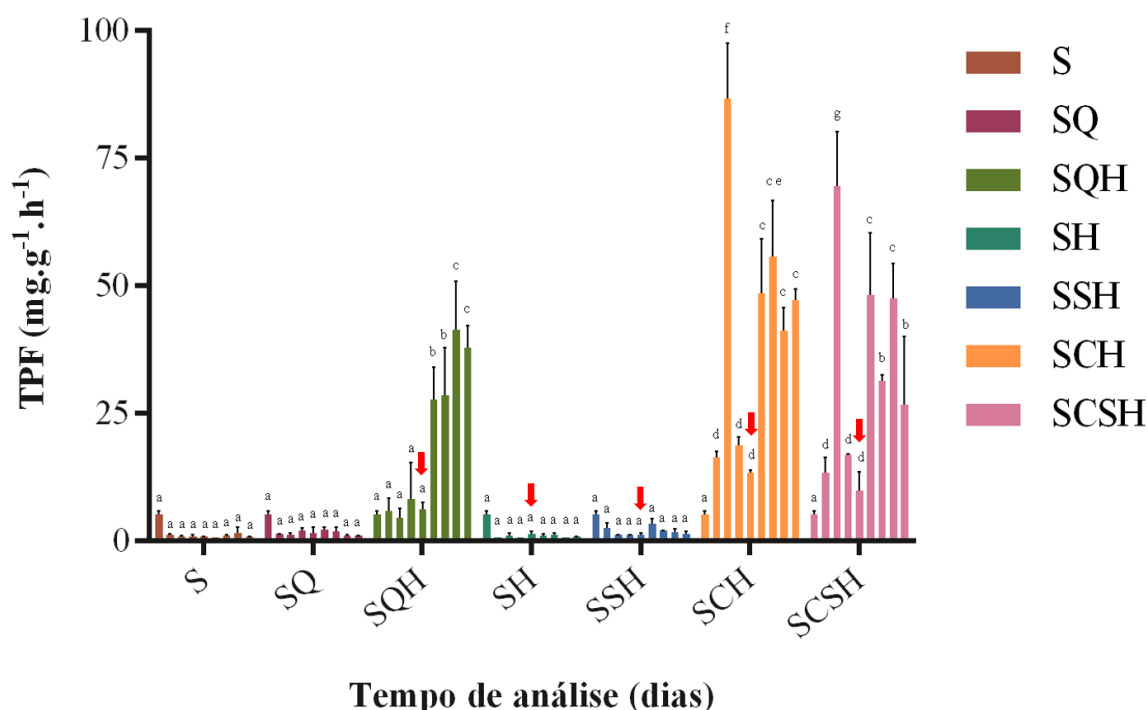
Legenda: os valores 10^{-4} e 10^{-5} correspondem às diluições empregadas no plaqueamento das culturas.

5.3 Biorremediação de sedimentos de manguezal em microcosmos

A atividade metabólica dos microcosmos foi analisada pela mensuração da atividade desidrogenásica. Os resultados estão mostrados nas Figuras 18 e 19. Foi realizada uma análise de variância pelo método *two-way* ANOVA, com o pós-teste de Tukey a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

A Figura 18 mostra a comparação entre os tempos dentro de cada grupo de tratamento, onde cada conjunto de barras da mesma cor corresponde a um tratamento, e cada barra representa um tempo de análise (T0, T3, T12, T21, T30, T33, T42, T51 e T60).

Figura 18 – Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$) nos determinados tempos de análise (agrupados por tratamento).



Legenda: Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes em relação aos demais. Para cada grupo, cada barra representa um tempo de análise (T0, T3, T12, T21, T30, T33, T42, T51 e T60). Setas vermelhas indicam o dia em que houve o reforço do contaminante (T30). **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

Como é possível observar na Figura 18, o grupo controle, **S** não apresentou variação significativa de atividade desidrogenásica ao longo dos 60 dias de experimento. Os grupos controles **SH**, **SQ** e **SSH** também não responderam aos componentes externos adicionados em cada grupo.

O grupo **SQH** manteve sua atividade metabólica sem grande variação até 30 dias de experimento. No entanto, 3 dias após a adição do reforço de contaminante ao sedimento, esse grupo apresentou aumento significativo em sua atividade desidrogenásica, que de $6,25 \pm 1,3 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$ no dia 30, subiu para $31,42 \pm 6,4 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$ no dia 33. A partir de então, esse valor aumentou até $41,49 \pm 9,47 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$ no 51º dia (**T51**) e manteve-se alta até o final dos 60 dias de experimento.

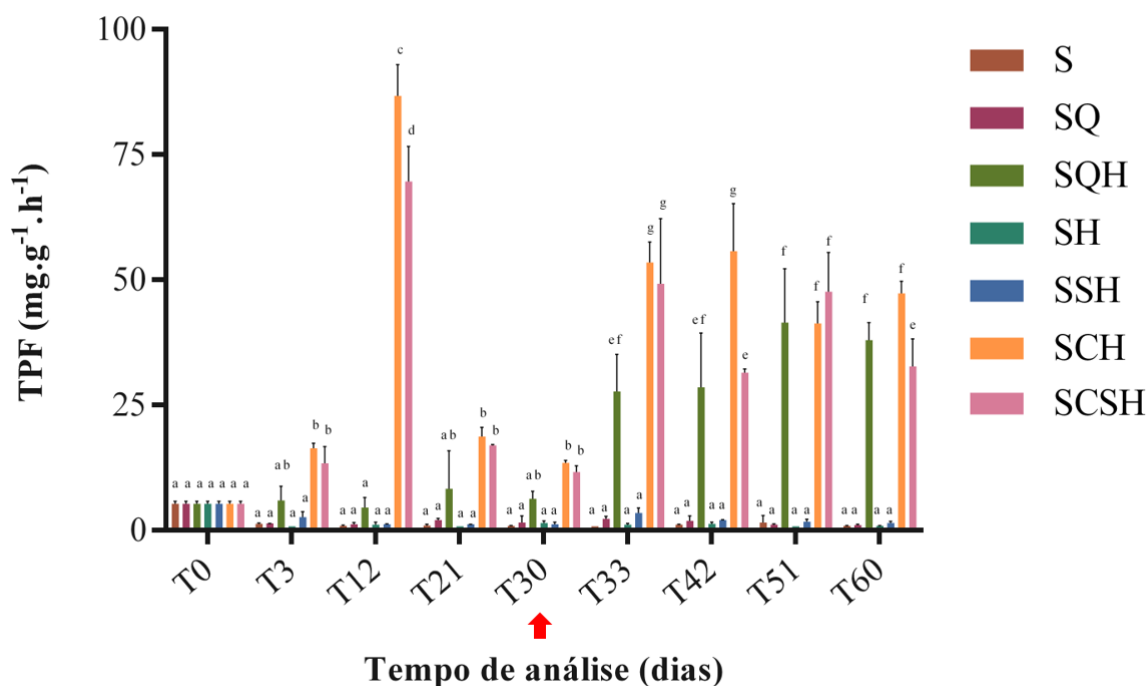
O grupo com consórcio imobilizado em quitosana, **SCH**, apresentou um aumento significativo da sua atividade metabólica em relação ao tempo 0 e em relação aos grupos controle **S**, **SH**, **SQ** e **SQH** já com três dias após o início do experimento. Em **T3**, esse valor é

de $16,37 \pm 1,1 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$. Em **T12**, o valor da atividade aumenta para $86,70 \pm 10,8 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ e volta a cair para $18,67 \pm 1,7 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ no **T21**. Em **T30**, a atividade é de $13,45 \pm 0,4 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ valor ainda significativamente diferente de **T0** e dos grupos controle **S**, **SH**, **SQ** e **SQH**. Em **T33**, 3 dias após o reforço de contaminante, a atividade desidrogenásica sobe novamente para $53,42 \pm 3,5 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ e mantém-se aproximadamente constante até o último dia de experimento, onde fica $47,24 \pm 2,2 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$.

