



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

LÍVIA PINHEIRO DE QUEIROZ

***Alcanivorax* sp. FOR1501: UMA NOVA CEPA ISOLADA DO ÓLEO QUE ATINGIU A
ZONA COSTEIRA DO BRASIL EM 2019 E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL
PARA BIORREMEDIAÇÃO**

FORTALEZA

2023

LÍVIA PINHEIRO DE QUEIROZ

Alcanivorax sp. FOR1501: UMA NOVA CEPA ISOLADA DO ÓLEO QUE ATINGIU A
ZONA COSTEIRA DO BRASIL EM 2019 E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA
BIORREMEDIAÇÃO

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

Orientador: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Coorientador: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Q45a Queiroz, Lívia Pinheiro de.
Alcanivorax sp. FOR1501: Uma nova cepa isolada do óleo que atingiu a zona costeira do Brasil em 2019 e avaliação do seu potencial para biorremediação / Lívia Pinheiro de Queiroz. – 2023.
77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Vânia Maria Maciel Melo .

Coorientação: Prof. Dr. Maria Valderez Ponte Rocha .

1. Derramamento de petróleo. 2. Biodegradação . 3. Biossurfactantes . I. Título.

CDD 660.6

LÍVIA PINHEIRO DE QUEIROZ

Alcanivorax sp. FOR1501: UMA NOVA CEPA ISOLADA DO ÓLEO QUE ATINGIU A
ZONA COSTEIRA DO BRASIL EM 2019 E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PARA
BIORREMEDIAÇÃO

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

Aprovada em: 15/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Denise Calvacante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues
Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA)

À minha avó, Maria Tabosa Sales Pinheiro.

AGRADECIMENTOS

À vida, por me conceder a honra de conviver com pessoas admiráveis, fortes e acolhedoras. Por todo o aprendizado que conquistei ao longo destes dois anos. Pela oportunidade de todas as manhãs poder recomeçar.

À minha avó, **Maria**, no qual tanto desejei sua presença física neste momento, principalmente por ter sido a minha grande inspiração de determinação, me ensinar tanto sobre a vida e a ter força e fé. Por ser uma força da natureza.

À minha mãe, **Elisabeth**, por ser a minha maior incentivadora, educadora e apoiadora. Por todo o cuidado, paciência e amor dedicados a mim durante toda a minha vida. Por ser meu porto seguro, onde eu sempre posso regressar. Não tenho palavras que expressem todo meu sentimento de amor e gratidão.

À minha família, em específico minhas tias **Fátima**, **Dorotéia**, **Ruth** e minha madrinha **Ana Carolina**, que, inúmeras vezes, foram suporte, lar, acolhimento e leveza.

À Professora **Vânia Melo**, por ter me concedido a oportunidade de realizar este trabalho. Por ter me proporcionado suporte e estrutura. Por ter sido uma grande conselheira científica, pela honestidade e paciência. Por ser uma cientista e professora admirável.

À Professora **Maria Valderez**, por todo apoio, paciência e tempo dedicado a mim. É sempre um prazer aprender com a senhora. A senhora tem em mim toda consideração, admiração e gratidão.

À Professora **Denise Hissa** e Professora **Tigressa Soares** por terem aceitado a compor a banca de avaliação e por todas as contribuições e sugestões para a realização deste trabalho.

À **Mirella Pereira**, **Talita Camila** e **Vanessa Ariane** pela amizade, risadas, amparo, leveza, carinho e confiança cultivados ao longo desta jornada. Por compartilharem comigo o cotidiano, as angústias e felicidades. Por serem grandes amigas, mulheres e inspirações.

Ao **Edvan Marques**, pela amizade, apoio, companheirismo e incentivo. Por ser uma pessoa cuja presença é tão quista e alegre. Por ser exemplo para mim.

À minhas amigas **Larisse Brandão** e **Luzia Gabrielle** que compartilharam comigo as ânsias, aflições e prazeres deste processo. Por tantas vezes me ouvirem e me aconselharem. Pelo cuidado e zelo comigo. Vocês têm de mim muito afeto e gratidão!

Ao Lembiotech, onde tive a oportunidade de conhecer e conviver com pessoas tão especiais, como a **Cristiane, João Vítor, Victor Lucas, Paulo Ricardo, Saulo, Igor, Mateus Honorato, Eric, Rhânia e Andréa**. Guardo com muito carinho todas as memórias que construí com vocês!

Aos alunos de iniciação científica, **Maria Clara, Paulo Roberto e Miriam** por toda ajuda, apoio, paciência, companhia, aprendizado e amizade. Vocês foram extremamente importantes para o meu amadurecimento profissional!

Ao GPBio, em especial **Carla Luzia e Allan Almeida**, pelo apoio, paciência e auxílio quando necessário.

Ao Sr. **Valdenor** e ao Sr. **Rogério** pela simpatia, educação, incentivo e motivação.

À **Grasieli Lustosa** e ao **Willyan Mota** pelo apoio terapêutico neste período. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À **Amora** que, apesar de não compartilharmos a mesma forma de comunicação, sempre nos compreendemos pela linguagem universal do amor e do cuidado. Por fazer dessa jornada mais feliz. Por ser a melhor e mais calorosa companhia nos meus dias de escrita.

A todos que convivi neste período e que, ainda que não tenham permanecido na minha vida, foram suporte, lar, felicidade e aprendizado.

À **Universidade Federal do Ceará** pela infraestrutura e suporte.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, Código de Financiamento 001 (Bolsa de Mestrado de Demanda Social), por financiar meu trabalho e contribuir com a minha formação.

“Mas é preciso ter manha, é preciso ter graça, é
preciso ter sonho sempre.”

Milton Nascimento

RESUMO

O petróleo bruto é um recurso não renovável de grande importância econômica mundial. Apesar dos avanços em segurança, a exploração de petróleo é uma prática susceptível à desastres ambientais. No Brasil, entre agosto de 2019 e janeiro de 2020, um óleo pesado, derramado a cerca de 400-700 km da costa, contaminou mais de 3.000 km do litoral brasileiro, atingindo todo o Nordeste e parte do Sudeste, causando diversos danos à biodiversidade e à saúde humana. Deste modo, é de suma importância o desenvolvimento de tecnologias que promovam a biorremediação das áreas contaminadas. Bactérias que degradam hidrocarbonetos e produzem compostos ativos de superfície são potenciais candidatas para aplicações em biorremediação, como a nova cepa de *Alcanivorax* sp. FOR1501, que foi isolada de amostras de praias oleadas no Ceará. Neste contexto, este trabalho avaliou a biodegradação de petróleo e diesel para a produção de biossurfactantes por essa cepa. A biodegradação foi avaliada por análises gravimétricas e cromatografia gasosa com espectrometria de massas, enquanto a produção de biossurfactantes foi avaliada por medidas de emulsificação, desemulsificação e tensão superficial. O biossurfactante foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho (FT-IR). FOR1501 foi capaz de degradar hidrocarbonetos de cadeias longas, com 100% de redução das áreas absolutas das cadeias de C₃₄-C₃₇. O diesel ou o petróleo associado à glicose, foram excelentes substratos para produção de biossurfactantes, que produziram índices de emulsificação de 55% e 66% respectivamente. Os produtos foram capazes de reduzir em 35% a tensão superficial e de dispersar óleo da superfície da água. A caracterização dos biossurfactantes por FT-IR mostrou semelhança estrutural com lipopeptídeos. Os resultados destacam que FOR1501 pode ser explorada biotecnologicamente para degradação de frações pesadas do petróleo e produção de biossurfactantes.

Palavras-chave: derramamento de petróleo, biodegradação, biossurfactantes, descontaminação ambiental.

ABSTRACT

Crude oil is a non-renewable resource of great global economic importance. Despite advances in safety, oil exploration is a practice susceptible to environmental disasters. In Brazil, between August 2019 and January 2020, heavy oil, spilled approximately 400-700 km from the coast, contaminated more than 3,000 km of the Brazilian coast, reaching the entire Northeast and part of the Southeast, causing extensive damage to biodiversity and human health. Therefore, it is extremely important to develop technologies that promote the bioremediation of contaminated areas. Bacteria that degrade hydrocarbons and produce surface-active compounds are potential candidates for applications in bioremediation, such as the new strain of *Alcanivorax* sp. FOR1501, which was isolated from oiled beach samples in Ceará. In this context, this work evaluated the biodegradation of petroleum and diesel for the production of biosurfactants by this strain. Biodegradation was evaluated by gravimetric analysis and gas chromatography with mass spectrometry, while biosurfactant production was evaluated by measurements of emulsification, demulsification and surface tension. The biosurfactant was characterized by infrared spectroscopy (FT-IR). FOR1501 was able to degrade long-chain hydrocarbons, with a 100% reduction in the absolute areas of the C₃₄-C₃₇ chains. Diesel or petroleum associated with glucose were excellent substrates for the production of biosurfactants, which produced emulsification rates of 55% and 66% respectively. The products were able to reduce surface tension by 35% and disperse oil from the water surface. The characterization of biosurfactants by FT-IR showed structural similarity with lipopeptides. The results highlight that FOR1501 can be biotechnologically exploited for the degradation of heavy petroleum fractions and the production of biosurfactants.

Keywords: oil spill, biodegradation, biosurfactants, environmental decontamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Pessoas aplicando agentes dispersantes no petróleo derramado no acidente <i>Torrey Canyon</i> em 1967.....	20
Figura 2	– Zona costeira contaminada por petróleo do acidente de <i>Exxon Valdez</i> em 1989.....	21
Figura 3	– Contaminação por óleo em pântano ocasionada pelo acidente do <i>Deepwater Horizon</i>	22
Figura 4	– Localidades afetadas pelo óleo de origem desconhecida ao longo da costa Brasileira (Em verde)	23
Figura 5	– Árvore filogenética construída com as sequências do gene rRNA 16S de <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501, usando o método de Neighbor-Joining com distâncias de Tamura-Nei (NJ-TN) e 1000 réplicas de bootstrap.....	28
Figura 6	– Mecanismo de biodegradação de alcanos.....	30
Figura 7	– Mecanismo de biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos.....	32
Figura 8	– Perfil dos hidrocarbonetos residuais presentes no óleo pesado obtido por CG-EM.....	48
Figura 9	– Percentual de biodegradação das frações carbônicas do óleo pesado por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 do meio contendo microrganismos avaliado por 21 dias (■) e por 28 dias (■).....	49
Figura 10	– Percentual de biodegradação das frações carbônicas do óleo pesado na presença de glicose por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 do meio com microrganismos avaliado por 21 dias (■) e por 28 dias (■).....	50
Figura 11	– Perfil dos hidrocarbonetos residuais extraído do óleo diesel S-10 comercial obtido por CG-EM.....	52
Figura 12	– Percentual de biodegradação das frações carbônicas de diesel S-10 por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 do meio contendo microrganismos avaliado por 21 dias (■) e por 28 dias (■).....	53
Figura 13	– Influência do tempo na biodegradação de óleo diesel S-10 por <i>Alcanivorax</i>	

	sp. FOR1501, analisando através do teste de <i>Tukey</i> com nível de significância de 5%.....	54
Figura 14	– Índice de emulsificação (%) obtidos usando os sobrenadantes livre de célula (■, barra em azul) e as células (■, barra em vermelho) obtidos do processo conduzido por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 por 21 dias, 35 °C e 150 rpm, usando o querosene como fonte hidrofóbica. A diferença estatística foi baseada no teste de <i>Tukey</i> com 95% de nível de confiança ($p < 0,05$), no qual letras iguais indicam que não houve diferença significativa.....	57
Figura 15	– Emulsões formadas entre querosene e sobrenadantes livre de células (A) e células (B) obtidos do cultivo de <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 conduzido por 21 dias, 35 °C e 150 rpm.....	58
Figura 16	– Aspecto das emulsões do tipo água-óleo produzida por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 usando petróleo (A), petróleo e glicose (B) e diesel (C) como fonte de carbono.....	60
Figura 17	– Tensão superficial dos sobrenadantes livres de células obtidos em bioprocessos conduzido por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 por 21 dias, 35 °C e 150 rpm. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)	62
Figura 18	– Índice de emulsificação das soluções com concentração de 1 g/L dos biossurfactantes obtidos por precipitação ácida.....	63
Figura 19	– Ensaio de dispersão do óleo usando soluções a uma concentração de 1 g/L de biossurfactantes obtidos nos processos fermentativos conduzidos por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 e separados por precipitação ácida.....	64
Figura 20	– Espectros FTIR dos biossurfactantes produzidos por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501, usando diesel (A) e petróleo e glicose (B) como fonte de carbono.....	66
Figura 21	– Acompanhamento do IE ₂₄ do sobrenadante (◆), IE ₂₄ da suspensão microbiana (■), TS do sobrenadante (▲) e pH (●) do meio de cultivo ao longo do bioprocessos usando <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501, 1% de diesel como fonte de carbono e conduzido a 35 °C, 150 rpm por 21 dias.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos produtores de biossurfactantes.....	33
Tabela 2 – Possíveis aplicações dos biossurfactantes nos diversos setores industriais...	34
Tabela 3 – Composição do meio mineral Bushnell Haas.....	37
Tabela 4 – Percentual de degradação de hidrocarboneto (HD%) extraídos do óleo pesado e do diesel por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501, baseado no teste de <i>Tukey</i> com 95% de nível de confiança ($p<0,05$), no qual letras iguais, em coluna, indicam que não houve diferença significativa.....	46
Tabela 5 – Percentual de aderência de <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 a hidrocarbonetos avaliados.....	56
Tabela 6 – Capacidade de desemulsificação dos sobrenadantes livres de células obtidos a partir de bioprocessos conduzidos a 35 °C, 150 rpm, 21 dias.....	61
Tabela 7 – Descrição das bandas de FT-IR em suas respectivas faixas de absorção (cm^{-1}).....	66
Tabela 8 – Concentração do bioproduto precipitado por diferentes métodos.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Objetivos	17
<i>1.1.1</i>	<i>Objetivo geral</i>	17
<i>1.1.2</i>	<i>Objetivos específicos</i>	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Petróleo e seus derivados	18
2.2	Acidentes envolvendo o derramamento de petróleo	19
2.3	Abordagens para a biorremediação de petróleo	24
2.4	Bactérias hidrocarbonoclásticas	26
<i>2.4.1</i>	<i>Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos</i>	26
<i>2.4.2</i>	<i>O gênero Alcanivorax</i>	26
<i>2.4.3</i>	<i>Metabolismo de bactérias hidrocarbonoclásticas</i>	29
2.5	Biossurfactantes	33
33	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Material	36
<i>3.1.1</i>	<i>Fontes de carbono</i>	36
<i>3.1.2</i>	<i>Bactéria hidrocarbonoclástica</i>	36
3.2	Métodos	36
<i>3.2.1</i>	<i>Obtenção do inóculo da bactéria hidrocarbonoclástica</i>	36
<i>3.2.2</i>	<i>Ensaio de biodegradação do petróleo e seus derivados</i>	37
<i>3.2.2.1</i>	<i>Bioprocesso de degradação do petróleo e seus derivados</i>	37
<i>3.2.2.2</i>	<i>Extração dos hidrocarbonetos residuais</i>	38
<i>3.2.2.3</i>	<i>Avaliação da biodegradação dos hidrocarbonetos</i>	38
<i>3.2.3</i>	<i>Ensaio de hidrofobicidade da superfície celular</i>	39
<i>3.2.4</i>	<i>Avaliação da produção de compostos ativos de superfície</i>	40
<i>3.2.4.1</i>	<i>Produção biotecnológica de biossurfactante</i>	40
<i>3.2.4.2</i>	<i>Índice de emulsificação (IE₂₄)</i>	40
<i>3.2.4.3</i>	<i>Análise das emulsões por microscopia</i>	41
<i>3.2.4.4</i>	<i>Capacidade de desemulsificação</i>	41
<i>3.2.4.5</i>	<i>Avaliação da tensão superficial (TS)</i>	41

3.2.4.6	<i>Precipitação dos biossurfactantes produzidos.....</i>	42
3.2.4.7	<i>Ensaio de dispersão de óleo.....</i>	42
3.2.5	<i>Avaliação da produção de biossurfactantes a partir do diesel como fonte de carbono.....</i>	43
3.2.5.1	<i>Estudo cinético da produção de biossurfactante a partir do diesel como fonte de carbono.....</i>	43
3.2.5.1	<i>Estudo de separação do biossurfactante produzido a partir do diesel por diferentes métodos.....</i>	43
3.2.5.2	<i>Rompimento da membrana celular.....</i>	44
3.2.6	<i>Métodos analíticos.....</i>	44
3.2.6.1	<i>Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	44
3.2.6.2	<i>Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa (CG-EM)</i>	45
3.2.7	<i>Análises estatísticas.....</i>	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1	<i>Avaliação do potencial de degradação dos hidrocarbonetos residuais presentes no óleo pesado e no diesel S-10 por <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501.....</i>	46
4.2	<i>Avaliação da aderência bacteriana às fontes de carbono.....</i>	55
4.3	<i>Avaliação da produção de biossurfactantes por diferentes fontes de carbono e seus parâmetros tensoativos.....</i>	56
4.3.1	<i>Índice de emulsificação (IE₂₄) e avaliação das emulsões por microscopia.....</i>	56
4.3.2	<i>Capacidade de desemulsificação.....</i>	60
4.3.4	<i>Redução da tensão superficial.....</i>	61
4.3.5	<i>Capacidade emulsificante e de dispersão do óleo dos biossurfactantes separados por precipitação ácida.....</i>	63
4.3.6	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	65
4.4	<i>Avaliação do uso do diesel como fonte de carbono.....</i>	67
4.4.1	<i>Estudo cinético da produção de biossurfactantes a partir do diesel.....</i>	67
4.4.2	<i>Avaliação dos métodos de separação do biossurfactante.....</i>	68
5	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O petróleo bruto é um recurso não-renovável de relevância no desenvolvimento econômico e social à nível mundial e a demanda por este recurso energético vem aumentando nas últimas décadas (CHUNYAN *et al.*, 2023; MELO *et al.*, 2022). Porém, este recurso, devido à sua composição e características físico-químicas, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos tóxica ao meio ambiente e à saúde humana, e sua presença no ambiente causa sérios prejuízos (JABBAR *et al.*, 2022).

A exploração do petróleo é uma prática de alto risco, susceptível à acidentes ambientais, pois requer a exploração de territórios marítimos, e derramamentos de óleo nestes ecossistemas podem ocorrer, principalmente devido ao transporte deste recurso (MELO *et al.*, 2022). Ao ser derramado no meio ambiente, causa diversos danos à fauna e à flora que ali se encontram, tendo em vista que aumentam o índice de mortalidade em massa nos locais afetados, como as praias, recifes de corais e os manguezais (ANTONIOU *et al.*, 2015; DELLAGNEZZE *et al.*, 2016; LOURENÇO *et al.*, 2020).

Acidentes envolvendo derramamento de petróleo são de preocupação mundial, pois há um grande desafio para recuperar as áreas afetadas pela liberação deste óleo. De acordo com a *International Tanker Owners Pollution Federation* (ITOPF), em 2021 mais de 10.000 toneladas de óleo foram despejadas no meio ambiente de forma acidental (ITOPF, 2022). Acidentes mais graves já foram datados, como o acidente que ocorreu no Golfo do México em 2010, no qual foram derramadas cerca de 600.000 toneladas de petróleo no mar (ANTONIOU *et al.*, 2015).

No Brasil também ocorreram derramamentos de óleo, como o acidente que aconteceu em 2019, no qual os primeiros vestígios de petróleo foram encontrados na costa do Nordeste e, até janeiro de 2020, mais de 5.000 toneladas de óleo ao longo da costa foram recolhidas (LOURENÇO *et al.*, 2020). Esse acidente teve impacto não somente em termos ambientais, mas, também, econômicos, tendo em vista que o comércio de pescados e o turismo local foram paralisados, afetando drasticamente estes setores da economia (ZACHARIAS; GAMA; FORNARO, 2021). Por isso, é urgente o desenvolvimento de novas tecnologias eficientes e sustentáveis que promovam a contenção e a biodegradação do petróleo (DELLAGNEZZE *et al.*, 2016; LOURENÇO *et al.*, 2020).

A biorremediação é um método que utiliza microrganismos ou seus produtos para a remoção de poluentes (ADAMS *et al.*, 2015). Este processo pode ocorrer *in situ* ou *ex situ*, ou seja, no local contaminado ou fora do local onde ocorreu a poluição, respectivamente

(HUSSAIN *et al.*, 2022). Dentre os métodos de biorremediação *in situ*, é possível citar a bioaumentação e a bioestimulação (ADAMS *et al.*, 2015).

A bioaumentação refere-se à adição de cepas ou consórcios microbianos conhecidos para otimizar a degradação de compostos químicos considerados danosos aos organismos vivos, e a bioestimulação refere-se à adição de nutrientes no meio contaminado para estimular a comunidade microbiana local, otimizando a biodegradação do poluente (ADAMS *et al.*, 2015; DELLAGNEZZE *et al.*, 2016).

Diversos gêneros são capazes de degradar hidrocarbonetos, como *Marinobacter*, *Acinetobacter*, *Cycloclasticus* e *Alcanivorax*. No Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech), localizado na Universidade Federal do Ceará, algumas cepas de microrganismos foram isoladas do óleo pesado encontrado na costa brasileira com o objetivo de avaliar o seu potencial biodegradador. Dentre os microrganismos isolados, a cepa bacteriana *Alcanivorax* sp. FOR1501 vem se destacando devido ao seu potencial de degradação de hidrocarbonetos e produção de compostos ativos de superfície (CASTRO, 2023).