O grupo **SCSH** teve um padrão de atividade metabólica semelhante ao grupo **SCH**. Em **T3**, a atividade desidrogenásica foi de $13,38 \pm 2,9 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, valor significativamente maior que **T0** e que os valores encontrados nos grupos controle **S**, **SH**, **SQ** e **SQH**. Em **T12**, o valor aumenta para $69,65 \pm 10,6 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, mais baixo e significativamente diferente do que o valor de **SCH** no mesmo tempo de análise. Em **T21** há uma redução na atividade metabólica para $16,94 \pm 0,1 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, que se mantém em $11,66 \pm 1,0 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ no **T30**. Três dias após a adição do reforço de contaminante, em **T33**, há um novo aumento na atividade para $49,22 \pm 11,27 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, valor que não difere estatisticamente do encontrado no grupo **SCH**. No entanto, em **T42** a atividade metabólica diminui para $31,46 \pm 1,1 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, que corresponde à metade do valor encontrado para **SCH**, e estatisticamente próximo ao valor do grupo **SQH**. Em **T51**, esse grupo apresenta um novo aumento da atividade, que atinge $48,0 \pm 6,5 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, valor estatisticamente semelhante ao valor do grupo **SCH**. Em **T60**, o valor fica em torno de $32,69 \pm 4,7 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$, menor que o valor do grupo **SCH** e mais uma vez próximo ao valor encontrado no grupo **SQH**.

A Figura 19 mostra a 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% ($p \leq 0,05$).

Figura 19 – Atividade desidrogenásica expressa em concentração do produto TPF ($\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$) nos determinados tempos de análise.



Legenda: Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes em relação aos demais. Seta vermelha indica o dia em que houve o reforço do contaminante (T30). **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

T0 representa a atividade metabólica basal da microbiota presente no sedimento de manguezal, antes da adição dos tratamentos dos microcosmos, e por isso apresenta o mesmo valor ($5,29 \pm 0,65 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$) para todos os grupos, uma vez que o mesmo sedimento foi utilizado na montagem dos microcosmos de todos os grupos. A diminuição e permanência da taxa metabólica pelos grupos controle **S**, **SH** e **SSH**, nos demais tempos, demonstra que a microbiota autóctone do sedimento não responde, sozinha, à presença do contaminante hexadecano, nem mesmo quando o biossurfactante está presente.

O primeiro aumento significativo de atividade ocorreu logo no 3º dia após o início do ensaio (**T3**), por parte dos grupos **SCH** e **SCSH**, ambos contendo consórcio imobilizado em quitosana e o contaminante n-hexadecano. Em **T12**, pode-se perceber claramente a expressiva diferença de atividade metabólica dos grupos **SCH** e **SCSH**, com picos muito distintos dos demais. Embora haja uma queda na atividade, essa diferença significativa com relação aos grupos controle segue até o 30º dia (**T30**).

No decorrer dos dias 0 a 30, a atividade do grupo **SQH** permanece significativamente constante, enquanto a dos grupos **SCH** e **SCSH** diminui após o pico do **T12**, de modo que no 30º dia (**T30**), os três grupos apresentam atividade significativamente semelhantes.

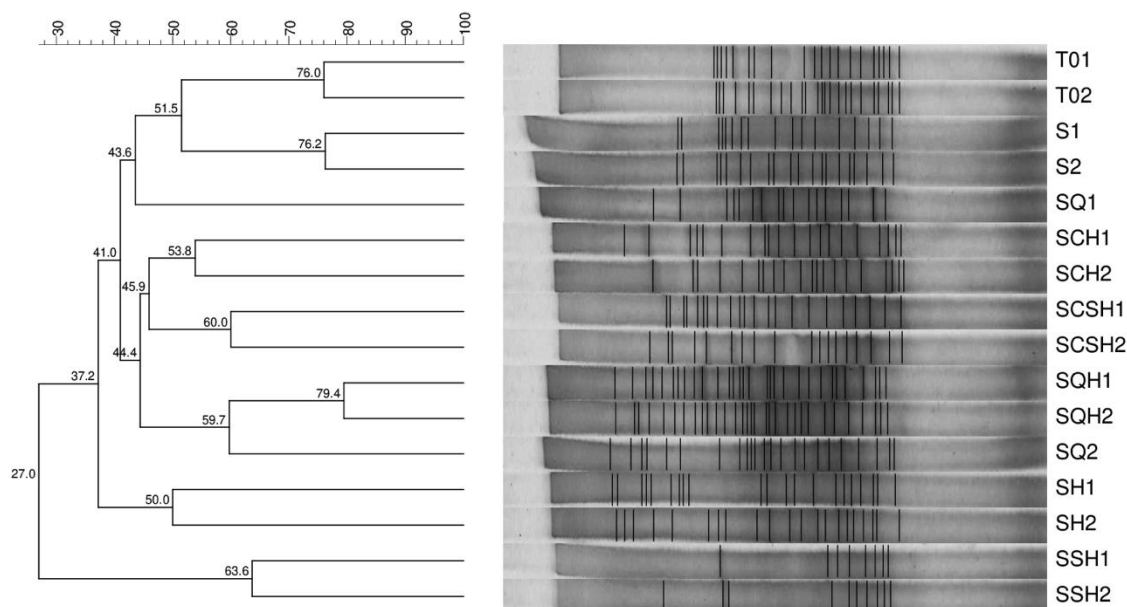
Após o reforço do contaminante, no dia 30, nota-se um aumento expressivo da atividade enzimática dos grupos **SQH**, **SCH** e **SCSH**, no **T33**. Os três grupos continuaram com alta atividade até o fim do experimento, com algumas oscilações. Percebe-se que o grupo **SQH** apresentou um aumento progressivo de sua atividade enzimática até o fim dos 60 dias, enquanto os grupos **SCH** e **SCSH** apresentaram uma leve diminuição. No **T51**, há uma diminuição da atividade de **SCH** e **SCSH** (semelhante ao padrão observado nos primeiros 21 dias de experimento), enquanto **SQH** atinge seu maior pico de atividade, de modo que os três grupos denotam valores de atividade significativamente semelhantes. No final do experimento, em **T60**, o grupo **SCH** mantém sua atividade, juntamente com **SQH**, com valores significativamente semelhantes, enquanto **SCSH** demonstra uma queda de atividade metabólica.

5.4 Análise das comunidades microbianas por PCR-DGGE

As Figuras 20, 22, 23 e 25 mostram os dendogramas gerados por análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons gerados por PCR-DGGE dos microcosmos, utilizando o índice de Jaccard, permitindo a comparação entre os perfis de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) das amostras estudadas.

No tempo **T12** (Figura 20), percebe-se que há uma semelhança de 27% entre todos os grupos. As amostras se dividiram em quatro grandes grupamentos, dos quais em um aglomeraram-se as amostras que continham apenas sedimentos de manguezal, em outro as que continham quitosana e n-hexadecano, restando outros dois grupos, cada um contendo uma duplicata das amostras que continham sedimentos e hexadecano. Com exceção das amostras do grupo **SQ**, nota-se que as duplicatas de todos os outros grupos apresentaram uma similaridade de pelo menos 50% entre si, sendo o grupo **SQH** o que apresentou a maior taxa de similaridade, com 79,4%, seguido por **S** (76,2%) e amostras do tempo zero (76%). As amostras que continham o consórcio (**SCH** e **SCSH**) apresentaram-se concatenadas em um grupo com similaridade de 45,9%, e foram as mais similares às que continham apenas sedimentos de manguezal. Os grupos **SSH** e **SH** foram os que mais divergiram das amostras do tempo zero.

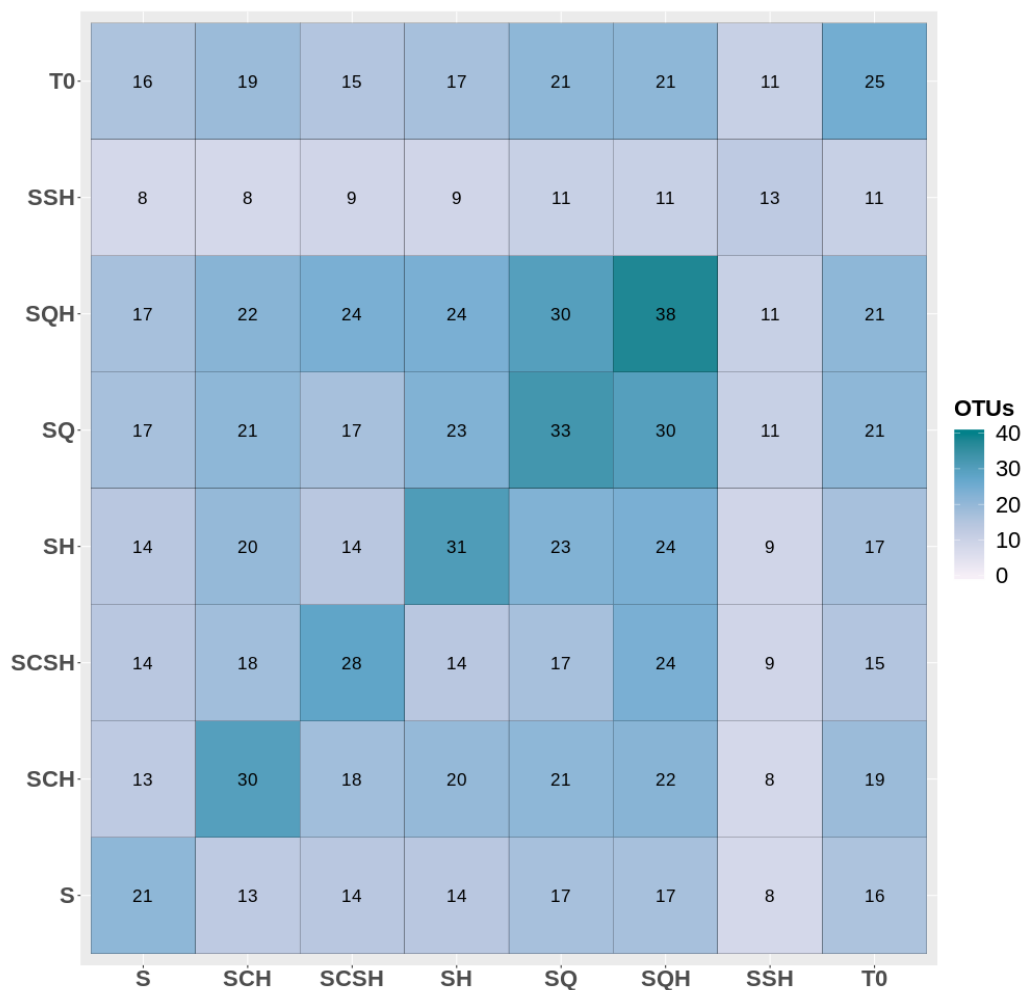
Figura 20 – Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons dos microcosmos gerados por PCR-DGGE no tempo T12, usando índice de Jaccard.



Legenda: **T0**: sedimento de manguezal recém-coletado. **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

Para visualizar melhor as semelhanças entre os grupos, foi gerada uma matriz de similaridade que compara os tratamentos dois a dois, evidenciando os números de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) compartilhados por cada par, que está representada na Figura 21. A diagonal principal mostra o número total de UTOs em cada grupo. A intensidade da cor de cada célula da matriz corresponde à quantidade de UTOs, portanto, quanto mais forte a cor maior o número de bandas presentes nos dois grupos comparados. Dentre as 221 UTOs detectadas no tempo **T12**, o maior número delas pertenceu ao grupo **SQH** (38), seguido por **SQ** (33), **SH** (31), **SCH** (30), **SCSH** (28), **T0** (25), **S** (21) e **SSH**, que apresentou o menor número de bandas (13). O grupo **SQH** compartilha 30 UTOs com o grupo **SQ** e 24 UTOs com os grupos **SH** e **SCSH**. Os grupos que mais se aproximaram do perfil de UTOs de **T0** foram **SQ** e **SQH**, que apresentaram 21 das 25 UTOs presentes nos sedimentos em T0. Percebeu-se também que houve um compartilhamento de UTOs entre os grupos que continham hexadecano e/ou quitosana (**SQ**, **SQH**, **SH**, **SCH** e **SCSH**).

Figura 21 – Matriz de similaridade entre o número de UTOs presentes em cada grupo de tratamento dos microcosmos no tempo T12.

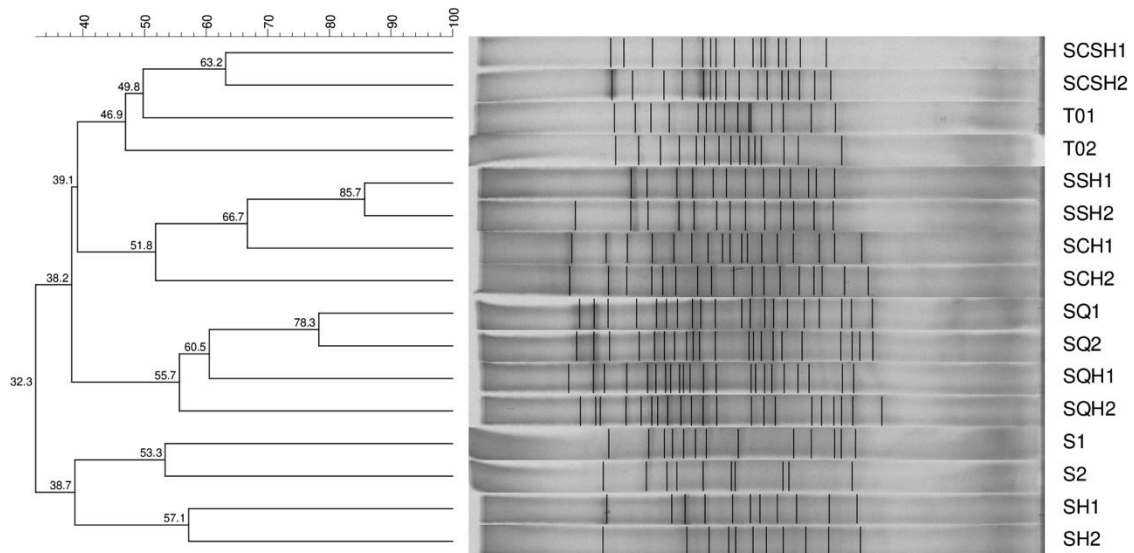


Legenda: **T0**: sedimento de manguezal recém-coletado. **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

A Figura 22 mostra o perfil das comunidades dos microcosmos em **T30**. Nesse tempo, nota-se que há uma menor quantidade de UTOs detectadas, o que sugere que houve uma diminuição da diversidade nos microcosmos desse tempo. Pode-se perceber, também, que há um maior grau de similaridade entre todas as amostras, que agora compartilham entre si 32,3% de semelhança. As duplicatas de cada tratamento se mostraram, em sua maioria, unidas por uma similaridade de pelo menos 53%. As duplicatas que apresentaram maior similaridade entre si foram as dos grupos **SSH**, com 85,7%, seguidas de **SQ**, com 78,3%, e **SCSH**, com 63,2% de semelhança do perfil de UTOs. O grupo **SCSH** demonstrou uma similaridade de 46,9% com as amostras do tempo zero do experimento. Os grupos **SSH** e

SCH compartilharam 51,8% de similaridade, enquanto os grupos que continham apenas quitosana (**SQ** e **SQH**) se agruparam em um clado com 55,7% de similaridade. Os grupos que mais distaram do tempo zero foram **S** e **SH**.

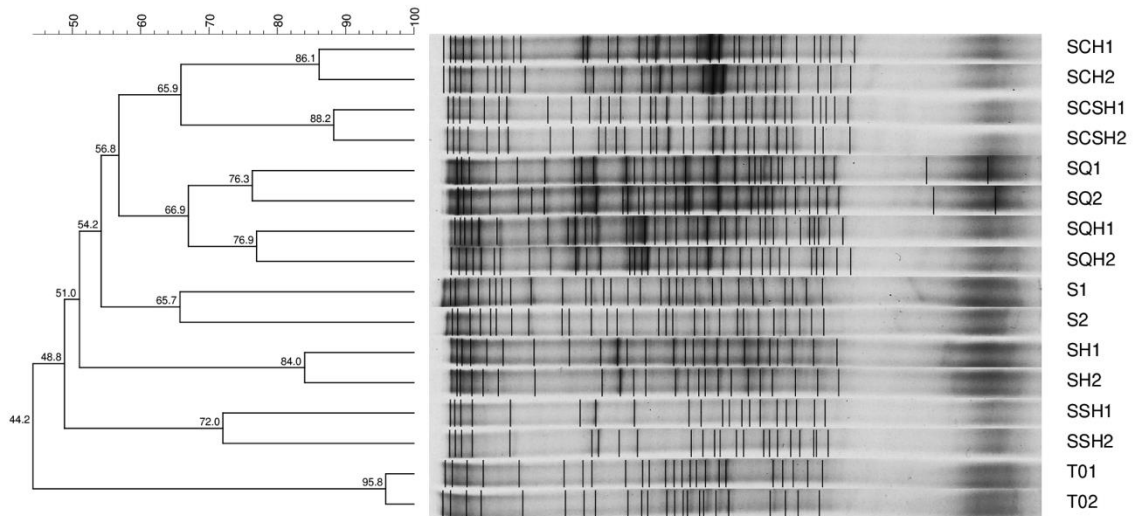
Figura 22 – Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons dos microcosmos gerados por PCR-DGGE no tempo T30, usando índice de Jaccard.