Bactérias do gênero *Alcanivorax* são microrganismos hidrocarbonoclásticos que em sua maioria encontram-se nos ecossistemas marinhos (ZHU *et al.*, 2022). Esses microrganismos possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos através da via metabólica de β -oxidação e de produzir biossurfactantes utilizando alcanos de cadeia curta e longa como fonte de carbono (OLIVERA *et al.*, 2009; RIZZO *et al.*, 2021; ZADJELOVIC *et al.*, 2022). Deste modo, esse gênero possui potencial aplicação para processos de biorremediação em derramamentos de óleo em ambientes oceânicos, assim como pode ser destinado à diversas aplicações biotecnológicas, como a produção de biossurfactantes (SHAIKHULOVA *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes são compostos tensoativos que podem ser produzidos por rota biotecnológica e que possuem diversas aplicações, apresentando, assim, importância comercial e industrial (LOURENÇO *et al.*, 2020; RIZZO *et al.*, 2021). Esses compostos são importantes no processo de biodegradação, pois possuem a capacidade de aumentar a biodisponibilidade de poluentes orgânicos e, conseqüentemente, otimizam o processo de biodegradação que podem ser realizadas por microrganismos de diversas espécies (LOURENÇO *et al.*, 2020).

Neste contexto, no presente trabalho investigou-se a biodegradação de petróleo e seu derivado, o diesel, por *Alcanivorax* sp. FOR1501, uma nova espécie isolada do óleo pesado coletado na costa Nordeste do Brasil, bem como seu potencial na produção de biossurfactantes.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de biodegradação de petróleo e do óleo diesel e a produção de compostos ativos de superfície por *Alcanivorax* sp. FOR1501, uma bactéria isolada de amostra de óleo que contaminou a praia de Fortim, Ceará.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o potencial biodegradador de hidrocarbonetos, como petróleo e diesel, por *Alcanivorax* sp. FOR1501;
2. Analisar a influência da presença da glicose na biodegradação do petróleo;
3. Estudar a influência do tempo na biodegradação de hidrocarbonetos, como petróleo e diesel, por *Alcanivorax* sp. FOR1501;
4. Avaliar a produção de compostos ativos de superfície por *Alcanivorax* sp. FOR1501 utilizando diferentes hidrocarbonetos como fontes de carbono;
5. Caracterizar os biossurfactantes produzidos por técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Petróleo e seus derivados

O petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos de caráter não-renovável que possui grande importância na economia mundial, tendo em vista ser um produto essencial para o desenvolvimento urbano de um país, e atuação no bem-estar social (CHUNYAN *et al.*, 2023; SREENU, 2022). Porém, a exploração desta matriz energética pode representar um risco ao meio ambiente, sendo a produção e o transporte de petróleo por navios-tanque uma das maiores causas de problemas ecossistêmicos (JABBAR *et al.*, 2022; JEFFERY *et al.*, 2023; MELO *et al.*, 2022).

O petróleo é um líquido complexo resultante da decomposição não oxidante da matéria orgânica residual ou biomassa de origem biogênica, como plantas terrestres, algas marinhas e fitoplânctons (SATTAR *et al.*, 2022). O petróleo é composto por hidrocarbonetos saturados e insaturados lineares, ramificados e cíclicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), resinas, asfaltenos e compostos contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre (CHUNYAN *et al.*, 2023). A presença e quantidade desses compostos podem variar por diversos fatores, como ambiente de decomposição, disponibilidade de materiais orgânicos, biomarcadores, temperatura e tempo (SATTAR *et al.*, 2022).

Dentre os hidrocarbonetos mais abundantes no petróleo, destacam-se os alcanos que podem ser classificados a partir do tamanho da sua cadeia, ou seja, curta, média ou longa (FENIBO *et al.*, 2023). Os alcanos de cadeia média possuem uma quantidade de carbonos entre C₈-C₁₈ e as frações de petróleo que se enquadram nesta classificação são a gasolina, o querosene e o óleo diesel que é destaque neste trabalho (FENIBO *et al.*, 2023).

O diesel, assim como o petróleo, é uma fonte energética muito utilizada mundialmente e, conseqüentemente, um poluente ambiental (GANESH; LIN, 2009; IMRON *et al.*, 2020a; LJEŠEVIĆ *et al.*, 2019). Sabe-se que cerca de 1.500 toneladas de diesel são liberadas nos oceanos a cada ano (TITAH *et al.*, 2018). Este derivado do petróleo é composto por alcanos, n-alcenos, cicloalcanos e HPAs, como o fenantreno (TIRALERDPANICH *et al.*, 2018). A partir desta descrição composicional é possível afirmar que o diesel é um composto tóxico, com potencial cancerígeno e que pode causar sérios danos ambientais, além de ser um composto que possui uma difícil degradação (IMRON; KURNIAWAN; TITAH, 2019).

Dentre as conseqüências causadas pela poluição com diesel é possível citar excesso da presença de óxidos de enxofre e nitrogênio no ar, contribuindo para a ocorrência de chuvas ácidas; sua combustão gera materiais particulados e sua exposição à saúde pode acarretar

problemas como a bronquite, infecções e doenças cardíacas (IMRON; KURNIAWAN; TITAH, 2019).

Neste contexto, como consequência da exploração do petróleo marinho, o alto tráfego de navios petroleiros, que utilizam diesel como combustível, e a existência de dutos marinhos subterrâneos para o transporte de petróleo e seus derivados, a contaminação de ecossistemas por hidrocarbonetos é uma preocupação mundial e é urgente o desenvolvimento de estratégias de mitigação dos impactos causados pelo petróleo, bem como seus hidrocarbonetos.

2.2 Acidentes envolvendo o derramamento de petróleo

O petróleo é um dos maiores recursos econômicos de um país e devido ao avanço da indústria de petróleo, acidentes envolvendo o derramamento deste produto é um sério problema ambiental (SHARMA; PANDEY, 2020). A distribuição do petróleo entre as nações é realizada principalmente por via marítima e diversos acidentes ocorreram ao longo dos últimos 50 anos, como o *Torrey Canyon* em 1967, *Exxon Valdez* em 1989, *Deepwater Horizon* em 2010 (CHEN *et al.*, 2019; GUTIERREZ *et al.*, 2013) e o mais recente ocorreu no Brasil, onde os primeiros vestígios de derramamento foram datados em 2019 (CRAVEIRO *et al.*, 2021).

Em março de 1967, na costa da Cornualha, o navio-tanque *Torrey Canyon* derramou cerca de 119.000 toneladas de petróleo bruto no mar, após uma colisão que danificou a estrutura do navio (CHEN *et al.*, 2019). O óleo despejado causou sérios problemas ambientais que levaram as autoridades do Reino Unido e da França a tomar medidas de controle e limpeza do óleo (HAWKINS *et al.*, 2017).

Visando a remediação do ambiente, a marinha rastreou e aplicou dispersantes no mar, além de pulverizar solventes orgânicos tóxicos no óleo encontrado na costa, dizimando grande parte dos herbívoros intermarés (HAWKINS *et al.*, 2017). Assim, neste acidente, cerca de 10.000 toneladas de dispersantes foram usadas para promover a limpeza de 14.000 toneladas de óleo, porém constatou-se que o petróleo derramado era menos poluente ao ambiente que os dispersantes utilizados, estimando-se que o ambiente contaminado demorou 10 anos para retornar ao estado pré-derramamento (HAWKINS *et al.*, 2017). Na Figura 1 é possível visualizar a aplicação dos agentes dispersantes pela população.

Figura 1 - Pessoas aplicando agentes dispersantes no petróleo derramado no acidente de *Torrey Canyon* em 1967.



Fonte: Divulgação / NBC News

Devido à grande quantidade de óleo derramado e as inúmeras sequelas ambientais e econômicas ocasionadas pelo acidente de *Torrey Canyon*, foi criado o Acordo Marítimo de Responsabilidade por Poluição por Óleo (MARPOL 73/78) e a Convenção internacional sobre Responsabilidade Civil por Danos por Poluição por Óleo (CLC69), objetivando a regulação e o desenvolvimento de diretrizes relacionadas às questões técnicas e legais associadas à segurança das águas contaminadas (CHEN *et al.*, 2019; HAWKINS *et al.*, 2017).

Já em 1989, ocorreu o acidente *Exxon Valdez* em Prince William Sound localizado no Alasca (Estados Unidos) que derramou cerca de 42 milhões de litros de petróleo que se espalhou pelo território costeiro do Golfo do Alasca (FUKUYAMA; SHIGENAKA; COATS, 2014). Nesse acidente, cerca de 44.000 km² de águas e 1.900 km de litoral foram contaminados por óleo (GILL; RITCHIE; PICOU, 2016). Na Figura 2 é possível visualizar a contaminação de uma pequena área da zona costeira por petróleo derramado pelo acidente em epígrafe neste parágrafo.

Figura 2 - Zona costeira contaminada por petróleo do acidente de *Exxon Valdez* em 1989.



Fonte: Divulgação / Herald Net

Diversas técnicas de limpeza foram aplicadas objetivando a remoção do óleo, como a remoção manual do petróleo nas rochas e lavagem com água do mar em altas temperaturas e pressão (LINDEBERG *et al.*, 2018). Porém, tais técnicas resultaram em prejuízos ambientais severos, no qual apenas 14 das 26 espécies afetadas obtiveram total recuperação após 25 anos do acidente, além de uma quantidade excessiva de resíduos sólidos produzidos, totalizando 33.000 toneladas (GILL; RITCHIE; PICOU, 2016; LINDEBERG *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que as técnicas aplicadas, além de danosas ao ambiente, foram ineficientes em relação ao tratamento do óleo, pois em 1997, ainda existia uma quantidade de óleo significativa nas localidades afetadas (NIXON; MICHEL, 2018).

Outro acidente com grande impacto aconteceu em abril de 2010 e decorreu da explosão da plataforma de perfuração *Deepwater horizon* localizada ao norte do Golfo do México (BEYER *et al.*, 2016). Estima-se que uma quantidade equivalente a 3,19 milhões de barris de petróleo foram derramados no oceano e centenas de milhares de toneladas de gases de hidrocarbonetos foram liberados, ocasionando a morte da vida marinha selvagem e impactando

diversos outros ecossistemas, como é possível visualizar na Figura 3 (BEYER *et al.*, 2016; WHITEHEAD *et al.*, 2012).

Figura 3 - Contaminação por óleo em pântano ocasionada pelo acidente do *Deepwater Horizon*.



Fonte: Whitehead *et al.* 2012.

Objetivando a mitigação dos danos causados pela poluição, dispersantes em águas profundas foram aplicados, gerando plumas ricas em hidrocarbonetos que, conseqüentemente, contaminou *habitats* de águas profundas (BEYER *et al.*, 2016). Além disso, a costa de diversos estados, como Alabama, Mississippi e Florida foram contaminadas devido às correntes marítimas associadas ao vento e às ondas, totalizando 2100 km de costa contaminadas (BEYER *et al.*, 2016).

Devido ao grande impacto ocasionado pelo acidente citado, a Administração Nacional Oceânica e Atmosférica (NOAA) e *Food and Drugs Administration* (FDA) estabeleceram um nível de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) em frutos do mar entre 35 a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o fechamento das áreas federais de pesca contaminadas por petróleo e, após um ano do *Deepwater Horizon*, avaliou-se o impacto do consumo de camarão contaminado à saúde humana (MELO *et al.*, 2022).

Acidentes envolvendo o despejo de petróleo também ocorreram no Brasil no período entre agosto de 2019 e janeiro de 2020, no qual óleo pesado de origem desconhecida foi

encontrado ao longo de 3000 km da costa Nordeste e parte da costa Sudeste, como pode ser observado na Figura 4 (CRAVEIRO *et al.*, 2021; LOURENÇO *et al.*, 2020).

Figura 4 - Localidades afetadas pelo óleo de origem desconhecida ao longo da costa Brasileira (Em verde).



NBC: Corrente Norte do Brasil; SEC: Corrente Sul Equatorial; BC: Corrente do Brasil.

Fonte: Lourenço *et al.* 2020

A origem do óleo que afetou a costa brasileira é misteriosa, porém, estudos relatam que há uma semelhança química entre o material oleoso encontrado e o petróleo oriundo da Bacia Venezuelana (AZEVEDO *et al.*, 2022; REDDY *et al.*, 2022). Foi relatado também, que as autoridades brasileiras concluíram que o responsável pelo derramamento datado em 2019 foi um navio petroleiro grego (AZEVEDO *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2022). Em janeiro de 2022,

outro derramamento foi detectado, no qual cerca de 8 mil litros de óleo foram encontrados nas praias do estado no Ceará, Brasil (AZEVEDO *et al.*, 2022).

Os impactos ambientais causados nas regiões de mangues, estuários, praias e recifes de corais ainda estão sendo datados (MAGALHÃES *et al.*, 2022). Porém, sabe-se que foi o maior derramamento ocorrido na costa Sul-Americana bem como nos oceanos tropicais, superando os impactos causados por grandes acidentes, como o ocorrido no Golfo do México, devido à extensão geográfica afetada e as consequências socioambientais desencadeadas (AZEVEDO *et al.*, 2022; MAGALHÃES *et al.*, 2021).

De acordo com a Agência Federal Brasileira de Proteção ao Meio Ambiente (IBAMA), relatou que em 2019, 159 animais foram contaminados, no qual 112 morreram, sendo 105 tartarugas (ZACHARIAS; GAMA; FORNARO, 2021). Além disso, outras aves e mamíferos marinhos também foram afetados (GUSMAO *et al.*, 2021). Sabe-se que 27 espécies estão em situação de vulnerabilidade devido à contaminação do petróleo (GUSMAO *et al.*, 2021; LOURENÇO *et al.*, 2020). No mais, mais de 5.000 toneladas de óleo brutos foram coletadas em um período de cinco meses e os impactos causados por este derramamento foram severos e imediatos, matando diversos animais marinhos, como tartarugas, golfinhos, aves e animais invertebrados (CRAVEIRO *et al.*, 2021).

As manchas de óleo também causaram consequências socioeconômicas significativas, afetando a comunidade pesqueira e o turismo, tendo em vista que o comércio e o consumo de moluscos, peixes e mariscos, além da utilização das praias, foram severamente impactados (LOURENÇO *et al.*, 2020; MAGALHÃES *et al.*, 2021). Além disso, a má atuação do governo federal brasileiro na implementação do plano de contingência resultou na atuação de civis na remoção do óleo, ocasionando na exposição da população ao contaminante e, consequentemente, à possíveis danos à saúde (ZACHARIAS; GAMA; FORNARO, 2021). Então, os derramamentos de óleo em ambientes oceânicos, acentuam a necessidade de estratégias de mitigação para o tratamento destes hidrocarbonetos liberados.

2.3 Abordagens para a biorremediação de petróleo

Os hidrocarbonetos podem ser remediados através de métodos físicos, químicos e biológicos (IMRON *et al.*, 2020b). O método físico envolve o uso de equipamentos caros, enquanto o químico, apesar de eficiente, gera resíduos prejudiciais ao ambiente e à saúde humana, tornando a aplicação de tais métodos inviáveis ou impróprios (IMRON *et al.*, 2020a; ZHANG, L. *et al.*, 2018).

Deste modo, métodos que envolvam o uso de microrganismos são preferíveis por poderem ser aplicados em grandes áreas contaminadas, além de ser considerado um tratamento efetivo (IMRON *et al.*, 2020a; IMRON; KURNIAWAN; TITAH, 2019; TIRALERDPANICH *et al.*, 2018). A biorremediação do petróleo e seus derivados pode ocorrer de maneira *ex situ* ou *in situ* (HUSSAIN *et al.*, 2022).

A biorremediação *ex situ* ocorre fora do local onde ocorreu a poluição, permite uma remoção mais eficiente dos poluentes, pois proporciona o controle dos parâmetros físico-químicos e pode ser exemplificada através das seguintes técnicas: uso de biorreatores para limpeza e lavagem do solo com biossurfactantes (DZIOONEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016; HUSSAIN *et al.*, 2022).

Já a biorremediação *in situ* ocorre no local onde ocorreu a contaminação, é utilizada, principalmente, quando a área afetada pelo contaminante é extensa e suas principais técnicas envolvem a atenuação natural, *landfarming*, bioaugmentação e a bioestimulação (DZIOONEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016; HUSSAIN *et al.*, 2022).

Apesar das vantagens da biorremediação *ex situ*, como o controle de parâmetros operacionais, a abordagem *in situ* é preferida, pois não há a transferência do contaminante e o tratamento pode ser realizado no local afetado (DECESARO *et al.*, 2017). Porém, é importante que os microrganismos envolvidos apresentem potencial catabólico viável e das características tóxicas do poluente (DECESARO *et al.*, 2017). Dentre as abordagens *in situ* principais é possível citar a bioaugmentação e a bioestimulação (DELLAGNEZZE *et al.*, 2016).

A bioaugmentação refere-se ao uso de microrganismos específicos ao local contaminado, objetivando otimizar o processo de biodegradação (MUTHUKUMAR *et al.*, 2023). Esta abordagem microbiológica é indicada em casos em que a população bacteriana nativa não é capaz de degradar o contaminante ou quando esta comunidade está sendo inibida pelo poluente (SUN *et al.*, 2021). Para a aplicação ambiental deste método, é necessário que os microrganismos envolvidos obedeçam a condições, sendo elas: degradar a maior parte do petróleo e seus componentes, manter a viabilidade genética durante o processo de biorremediação, sobreviver em ambientes fora da sua origem natural, poluídos, manter a competitividade com microrganismos nativos e não ser patogênico (SUN *et al.*, 2021).

Na literatura é relatado que o uso de consórcios bacterianos pode contribuir com uma biorremediação mais eficiente, no qual é possível obter um percentual de 85% de degradação do petróleo em cinco semanas, revelando a vantagem do uso destas combinações frente ao uso de cepas isoladas (BANET *et al.*, 2021).

A bioestimulação refere-se à adição de nutrientes ou de compostos tensoativos, como os biossurfactantes, ao local, promovendo a estimulação da microbiota nativa e, deste modo, melhorando a biodegradação do contaminante (DELLAGNEZZE *et al.*, 2016). Esse método é utilizado para acelerar processos *in situ*, pois a bioestimulação modifica os parâmetros físicos e químicos do ambiente, através da adição de fontes de substratos ou aceptores de elétrons (DZIOEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016).

A aplicação de biossurfactantes ao ambiente contaminado é tida como uma estratégia *in situ* de biorremediação, tendo em vista que estes biotensoativos podem atuar como bioestimulantes, pois melhoram a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos para as bactérias hidrocarbonoclásticas (DECESARO *et al.*, 2017; GÓNGORA *et al.*, 2022). Além disso, sabe-se que os biossurfactantes são naturalmente produzidos nos processos *in situ*, porém não são quantificados ou identificados (DECESARO *et al.*, 2017).

2.4 Bactérias hidrocarbonoclásticas

2.4.1 Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos

As bactérias hidrocarbonoclásticas são microrganismos capazes de degradar e utilizar hidrocarbonetos como substrato, são geralmente encontrados em ambientes marinhos e podem ser aplicados em processos de biorremediação (HASSANSHAHIAN; AMIRINEJAD; ASKARINEJAD BEHZADI, 2020). Diversos gêneros de espécies de microrganismos estão associados à degradação de hidrocarbonetos, como *Alcanivorax*, *Bacillus*, *Cycloclasticus*, *Gordonia*, *Marinobacter*, *Oleispira*, *Rhodococcus* e *Thalassolituus* (HASSANSHAHIAN; AMIRINEJAD; ASKARINEJAD BEHZADI, 2020; SADRAZODI *et al.*, 2019).

Neste trabalho, destaca-se a cepa *Alcanivorax* sp. FOR1501, uma nova espécie de bactéria que foi isolada do óleo pesado encontrado na costa Nordeste do Brasil no Lembiotech, localizado na Universidade Federal do Ceará (COSTA, 2023).

2.4.2 O gênero *Alcanivorax*

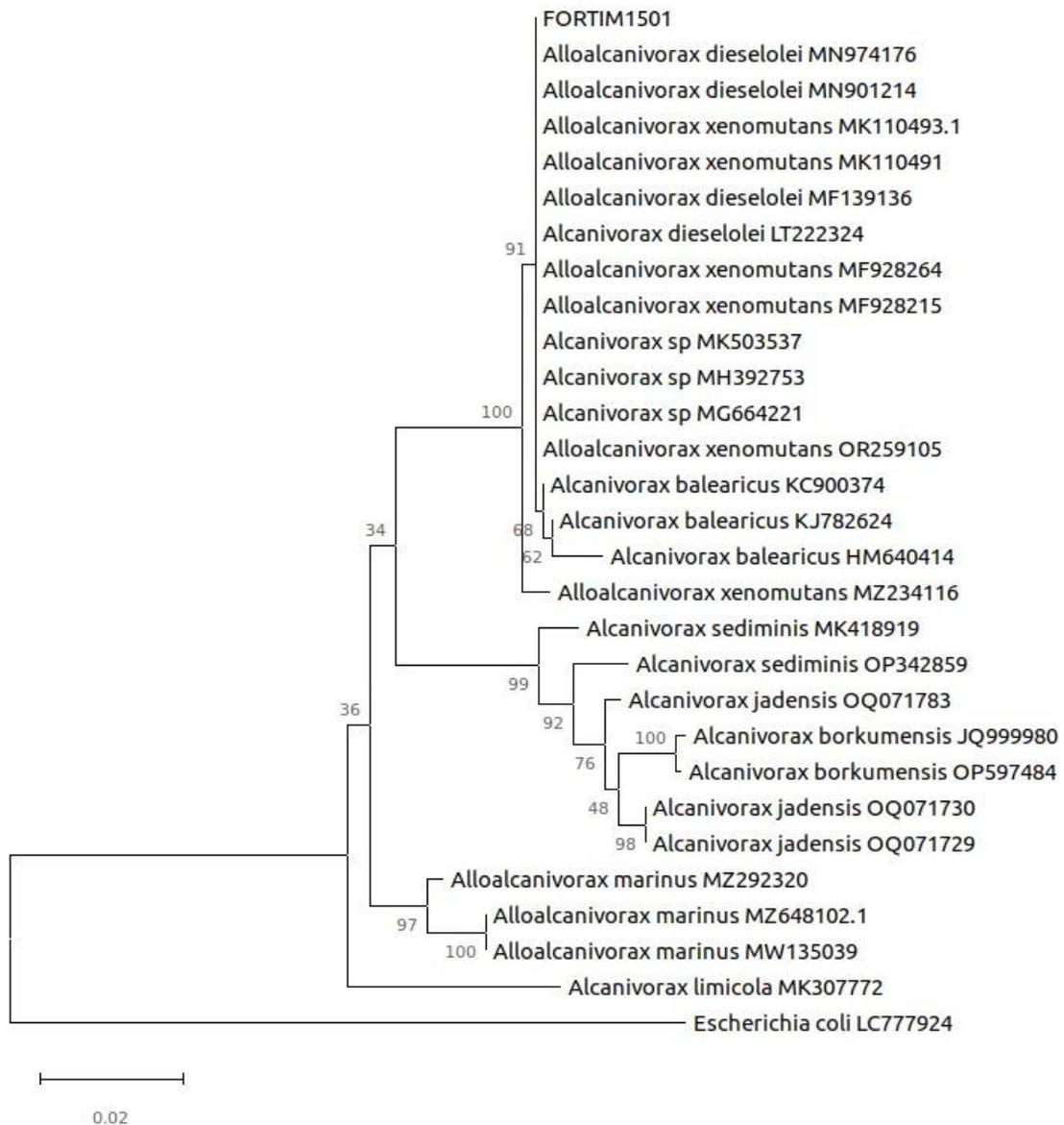
O gênero *Alcanivorax* é conhecido por agrupar bactérias hidrocarbonoclásticas e está presente em ambientes marinhos, como zonas costeiras, de mar profundo e em sedimentos (ZHU *et al.*, 2022). De acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), 15 espécies foram registradas ao redor do mundo, incluindo *A. borkumensis*, *A. dieselolei*, *A. nanhaiticus*, *A. pacificus*, *A. jadensis*, *A. mobilis*, *A. marinus*, *A. gelathinipagus*, *A. indicus*, *A. pacificus*, *A. profundis*, *A. hongdegensis*, *A. profundimaris*, *A. sediminis*, *A. venustensis* e *A. xenomutans* (CAO *et al.*, 2022; DONG *et al.*, 2021).