Legenda: **T0**: sedimento de manguezal recém-coletado. **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

A Figura 23 fornece o perfil de UTOs dos microcosmos 3 dias após o reforço do contaminante n-hexadecano, no tempo **T33**. Percebe-se que há um aumento da similaridade entre todos os grupos de tratamento utilizados no ensaio, com um percentual de similaridade de 44,2%. Pode-se notar também que em todos os grupos as duplicatas apresentaram-se unidas e com alto grau de similaridade entre si, com percentual de pelo menos 65,7%. Há um agrupamento dos tratamentos **SCH** e **SCSH**, que compartilharam 65,9% de similaridade, e de **SQ** e **SQH**, com 66,9% de semelhança entre si. Os grupos **S**, **SH** e **SSH** foram os que apresentaram perfis de UTOs mais aproximados do perfil do grupo **T0**, em comparação aos restantes.

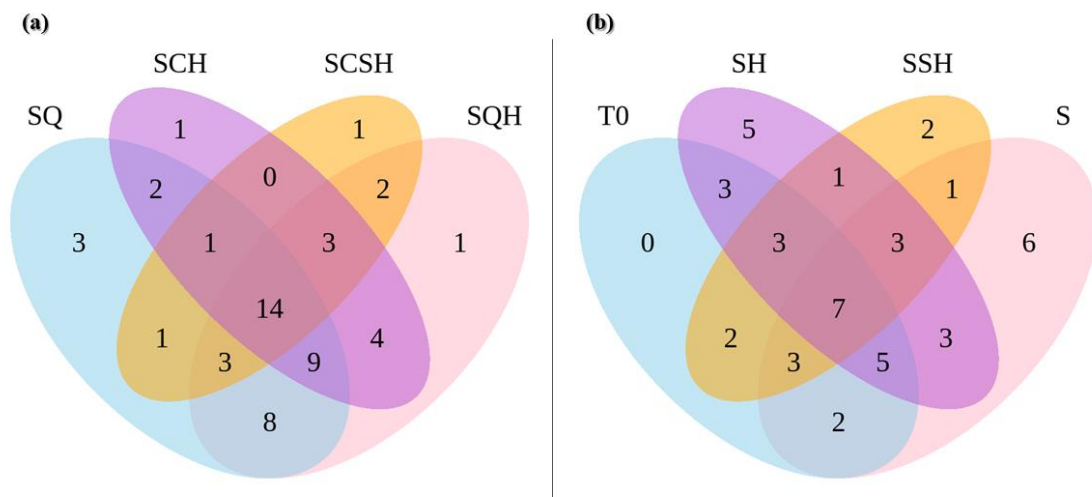
Figura 23 – Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons dos microcosmos gerados por PCR-DGGE no tempo T33, usando índice de Jaccard.



Legenda: **T0**: sedimento de manguezal recém-coletado. **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

Em **T33** houve uma aproximação dos perfis de UTOs formando dois grandes grupos. O primeiro, caracterizado por apresentar grupos que continham quitosana (**SQ**, **SQH**, **SCH** e **SCSH**), e o segundo, formado pelos grupos restantes (**T0**, **S**, **SH** e **SSH**). Foram construídos dois diagramas de Venn relacionando o número de UTOs presentes em cada um desses agrupados (Figura 24).

Figura 24 – Diagrama de Venn relacionando a quantidade de UTOs presentes em cada microcosmos em T33.



Legenda: (a) Diagrama de Venn dos grupos SQ, SQH, SQCH e SCSH. (b) Diagrama de Venn dos grupos S, SH, SSH e T0. **T0**: sedimento de manguezal recém-coletado. **S**: Sedimento; **SQ**:

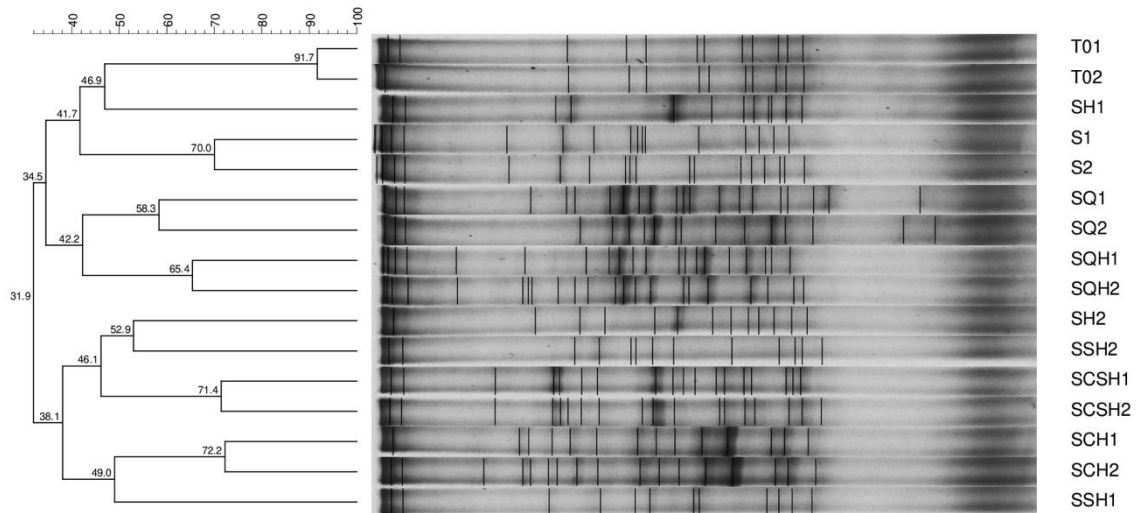
Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

Na figura 24a observa-se que a maioria das UTOs identificadas (14) é comum entre os quatro grupos que continham quitosana em seus microcosmos (**SCH**, **SCSH**, **SQ** e **SQH**). O maior número de UTOs compartilhadas foi entre os grupos **SQH**, **SQ** e **SCH**, que compartilharam 9 entre si, seguidos pela quantidade de 8 UTOs presentes nos grupos **SQ** e **SQH**. Os grupos **SCH** e **SCSH** não compartilharam UTOs exclusivas entre si. Ao todo foram identificadas 53 UTOs. O grupo que apresentou maior número de UTOs identificadas foi **SQH** (44), seguido de **SQ** (41) e **SCH** (34), sendo **SCSH** o que conteve menos UTOs (25).

A Figura 24b mostra que os grupos **S**, **SH**, **SSH** e **T0** compartilharam entre si 7 UTOs. Foram identificadas 46 UTOs, das quais 5 eram exclusivas do grupo **SH**, 6 do grupo **S** e 2 do **SSH**. O grupo **T0** não apresentou nenhuma UTO exclusiva. **S**, **SH** e **T0** compartilharam entre si 5 UTOs. Os grupos que apresentaram maior quantidade de UTOs foram **SH** e **S**, com um total de 30 UTOs cada. O grupo **SSH** teve o menor número de UTOs (22) entre todos os grupos.

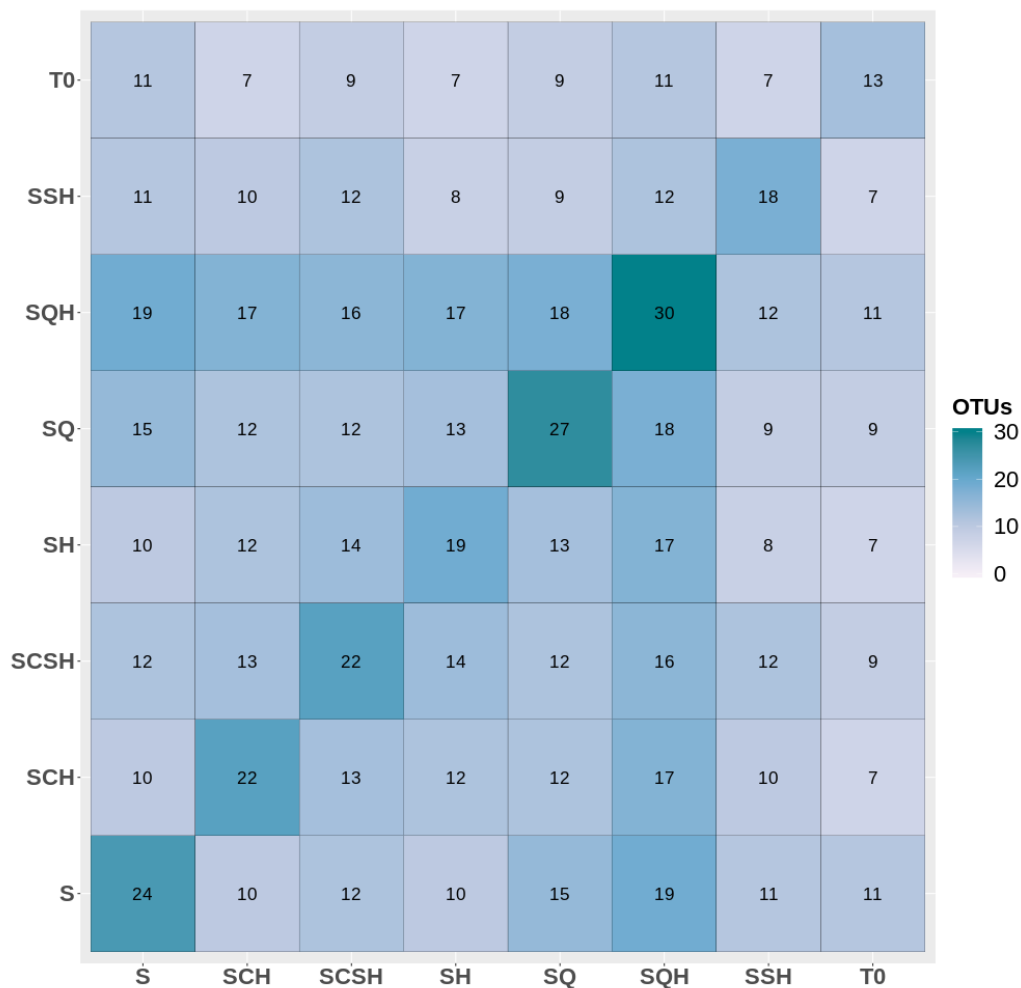
A análise das comunidades dos microcosmos ao final do experimento, após 60 dias (Figura 25), apresentou uma similaridade de 31,9% entre todos os grupos de tratamento. Os grupos **SQ** e **SQH** apresentaram-se agrupados, com similaridade de 46,1%, e o grupo mais próximo do perfil de **T0** foi o **S**. O grupo que mais se diferenciou do perfil de **T0** foi o **SCH**, seguido por **SCSH**. Com exceção de **SH** e **SSH**, as duplicatas apresentaram-se unidas por uma similaridade de pelo menos 58,3% entre si. Para visualizar melhor as semelhanças entre os grupos desse tempo, também foi gerada uma matriz de similaridade comparando os tratamentos dois a dois, conforme representado na Figura 26.

Figura 25 – Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de amplicons dos microcosmos gerados por PCR-DGGE no tempo T60, usando índice de Jaccard.



Legenda: **T0**: sedimento de manguezal recém-coletado. **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

Figura 26 – Matriz de similaridade entre o número de UTOs presentes em cada grupo de tratamento dos microcosmos no tempo T60.

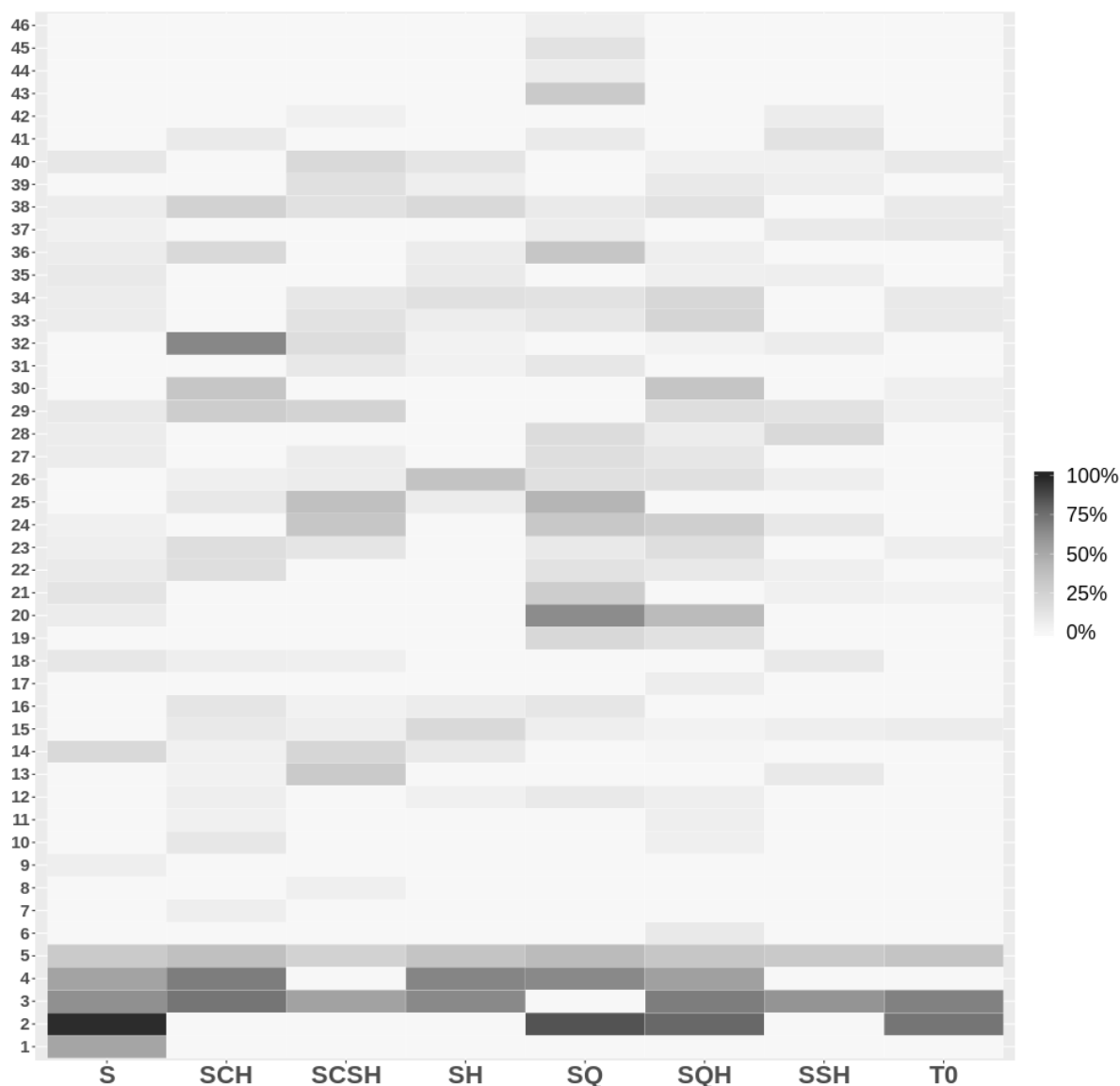


Legenda: **T0**: sedimento de manguezal recém-coletado. **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10^7 UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

Dentre as 175 UTOs detectadas no tempo **T60**, o maior número delas pertenceu ao grupo **SQH** (30), seguido por **SQ** (27), **S** (24), **SCH** e **SCSH**, ambos com 22 UTOs, **SH** (19), **SSH** (18) e **T0**, que apresentou o menor número de bandas (13). Dentre as 13 bandas apresentadas por **T0**, 11 estavam presentes também nos grupos **S** e **SQH**. O grupo **SQH** apresentou uma quantidade razoável de UTOs compartilhadas com diversos outros grupos. Das 19 UTOs pertencentes ao grupo **S**, 17 também estavam presentes em **SQH**. O grupo **SQH** também compartilhou 18 UTOs com **SQ**, 17 com **SH** e **SCH**, além de 16 com **SCSH**.