Bactérias do gênero *Alcanivorax* caracterizam-se por serem Gram-negativas, aeróbicas, halófitas, capazes de metabolizar alcanos de cadeia curta e longa e de produzir biossurfactantes através da via metabólica da β -oxidação (CAMPOS *et al.*, 2015; ZADJELOVIC *et al.*, 2022). Este gênero, também se caracteriza pelo potencial em atuar como um biossensor destinados ao monitoramento de compostos aromáticos e alifáticos em processos *in situ* de biorremediação (LIU; SHAO, 2005).

Deste modo, é possível utilizar estes microrganismos para diversas aplicações biotecnológicas, incluindo a biorremediação de petróleo em casos de derramamento e a produção de compostos ativos de superfície (RIZZO *et al.*, 2021; SHAIKHULOVA *et al.*, 2021). Além disso, estes microrganismos são capazes de liberar esterases específicas que são eficientes para a biodegradação de bioplásticos, como o polibutileno succinato (PBS) e policaprolactona (PCL) (CAO *et al.*, 2022).

A partir da amostra do óleo pesado encontrado em Fortim, Ceará, Brasil, a espécie *Alcanivorax* sp. FOR1501, foi isolada e, utilizando rRNA 16S foi construída uma árvore filogenética para averiguar a similaridade desta cepa com outras espécies do mesmo gênero, conforme a Figura 5 (CASTRO, 2023).

Figura 5 - Árvore filogenética construída com as sequências do gene rRNA 16S de *Alcanivorax* sp. FOR1501, usando o método de Neighbor-Joining com distâncias de Tamura-Nei (NJ-TN) e 1000 réplicas de bootstrap.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

A partir da Figura 5, observa-se que a cepa de *Alcanivorax* sp. FOR1501 foi agrupada no mesmo clado com as espécies *Alcanivorax balearicus*, *Alcanivorax xenomutans* e *Alcanivorax dieselolei* (CASTRO, 2023). Deste modo, por se tratar de um novo isolado cuja maior parte dos seus aspectos morfológicos e de cultivo ainda são desconhecidas, é importante avaliar e sumarizar as características principais das espécies agrupadas no mesmo clado que *Alcanivorax* sp. FOR1501.

A espécie *A. balearicus* caracteriza-se por ser Gram-negativa, aeróbica, forma de bastonete (1,1-1,3 x 0,6-0,8 μm), móvel através de flagelo polar ou subpolar, halotolerante, capaz de metabolizar glicose e L-arabinose, possui crescimento em uma faixa de temperatura de 4 a 37 °C e em uma faixa de pH de 5,5 a 9. As colônias obtidas por esta cepa são lisas com coloração branco-creme, opacas, mucóides e exibem iridescência verde-azulada em meio contendo tween incubadas por 5 dias a 28 °C (RIVAS *et al.*, 2007).

A. xenomutans caracteriza-se por ser Gram-negativa, aeróbica, possui forma de bastonete, requer uma faixa de NaCl de 0,5% a 20% (m/v) e faixa de temperatura de 25 °C a 40 °C para crescimento, incapaz de metabolizar glicose como substrato. Esta espécie é capaz de se reproduzir em meio mínimo contendo óleo diesel, octano, hexano, tolueno, benzeno ou xileno como únicas fontes de carbono. Porém, não suportam hidrocarbonetos aromáticos nitrogenados e halogenados como substratos (RAHUL *et al.*, 2014).

A espécie *A. dieselolei*, cuja nomenclatura faz alusão ao óleo diesel, pois o único substrato utilizado no processo de isolamento deste microrganismo foi o óleo diesel, caracteriza-se por não formar esporos, possuir células de 0,8-2,0 μm de comprimento e 0,3-0,7 μm de largura, a morfologia de bastonete, temperatura de crescimento que varia de 15 °C a 45 °C, exige a presença de NaCl para o crescimento, podendo a concentração deste sal variar de 1 a 15% no meio de cultura e não utiliza carboidratos como fonte de carbono. Além disso, *A. dieselolei* pode ser encontrada em zonas marinhas costeiras e pelágicas, degrada ativamente cadeias carbônicas C₆-C₃₆, alcanos ramificados e é capaz de produzir um biossurfactante do tipo lipopeptídeo (LAI; LI; SHAO, 2012; WANG; SHAO, 2014). É importante destacar que o processo de catabolismo de hidrocarbonetos por bactérias hidrocarbonoclásticas é composto por um complexo sistema de alcano monooxigenase que será detalhado no Tópico 2.4.3.

Deste modo, é notório o potencial das espécies *A. balearicus*, *A. xenomutans* e *A. dieselolei* em processos de biodegradação de hidrocarbonetos e de produção de biossurfactantes, indicando que *Alcanivorax* sp. FOR1501 é uma candidata promissora para a mitigação dos impactos gerados no acidente que ocorreu na zona costeira do Brasil em 2019, 2020 e 2022.

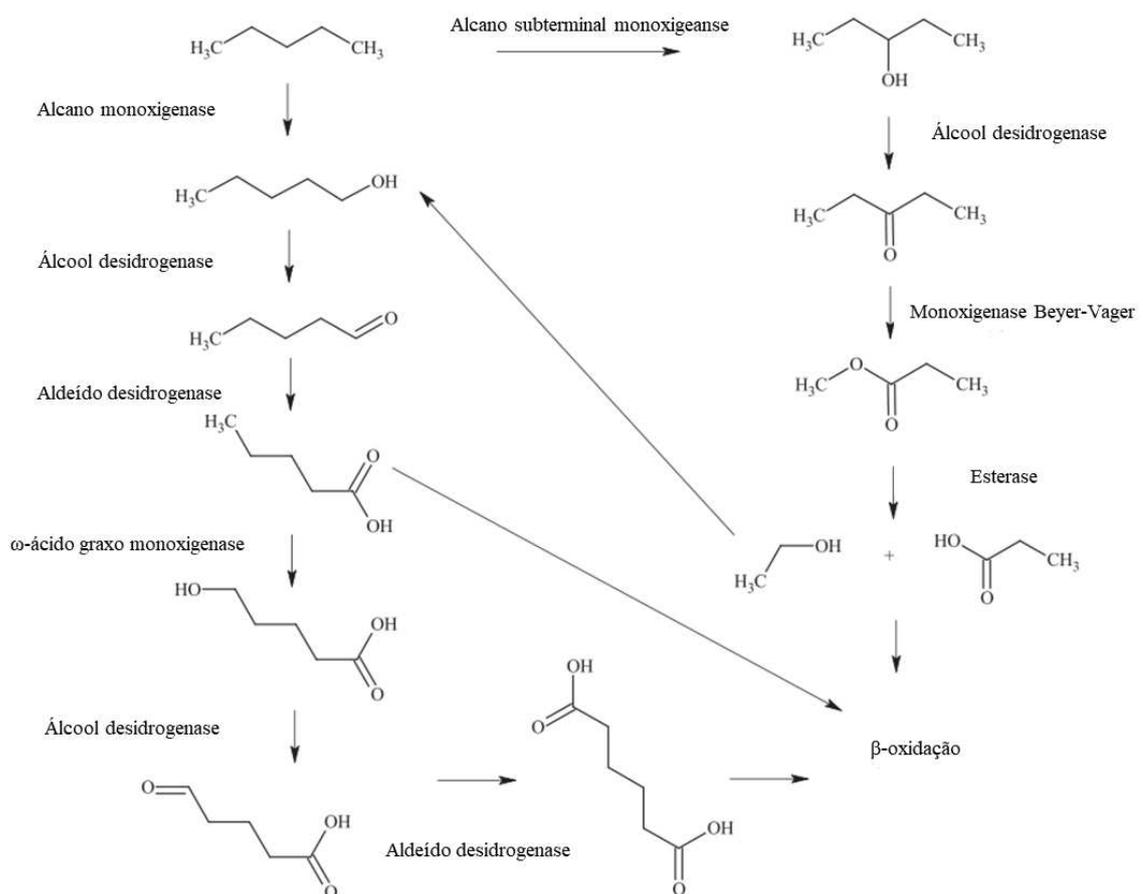
2.4.3 Metabolismo de bactérias hidrocarbonoclásticas

O metabolismo de hidrocarbonetos por bactérias envolve a via metabólica da β -oxidação e a ação das enzimas monooxigenases e dioxigenases (AL-HAWASH *et al.*, 2018; KOTOKY; OGAWA; PANDEY, 2022). A metabolização de alcanos e compostos poliaromáticos ocorrem de formas distintas, no qual a degradação de alcanos envolve a enzima monooxigenase, e os

compostos poliaromáticos envolvem a atividade da enzima dioxigenase e podem ser clivados em diferentes regiões, resultando em intermediários de via distintos (IMRON *et al.*, 2020b).

O processo de metabolização de n-alcenos ocorre em condições aeróbicas, no qual um átomo de oxigênio é adicionado ao carbono terminal ou subterminal, convertendo este composto em um álcool. Este álcool resultante da reação anterior será transformado em aldeído e, posteriormente, em ácido graxo, através da atuação da enzima álcool desidrogenase. Então, a coenzima A irá reagir com o ácido graxo para a produção de acetil-CoA na via da β -oxidação. Por fim, a molécula de acetil-CoA produzida irá seguir através da via metabólica central para a produção de adenosina trifosfato (ATP) (CHIKERE; OKPOKWASIL; CHIKERE, 2011; IMRON *et al.*, 2020b). A Figura 6 esquematiza este processo metabólico.

Figura 6 - Mecanismo de biodegradação de alcanos

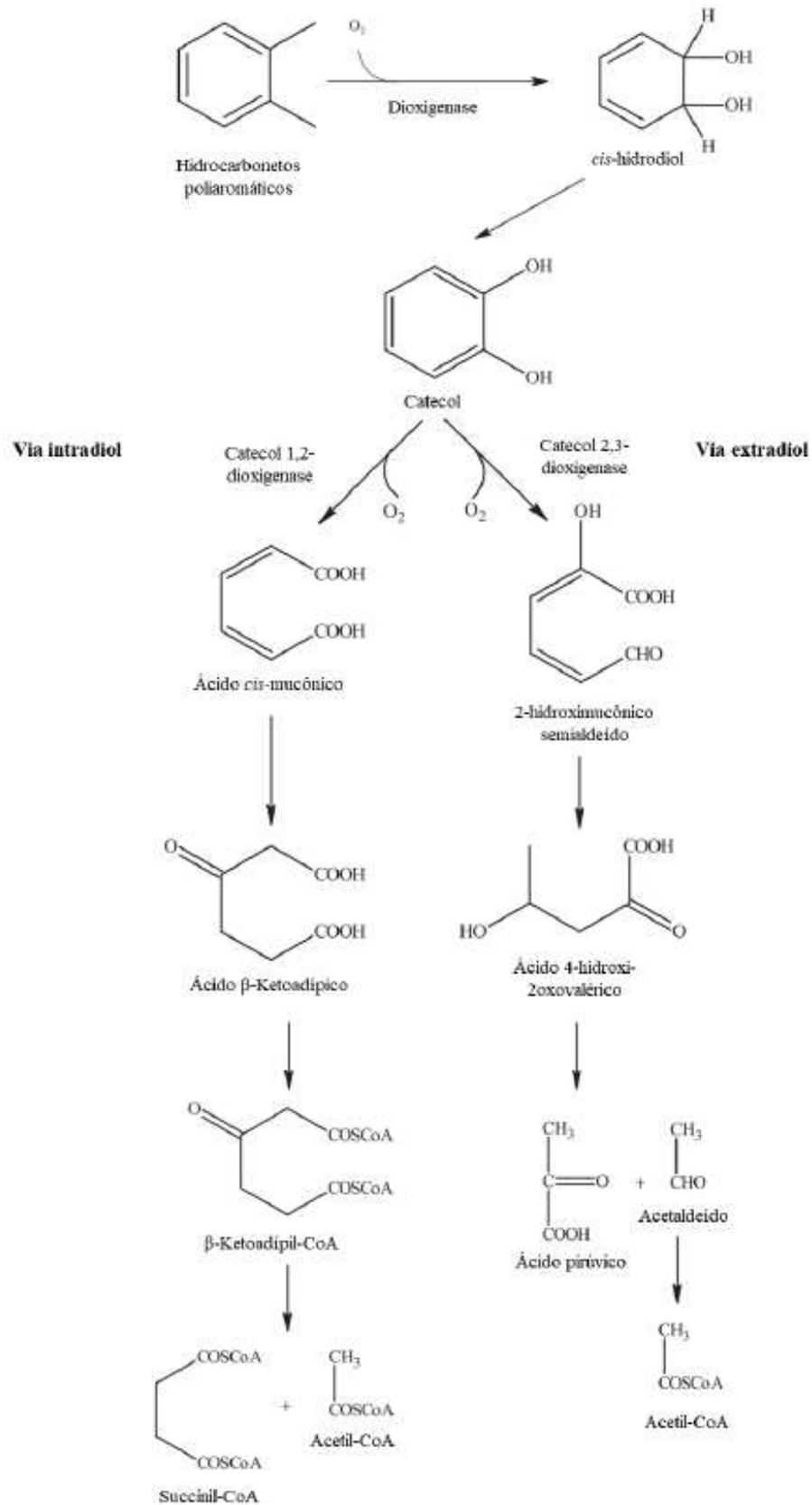


Fonte: Traduzido de IMRON *et al.* (2020b)

Já a metabolização de compostos poliaromáticos ocorre a partir da união de dois átomos de oxigênio ao anel benzênico a partir da ação da dioxigenase, gerando o cis-benzeno dihidrodiol, que, por sua vez, será convertido em catecol pela enzima cis-diol desidrogenase. A

molécula de catecol é quebrada, através da clivagem que pode ocorrer em duas regiões distintas pelas enzimas intradiol dioxigenase e extradiol dioxigenase, gerando cis-ácido mucônico e semialdeído 2-hidroximucônico, respectivamente. Estes compostos são moléculas de cadeia linear, cujas reações sucessoras são semelhantes ao do metabolismo de alcanos (IMRON *et al.*, 2020b). A Figura 7 esquematiza o mecanismo de degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos por microrganismos.

Figura 7 - Mecanismo de biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos



Fonte: Traduzido IMRON *et al.* (2020b)

É importante ressaltar que a metabolização de alcanos é rigidamente regulada, garantindo que a expressão dos genes envolvidos nestas vias metabólicas sejam ativadas somente na presença destes compostos (ROJO, 2010). Além disso, os hidrocarbonetos não são os substratos preferíveis pela maior parte dos microrganismos, podendo haver a inibição da via de degradação de alcanos quando há a presença de outros substratos (ROJO, 2010).

Ademais, a partir da via de β -oxidação do metabolismo é possível, também, a produção de compostos ativos de superfície como produto do metabolismo (ZADJELOVIC *et al.*, 2022). Relata-se na literatura que o gênero *Alcanivorax* produz um biossurfactante do tipo lipopeptídeo que auxilia na biodisponibilidade, ou seja, absorção do petróleo pela bactéria, influenciando, deste modo, no processo de biodegradação de compostos hidrofóbicos (WANG; SHAO, 2014).

2.5 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por diversas espécies de bactérias e fungos, possuem diferentes classes e subclasses, e, devido às suas propriedades tensoativas, apresentam uma ampla gama de aplicações em diversos setores industriais (CAROLIN *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2013; NG *et al.*, 2022; VIEIRA *et al.*, 2021)

Os biossurfactantes podem ser classificadas como lipopeptídeos, glicolipídeos, fosfolipídeos e surfactantes poliméricos (JAHAN *et al.*, 2020; SARUBBO *et al.*, 2022). Dentro desta classificação é possível categorizá-las em subclasses, no qual é possível citar surfactina, que faz parte do grupo dos lipopeptídeos; rhamnolipídeos, trehalolipídeos, soforolipídeos, pertencentes à classe dos glicolipídeos; alasan e emulsan que são surfactantes poliméricos (GAUR *et al.*, 2022; SARUBBO *et al.*, 2022). Na Tabela 1 é possível visualizar alguns exemplos de microrganismos produtores de biossurfactantes de acordo com sua classe correspondente.

Tabela 1 - Microrganismos produtores de biossurfactantes

Classe	Subclasse	Microrganismo	Referência
Lipopeptídeo	Surfactina	<i>Alcaligenes aquatilis</i>	Yalaoui-Guellal <i>et al.</i> , 2021
		<i>Bacillus subtilis</i>	Jahan <i>et al.</i> , 2020; Felix <i>et al.</i> , 2019
		<i>Micromonospora marina</i>	Ramalingam <i>et al.</i> , 2019
Glicopeptídeo	Rhamnolipídeo	<i>Pseudomonas</i> sp.	Gaur <i>et al.</i> , 2022; Rocha <i>et al.</i> , 2007
	Soforolipídeo	<i>Candida bombicola</i>	Ohadi <i>et al.</i> , 2020

	Trehalolípídeo	<i>Nocardia erythropolis</i>	Kashif <i>et al.</i> , 2022
Fosfolípídeo		<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Sarubbo <i>et al.</i> , 2022
Surfactante	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Abbot <i>et al.</i> , 2022
polimérico	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Tripathi <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os biossurfactantes são considerados anfífilicos, ou seja, possuem em sua estrutura uma porção polar e uma porção apolar (JAHAN *et al.*, 2020). A porção apolar é composta, principalmente, por hidrocarbonetos, enquanto a porção polar podem ser moléculas catiônicas, aniônicas, não iônicas ou anfotéricas (SARUBBO *et al.*, 2022). É esta característica anfipática que promove aos biossurfactantes suas propriedades tensoativas, como capacidade emulsificante ou desemulsificante, alteração da tensão superficial e da solubilidade (ABBOT *et al.*, 2022; SARUBBO *et al.*, 2022).

Estes compostos, por apresentarem estas propriedades, possuem grande relevância em diversos setores industriais, sendo aplicados para diversos fins na indústria farmacêutica, agrícola, alimentícia e cosmética (ABBOT *et al.*, 2022). Além disso, estes compostos podem atuar também em processos de biorremediação, melhorando o processo de biodegradação por microrganismos e atuando na dispersão de óleo em casos de derramamento (CAROLIN *et al.*, 2023; RIZZO *et al.*, 2021; ZHANG; FENG; XUE, 2022). A Tabela 2 sumariza diversas aplicações industriais para os biossurfactantes.

Tabela 2 - Possíveis aplicações dos biossurfactantes nos diversos setores industriais.

Setor industrial	Aplicações	Função do biossurfactante
Farmacêutica	Controle microbiológico e terapêutico	Agente antiadesivo, antifúngico, antibacteriano, antiviral, terapia gênica e vacinas
Agrícola	Controle biológico e fertilização de plantas	Umectação, dispersão, emulsificação de soluções pesticidas e aumento da biodisponibilidade de nutrientes para microrganismos benéficos às plantas
Alimentícia	Emulsificação de ingredientes funcionais	Solubilização de aromatizantes, controle de consistência, agente umectante, espumante, espessante e detergente
Cosmética	Produtos de saúde e beleza	Emulsificação, agentes espumantes, solubilizantes, umectantes, limpadores, antimicrobianos, antioxidantes, hidratantes, cicatrizantes e tonificantes

Petróleo	Recuperação avançada de petróleo e transporte	Emulsificação, redução da tensão superficial, desemulsificação e redução da viscosidade do óleo
Ambiental	Biorremediação de solos, contaminações por metais pesados e derramamentos de óleo	Emulsificação, desemulsificação, redução da tensão superficial, dispersão, solubilização, mobilização e dessorção

Fonte: Adaptado de Abbot *et al.* (2022); Sarubbo *et al.* (2022)

O uso dos biossurfactantes possuem diversas vantagens frente ao uso dos surfactantes sintéticos, no qual se destaca a baixa ou nenhuma toxicidade, maior biodegradabilidade, uso de substratos renováveis, de baixo custo e alta atividade de superfície em baixas concentrações (HAZRA; KUNDU; CHAUDHARI, 2015; JAHAN *et al.*, 2020; GIRO *et al.*, 2009).

Contudo, apesar de eficiente em processos de biorremediação, os biossurfactantes possuem altos custos de produção em comparação aos surfactantes sintéticos, o que indica um gargalo para sua aplicação no setor ambiental (GAUR *et al.*, 2022; VIEIRA *et al.*, 2021). Além disso, outro obstáculo é a implementação efetiva deste bioproduto no mercado mundial devido aos altos custos de produção, baixos rendimentos, dificuldades de otimização e processos *downstream* ineficientes (VIEIRA *et al.*, 2021). Por isso, é interessante o uso de microrganismos mutantes ou recombinantes, matérias-primas de baixo custo e otimização de processos fermentativos, objetivando que esta biomolécula se torne economicamente competitiva no mercado (ABBOT *et al.*, 2022; KASHIF *et al.*, 2022; VIEIRA *et al.*, 2021).

Tendo em vista que a complexidade do meio nutricional é um fator importante para otimizar a produção de biossurfactantes e, conseqüentemente, a sua aplicação em larga escala, é possível utilizar diversos substratos oriundos de fontes renováveis ou resíduos de diferentes setores industriais (KASHIF *et al.*, 2022; SARUBBO *et al.*, 2022; VIEIRA *et al.*, 2021). Dentre essas matérias-primas é possível citar malte, melão, suco de caju, petróleo e seus derivados, óleo de cozinha e gordura animal que podem ser usados como fontes de carbono e a ureia, aminoácidos e extrato de levedura que são utilizados como fonte de nitrogênio (ROCHA *et al.*, 2007; SARUBBO *et al.*, 2022).

Deste modo, é notória a importância do estudo de produção de biossurfactantes por uma cepa de *Alcanivorax* sp. FOR1501 isolada do óleo pesado encontrado na região Nordeste do Brasil, utilizando hidrocarbonetos derivados do petróleo como fonte de carbono para aprimorar os processos de biorremediação destes compostos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Fontes de carbono

O petróleo utilizado nos experimentos de biodegradação é proveniente do material oleoso encontrado na costa do Nordeste do Brasil em 2019. A amostra foi coletada na praia de Icaraí de Amontada, Ceará, Brasil (3° 01' 25'' S - 39° 38' 47,3'' W), acondicionado em frascos estéreis e transportados para o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBiotech) pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

O diesel foi obtido comercialmente em um posto de gasolina localizado em Fortaleza, Ceará, Brasil e a glicose foi adquirida da Dinâmica Química Contemporânea.

Os demais compostos químicos utilizados neste trabalho apresentam grau analítico, sendo adquiridos de empresas que comercializam produtos químicos.

3.1.2 Bactéria hidrocarbonoclástica

Nos experimentos realizados neste trabalho, utilizou-se a bactéria hidrocarbonoclástica da espécie *Alcanivorax* sp. FOR1501, isolada através do enriquecimento da amostra de óleo proveniente do derramamento que ocorreu na costa do Nordeste do Brasil em 2019, mais especificadamente na praia de Fortim, Ceará, Brasil (4° 25' 24,4''S – 37° 46' 13,7''W) pelo Lembitech. A cultura encontra-se armazenada em meio Triptona-Glicose-Extrato de Levedura suplementado com 3% (m/v) de cloreto de sódio (TGE-salino) e pH 6,0 contendo glicerol 20% (v/v) a -20 °C e -80 °C. Este meio é composto por 5 g/L de triptona, 1 g/L de glicose, 2,5 g/L de extrato de levedura e 30 g/L de cloreto de sódio (CASTRO, 2023).

A cepa possui sequência depositada no GenBank, podendo ser visualizada através do número de acesso MK503537.1.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do inóculo da bactéria hidrocarbonoclástica

Inicialmente, a cepa que estava armazenada a temperatura de -20°C foi reativada em 20 mL de TGE-salino a 35 °C, 150 rpm por um período de 7 dias. Após o desenvolvimento da cultura, foi realizado o plaqueamento do microrganismo utilizando a técnica de esgotamento

em quadrantes em TGE-salino contendo ágar 1,5% (m/v), visando verificar a pureza do estoque e a obtenção de colônias isoladas.

Então, o equivalente a 6 colônias isoladas foi inoculado em Erlenmeyer de 250 mL, preenchido com 100 mL de caldo sintético TGE-Salino. Deste modo, a bactéria *Alcanivorax* sp. FOR1501 foi cultivada e, posteriormente, incubada a 35 °C e 150 rpm em agitador orbital (Tecnal – TE 422, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 7 dias.

As células foram separadas por centrifugação a 10.000 g por 15 minutos, ressuspensas em 20 mL de solução salina (0,9% (m/v) de NaCl) e homogeneizadas com o auxílio de um agitador vórtex. Este processo foi repetido mais 2 vezes, objetivando obter uma suspensão microbiana livre de resíduos do meio de cultivo. Posteriormente, a densidade óptica foi ajustada para 0,5 com o auxílio de equipamento espectrofotômetro (GENESIS™, EUA), utilizando um comprimento de 600 nm, obtendo-se uma suspensão com concentração de $2,26 \times 10^9$ UFC/mL.

3.2.2 Ensaio de biodegradação do petróleo e seus derivados

3.2.2.1 Bioprocesso de degradação do petróleo e seus derivados

O meio utilizado nos ensaios biodegradação foi o meio mineral Bushnell Haas (MBH) suplementado com 3% (m/v) de NaCl (MBH-salino), cuja composição está descrita na Tabela 3, com pH ajustado para 6,0 usando HCl 0,1 mol/L ou NaOH 0,1 mol/L. O MBH-salino foi esterilizado por processo de autoclavagem a 120 °C por 15 minutos. Os processos de biodegradação foram realizados em Erlenmeyers de 50 mL contendo 20 mL de MBH-salino contendo 1% de fonte de carbono e o inóculo microbiano foi padronizado em 1% (v/v) da cultura de *Alcanivorax* sp. FOR1501 com absorbância ajustada para 0,5.

Tabela 3 - Composição do meio mineral Bushnell Haas salino (MBH-salino).

Composto	Concentração (g/L)
Cloreto de sódio	30,0
Sulfato de magnésio	0,20
Cloreto de Cálcio	0,02
Fosfato de potássio monobásico	1,00
Fosfato de potássio bibásico	1,00
Nitrato de amônio	1,00
Cloreto de ferro	0,05

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Neste ensaio, avaliou-se a biodegradação dos seguintes hidrocarbonetos: 1% (m/v) petróleo com glicose na proporção de 1:1 (m/m), 1% (m/v) de petróleo e 1% (v/v) de diesel. O diesel foi previamente filtrado em membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) e o petróleo foi esterilizado por processo de autoclavagem a 120 °C por 30 minutos.

Os ensaios foram realizados em triplicata e conduzidos em agitador orbital a 35 °C e 150 rpm, no qual avaliou-se o período de 21 e 28 dias. Além disso, também foi avaliado o grupo controle que consistia no meio mineral com mesma formulação, porém sem a presença de células. Os hidrocarbonetos residuais foram extraídos para a realização do ensaio gravimétrico e de cromatografia gasosa, Tópico 3.2.2.3 e Tópico 3.2.6.2, respectivamente. Além disso, os mesmos parâmetros de cultivo foram utilizados para avaliar a produção de compostos ativos de superfície no intervalo de 21 dias.

3.2.2.2 Extração dos hidrocarbonetos residuais

Após o ensaio de biodegradação as culturas e o grupo controle passaram por um processo de extração de hidrocarbonetos residuais. Deste modo, os hidrocarbonetos foram extraídos por extração líquido-líquido utilizando hexano como solvente na proporção de 2:1 (v/v) até a exaustão da matriz. As fases foram separadas usando um funil de separação. Então, a fase orgânica foi coletada e deixada em capela de exaustão, objetivando a completa evaporação do solvente orgânico.

3.2.2.3 Avaliação da biodegradação dos hidrocarbonetos

Os percentuais de biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo pesado e no óleo diesel S-10 nos períodos de 21 e 28 dias foram obtidos por análise gravimétrica e por cromatografia gasosa. A análise gravimétrica foi realizada após a extração dos hidrocarbonetos residuais, de acordo com a metodologia descrita por Mnif *et al.* (2017). Tal método consiste na pesagem dos hidrocarbonetos antes do ensaio de biodegradação e na pesagem dos hidrocarbonetos residuais extraídos em condições abióticas (controle) e bióticas (na presença de *Alcanivorax* sp. FOR1501), o percentual de degradação calculado através da Equação 1,

$$HD(\%) = \left(\frac{HR_a - HR_b}{H} \right) \times 100 \quad (1)$$

sendo:

HD% = percentual de degradação de hidrocarboneto

HR_a = peso do hidrocarboneto residual no controle (MBH-salino)

HR_b = peso do hidrocarboneto residual obtido a partir do ensaio de biodegradação

H = peso do hidrocarboneto inicialmente adicionado ao ensaio de degradação

Após a realização do método analítico de cromatografia gasosa com espectrômetro de massas acoplado, descrito no Tópico 3.2.6.2, foram obtidos perfis de faixas carbônicas. As áreas relativas adquiridas a partir destes perfis foram utilizadas para o cálculo do percentual de biodegradação das faixas carbônicas analisadas neste trabalho, conforme a Equação 2,

$$\text{Percentual de biodegradação} = \left[1 - \left(\frac{ARB-ARC}{ARC} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

sendo:

ARB: Área relativa da faixa carbônica após o processo de biodegradação

ARC: Área relativa da faixa carbônica do grupo controle (ausente de microrganismos)

3.2.3 Ensaio de hidrofobicidade da superfície celular

Objetivando correlacionar o grau de aderência das células de *Alcanivorax* sp. FOR1501 aos compostos hidrofóbicos avaliados neste trabalho com o processo de biodegradação, foi realizado o ensaio de hidrofobicidade da superfície celular, cuja metodologia foi descrita por Khan *et al.* (2017).

O percentual de hidrofobicidade foi obtido através do cultivo do inóculo de *Alcanivorax* sp. FOR1501 em meio sintético TGE-Salino a 35 °C, 150 rpm, durante 3 dias. Após esse período, o inóculo foi precipitado por centrifugação a 10.000 g por 15 minutos e ressuspenso em 20 mL de solução fisiológica estéril com o auxílio de um agitador vórtex. Este processo foi repetido mais 2 vezes, obtendo-se, deste modo, uma suspensão microbiana.

Então, a densidade óptica da suspensão microbiana foi medida, utilizando espectrofotômetro a um comprimento de onda (λ) de 600 nm. Posteriormente, foi aliqotado em condições estéreis um volume de 1,5 mL da suspensão microbiana e adicionado 200 μ L de fonte de carbono (petróleo ou diesel).

Após a adição da fonte de carbono, as amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex por 3 minutos e a densidade óptica foi medida novamente. Os valores de densidade óptica obtidos foram utilizados para calcular o percentual de aderência da fonte de carbono à superfície celular através da Equação 3,

$$AB (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{DO_{smfc}}{DO_{sm}}\right) \quad (3)$$

sendo:

AB = Aderência bacteriana

DO_{smfc} = Densidade óptica da suspensão microbiana após a adição da fonte de carbono

DO_{sm} = Densidade óptica da suspensão microbiana

3.2.4 Avaliação da produção de compostos ativos de superfície

3.2.4.1 Produção biotecnológica de biossurfactante

Além do ensaio de biodegradação do petróleo e do diesel, também foi avaliada o potencial destes compostos como fontes de carbono para a produção de biossurfactantes. Deste modo, foi utilizado Erlenmeyer de 250 mL para os ensaios, no qual foram preenchidos com 100 mL de MBH-salino. Foi adicionado ao meio mineral 1% de fonte de carbono e 1% (v/v) de inóculo de *Alcanivorax* sp. FOR1501 com densidade óptica ajustada para 0,5. As mesmas fontes avaliadas nos processos de biodegradação foram usadas nos ensaios de produção de compostos ativos de superfície, descritos no Tópico 3.2.2.1.

O processo biotecnológico foi conduzido em agitador orbital a 35 °C e 150 rpm por um período de 21 dias. Após o bioprocessamento, o volume reacional foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos, objetivando a separação da fase aquosa e da biomassa, para verificar a produção do biossurfactante bem como suas características tensoativas através da determinação do índice de emulsificação, capacidade de desemulsificação, tensão superficial e a separação do biotensoativo produzido por precipitação ácida. As metodologias destas análises estão apresentadas nos Tópicos 3.2.4.2 a 3.2.4.6, as quais foram realizadas no mínimo em triplicata.

3.2.4.2 Índice de emulsificação (IE₂₄)

A atividade emulsificante foi avaliada através da metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Neste ensaio, avaliou-se o sobrenadante livre de células e a suspensão microbiana. Assim, 2 mL de sobrenadante livre de células ou suspensão microbiana e 2 mL de querosene (fonte hidrofóbica) foram adicionados a um tubo de ensaio com tampa rosqueada e agitado vigorosamente usando agitador vórtex por 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 horas a temperatura ambiente (20 °C) e o percentual de emulsificação foi obtido

através da Equação 4. É válido ressaltar que as emulsões obtidas a partir da suspensão microbiana foram analisadas por microscopia.

$$IE_{24}(\%) = 100 \times \left(\frac{H_{FE}}{H_T} \right) \quad (4)$$

sendo:

%IE₂₄ = percentual de emulsificação

H_{FE} = Altura da fase emulsionada (cm)

H_T = Altura total (cm)

3.2.4.3 *Análise das emulsões por microscopia*

Amostras das emulsões obtidas a partir da suspensão celular no ensaio de IE₂₄ usando petróleo e glicose, petróleo e diesel como fontes de carbono foram coletadas, transferidas para lâminas e coradas com rosa bengala, objetivando a caracterização por microscopia de campo claro e contraste de fase através de microscópio óptico (*Axiostar plus*, Carl Zeiss, Alemanha).

3.2.4.4 *Capacidade de desemulsificação*

A capacidade desemulsificante foi realizada através da observação da capacidade dos sobrenadantes livres de células em destabilizar emulsões (ANGELIM, 2012). O método baseia-se na adição de 2 mL de sobrenadante livre de células, 2 mL de querone e 4 µL de *Tween* 80 em tubo de ensaio com tampa rosqueada. Então, agitou-se vigorosamente com o auxílio de agitador vórtex por 2 minutos e, posteriormente, os tubos foram deixados em repouso por 24 horas a temperatura ambiente (20 °C), objetivando observar a permanência da estabilidade da emulsão produzida. Em seguida, foi avaliada a persistência total, parcial ou a desemulsificação das emulsões. Os resultados de persistência total da emulsão foram considerados negativos e a persistência parcial ou a completa desemulsificação foram considerados positivos.

3.2.4.5 *Avaliação da tensão superficial (TS)*

A capacidade do composto ativo de superfície em diminuir a tensão superficial foi medida utilizando Anel Du Nöuy (D Nöuy, 1925) através de equipamento tensiômetro Kruss (Hamburgo, Alemanha, modelo K20). Deste modo, observou-se a resistência do anel de platina no rompimento da tensão superficial da amostra a ser analisada. Então, utilizou-se 20 mL dos

sobrenadantes livres de células para a realização do ensaio em equipamento previamente calibrado com água destilada (72 mN/m), em temperatura ambiente (20 °C). Os valores de redução da tensão foram expressos em porcentagem e calculados através da Equação 5.

$$RTS (\%) = \frac{(TS_i - TS_f)}{TS_i} \times 100 \quad (5)$$

sendo:

RTS = redução da tensão superficial (%)

TS_i = Valor da tensão superficial do meio mineral (BH)

TS_f = Valor da tensão superficial do sobrenadante livre de células

3.2.4.6 Precipitação dos biossurfactantes produzidos

Para a extração dos biossurfactantes produzidos, foi realizado o método de precipitação ácida adaptado descrito por França *et al.* (2015).

Neste processo de precipitação ácida, os sobrenadantes livres de células tiveram o seu pH ajustado para 2,0 utilizando HCl 6 mol/L e, então, foram deixados a 4 °C *overnight*. Após este período, os sobrenadantes foram centrifugados a 10.000 g, 4 °C por 20 minutos para a precipitação do composto de interesse. Os sobrenadantes então foram descartados e o biossurfactante precipitado é ressuspensionado utilizando água acidificada (pH 2,0) com o auxílio de um agitador vórtex. As etapas de centrifugação e ressuspensão são repetidas mais 2 vezes e, após as lavagens, o biossurfactante é dissolvido em água destilada e tem seu pH reajustado para 7,0 usando NaOH 1 mol/L. Por fim, a solução é liofilizada e o produto obtido foi ressuspensionado em água destilada na concentração de 1 g/L para avaliar o IE₂₄, a sua capacidade de dispersar óleo e caracterizá-lo por FT-IR.

3.2.4.7 Ensaio de dispersão de óleo

Os ensaios de dispersão foram realizados como descrito por Moriwaka *et al.* (2000). Nos ensaios foram usadas placas de Petri de 100 mm de diâmetro, onde foram adicionados 40 mL de água do mar sintética (pH ajustado para 7,8 e salinidade 43) e derramado 0,15 g de petróleo. Em seguida, as placas foram agitadas para promover a formação de uma camada de óleo e, posteriormente, foram aplicados 100 µL de solução rica em biossurfactantes obtidos através dos métodos de precipitação ácida na concentração de 1 g/L. O ensaio foi realizado em triplicata e foi utilizado água Milli-Q como controle negativo.

3.2.5 Avaliação da produção de biossurfactantes a partir do diesel como fonte de carbono

3.2.5.1 Estudo cinético da produção de biossurfactante a partir do diesel como fonte de carbono

A produção de biossurfactante usando o diesel como fonte de carbono foi reproduzida, utilizando um Erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de volume reacional, objetivando correlacionar as mudanças dos parâmetros tensoativos com o tempo de bioprocessamento. Deste modo, *Alcanivorax* sp. FOR1501 teve sua densidade óptica ajustada para 0,5 e foi inoculada na proporção de 1% (v/v) em MBH-salino contendo 1% (v/v) de diesel.

Durante o bioprocessamento, foram retiradas amostras nos dias 0, 7, 9, 14, 16 e 21. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos para promover a separação do sobrenadante livre de células e da biomassa. O sobrenadante livre de células e a suspensão microbiana obtida foram utilizadas para a realização dos testes de IE₂₄ (Tópico 3.2.4.2). Além disso, a partir do sobrenadante livre de células foi possível analisar a tensão superficial (Tópico 3.2.4.5) e a alteração do pH ao longo do processo fermentativo. Também, foi avaliado a separação do biossurfactante produzido conforme será descrito no Tópico 3.2.5.2.

3.2.5.2 Estudo de separação do biossurfactante produzido a partir do diesel por diferentes métodos

Após o bioprocessamento, a obtenção do biossurfactante bruto foi avaliada com o objetivo de investigar um método de separação capaz de aumentar os rendimentos obtidos. Para isso, foram estudados três métodos diferentes de separação: precipitação ácida, precipitação por sulfato de amônio e extração líquido-líquido usando etanol como solvente extrator.

No processo de precipitação ácida, os meios de cultura obtidos após o bioprocessamento tiveram o seu pH ajustado para 2,0 utilizando HCl 6 mol/L e, então, foram deixados a 4 °C *overnight*. Após este período, o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g, 4 °C por 20 minutos para a precipitação do composto de interesse. O sobrenadante é então descartado e o biossurfactante precipitado é ressuspensionado utilizando água acidificada (pH 2,0) com o auxílio de um agitador vórtex. As etapas de centrifugação e ressuspensão são repetidas mais 2 vezes e, após as lavagens, o biossurfactante é dissolvido em água destilada e tem seu pH reajustado para 7,0 usando NaOH 1 mol/L. As soluções foram filtradas com filtro Millipore 0,22 µm. Por fim, a solução é liofilizada e o produto obtido foi pesado e analisado por FT-IR.

A precipitação utilizando o sulfato de amônio, no qual o método foi descrito por Chamanrokh *et al.* (2008), consiste na adição do sulfato de amônio ao meio fermentativo e

permaneceu por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, o precipitado é obtido por centrifugação a 10.000 g, 4 °C por 40 minutos e ressuspensão em água destilada. A suspensão passa por processo de diálise por um período de 48 horas, no qual a água foi repostada 5 vezes. As suspensões foram filtradas com filtro Millipore 0,22 µm, liofilizadas, pesadas e analisadas por FT-IR.

A extração etanólica, cujo método foi descrito por Nohata, Azuma e Kurane (1996), foi realizada através da adição de etanol na proporção de 2:1 (v/v) ao meio de cultura obtido no processo de produção do composto ativo de superfície. Após a extração, as soluções foram centrifugadas a 10.000 g, 4 °C por 20 minutos, objetivando a precipitação da biomolécula. O precipitado é ressuspensionado em água com temperatura de 60 °C e passa por um novo processo de extração usando etanol na proporção de 5:1 (v/v) e, posteriormente, centrifugação a 10.000 g, 4 °C por 20 minutos. O material é ressuspensionado em água destilada e filtrado com filtro Millipore 0,22 µm, liofilizado e o produto obtido pesado e analisado por FT-IR.

É importante destacar que todos os métodos foram testados com as culturas preservadas e com as culturas lisadas por ultrassom, a fim de comparar se o rompimento da membrana celular é um fator que influencia no rendimento de obtenção do biossurfactante de interesse.

3.2.5.3 Rompimento da membrana celular

Objetivando avaliar o impacto do rompimento da membrana celular na precipitação do produto de interesse, após o bioprocessamento, culturas de *A. FOR1501* cultivadas utilizando óleo diesel como fonte de carbono foram destinadas ao processo de lise celular e avaliar a liberação do biossurfactante. O rompimento celular foi realizado em aparelho ultrassom de ponta (Q500 sonicators, Sonicator Qsonic, Newton, CT, EUA) conduzido por 15 minutos, com amplitude de 40%, pulsos de 5 segundos *on* e segundos *off* e potência de 500 W. Todo o processo foi realizado em banho de gelo.