Para comparar o perfil de bandas de cada grupo no **T60**, foi gerado um *heat-map* (Figura 27), onde a intensidade de cada banda é dada pela intensidade da cor.

Figura 27 – *Heat-Map* dos perfis de amplicons dos microcosmos de sedimentos de manguezal gerados por PCR-DGGE.



Legenda: **T0**: sedimento de manguezal recém-coletado. **S**: Sedimento; **SQ**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos; **SQH**: Sedimento + esferas de quitosana sem microrganismos + hexadecano (10 g/kg); **SH**: Sedimento + hexadecano (10 g/kg); **SSH**: Sedimento + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg); **SCH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10⁷ UFC) + hexadecano (10 g/kg); **SCSH**: Sedimento + esferas de quitosana com consórcio imobilizado (10⁷ UFC) + biossurfactante + hexadecano (10 g/kg).

Os perfis das comunidades de **T0** e **S** se assemelham, exceto pela banda de amplicon n° 2, que se apresenta bem intensa no grupo **S**. Os grupos que continham quitosana (**SQ** e **SQH**) também apresentaram perfil de bandas muito similares, no entanto, o grupo **SQ**

não apresentou a banda nº 3, que está presente em todos os outros grupos do experimento. Além disso, o grupo **SQ** apresentou a banda nº 20 bem intensa, que também estava presente em **SQH**, porém em menor intensidade. O grupo **SCH** apresentou uma banda bem destacada e intensa (nº 32), que estava presente nos outros grupos, porém em baixa intensidade.

A quantidade de UTOs de cada grupo de tratamento apresentada em cada tempo de análise foi compilada na Tabela 4. Pode-se perceber que, durante todos os tempos apresentados, o grupo que sempre apresentou maior número de UTOs foi **SQH**, e o que apresentou menor número de UTOs (excetuando-se da comparação os sedimentos do tempo zero) foi **SSH**. Com exceção dos sedimentos de T0 e do grupo **SH**, todos os outros apresentaram um aumento no número de UTOs detectadas no tempo **T30**. Todos os grupos tiveram uma redução no número de UTOs detectadas no último dia do experimento, em **T60**.

Tabela 4 – Número total de UTOs detectadas nos microcosmos nos tempos T12, T30, T33 e T60.

GRUPOS	TEMPOS			
	T12	T30	T33	T60
Sedimento (T0)	25	25	25	13
S	21	37	30	24
SQ	33	43	41	27
SH	31	28	30	19
SQH	38	44	44	30
SSH	13	28	22	18
SCH	31	43	34	22
SCSH	29	36	25	22

6 DISCUSSÃO

A biodegradação de hidrocarbonetos em sedimentos contaminados depende de muitos fatores, como a composição, concentração e biodisponibilidade do contaminante, além de fatores intrínsecos ao solo e ao ambiente, como temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Esses fatores influenciam diretamente no grau de toxicidade desses contaminantes nos sedimentos e devem ser levados em consideração na escolha do processo de biorremediação. A textura dos sedimentos afeta diretamente a biodegradação de hidrocarbonetos, pois influencia no transporte de água, oxigênio e nutrientes, que acaba sendo comprometido em sedimentos com alto conteúdo argiloso, como os de manguezais. Nesses ambientes, os sedimentos acabam funcionando como reservatórios, retendo os poluentes, o que contribui para o aumento de sua toxicidade (KHAN *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2011).

Os sedimentos do manguezal do rio Pacoti, utilizados nesse estudo, são salinos, possuem pH próximo do neutro, e são ricos em matéria orgânica. ALVES (2018) analisou sedimentos do mesmo manguezal nos mesmos pontos de amostragem desse estudo, caracterizando-os como argilosos e de granulometria fina, o que contribui para a retenção de contaminantes nesses habitats (SANTOS *et al.*, 2011). O fato de manguezais serem ambientes costeiros com influência constante de inundações com água do mar contribui para que esses sedimentos apresentem alta salinidade e pH alcalino.

A coleta dos sedimentos usados nesse trabalho foi realizada no dia 15 de maio de 2019. De acordo com dados da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME), o índice pluviométrico do mês de maio no litoral de Fortaleza foi de 341,5 mm, índice bem acima do esperado (186,8 mm). Devido à incidência das chuvas, os sedimentos apresentaram valores de pH e salinidade mais baixos do que os reportados por ALVES (2018), em decorrência da diluição da água do mar pela água doce o que contribui para a diminuição da salinidade e ocorrência de pH mais ácido ou próximo da neutralidade (BORGES; SILVA, 2013).

Os sedimentos também apresentaram menor teor de matéria orgânica do que o reportado por ALVES (2018), e isso também pode ser atribuído às chuvas, já que a entrada de água doce nos manguezais contribui para a lixiviação da matéria orgânica (KIDA *et al.*, 2019).

Para realizar um estudo de biorremediação em manguezais é relevante que haja uma avaliação detalhada dos sedimentos, pois a resposta da microbiota autóctone e sua interação com a matriz do sedimento são fatores-chave para o destino desses poluentes

(ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2018). Devido às particularidades de cada manguezal, é interessante, portanto, simular a biorremediação em microcosmos antes de aplicar o método *in situ* (CAMEOTRA; SINGH, 2008).

Um dos métodos mais amplamente empregados para monitorar a biodegradação de poluentes em solos ou sedimentos é a mensuração de atividades enzimáticas. As desidrogenases despontam como as mais utilizadas, sendo considerada um bom indicador da atividade microbiana (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2018; AL-HAWASH *et al.*, 2018).

Pela análise da atividade desidrogenásica nos microcosmos percebeu-se que o grupo **S**, que continha apenas sedimento de manguezal, manteve atividade metabólica basal constante e praticamente inalterada durante todo o experimento. Os géis de DGGE mostraram que no início e no final do experimento, o grupo **S** foi o que apresentou maior similaridade com o grupo **T0**, mostrando que os sedimentos preservaram boa parte da sua microbiota nativa inicial.

A atividade desidrogenásica do grupo **SQ** também se manteve constante e inalterada durante todo o experimento, mostrando que a quitosana não foi utilizada como fonte de carbono pela microbiota nativa, provavelmente devido a adaptações às fontes de carbono disponíveis no próprio ambiente.

O grupo **SH** não apresentou diferença significativa na sua atividade desidrogenásica, que se manteve baixa e constante durante todo o experimento, evidenciando a incapacidade da microbiota nativa em degradar o n-hexadecano. TIRALERDPANICH *et al.* (2018) demonstraram que microrganismos de solos expostos à contaminação crônica por hidrocarbonetos possuem alta capacidade de degradação de n-hexadecano, enquanto áreas que sofreram contaminação aguda não apresentam essa mesma eficácia, por necessitarem de um período mais demorado de adaptação para iniciar a degradação. Além do mais, o n-hexadecano pode ter apresentado algum grau de toxicidade para os microrganismos dos sedimentos (KHAN *et al.*, 2018).

No tempo **T12** foram detectadas 31 UTOs no grupo **SH**, esse valor caiu para 28 em **T30** e, por fim, em **T60** foram detectadas 19 UTOs. Isso mostra que realmente houve uma perda de diversidade de microrganismos nesse grupo ao longo do experimento, podendo ter decorrido da toxicidade do hidrocarboneto e perda de viabilidade celular ao longo do tempo dentro do microcosmo em decorrência da exaustão de matéria orgânica disponível e acúmulo de produtos do metabolismo microbiano (PANDEY; PATHAK; DAVE, 2016). Também é preciso considerar que pode ter ocorrido a acumulação do próprio contaminante dentro do microcosmo após a adição do reforço no **T30**, aumentando sua concentração e

consequentemente sua toxicidade. Portanto, apenas os microrganismos resistentes a essas condições permaneceram nesse microcosmo até o final do experimento (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

A adição de biossurfactante ao sedimento não promoveu nenhuma alteração na atividade desidrogenásica. Existe a possibilidade do biossurfactante aumentar a solubilidade do contaminante a ponto de aumentar sua toxicidade. SHIN; AHN; KIM, (2005) relataram o efeito da aplicação de um ramnolípídeo na degradação microbiana de fenantreno por duas estirpes de bactérias, e verificaram que a adição do biossurfactante diminuiu a degradação, por aumentar a solubilidade do contaminante e consequentemente sua toxicidade. Estudos anteriores utilizaram, com sucesso, biossurfactantes para facilitar a utilização de compostos hidrofóbicos pelos microrganismos (LI *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2016).