3.2.6 Métodos analíticos

3.2.6.1 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os biossurfactantes produzidos e liofilizados foram caracterizados por análises de Infravermelho, realizadas no Grupo de Pesquisa em Termodinâmica Aplicada (GPTA) do Departamento de Engenharia Química da UFC. Os biossurfactantes produzidos foram analisados em um espectro de absorção do infravermelho por transformada de Fourier (Cary 630, Agilent Technologies), operado em modo de reflexão total atenuada (ATR). Os espectros foram coletados em uma faixa de número de onda de 650 a 4000 cm⁻¹ com uma resolução de 1 cm⁻¹, 32 scans e corrigidos para transmitância.

3.2.6.2 Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa (CG-EM)

A degradação de hidrocarbonetos foi determinada por CG-EM. Os hidrocarbonetos residuais foram analisados utilizando um cromatógrafo gasoso-espectrômetro de massa QP2020 (Shimadzu, Japão). As amostras foram diluídas em 400 µL de diclorometano. Posteriormente, 10 µL dessas soluções foram diluídas em 1 mL de diclorometano, no qual foi injetado 1 µL. A coluna utilizada para separação dos hidrocarbonetos foi a DB5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando hélio como gás de arraste no fluxo de 1 mL/min. A temperatura do injetor e linha de transferência foram mantidas a 280 °C. A temperatura inicial foi ajustada para 50°C, mantida por 1 minuto seguida de aumento na taxa de 3°C/min e mantida por 20 minutos ao término da corrida.

3.2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software Minitab® 19, no qual utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*, usando nível de confiança de 95% e uma probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do potencial de degradação dos hidrocarbonetos residuais presentes no óleo pesado e no diesel S-10 por *Alcanivorax* sp. FOR1501

A degradação de petróleo por *Alcanivorax* sp. FOR1501 foi avaliada por 21 e 28 dias. Estes períodos de bioprocessos foram selecionados com base no tempo de crescimento que as espécies similares à *Alcanivorax* sp. FOR1501 requerem e a complexidade das fontes de carbono avaliadas neste trabalho, em específico o óleo pesado e o óleo diesel (LIU; SHAO, 2005; OLIVERA *et al.*, 2009; RAHUL *et al.*, 2014; ROJO, 2010).

Após os bioprocessos conduzidos com petróleo, petróleo e glicose e diesel como fonte de carbono, realizou-se a extração dos hidrocarbonetos residuais e a análise gravimétrica, cujos resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 – Percentual de degradação de hidrocarboneto (HD%) extraídos do óleo pesado e do diesel por *Alcanivorax* sp. FOR1501, baseado no teste de *Tukey* com 95% de nível de confiança ($p < 0,05$), no qual letras iguais em coluna indicam que não houve diferença significativa.

Fonte de carbono	Percentual gravimétrico	
	21 dias	28 dias
Petróleo	19 ± 0,0% ^a	30 ± 0,1% ^a
Petróleo e glicose	13 ± 0,0% ^b	24 ± 0,1% ^c
Diesel	10 ± 0,0% ^c	28 ± 0,1% ^b

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Ao adicionar a glicose junto com o petróleo como fonte de carbono, o HD% é inferior ao processo realizado usando somente o petróleo. Tendo em vista que ambos os substratos são metabolizáveis pela espécie em destaque, supõe-se que a glicose tenha interferido na adesão entre o hidrocarboneto e a célula, resultando em um processo de biodegradação menos eficiente (ALI KHAN *et al.*, 2017; ZHAO; SELVAM; WONG, 2011).

A partir da análise gravimétrica, é possível visualizar que houve uma redução na massa de diesel ao final dos ensaios de biodegradação, corroborando com a hipótese de degradação desta fonte de carbono por *Alcanivorax* sp. FOR1501. No mais, é notório que a degradação de diesel e petróleo foram similares, tendo em vista a redução de 28% e 30% no peso destes hidrocarbonetos, respectivamente, nos processos conduzidos por 28 dias.

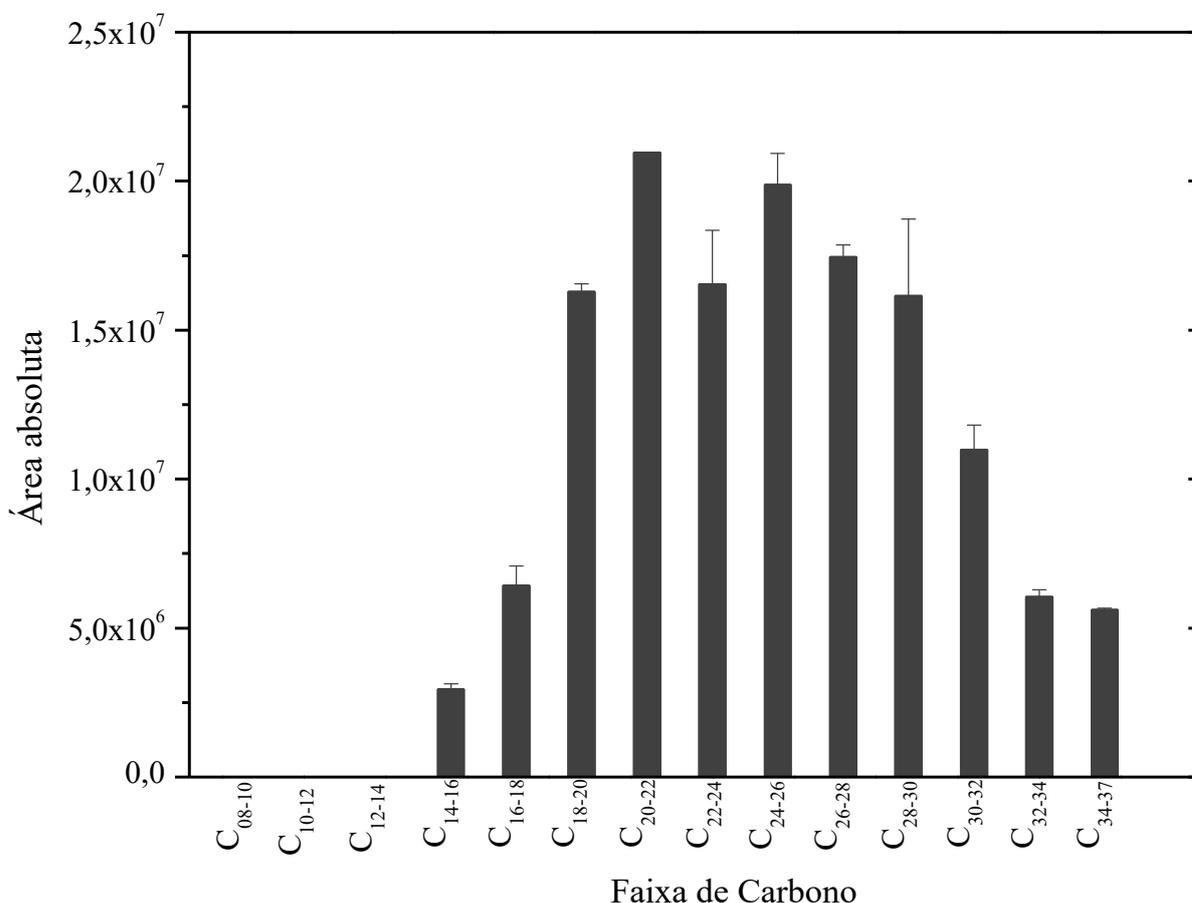
Neste contexto, observa-se, também, que o tempo de bioprocesso foi um fator que influenciou nos resultados desta análise, independentemente da fonte de carbono utilizada, no qual o período de 28 dias se mostrou promissor na degradação dos hidrocarbonetos.

Outros trabalhos também relataram a redução da massa do diesel e do petróleo residual. Mnif *et al.* (2017) obtiveram percentuais de redução da massa de diesel superiores aos obtidos neste trabalho, alcançando um percentual de $43,54 \pm 1,54\%$ através de um consórcio bacteriano formado por *Lysinibacillus bronitolerans* RI18, *Bacillus thuringiensis* RI16 e *Bacillus weihenstephanensis* RI12. Rathod *et al.* (2022) também obtiveram um percentual superior, atingindo 62,45% de redução na análise gravimétrica dos hidrocarbonetos totais do petróleo através da espécie *Acinetobacter calcoaceticus*, em processo realizado através da contaminação de uma amostra de solo por petróleo a uma taxa de 4% (m/v) durante 30 dias.

Objetivando investigar a biodegradação do petróleo e do diesel por *Alcanivorax* sp. FOR1501 em termos de composição química, foi realizada a análise por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas. A partir das Figuras 9, 10 e 11 é possível observar os perfis comparativos de biodegradação do meio ausente de células (MBH) e meio contendo o microrganismo nos períodos de 21 e 28 dias obtidos nos processos realizados usando petróleo, petróleo e glicose e diesel, respectivamente.

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, no qual é composto por hidrocarbonetos saturados e insaturados lineares, ramificados e cíclicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, resinas e asfaltenos (CHUNYAN *et al.*, 2023). Sabe-se que a composição deste recurso não renovável varia de acordo com o ambiente, temperatura e tempo (SATTAR *et al.*, 2022). Neste contexto, a partir da análise por cromatografia gasosa, foi possível visualizar a composição organizada por área absoluta agrupando os hidrocarbonetos aos pares do óleo pesado coletado em Icarai de Amontada, Ceará, Brasil, conforme a Figura 8.

Figura 8 - Perfil dos hidrocarbonetos residuais presentes no óleo pesado obtido por CG-EM.

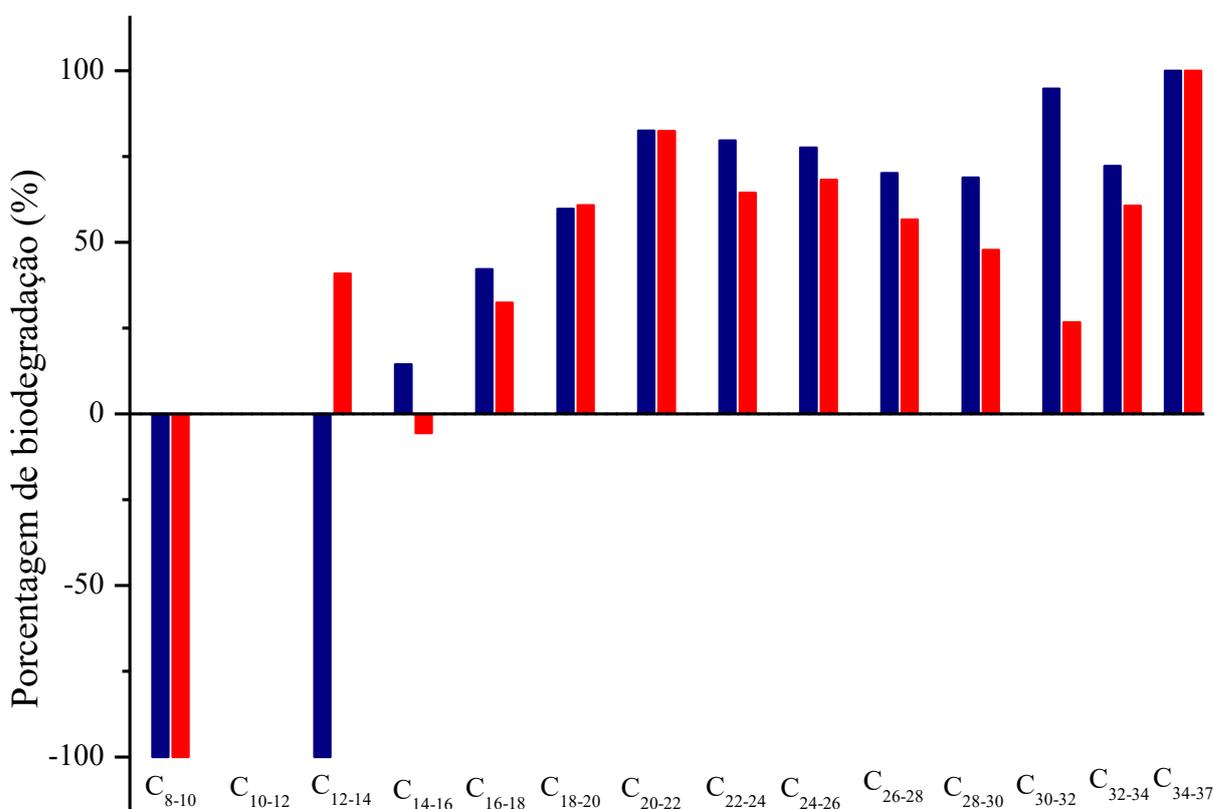


Fonte: Elaborado pela autora (2023)

A partir da Figura 8 é possível observar que o óleo pesado coletado na praia de Icarai de Amontada, Ceará, Brasil, possui faixas carbônicas que incluem compostos de n-C₁₄ a n-C₃₇, possuindo uma maior abundância de cadeias de carbono média, em específico C₂₀-C₂₂. Este resultado está em consonância ao perfil de hidrocarbonetos obtido a partir do óleo coletado na praia de Paracuru, Ceará, Brasil, no qual apresentou hidrocarbonetos de n-C₁₄ a n-C₃₈, e aos coletados nos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco e Sergipe, no qual o cromatograma demonstrou que havia hidrocarbonetos contendo de n-C₁₀ a n-C₃₅ (LOURENÇO *et al.*, 2020; REDDY *et al.*, 2022).

Deste modo, avaliou-se a degradação destas cadeias carbônicas por *Alcanivorax* sp. FOR1501 em bioprocessos conduzidos por 21 e 28 dias e esses resultados de biodegradação do óleo pesado por faixas de carbono podem ser visualizados através da Figura 9.

Figura 9 – Percentual de biodegradação das frações carbônicas do óleo pesado por *Alcanivorax* sp. FOR1501 do meio contendo microrganismos avaliado por 21 dias (■) e por 28 dias (■).



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

No bioprocesso conduzido por 21 dias, ao se comparar com o controle (MBH-salino), ou seja, com o os meios contendo a presença de *Alcanivorax* sp. FOR1501 é possível observar uma redução na área absoluta de 14,45% para C₁₄₋₁₆, 42,17% para C₁₆₋₁₈, 59,80% para C₁₈₋₂₀, 82,50% para C₂₀₋₂₂, 79,74% para C₂₂₋₂₄, , 77,53% para C₂₄₋₂₆, 70,18% para C₂₆₋₂₈, 68,82% para C₂₈₋₃₀, 94,80% para C₃₀₋₃₂ e 72,28% para C₃₂₋₃₄ e a degradação de 100% das cadeias carbônicas de n-C₃₄ a n-C₃₇ em comparação ao grupo controle.

É possível observamos, também, que houve um aumento nas faixas de cadeias menores, em específico C₈₋₁₀ e C₁₂₋₁₄, em comparação ao perfil do petróleo bruto sem microrganismo. Este comportamento pode ser explicado pela quebra das cadeias carbônicas mais longas em cadeias menores para a utilização das mesmas como substrato.

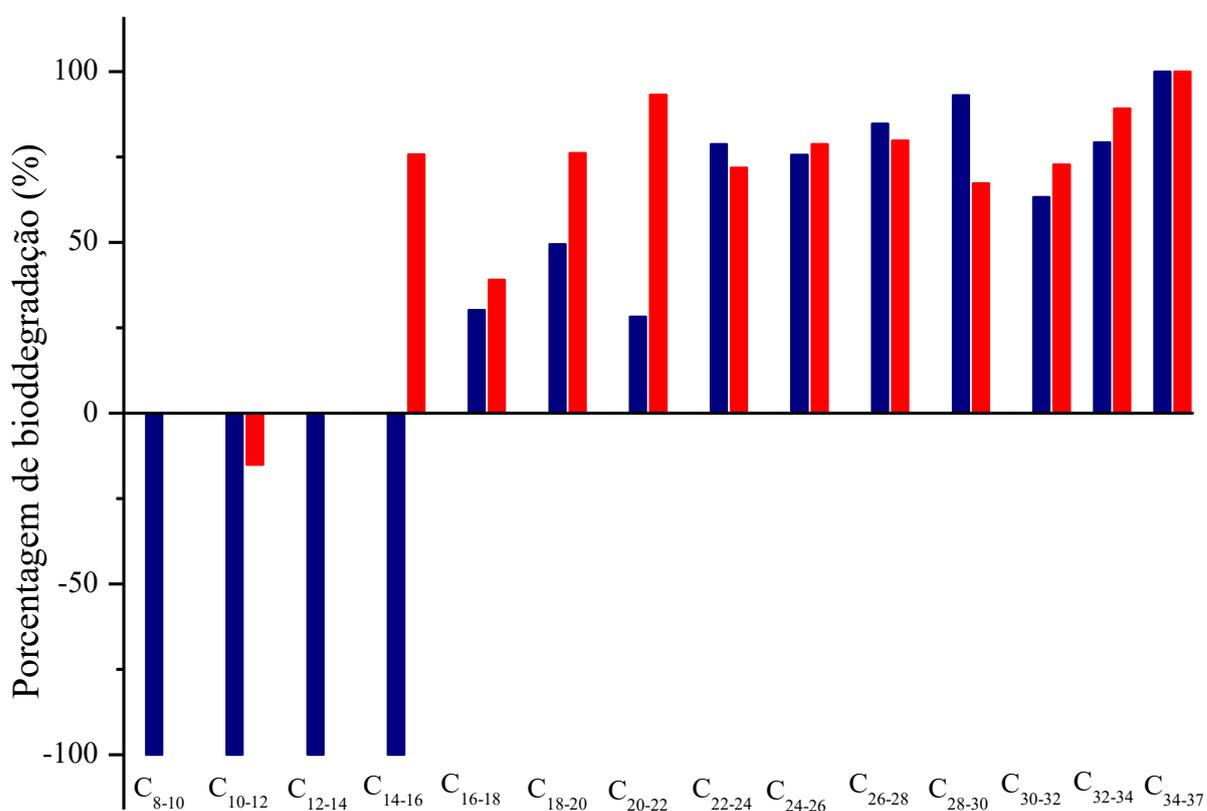
No ensaio de biodegradação que teve duração de 28 dias é observado um comportamento diferente, no qual houve uma diminuição na área absoluta em 32,41% para a faixa de C₁₆₋₁₈, 60,74% para C₁₈₋₂₀, 82,44% para C₂₀₋₂₂, 64,40% para C₂₂₋₂₄, 68,21% para C₂₄₋₂₆, 56,66% para C₂₆₋₂₈, 47,83% para C₂₈₋₃₀, 26,66% para C₃₀₋₃₂ e 60,72% para C₃₂₋₃₄. Visualiza-se, também, a degradação de 100% dos compostos n-C₃₄ a n-C₃₇, em comparação ao grupo

controle. Contudo, em comparação com o meio ausente de microrganismos, houve um aumento da área absoluta das faixas C₈₋₁₀, C₁₂₋₁₄ e C₁₄₋₁₆, que são hidrocarbonetos ausentes no grupo controle. No período de 28 dias, observa-se, também o consumo das faixas C₂₂₋₂₄ que não foram degradadas no período de 21 dias.

A partir dos perfis obtidos por cromatografia gasosa e dos percentuais de biodegradação, é possível afirmar que a biodegradação do petróleo por *Alcanivorax* sp. FOR1501 foi mais eficiente em 28 dias de bioprocessamento, principalmente das frações correspondentes aos lubrificantes (C₂₆₋₃₇), gásóleo pesado (C₁₈₋₂₅) e diesel (C₁₆₋₂₀), pois houve a redução da área absoluta dos compostos identificados na faixa de hidrocarbonetos investigada do óleo pesado coletado em Icarai de Amontada.

Além do petróleo como única fonte de carbono, avaliou-se se a suplementação do petróleo com glicose influenciaria na biodegradação do petróleo. Deste modo, avaliou-se a biodegradação do óleo pesado na presença de glicose nos períodos de 21 e 28 dias, obtendo-se os perfis de hidrocarbonetos que podem ser visualizados na Figura 10.

Figura 10 – Percentual de biodegradação das frações carbônicas do óleo pesado na presença de glicose por *Alcanivorax* sp. FOR1501 do meio com microrganismos avaliado por 21 dias (■) e por 28 dias (■).



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

A partir da Figura 10 é possível observar que no ensaio conduzido por 21 dias houve o consumo de cadeias carbônicas, pois houve a redução de 30,19% da faixa de C₁₆-C₁₈, 49,50% para C₁₈-C₂₀, 28,30% para C₂₀₋₂₂, 78,79% para C₂₂-C₂₄, 75,60% para C₂₄-C₂₆, 84,72% para C₂₆-C₂₈, 93,05% para C₂₈₋₃₀, 63,33% para C₃₀-C₃₂ e 79,24% para C₃₂-C₃₄. Foi observado, também, que houve a degradação de 100% dos compostos n-C₃₄ e n-C₃₇. Entretanto, observou-se, também, um aumento das faixas C₈-C₁₀, C₁₀-C₁₂, C₁₂-C₁₄ e C₁₄-C₁₆, em comparação ao grupo controle.

No bioprocessamento conduzido por 28 dias, nota-se o consumo das mesmas cadeias carbônicas, em específico de 39,03% para C₁₆-C₁₈, 76,10% para C₁₈-C₂₀, 93,23% para C₂₀₋₂₂, 71,93% para C₂₂-C₂₄, 78,74% para C₂₄-C₂₆, 79,83% para C₂₆-C₂₈, 67,28% para C₂₈-C₃₀ e 89,18% para C₃₀₋₃₂, incluindo uma redução de 75,74% para as cadeias carbônicas de C₁₄₋₁₆, e o consumo total das faixas C₃₄-C₃₇, em comparação ao grupo controle, ou seja, ocorreu a biodegradação das frações correspondentes ao diesel, gasóleo pesado e lubrificantes. Além disso, houve a detecção das cadeias C₁₀-C₁₂ ausentes no petróleo bruto como consequência da degradação das cadeias maiores.

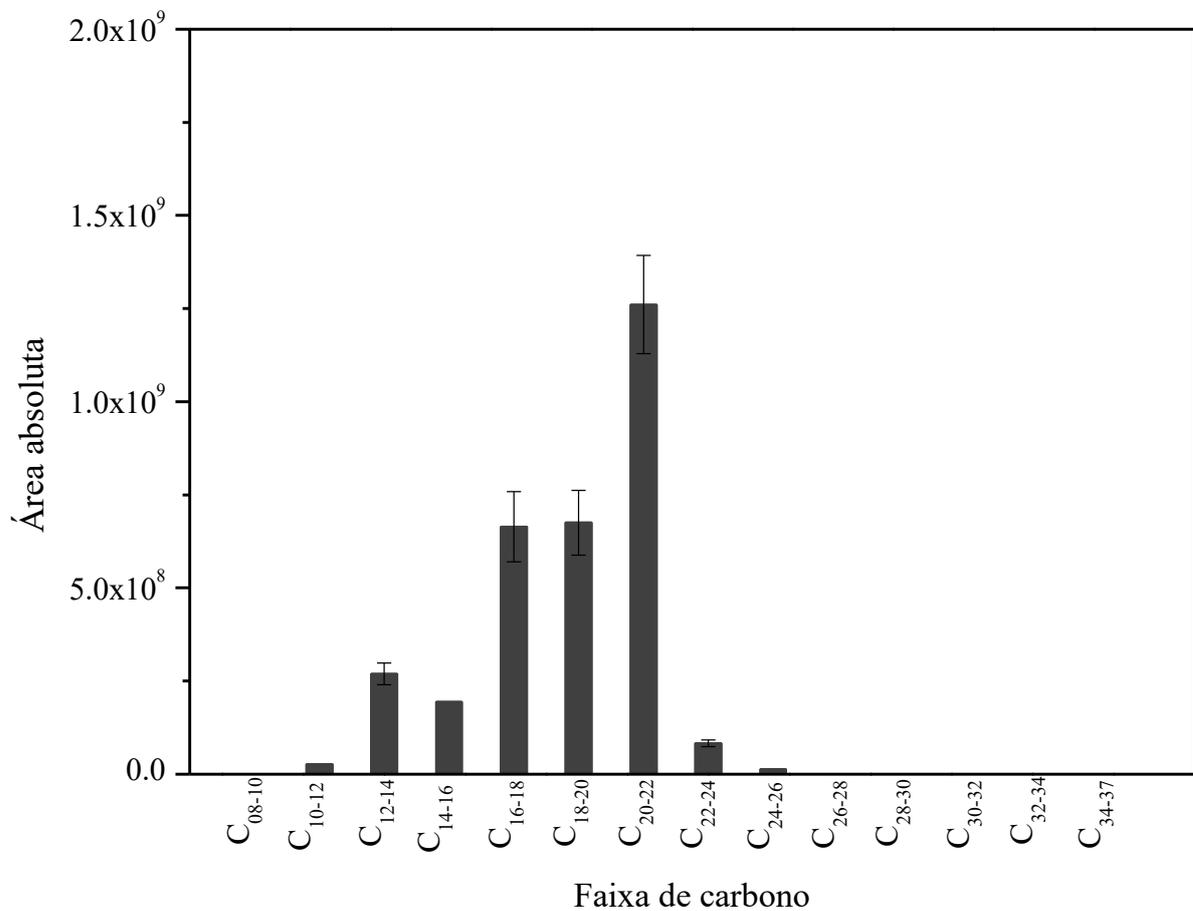
Deste modo, a partir dos perfis obtidos por CG-EM, é possível afirmar que a degradação do óleo pesado em meio contendo glicose nos períodos avaliados foram eficientes, tendo em vista a degradação dos compostos observados na faixa carbônica investigada.

Neste contexto, a menor concentração de petróleo pode ter auxiliado na redução do grau de hidrofobicidade e, conseqüentemente, na liberação dos compostos ativos de superfície produzidos por *Alcanivorax* sp. FOR1501 que auxiliaram o processo de degradação do hidrocarboneto em destaque da Figura 9 e Figura 10.

Os resultados obtidos a partir da cromatografia gasosa referentes à degradação de petróleo, estão em consonância aos obtidos na análise gravimétrica no que se refere à avaliação do período de biodegradação, no qual o período de 28 dias foi mais eficiente para ambas as condições de cultivo de *Alcanivorax* sp. FOR1501.

A biodegradação do óleo diesel também foi avaliada, tendo em vista a semelhança filogenética em *Alcanovirax* sp. FOR1501 e *A. dieselolei* e que este derivado do petróleo é um composto tóxico prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana (CASTRO, 2023; IMRON; KURNIAWAN; TITAH, 2019). Deste modo, a partir da Figura 11 é possível visualizar o perfil de hidrocarbonetos presente no diesel utilizado neste trabalho.

Figura 11 - Perfil dos hidrocarbonetos residuais extraídos do óleo diesel S-10 comercial obtido por CG-EM.

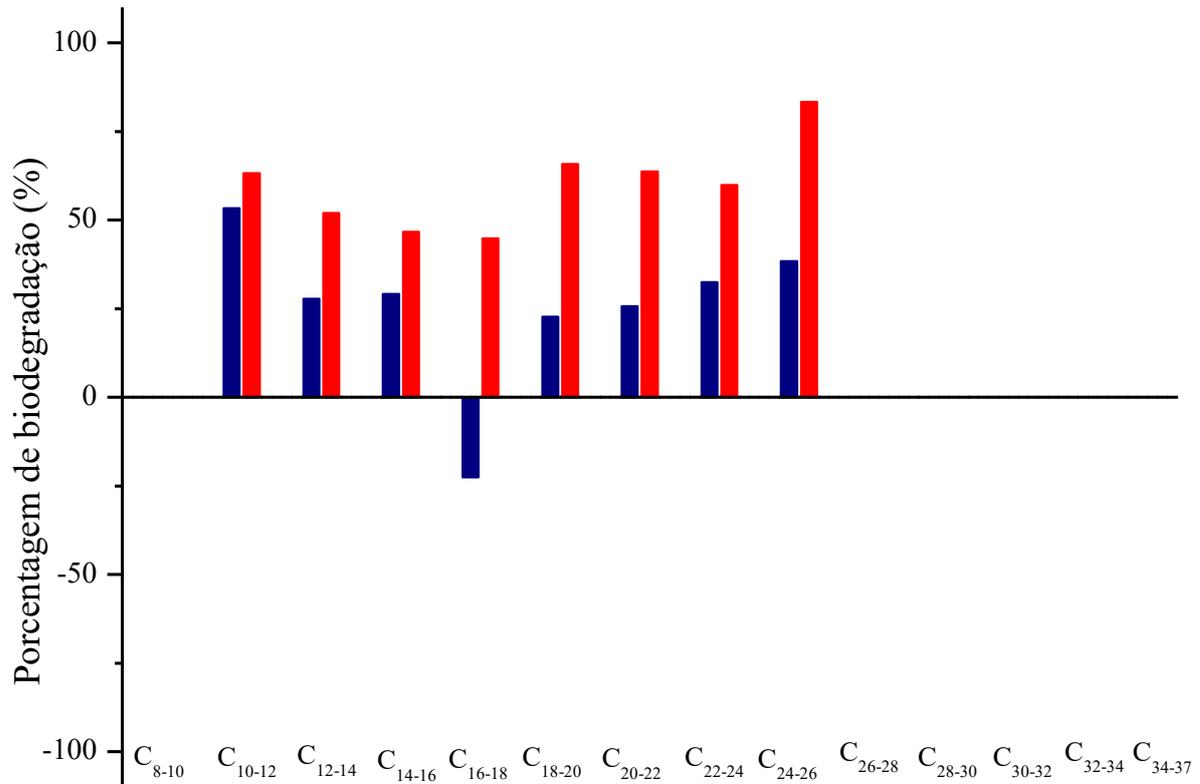


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A partir da Figura 11 é possível observar que a composição do óleo diesel utilizado neste trabalho possui hidrocarbonetos de n-C₁₀ a n-C₂₆. É importante destacar que o diesel utilizado neste estudo é o S-10 e sua composição é formada por cadeias de carbono de n-C₁₀ a n-C₂₁ (ASLAN, 2023; PYDIMALLA *et al.*, 2023). Porém, sabe-se que o diesel S-10 disponível nos postos de combustíveis possui percentual de 5% de biodiesel, influenciando sua composição devido à presença de cadeias de ácidos graxos, onde podem ser encontradas cadeias de carbono maiores que n-C₂₄, e teor máximo de enxofre de 10 mg/kg (SOUZA *et al.*, 2014; PYDIMALLA *et al.*, 2023).

Desta forma, foi avaliado a biodegradação das cadeias carbônicas do óleo diesel por *Alcanivorax* sp. FOR1501 pelo período de 21 e 28 dias, no qual os resultados estão apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Percentual de biodegradação das frações carbônicas de diesel S-10 por *Alcanivorax* sp. FOR1501 do meio contendo microrganismos avaliado por 21 dias (■) e por 28 dias (■).



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

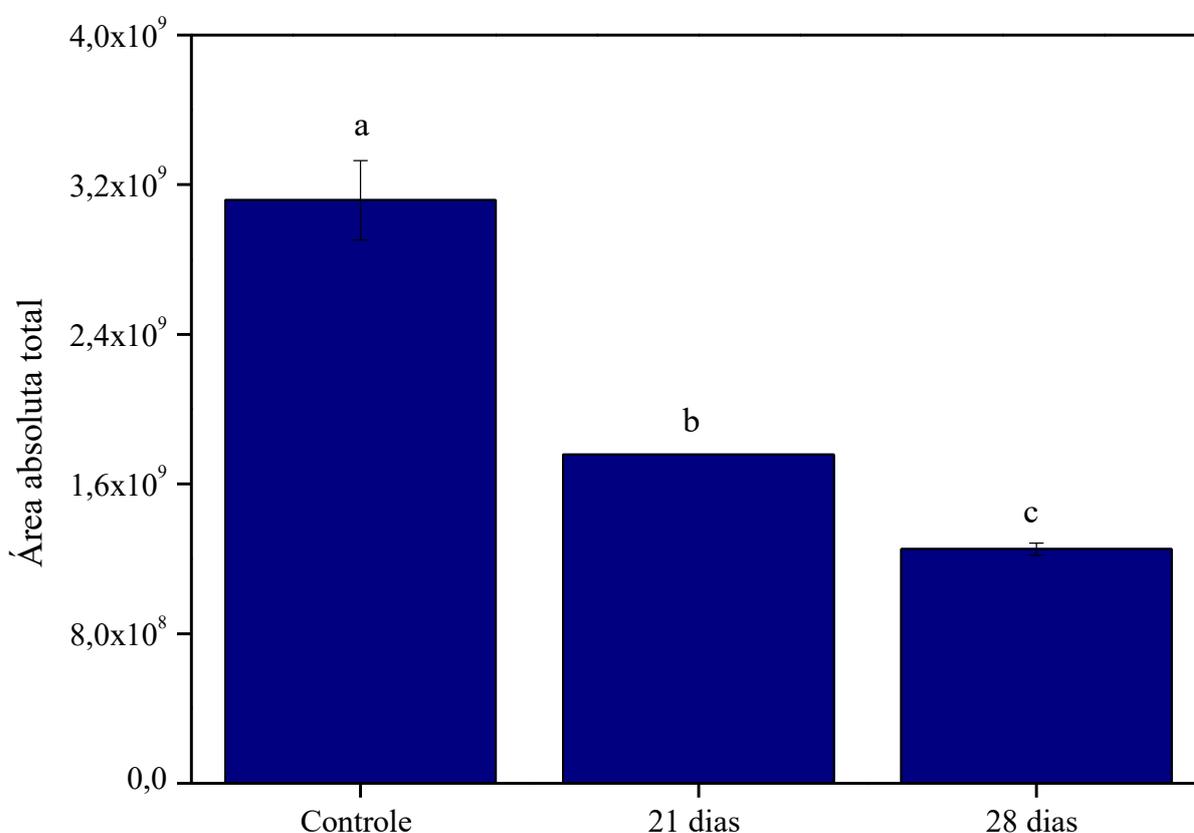
Na Figura 12, é possível observar o consumo de hidrocarbonetos por *Alcanivorax* sp. FOR1501, pois ocorreu a redução da área absoluta em 53,37% para C₁₀₋₁₂, 27,72% para C₁₂₋₁₄, 29,13% para C₁₄₋₁₆, 22,71% para C₁₈₋₂₀, 25,70% para C₂₀₋₂₂, 32,41% para C₂₂₋₂₄ e 38,36% para C₂₄₋₂₆ no período de 21 dias em relação ao grupo controle. Neste ensaio houve um aumento da área absoluta das cadeias carbônicas com faixa de C₁₆₋₁₈ em 22,59% em comparação ao grupo controle.

No bioprocessamento conduzido por 28 dias, foi observado a diminuição da área absoluta de todas as faixas carbônicas detectadas na análise de CG-EM, em específico de 63,26% para C₁₀₋₁₂, 51,95% para C₁₂₋₁₄, 46,71% para C₁₄₋₁₆, 44,84% para C₁₆₋₁₈, 65,80% para C₁₈₋₂₀, 63,65% para C₂₀₋₂₂, 59,87% para C₂₂₋₂₄ e 83,34% para C₂₄₋₂₆. É importante ressaltar que a porcentagem de biodiesel presente no óleo diesel S-10 comercial pode ser um fator que influencia na biodegradação deste hidrocarboneto, pois os ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no biodiesel é uma fonte de carbono mais susceptível ao crescimento microbiano, comparado aos hidrocarbonetos do petróleo (LISIECKI *et al.*, 2014).

Deste modo, nota-se que ocorreu a degradação do óleo diesel S-10 por *Alcanivorax* sp. FOR1501 em ambos os períodos avaliados. Porém, o período de 28 dias foi mais eficiente para o processo de degradação desta fonte de carbono, tendo em vista que a área absoluta total foi reduzida em 59,8% em comparação ao grupo controle. No período de 21 dias a redução da área absoluta total foi de 43,73%, em comparação ao grupo controle.

Assim, visando analisar o período de biodegradação mais promissor para o óleo diesel, realizou-se a análise estatística que é possível ser visualizada através da Figura 13.

Figura 13 - Influência do tempo na biodegradação de óleo diesel S-10 por *Alcanivorax* sp. FOR1501, analisado através do teste de *Tukey* com nível de significância de 5%.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Neste contexto, a partir da Figura 13 é possível afirmar que os períodos avaliados neste trabalho apresentaram diferença significativa para a biodegradação do óleo diesel, no qual o tempo de bioprocessamento mais promissor é o de 28 dias, em comparação ao período de 21 dias. Além disso, é possível observar que *Alcanivorax* sp. FOR1501 teve preferência por cadeias de carbono médias e longas tanto para o processo de degradação do petróleo como para a degradação do diesel. Este comportamento pode estar associado ao grau de hidrofobicidade

celular. Neste contexto, foi realizado um estudo sobre a aderência celular do microrganismo em destaque neste estudo às fontes de carbono avaliadas, conforme o Tópico 4.2.

Sabe-se, através da literatura, que a espécie *A. dieselolei*, agrupada no mesmo clado que *A. sp. FOR1501*, é capaz de metabolizar cadeias contendo de 6 a 36 carbonos, incluindo alcanos ramificados (WANG; SHAO, 2014). Porém, ao comparar os perfis de biodegradação de todos os hidrocarbonetos é observável que a espécie em destaque prefere alcanos de cadeias longas, ou seja, cadeias maiores que n-C₁₈.

Existem quatro alcanos hidroxilases que podem ser utilizadas por *Alcanivorax dieselolei*, sendo elas os homólogos de AlkB (AlkB1 e AlkB2), citocromo P450 e AlmA (LAI; LI; SHAO, 2012). Os homólogos de AlkB estão associados ao catabolismo de cadeias médias, enquanto o consumo de cadeias longas por *Alcanivorax sp. FOR1501* depende da expressão de AlmA (FENIBO *et al.*, 2023; LAI; LI; SHAO, 2012).

Nos casos do consumo de cadeias médias, é importante ressaltar, também, que o comprimento da cadeia de carbono que será decomposta é designada por um resíduo de aminoácido presente na estrutura do AlkB, um gene encontrado nos processos de biodegradação de um amplo espectro de bactérias (FENIBO *et al.*, 2023). Neste contexto, é claro o papel da regulação gênica na preferência entre cadeias médias e longas de carbonos (FENIBO *et al.*, 2023; LAI; LI; SHAO, 2012; WANG; SHAO, 2014).

A preferência por cadeias carbônicas mais longas indica que a nova cepa deste trabalho é eficiente na biodegradação de hidrocarbonetos. Porém, para os processos de biorremediação *in situ* e *ex situ*, é interessante que seu uso esteja associado a um consórcio microbiano, tendo em vista que a utilização de uma única espécie nestes processos está relacionada à degradação não uniforme do contaminante, redução da taxa de crescimento celular e rendimento da biomassa (LIU *et al.*, 2021).

4.2 Avaliação da aderência bacteriana às fontes de carbono

A avaliação da aderência do microrganismo aos hidrocarbonetos foi realizada, objetivando correlacionar a hidrofobicidade celular aos resultados obtidos nos ensaios de biodegradação e de produção de biossurfactantes e os resultados de percentual de aderência estão indicados na Tabela 5.

Tabela 5 – Percentual de aderência de *Alcanivorax* sp. FOR1501 aos hidrocarbonetos avaliados.

Hidrocarboneto	Percentual de aderência (%)
Petróleo	89,9 ± 0,1
Diesel	4,9 ± 0,1

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O grau de hidrofobicidade da superfície celular é um fator de grande importância nos processos de biodegradação e produção de compostos ativos de superfície, no qual um grau elevado de aderência à compostos hidrofóbicos estão associados à microrganismos produtores de biossurfactantes (REHMAN *et al.*, 2021). Esta associação se deve à adsorção dos monômeros surfactantes à membrana celular, auxiliando a interação do microrganismo a superfícies hidrofóbicas e promovendo a adesão celular, além da difusão e consumo do substrato de caráter hidrofóbico (REHMAN *et al.*, 2021; ROSENBERG, 1984; ZHANG; MILLER, 1994; ZHAO; SELVAM; WONG, 2011; ZHONG *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos a partir da análise do grau de hidrofobicidade estão relacionados aos adquiridos nos ensaios de biodegradação, no qual foi possível obtermos uma maior degradação em fontes hidrofóbicas em que *Alcanivorax* sp. FOR1501 apresentou maior aderência, em específico o petróleo, indicando que houve uma maior interação entre o microrganismo e a fonte de carbono em destaque. A menor aderência de *Alcanivorax* sp. FOR1501 ao diesel S-10, pode estar relacionada à presença dos ácidos graxos do biodiesel e o teor de enxofre existentes na composição deste combustível (SOUZA *et al.*, 2014).

4.3 Avaliação da produção de biossurfactantes por diferentes fontes de carbono e seus parâmetros tensoativos

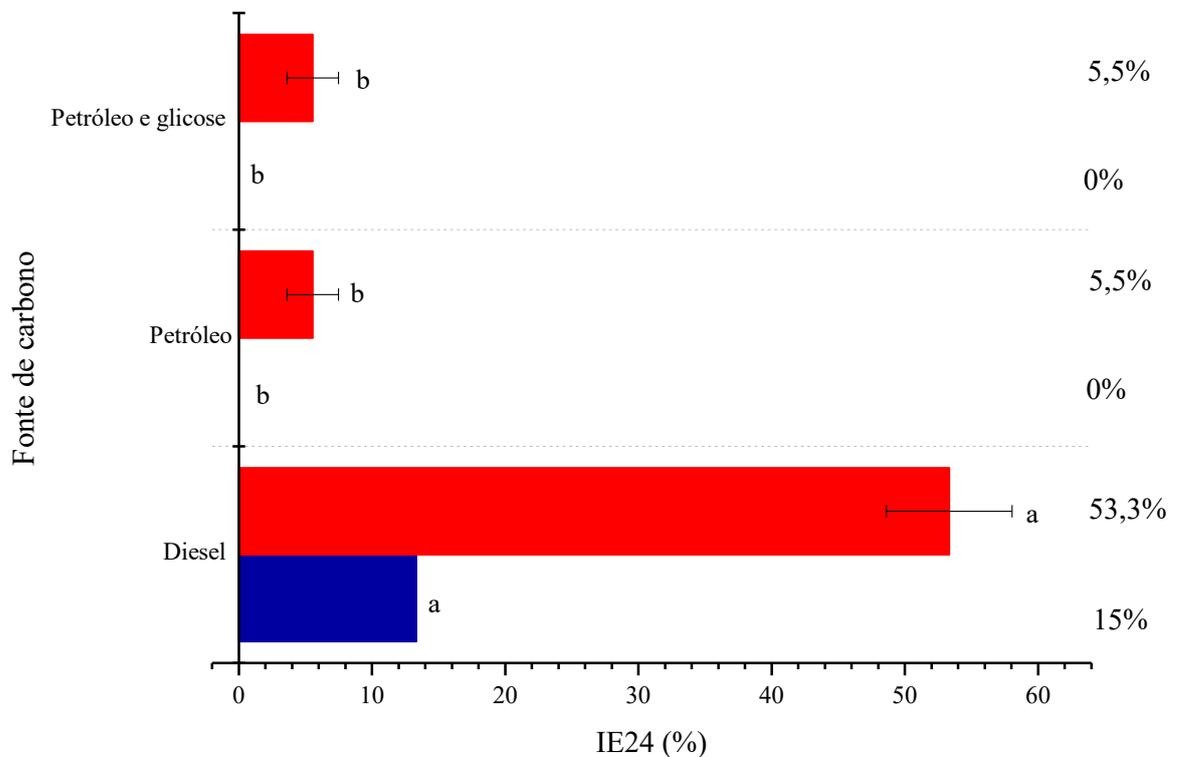
4.3.1 Índice de emulsificação (IE_{24}) e avaliação das emulsões por microscopia

O índice de emulsificação é um importante parâmetro para avaliar a capacidade do biossurfactante analisado em produzir emulsões estáveis frente aos hidrocarbonetos (ABOUSEOUD *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2021). A capacidade emulsificante dos biossurfactantes é uma importante característica para a aplicação do bioproduto na indústria petroquímica, principalmente nas técnicas de recuperação avançada de petróleo (EOR), recuperação microbiana avançada de petróleo (MEOR) e biorremediação (SARUBBO *et al.*, 2022).