Nas análises de DGGE, o grupo **SSH** é o que apresenta menor número de UTOs identificadas comparado com os outros grupos em cada um dos tempos de análise, o que indica que houve perda de biodiversidade provavelmente devido a toxicidade para os microrganismos, seja pelo próprio biossurfactante ou pelo aumento da solubilidade do hexadecano (BRAMWELL; LAHA, 2000).

Diferentemente dos grupos **SQ** e **SH** o grupo **SQH** estimulou a microbiota depois do segundo derrame de hexadecano aos 30 dias. Ou seja, no dia **T33** houve um aumento significativo na atividade metabólica desse grupo. Isso sugere que a presença da quitosana influenciou na assimilação do hexadecano por parte da microbiota autóctone, levando à hipótese de que a quitosana, devido à sua propriedade oleofílica, pode ter tornado o hexadecano mais acessível aos microrganismos na matriz dos sedimentos (GENTILI *et al.*, 2006).

GONG *et al.* (2015) mostraram que a quitosana associada com células bacterianas foi capaz de aumentar a hidrofobicidade da superfície celular e formar uma camada compacta na parte externa das gotículas de óleo, aumentando a estabilidade da emulsão e a área de contato óleo-água. No referido trabalho, a quitosana promoveu aumento na taxa de degradação de n-tetradecano (um hidrocarboneto alifático como o n-hexadecano) por uma estirpe de *Bacillus cereus*. A quitosana pode ser utilizada em flocos para auxiliar na biorremediação de hidrocarbonetos (GENTILI *et al.*, 2006), no entanto, foi demonstrado que o seu emprego em forma de esferas, por apresentarem maior área de superfície, podem ser mais eficientes na captação de contaminantes do que na forma de flocos (CRINI, 2006).

Os grupos **SCH** (sedimento, consórcio e hexadecano) e **SCSH** (sedimento, consórcio, surfactante e hexadecano) mostraram que o consórcio de bactérias degradou o

hexadecano, sendo essa atividade confirmada pelo aumento significativo da atividade desidrogenásica três dias (**T3**) após o derrame inicial com um pico em **T12**. Após o reforço do contaminante no **T30**, o pico de atividade enzimática de **T33** foi maior do que **T3**. Provavelmente, na segunda contaminação os microrganismos já estavam adaptados ao contaminante e responderam mais rapidamente. Resposta adaptativa semelhante foi relatada por EVANS *et al.*, (2004). A adição de biossurfactante não favoreceu a biodegradação do hexadecano pelo consórcio, podendo então ser retirado do produto final, tornando-o mais barato.

ALVES (2018) demonstrou que as estirpes utilizadas nesse trabalho (*Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6) são degradadoras de hexadecano, tanto pela presença do gene *alkB* (gene biomarcador de bactérias degradadoras de alcanos) em HEX 5, quanto pela capacidade de HEX 5 e HEX 6 se desenvolverem em meio mineral contendo apenas hexadecano como fonte de carbono. Isso comprova que a atividade enzimática mostrada pelos grupos que continham consórcio (**SCH** e **SCSH**) durante o experimento foi de fato promovida pela degradação do contaminante hexadecano pelas bactérias imobilizadas. A diminuição da atividade dos grupos **SCH** e **SCSH** ao final de 30 dias para valores de atividade metabólica próximos aos basais sugere que, num intervalo de tempo de pelo menos 18 dias (**T3** a **T21**), houve a degradação de boa parte do contaminante pelas bactérias do consórcio.

Muitos estudos relatam que as actinobactérias estão contidas no espectro de microrganismos utilizados para a degradação de hidrocarbonetos, visto que esses microrganismos estão amplamente espalhados em ecossistemas poluídos por petróleo, onde actinobactérias oxidantes de hidrocarbonetos desempenham um papel significativo, o que é explicado pelas peculiaridades metabólicas dessas bactérias e sua resistência a condições desfavoráveis (PIDGORSKYI; NOGINA, 2016). Além disso, VILLELA *et al.* (2019) relatam que, dentre as bactérias da ordem dos actinomicetos, o gênero *Gordonia* e *Micrococcus*, ambos empregados nesse estudo, estão entre os 10 gêneros mais citados no ranking de patentes depositadas utilizando esses microrganismos como agentes de biorremediação.

As análises dos perfis das comunidades de bactérias dos microcosmos foram sintetizadas no diagrama de Venn gerado com os dados obtidos no tempo **T33**. Essa análise separou os microcosmos em dois grupos distintos, os que receberam quitosana (**SQ**, **SQH**, **SCH** e **SCSH**) e que não continham esse polímero (**SH**, **SSH** e **S**). O maior número de UTOs compartilhadas entre todos os grupos se deu nos grupos que continham quitosana, o que evidencia a similaridade entre eles, e como a quitosana pode ter influenciado esse perfil de bandas compartilhado entre esses grupos. DE TENDER *et al.* (2019) mostraram, por

sequenciamento de RNA 16s, que a presença de quitina aumentou a abundância relativa de microorganismos da rizosfera que estavam envolvidos na degradação do ciclo do nitrogênio e da quitina, e que sua adição influenciou significativamente a composição taxonômica microbiana da rizosfera, o que sugere que a quitosana pode ter atuado na seleção dos microorganismos do presente trabalho. Os resultados sugerem ainda que a quitosana teve um efeito facilitador da biodegradação de hexadecano, potencializando a atividade do consórcio de actinobactérias, conforme citado em outros estudos onde a quitosana auxiliou na degradação de hidrocarbonetos (ESCUADERO-OÑATE; MARTÍNEZ-FRANCÉS, 2018).

No **T60**, houve de forma geral, uma redução no número de UTOs apresentado por todos os grupos, o que indica que de fato houve uma seleção nas comunidades microbianas para cada caso de tratamento. As populações de microorganismos em laboratório são ideias para avaliação da adaptação e seleção em experimentos realizados em microcosmos. O curto tempo de geração (horas) e grandes populações permitem uma rápida seleção sob condições controladas. Nos microcosmos microbianos é possível observar diretamente a seleção de microorganismos adaptados a condições específicas em uma escala de tempo de semanas a meses (CRAIG MACLEAN, 2005).

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi desenvolvido um produto confeccionado com duas estirpes de actinobactérias (*Gordonia* sp. HEX 5 e *Micrococcus* sp. HEX 6) hidrocarnoclasticas, immobilizadas em esferas de quitosana, destinado a mitigação de n-hexadecano em sedimentos de manguezais. A quitosana tem um duplo papel no produto, como matriz de proteção para as actinobactérias immobilizadas e como bioestimulante da comunidade autóctone.

Além de ser um produto inovador no mercado de remediadores ambientais, o produto não causa desequilíbrio na comunidade microbiana local, é de fácil manejo e aplicação e tem duração de, no mínimo, 60 dias a campo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SHAIFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. **Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment: An Overview**. In: *Microbial Action on Hydrocarbons*. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 353–386.
- AL-HAWASH, A. B. *et al.* **Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment**. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 44, n. 2, p. 71–76, jun. 2018.
- ALSULAIMAN, A.; NIZAM, A. A. **Evaluation Ability of Different Barada River Micrococcus spp. Strain to Bioremediation of Hydrocarbons**. *Journal CleanWAS*, v. 2, n. 2, p. 01–05, 1 jan. 2018.
- ALVES, B. G. T. **Avaliação da Biodegradação de Hexadecano por um Consórcio de Actinobactérias Imobilizado em Quitosana em Microcosmos de Sedimentos de Manguezal por Medida de Atividade Desidrogenásica**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2018.
- ANGELIM, A. L. **Seleção e Imobilização de Consórcios de Bactérias Hidrocarbonoclasticas e Produtoras de Compostos Ativos de Superfície para Aplicações em Processos de Biorremediação**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2012.
- ANGELIM, A. L. *et al.* **An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads**. *Journal of Environmental Management*, v. 127, p. 10–17, 30 set. 2013.
- BORGES, A. DE C.; SILVA, V. M. DA. **Influência hidrogeoquímica da água subterrânea em manguezais**. *Geochimica Brasiliensis*, v. 27, n. 2, p. 98–103, 2013.
- BRAMWELL, D. A. P.; LAHA, S. **Effects of surfactant addition on the biomineralization and microbial toxicity of phenanthrene**. *Biodegradation*, v. 11, n. 4, p. 263–277, 2000.
- BRASIL. Norma DNER 213/94, de 21 de março de 1994. **Solos – determinação do teor de umidade**, Departamento Nacional de Estradas e Rodagens, Brasil, 21 mar. 1994. p. 3. Disponível em: <http://ipr.dnit.gov.br/normas-e-manuais/normas/meetodo-de-ensaio-me/dner-me213-94.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2019.
- BRITO, E. M. S. *et al.* **Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil**. *Research in Microbiology*, v. 157, n. 8, p. 752–762, out. 2006.
- CAMEOTRA, S. S.; SINGH, P. **Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants**. 2008.
- CASIDA, L. E. **Microbial Metabolic Activity in Soil as Measured by Dehydrogenase Determinations**. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. [s.l.: s.n.].
- CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J. T. **Environmental applications of immobilized**

microbial cells: A review. Journal of Industrial Microbiology, v. 16, n. 2, p. 79–101, fev. 1996.