Deste modo, a formação de emulsão a partir do biossurfactante produzido usando petróleo e glicose, petróleo e diesel como fontes de carbono foram avaliados frente à querosene

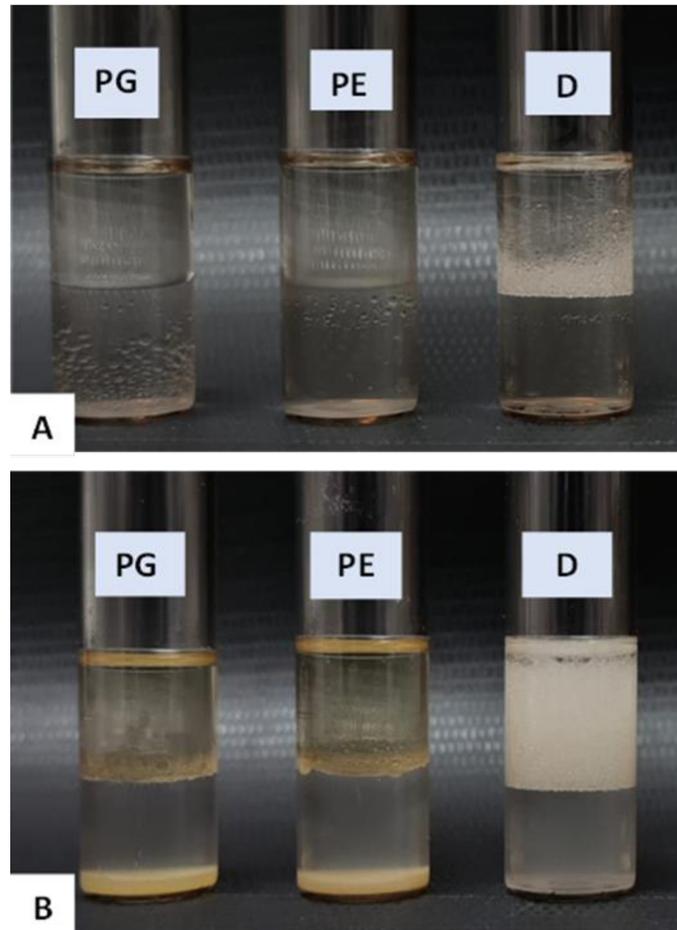
(fonte hidrofóbica na formação da emulsão). As Figuras 14 e 15 ilustram uma comparação dos resultados referente ao índice de emulsificação utilizando o sobrenadante livre de células e a biomassa.

Figura 14 - Índice de emulsificação (%) obtidos usando os sobrenadantes livre de célula (■, barra em azul) e as células (■, barra em vermelho) obtidos do processo conduzido por *Alcanivorax* sp. FOR1501 por 21 dias, 35 °C e 150 rpm, usando o querosene como fonte hidrofóbica. A diferença estatística foi baseada no teste de *Tukey* com 95% de nível de confiança ($p < 0,05$), no qual letras iguais indicam que não houve diferença significativa.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Figura 15 – Emulsões formadas entre querosene e sobrenadantes livre de células (A) e células (B) obtidos do cultivo de *Alcanivorax* sp. FOR1501 conduzido por 21 dias, 35 °C e 150 rpm.



Legenda: PG: Petróleo e glicose; PE: Petróleo; D: Diesel.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Através da Figura 14, visualiza-se que apenas as culturas que utilizaram diesel como fonte de carbono foram capazes de produzir emulsões a partir da suspensão microbiana e usando o sobrenadante livre de células. É notório, também, que as emulsões formadas por tais fontes de carbono são do tipo água/óleo. A concentração de biossurfactante no sobrenadante é maior em processo conduzido com o diesel que possui menor aderência. Assim, nota-se que o grau de hidrofobicidade das células tem influência no processo de excreção da biomolécula de interesse (ALI KHAN *et al.*, 2017; OLIVERA *et al.*, 2009).

Entretanto, a formação de emulsão nas análises de petróleo e glicose, e petróleo foram inferiores a 50 %, indicando uma menor estabilidade da emulsão produzida pelos biossurfactantes em querosene. Os baixos índices de emulsificação obtidos através do petróleo e glicose, e petróleo, podem estar relacionados à alta aderência bacteriana a estes hidrocarbonetos, havendo a necessidade de novos estudos que investiguem o tempo de

bioprocesso, bem como outros parâmetros de produtividade (REHMAN *et al.*, 2021; ZADJELOVIC *et al.*, 2022).

É possível que diferentes tipos de biossurfactantes possam ser produzidos por uma mesma espécie a depender da fonte de carbono consumida durante o processo (RAHMATI *et al.*, 2022), ou seja, nos processos nos quais se utilizou petróleo como fonte de carbono, pode ter ocorrido a produção de biossurfactantes que não possuam capacidade emulsificante (SARUBBO *et al.*, 2022). Para isto, foi realizada a caracterização por FT-IR dos compostos ativos de superfície obtidos por precipitação ácida, conforme o Tópico 4.3.5.

Porém, Bayat, Hassanshahian e Hesni (2016) afirmaram que através da espécie *Alcanivorax dieselolei* cepa BHA25 foi possível obter um índice de emulsificação de 37% utilizando petróleo como fonte de carbono a uma concentração de 1% em caldo ONR7a por um período de 15 dias. É importante ressaltar que a complexidade deste caldo difere da do encontrado no MBH, pois este meio é composto por 40 g/L de cloreto de sódio, 11,18 g/L de cloreto de magnésio hexahidratado, 3,98 g/L de sulfato de sódio, 1,46 g/L de cloreto de cálcio, 1,3 g/L de TAPSO, 0,72 g/L de cloreto de potássio, 0,27 g/L de cloreto de amônio, 0,089 g/L fosfato de sódio heptahidratado, 0,083 g/L de brometo de sódio, 0,031 g/L de bicarbonato de sódio, 0,027 g/L de ácido bórico, 0,024 g/L de cloreto de estrôncio, 0,002 g/L de NaF e 0,002 g/L de cloreto de ferro (II) tetra hidratado.

A partir do trabalho citado, nota-se a capacidade de cepas do mesmo gênero ao da bactéria isolada do óleo pesado coletado em Fortim em produzir biossurfactantes com capacidade de emulsificação usando petróleo como fonte de carbono. Assim, é importante avaliar a complexidade do meio nutricional e outros parâmetros operacionais em que *Alcanivorax* sp. FOR1501 está sendo cultivada para promover a produção do composto de interesse.

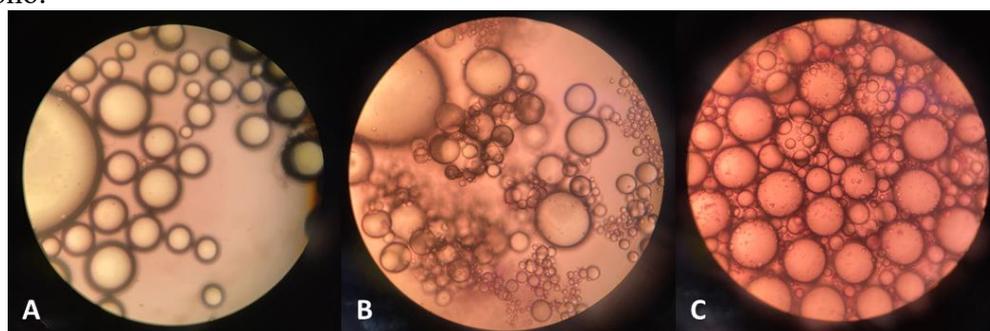
Os resultados obtidos na avaliação da produção de emulsão contra querosene podem ser correlacionados aos adquiridos nos ensaios de degradação. Deste modo, foi possível observar que o diesel foi a fonte hidrofóbica que apresentou índice de emulsificação ao utilizar o sobrenadante ausente de células no período de 21 dias de bioprocesso e obteve bons resultados de degradação em ambos os períodos avaliados.

É possível afirmar, também, que o processo conduzido com petróleo como substrato hidrofóbico, não apresentou bons índices de emulsificação apesar dos resultados positivos de biodegradação. Porém, *Alcanivorax* sp. FOR1501 possui uma alta aderência a este hidrocarboneto, indicando que é provável a necessidade de aumentar o tempo de bioprocesso

em ensaios que utilizem esta fonte para haver a formação de emulsão utilizando o sobrenadante ausente de células.

Após o teste de emulsificação (IE_{24}), as emulsões observadas na Figura 15B foram analisadas por microscopia e as imagens podem ser visualizadas na Figura 16.

Figura 16 – Aspecto das emulsões do tipo água-óleo produzida pela suspensão microbiana de *Alcanivorax* sp. FOR1501 usando petróleo (A), petróleo e glicose (B) e diesel (C) como fonte de carbono.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

A análise das emulsões por microscopia permite visualizar que todas as emulsões água/óleo possuem gotículas esféricas de tamanho variado e superfície de aspecto regular com a presença de um filme lamelar possivelmente atribuído a presença de biossurfactantes. Entretanto, é visível que na emulsão formada com o biossurfactante produzido por diesel as gotículas possuem tamanhos menos variáveis e estão dispostas de forma regular, indicando uma estabilidade maior frente às outras emulsões produzidas.

4.3.2 Capacidade de desemulsificação

Tendo em vista os baixos índices de emulsificação obtidos, testou-se, a partir do sobrenadante livre de células, a capacidade de desestabilizar emulsões. Na Tabela 6 é possível visualizar estes resultados.

Tabela 6 - Capacidade de desemulsificação dos sobrenadantes obtidos a partir de bioprocessos conduzido a 35 °C, 150 rpm, 21 dias.

Fonte de carbono	Capacidade de desemulsificação
Petróleo e glicose	Persistência total
Petróleo	Persistência total
Diesel	Persistência total

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

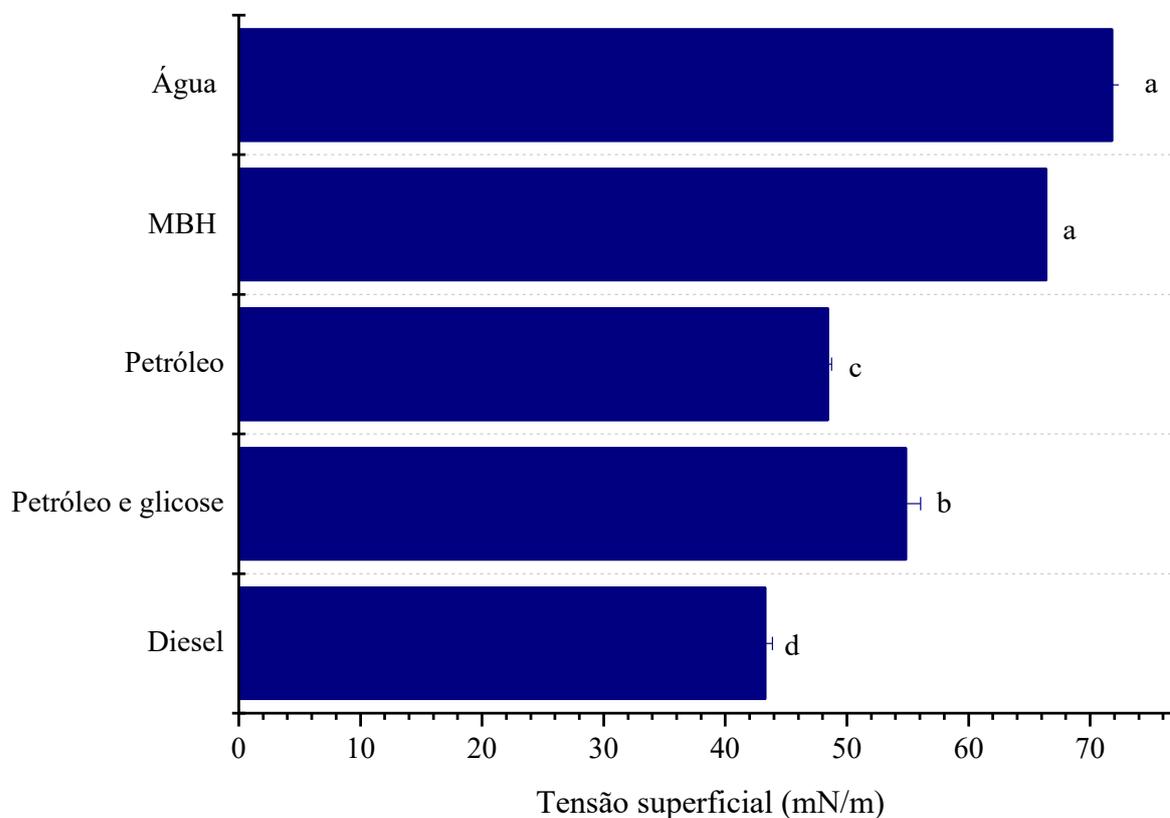
A partir da Tabela 1 nota-se que em todas as fontes de carbono testadas os biossurfactantes produzidos não possuem capacidade desemulsificante contra Tween 80. A capacidade desemulsificante, ou seja, desestabilizar emulsões, é uma característica desejada em biossurfactantes aplicados na recuperação de petróleo bruto emulsionado em casos de recuperação avançada de petróleo (EOR) (AL-SAKKAF; ONAIZI, 2023).

A baixa formação de emulsões e a aderência bacteriana aos hidrocarbonetos são fatores que levaram a uma baixa concentração do biossurfactante no sobrenadante ausente de células, interferindo no índice de emulsificação e na capacidade de desemulsificação. Deste modo, avaliou-se também a redução da tensão superficial com o objetivo de investigar as características tensoativas do bioproduto.

4.3.3 Redução da tensão superficial

A redução da tensão superficial, também foi testada a fim de investigar as características tensoativas dos biossurfactantes produzidos pelas diferentes fontes de carbono. A Figura 17 representa os valores de tensão superficial dos sobrenadantes livres de células obtidos após os bioprocessos em comparação com a água e o meio de cultura Bushnell Haas salino (MBH-salino).

Figura 17 - Tensão superficial dos sobrenadantes livres de células obtidos em bioprocesso conduzido por *Alcanivorax* sp. FOR1501 por 21 dias, 35 °C e 150 rpm. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

A partir dos valores de tensão superficial visualizado na Figura 17, foi possível calcular a redução da tensão superficial conforme a Equação 4. Deste modo, o biossurfactante produzido por *Alcanivorax* sp. FOR1501 a partir do diesel promoveu a maior redução da tensão superficial, calculada em $35 \pm 1\%$, em comparação ao MBH-salino. Ao utilizar o petróleo como fonte de carbono foi possível reduzir a tensão superficial do meio mineral BH salino em $27 \pm 1\%$. Entretanto, o bioprocesso conduzido com petróleo e glicose como substratos, obteve a menor redução da tensão superficial, atingindo um percentual de $17 \pm 2\%$.

Estes resultados podem ser correlacionados aos apresentados no Tópico 4.3.1 referente ao IE₂₄, pois a maior redução da tensão superficial ocorreu com o sobrenadante livre de células que apresentou a formação de emulsão, ou seja, proveniente do processo que utilizou o diesel como fonte de carbono. É possível, também, associar estes resultados à aderência bacteriana aos hidrocarbonetos, corroborando que quanto menor o percentual de hidrofobicidade celular, mais facilmente o biossurfactante é expelido da célula, contribuindo com a propriedades

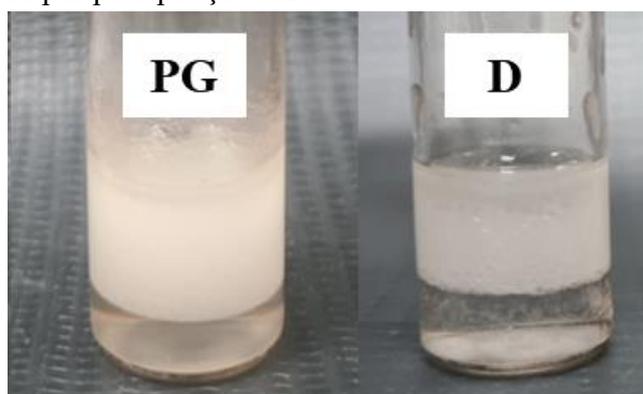
tensoativas do meio (ALI KHAN *et al.*, 2017). Conseqüentemente, a produção de biossurfactante é afetada acarretando concentrações do bioproduto insuficientes para que haja a alteração da TS.

Resultados similares utilizando um microrganismo do mesmo gênero ao de destaque neste estudo, foi obtido por Rizzo *et al.* (2021) que relatou a redução da tensão superficial do meio mineral ONR7a de 55,4 mN/m para 46,7 mN/m utilizando tetradecano na proporção de 2% (v/v) e inóculo de *Alcanivorax* sp. BIC1A5 a uma taxa de 10% (v/v) por um período de 360 horas a 25 °C.

4.3.4 Capacidade emulsificante e de dispersão do óleo dos biossurfactantes separados por precipitação ácida

Os biossurfactantes produzidos por *Alcanivorax* sp. FOR1501, usando petróleo, petróleo e glicose e diesel foram obtidos por precipitação ácida, no qual se avaliou o índice de emulsificação e a dispersão do óleo utilizando uma concentração definida de 1 g/L. É importante ressaltar que, nas condições estudadas, obteve-se a precipitação somente dos compostos ativos de superfície produzidos por petróleo e glicose e diesel. As Figuras 18 e 19 ilustram os testes referentes aos índices de emulsificação e de dispersão do óleo, respectivamente, realizados com as biomoléculas obtidas.

Figura 18 - Índice de emulsificação das soluções com concentração de 1 g/L dos biossurfactantes obtidos por precipitação ácida.



PG: Petróleo e glicose; D: Diesel.

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

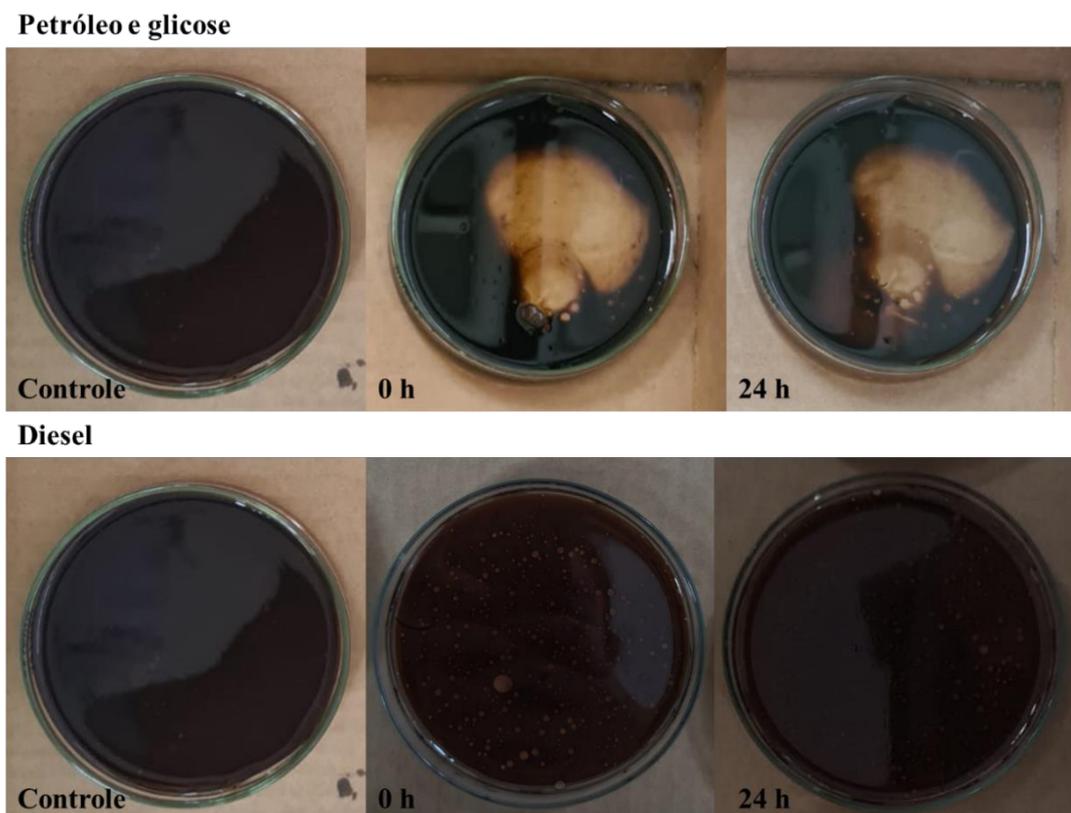
Assim, é possível observar a capacidade emulsificante do biossurfactante bruto produzido a partir do petróleo e glicose, atingindo um índice de emulsificação de 66%. Sharma e Pandey (2020) obtiveram um índice de emulsificação de 57% através da espécie *Bacillus*

subtilis cepa RSL-2 e 45% através da espécie *Klebsiellia* sp. em meio BH com 1% (v/v) de óleo cru, a 37 °C, 180 rpm, por 24 horas.

Resultados de IE₂₄ superiores foram obtidos através de uma bactéria do mesmo gênero por Quio e Shao (2009), no qual relatam que *Alcanivorax dieselolei* atingiu um percentual de $75 \pm 3\%$ de emulsificação ao utilizar o sobrenadante contendo o biossurfactante produzido utilizando n-hexadecano como substrato.

Posteriormente, os compostos ativos de superfície obtidos por precipitação ácida foram ressuspensos em uma solução de concentração final de 1g/L em água destilada para a realização deste ensaio. Os resultados obtidos na análise de dispersão do óleo podem ser visualizados através da Figura 19.

Figura 19 - Ensaio de dispersão do óleo usando soluções a uma concentração de 1 g/L de biossurfactantes obtidos nos processos fermentativos conduzidos por *Alcanivorax* sp. FOR1501 e separados por precipitação ácida.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O biossurfactante produzido utilizando petróleo e glicose como fonte de carbono foi capaz de dispersar a película de petróleo instantaneamente, tendo em vista a formação de halos. A dispersão se mostrou estável, pois não se desfez ou regrediu no período de 24 horas.