CHANDER, K.; BROOKES, P. C. **Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils?** Soil Biology and Biochemistry, v. 23, n. 10, p. 909–915, jan. 1991.

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.

CRAIG MACLEAN, R. **Adaptive radiation in microbial microcosms.** Journal of Evolutionary Biology, v. 18, n. 6, p. 1376–1386, 12 out. 2005.

CRINI, G. **Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review.** Bioresource Technology, jun. 2006.

DARVISHI, P. *et al.* **Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 84, n. 2, p. 292–300, 1 jun. 2011.

DE LA CUEVA, S. C. *et al.* **Changes in Bacterial Populations during Bioremediation of Soil Contaminated with Petroleum Hydrocarbons.** Water, Air, and Soil Pollution, v. 227, n. 3, 2016.

DE TENDER, C. *et al.* **Peat substrate amended with chitin modulates the N-cycle, siderophore and chitinase responses in the lettuce rhizobiome.** Scientific Reports, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

DRZYZGA, O. **The strengths and weaknesses of Gordonia: A review of an emerging genus with increasing biotechnological potential.** Critical Reviews in Microbiology, v. 38, n. 4, p. 300–316, 2012.

ESCUDERO-OÑATE, C.; MARTÍNEZ-FRANCÉS, E. **A Review of Chitosan-Based Materials for the Removal of Organic Pollution from Water and Bioaugmentation.** In: Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology. [s.l.] InTech, 2018.

EVANS, F. F. *et al.* **Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms.** FEMS Microbiology Ecology, v. 49, n. 2, p. 295–305, 2004.

FUENTES, S. *et al.* **Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, n. 11, p. 4781–4794, 2 jun. 2014.

GENTILI, A. R. *et al.* **Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes.** International Biodeterioration and Biodegradation, v. 57, n. 4, p. 222–228, jun. 2006.

GIRI, C. *et al.* **Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data.** Global Ecology and Biogeography, v. 20, n. 1, p. 154–159, 1 jan.

2011.

GOLDIN, A. **Reassessing the use of loss-on-ignition for estimating organic matter content in noncalcareous soils.** *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 18, n. 10, p. 1111–1116, 11 out. 1987.

GONG, H. *et al.* **Petroleum hydrocarbon degrading bacteria associated with chitosan as effective particle-stabilizers for oil emulsification.** *RSC Advances*, v. 5, n. 47, p. 37640–37647, 2015.

GUSTAVO COVIZZI, L. *et al.* **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas.** [s.l.: s.n.]. Disponível em:
<https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46274337/1601.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1539978739&Signature=LcXiL%2B5INXZtDAiJnPrPd3l%2FswI%3D&response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DImobilizacao_de_celulas_microbianas_e_s>. Acesso em: 19 out. 2018.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. **The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview.** *Biology and Fertility of Soils*, v. 33, n. 4, p. 265–278, 9 abr. 2001.

HSIEH, F.-M. *et al.* **Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation.** *Process Biochemistry*, v. 43, n. 1, p. 83–92, 1 jan. 2008.

JENNERJAHN, T. C.; ITTEKKOT, V. **Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins.** *Naturwissenschaften*, v. 89, n. 1, p. 23–30, 2002.

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

KIDA, M. *et al.* **Changes in dissolved organic matter composition and dynamics in a subtropical mangrove river driven by rainfall.** *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 223, p. 6–17, 31 jul. 2019.

KOCUR, M.; KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K.-H. **The Genus *Micrococcus*.** In: *The Prokaryotes*. [s.l.] Springer New York, 2006. p. 961–971.

KUMAR, M. N. V. R. **A review of chitin and chitosan applications.** *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, n. 1, p. 1–27, 1 nov. 2000.

KUMAR, S.; MAITI, S. K. **Dehydrogenase activity in natural and mine soil - A review.** *Environment and Ecology Research*, n. May 2010, 2015.

KUMARI, S.; REGAR, R. K.; MANICKAM, N. **Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria.** *Bioresource Technology*, v. 254, p. 174–179, 1 abr. 2018.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. **Microbial degradation of hydrocarbons in the**

environment. Microbiological reviews, v. 54, n. 3, p. 305–15, 1 set. 1990.

LI, X. *et al.* **Surfactants selectively reallocated the bacterial distribution in soil bioelectrochemical remediation of petroleum hydrocarbons.** Journal of Hazardous Materials, v. 344, p. 23–32, 15 fev. 2018.

MORIN-CRINI, N. *et al.* **Fundamentals and Applications of Chitosan.** In: [s.l: s.n.]. p. 49–123.

ØVREÅS, L. *et al.* **Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Saelenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA.** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. [s.l: s.n.].

PANDEY, P.; PATHAK, H.; DAVE, S. **Microbial Ecology of Hydrocarbon Degradation in the Soil: A Review.** Research Journal of Environmental Toxicology, v. 10, n. 1, p. 1–15, 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, v. 48, n. 1, p. 1–38, 2018.

PIDGORSKYI, V. S.; NOGINA, T. M. **Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Actinobacteria and Acinetobacteria Strains Producing Biosurfactant.** Mikrobiolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993), v. 78, n. 6, p. 92–103, 2016.

QUINTELLA, C. M.; MATA, A. M. T.; LIMA, L. C. P. **Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils.** Journal of Environmental Management Academic Press, , 1 jul. 2019.

RODELLA, A. A.; ALCARDE, J. C. **Avaliação de materiais orgânicos empregados como fertilizantes.** Scientia Agrícola, v. 51, n. 3, p. 556–562, dez. 1994.

SAJNA, K. V. *et al.* **Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from Pseudozyma sp. NII 08165 or its culture broth.** Bioresource Technology, 2015.

SANTHINI, K. *et al.* **Screening of Micrococcus Sp from Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation.** Botany Research International, v. 2, n. 4, p. 248–252, 2009.

SANTOS, D. *et al.* **Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century.** International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 3, p. 401, 18 mar. 2016.

SANTOS, H. F. *et al.* **Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum.** Water, Air, & Soil Pollution, v. 216, n. 1–4, p. 329–350, 13 mar. 2011.

SHIN, K.-H.; AHN, Y.; KIM, K.-W. **Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene.** Environmental toxicology and chemistry, v. 24, n. 11, p. 2768–74, nov. 2005.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. **Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons.** Microbiological Reviews, 1995.

SOWANI, H.; KULKARNI, M.; ZINJARDE, S. **An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species.** *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd, , 4 jul. 2018.

TIRALERDPANICH, P. *et al.* **Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis.** *Marine Pollution Bulletin*, v. 133, p. 595–605, ago. 2018.

VARJANI, S. J. **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons.** *Bioresource Technology*, v. 223, p. 277–286, 1 jan. 2017.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. **A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 120, p. 71–83, maio 2017.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. **Biosurfactants-Types , Sources and Applications.** *Research Journal of Microbiology*, 2015.

VILLELA, H. D. M. *et al.* **Microbial bioremediation of oil contaminated seawater: A survey of patent deposits and the characterization of the top genera applied.** *Science of The Total Environment*, v. 666, p. 743–758, 20 maio 2019.

WU, M. *et al.* **Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination.** *Chemosphere*, v. 169, p. 124–130, fev. 2017.