Entretanto, a biomolécula produzida por diesel, não apresentou atividade dispersante contra o petróleo permanecendo semelhante ao controle negativo (água destilada) durante todo o período do experimento.

Deste modo, os biotensoativos avaliados neste tópico foram caracterizados por FTIR, objetivando visualizar as diferenças estruturais entre os bioprodutos que podem influenciar nos parâmetros tensoativos dos mesmos.

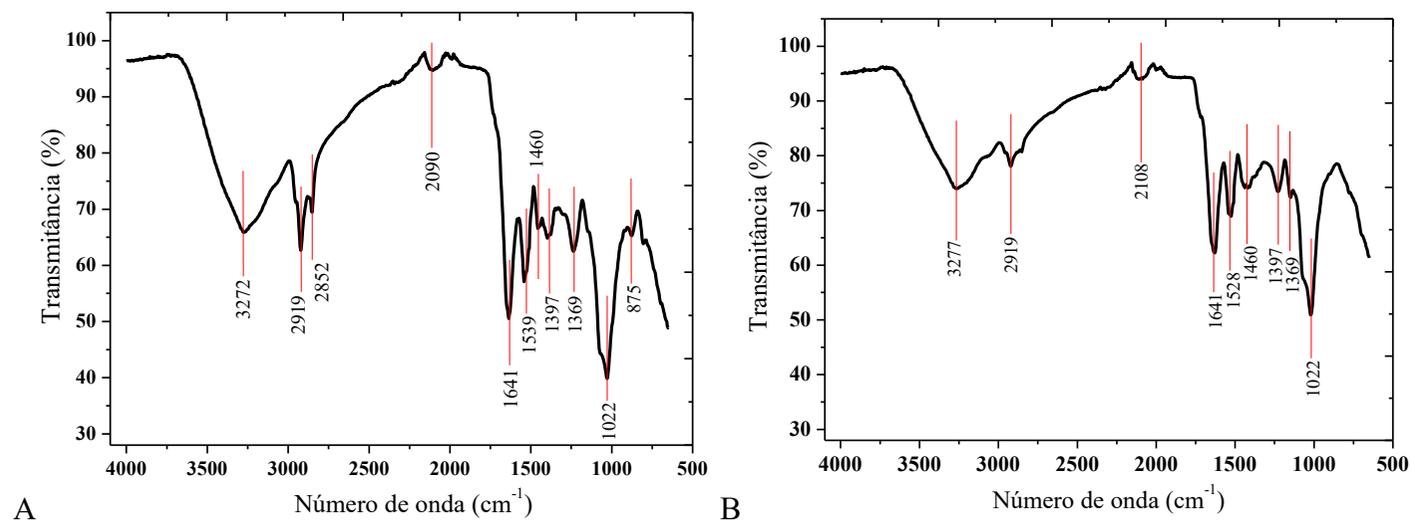
4.3.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os grupos funcionais presentes nos biossurfactantes produzidos foram identificados através da espectroscopia de infravermelho. Apesar das diferentes fontes de carbono utilizadas, os perfis espectrais indicam semelhanças estruturais entre os bioprodutos. Neste contexto, foram identificados picos referentes às ligações peptídicas e à grupamentos carboxílicos, apontando a existência de hidrocarbonetos alifáticos ligados a um domínio peptídico, característica presente nos lipopeptídeos como pode ser observado na Tabela 7 e Figura 20.

As bandas de absorção na faixa de 3300 cm^{-1} a 3060 cm^{-1} ao padrão de estiramento das ligações N-H; bandas com comprimento de onda de aproximadamente 1640 cm^{-1} e 1530 cm^{-1} referem-se à estiramento de ligações OC-N e deformação da ligação N-H combinado com o estiramento de C-N, respectivamente, sugerindo a presença de grupamentos amina e ligações peptídicas. A presença de cadeias alifáticas ($-\text{CH}_3-$; $-\text{CH}_2-$) com estiramento são apontadas nos espectros nas bandas entre 2080 cm^{-1} a 2980 cm^{-1} e com torção na faixa entre 1470 cm^{-1} a 1356 cm^{-1} . Além disso, foi possível observar na faixa de absorção entre 1000 cm^{-1} e 675 cm^{-1} um grupo funcional relacionado aos alcenos para a molécula obtida em bioprocessos que usou diesel como fonte de carbono (AMBUST *et al.*, 2022; NAYAK *et al.*, 2020; NOR *et al.*, 2021; RAVINDRAN; KIRAN; SELVIN, 2022; YALAOUI-GUELLAL *et al.*, 2021).

Na Tabela 7, destaca-se uma menor quantidade dos picos relacionados aos grupamentos amina em comparação aos picos referentes às cadeias alifáticas. Isto pode ter correlação com os parâmetros estruturais do bioproduto, pois os biossurfactantes são macromoléculas complexas que necessitam de técnicas mais refinadas para a sua elucidação. Deste modo, é necessária uma caracterização mais aprofundada das biomoléculas, objetivando o tipo e a classe dos lipopeptídeos produzidos.

Figura 20 - Espectros FTIR dos biossurfactantes produzidos por *Alcanivorax* sp. FOR1501, usando diesel (A) e petróleo e glicose (B) como fonte de carbono.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Tabela 7 - Descrição das bandas de FTIR em suas respectivas faixas de absorção (cm^{-1})

Picos FTIR									
Grupo funcional	N-H	CO-N	CN/N-H	C-N	-CH ₃ ;-CH ₂ -		C=C	Porção polissacarídica	
					v	δ			
Faixa de absorção (cm^{-1})	3300-3060	~1640	~1530	1360-1080	2080-2980	1470-1356	1000-675	~1020	
Fonte de carbono	Diesel	3272	1641	1539	1295/1232	2919/2852/2090	1460/1397/1369	875/801	1022
	Petróleo e glicose	3277	1641	1528	1221/1142	2919/2108	1437/1409	-	1022

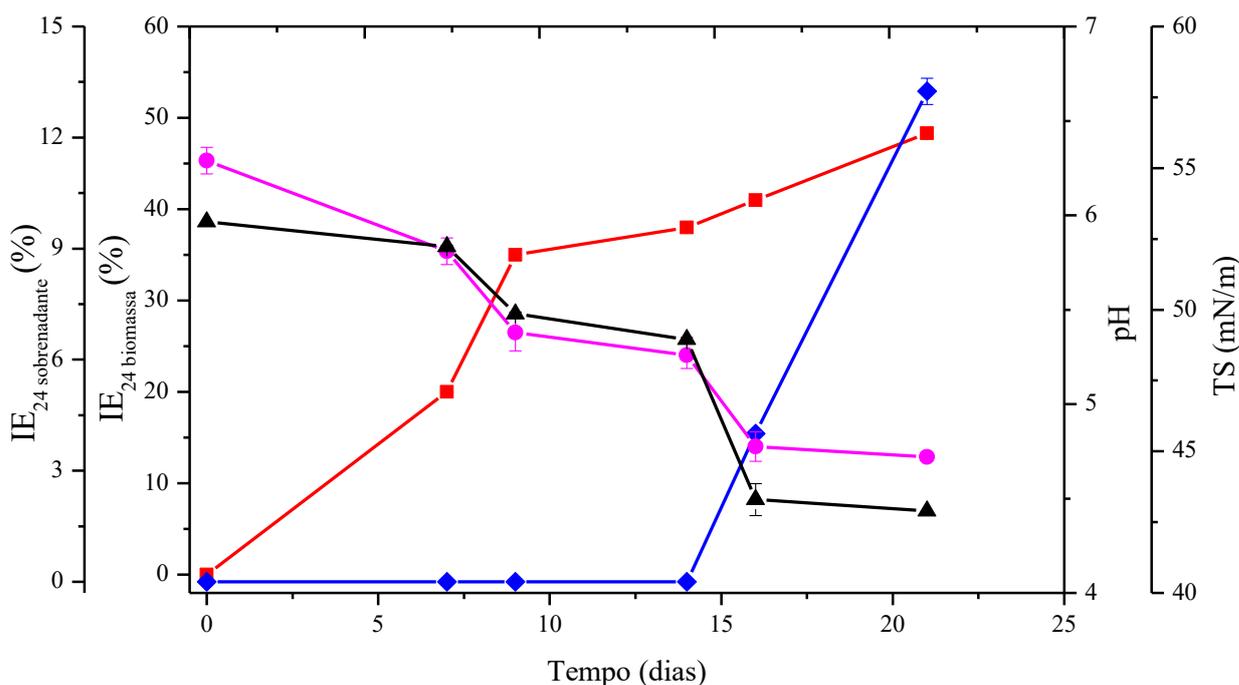
Fonte: Elaborado pela autora (2023)

4.4 Avaliação do uso do diesel como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes

4.4.1 Estudo cinético da produção de biossurfactantes a partir do diesel

Visualizando a Figura 13 é possível notar que somente o diesel foi capaz de produzir emulsões estáveis com índice superior a 50% e de reduzir a tensão superficial. Além disso, nas condições estudadas, os biossurfactantes produzidos a partir do diesel são expelidos para o sobrenadante como foi possível observar na Figura 14a. Por isso, o experimento foi reproduzido novamente e os parâmetros de IE₂₄ (sobrenadante e biomassa), tensão superficial e pH foram monitorados ao longo dos 21 dias, sendo os resultados apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Acompanhamento do IE₂₄ do sobrenadante (◆), IE₂₄ da suspensão microbiana (■), TS do sobrenadante (▲) e pH (●) do meio de cultivo ao longo do bioprocessamento usando *Alcanivorax* sp. FOR1501, 1% (v/v) de diesel como fonte de carbono e conduzido a 35 °C, 150 rpm por 21 dias.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A partir do gráfico exposto na Figura 21 é possível notar que durante todo o período avaliado houve a formação de emulsificação em análise realizada com a suspensão microbiana, atingido um IE₂₄ de 48,3% em 21 dias de processo. Já utilizando o sobrenadante ausente de células, observa-se a formação de emulsão, somente ao final do processo, no qual obteve-se um IE₂₄ de 13,2%. O pH também é outra variável que sofreu variação, no qual o meio acidificou durante o bioprocessamento, pois houve uma redução deste fator de 6,2 para 4,7. Outro parâmetro

avaliado neste estudo foi a tensão superficial, no qual a sua redução pode ser observada a partir do sétimo dia de monitoramento e chegou a 42,9 mN/m ao final do experimento. Assim, é possível observar uma redução de 35,3% em relação ao meio mineral BH salino.

Diversos fatores ambientais podem ter influenciado nos resultados de tensão superficial e índice de emulsificação. Fatores como a salinidade e o pH são parâmetros importantes quanto à produção de biossurfactantes, pois, além de afetarem o crescimento microbiano, eles podem afetar as características adsorptivas, assim como sua morfologia (ABOUSEOUD *et al.*, 2010; BELHAJ *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2021). Neste trabalho, os meios para o cultivo de *Alcanivorax* sp. FOR1501, produção de biossurfactantes e ensaios de biodegradação foram suplementados com 3% (m/v) de NaCl, pois são microrganismos halófilos, e o pH do meio mineral BH foi ajustado para 6,0.

Neste contexto, estudos afirmam que meios contendo uma faixa de concentração de 0-20% de sais possuem uma fraca influência na redução da tensão superficial e do índice de emulsificação, inferindo a pouca influência desta condição ambiental nos parâmetros tensoativos do bioproduto obtido (ABOUSEOUD *et al.*, 2010; ZHANG; FENG; XUE, 2022).

Entretanto, o pH possui influência na redução da tensão superficial e no índice de emulsificação, no qual o aumento do pH possui um efeito positivo na diminuição da TS e no aumento do IE₂₄ (ABOUSEOUD *et al.*, 2010). Isto pode ser explicado devido que na presença de grupos hidroxila (-OH) há uma maior estabilidade das micelas de ácidos graxos-surfactantes (ABOUSEOUD *et al.*, 2010; BELHAJ *et al.*, 2020).

Deste modo, tendo a vista a redução de pH durante o bioprocessamento, é possível afirmar que o controle de pH durante o bioprocessamento seja um fator importante para a obtenção de valores de tensão superficial menores e IE₂₄ maiores, necessitando a investigação deste parâmetro em trabalhos futuros.

Assim, tendo em vista que o diesel foi a fonte de carbono mais promissora, foi realizado um estudo de precipitação do bioproduto de interesse utilizando este hidrocarboneto como fonte de carbono, visando avaliar o método de separação mais adequado para a biomolécula produzida neste estudo.

4.4.2 Avaliação dos métodos de separação do biossurfactante

Objetivando maiores rendimentos do bioproduto obtido a partir de *Alcanivorax* sp. FOR1501, usando diesel como substrato, três diferentes métodos foram avaliados. É importante destacar que cada método foi testado, também, com a cultura de células lisada por processo de ultrassônico, tendo em vista os resultados obtidos através da suspensão microbiana na avaliação

do IE₂₄. Os dados de separação dos biossurfactantes por diferentes métodos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração do bioproducto precipitado por diferentes métodos.

Tipo de cultura	Método de separação	Concentração de biossurfactante (mg/L)
Sobrenadante ausente de células	Precipitação ácida	99,2
	Extração etanólica	740,0
	Precipitação com sulfato de amônio	96,8
Cultura de <i>Alcanivorax</i> sp. FOR1501 lisada	Precipitação ácida	66,2
	Extração etanólica	296,8
	Precipitação com sulfato de amônio	41,2

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Ao observar a Tabela 8 é notório que, o método que demonstrou ser melhor para a obtenção do biossurfactante produzido por *Alcanivorax* sp. FOR1501 foi o de extração por etanol sem rompimento celular, obtendo uma quantidade 86,6% e 86,9% maior que o método de precipitação ácida e por sulfato de amônio, ambos sem lise de células, respectivamente.

Deste modo, os métodos avaliados usando a cultura lisada obtiveram menores rendimentos em comparação aos métodos utilizando a cultura padrão. Isto pode ser associado à metodologia utilizada para promover o rompimento celular, que, possivelmente, resultou em variações estruturais na molécula do bioproducto (BEHZADNIA *et al.*, 2020). Deste modo, é importante a investigação de parâmetros ultrassônicos adequados para promover um aumento do rendimento do produto de interesse.

5 CONCLUSÃO

A bactéria *Alcanivorax* sp. FOR1501, isolada do óleo pesado derramado na praia de Fortim, Ceará, Brasil, é promissora para degradação de alcanos de cadeia média e longa. Além do que, a cepa é capaz de produzir compostos ativos de superfície usando diesel como fonte de carbono, dentre estes produtos um biossurfactante com semelhança estrutural à classe dos lipopeptídeos. Ademais, é possível afirmar que a *Alcanivorax* sp. FOR1501 é promissora para a aplicação em diferentes técnicas de biorremediação que poderão auxiliar na mitigação dos impactos causados por derramamentos de petróleo e seus derivados no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABBOT, V. *et al.* A review on the physicochemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceuticals. **Heliyon** **8**, 2022. e10149.
- ABOUSEOUD, M. *et al.* Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Hazardous Materials**, 2010. v. 180, n. 1–3, p. 131–136.
- ADAMS, G. O. *et al.* Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, 29 out. 2020. v. 3, n. 1, p. 28–39.
- AL-HAWASH, A. B. *et al.* Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, 2018, p. 71-76.
- ALI KHAN, A. H. *et al.* Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. **Ecological Engineering**, 1 jul. 2017. v. 104, p. 158–164.
- AL-SAKKAF, M. K.; ONAIZI, S. A. Crude oil/water nanoemulsions stabilized by rhamnolipid biosurfactant: Effects of acidity/basicity and salinity on emulsion characteristics, stability, and demulsification. **Fuel**, 15 jul. 2023. v. 344.
- AMBUST, S. *et al.* Remediation and detoxification of oil contaminated marine intertidal sites through lipopeptide assisted washing strategy: An experimental and kinetic validation approach. **Marine Pollution Bulletin**, 1 jul. 2022. v. 180.
- ANGELIM, A.L. Seleção e imobilização de consórcios de bactérias hidrocarbonoclasticas e produtoras de compostos ativos de superfície para aplicações em processos de biorremediação. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- ANTONIOU, E. *et al.* Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. **Frontiers in Microbiology**, 2015. v. 6, n. APR.
- ASLAN, V. Fuel characterization, engine performance characteristics and emissions analysis of different mustard seed biodiesel: An overview. **Journal of Biotechnology**, 2023, p. 12-30.
- AZEVEDO, R. N. A. *et al.* Is there a similarity between the 2019 and 2022 oil spills that occurred on the coast of Ceará (Northeast Brazil)? An analysis based on forensic environmental geochemistry. **Environmental Pollution**, 1 dez. 2022. v. 314.
- BANET, G. *et al.* The effects of biostimulation and bioaugmentation on crude oil biodegradation in two adjacent terrestrial oil spills of different age, in a hyper-arid region. **Journal of Environmental Management**, 15 maio. 2021. v. 286.
- BAYAT, Z.; HASSANSHAHIAN, M.; HESNI, M. A. Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Macra stultorum* collected from the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, 15 abr. 2016. v. 105, n. 1, p. 120–124.
- BEHZADNIA, A. *et al.* Lactobacillus plantarum-derived biosurfactant: Ultrasound-induced production and characterization. **Ultrasonics Sonochemistry**, 1 jul. 2020. v. 65.

BELHAJ, A. F. *et al.* The effect of surfactant concentration, salinity, temperature, and pH on surfactant adsorption for chemical enhanced oil recovery: a review. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, 1 jan. 2020. v. 10, n. 1, p. 125–137.

BEYER, J. *et al.* Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. **Marine Pollution Bulletin**, 2016, p. 28-51.

CAO, Y. *et al.* Responses of Alcanivorax species to marine alkanes and polyhydroxybutyrate plastic pollution: Importance of the ocean hydrocarbon cycles. **Environmental Pollution**, 15 nov. 2022. v. 313.

CAMPOS, F. F. *et al.* Alcanivorax dieselolei, an alkane-degrading bacterium associated with the mucus of the zoanthid Palythoa caribaeorum (Cnidaria, Anthozoa). **Brazilian Journal of Biology**, 7 jul. 2015. v. 75, n. 2, p. 431–434.

CAROLIN, F. *et al.* Sustainable production of biosurfactants via valorisation of industrial wastes as alternate feedstocks. **Chemosphere**, 1 jan. 2023. v. 312.

CASTRO, L. G. Z. Consórcio microbiano isolado a partir do óleo derramado no Nordeste brasileiro: Biorremediação de áreas contaminadas. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Centro de Tecnologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

CHAMANROKH, P.; ASSADI, M. M.; NOOHI, A.; YAHYAI, S. Emulsan analysis produced by locally isolated bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.**, 2008, Vol. 5, No. 2, pp. 101-108.

CHEN, J. *et al.* Oil spills from global tankers: Status review and future governance. **Journal of Cleaner Production**, 2019, p. 20-32.

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

CHUNYAN, X. *et al.* The role of microorganisms in petroleum degradation: Current development and prospects. **Science of The Total Environment**, mar. 2023. v. 865, p. 161112.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 1987, v. 53, n. 2, p. 224-229.

COSTA, S. P. *et al.* Vegetative cells of *Bacillus pumilus* entrapped in chitosan beads as a product for hydrocarbon biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, fev. 2014. v. 87, p. 122–127.

CRAVEIRO, N. *et al.* Immediate effects of the 2019 oil spill on the macrobenthic fauna associated with macroalgae on the tropical coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 1 abr. 2021. v. 165.

DECESARO, A. *et al.* Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation. **Environmental Science and Pollution Research**, 1 set. 2017. v. 24, n. 26, p. 20831–20843.

DELLAGNEZZE, B. M. *et al.* Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale. **Marine Pollution Bulletin**, 15 jun. 2016. v. 107, n. 1, p. 107–117.

- DONG, C. *et al.* Alcanivorax profundimaris sp. nov., a Novel Marine Hydrocarbonoclastic Bacterium Isolated from Seawater and Deep-Sea Sediment. **Current Microbiology**, 1 mar. 2021. v. 78, n. 3, p. 1053–1060.
- DU NÖUY, P. L. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 625–631, 20 maio 1925.
- DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U. Natural carriers in bioremediation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2016, p. 28-36.
- FENIBO, E. O. *et al.* Medium-chain alkane biodegradation and its link to some unifying attributes of alkB genes diversity. **Science of the Total Environment**, 2023, p. 163951.
- FRANÇA, Í. W. L. DE *et al.* Production of a biosurfactant by Bacillus subtilis ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, 29 jul. 2015. v. 255, p. 10–15.
- FUKUYAMA, A. K.; SHIGENAKA, G.; COATS, D. A. Status of intertidal infaunal communities following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska. **Marine Pollution Bulletin**, 15 jul. 2014. v. 84, n. 1–2, p. 56–69.
- GANESH, A.; LIN, J. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. **African Journal of Biotechnology**, 2009. v. 8, n. 21, p. 5847–5854.
- GAUR, V. K. *et al.* Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: Strategies and advancements. **Environmental Technology and Innovation**. 2022, p. 102132.
- GILL, D. A.; RITCHIE, L. A.; PICOU, J. S. Sociocultural and psychosocial impacts of the Exxon Valdez oil spill: Twenty-four years of research in Cordova, Alaska. **Extractive Industries and Society**, 2016, p. 1105-1116.
- GIRO, M. E. A. *et al.* Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by Bacillus subtilis in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, 2009. v. 4, n. 5, p. 738–747.
- GÓNGORA, E. *et al.* Hydrocarbon bioremediation on Arctic shorelines: Historic perspective and roadway to the future. **Environmental Pollution**, 2022, p. 119247.
- GUSMAO, J. B. *et al.* The barnacle Chthamalus bisinuatus is the only sessile invertebrate colonizing oil patches on beachrocks one year after a massive oil spill on the Northeastern Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**, 1 dez. 2021. v. 173.
- GUTIERREZ, T. *et al.* Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. **ISME Journal**, nov. 2013a. v. 7, n. 11, p. 2091–2104.
- HASSANSHAHIAN, M.; AMIRINEJAD, N.; ASKARINEJAD BEHZADI, M. Crude oil pollution and biodegradation at the Persian Gulf: A comprehensive and review study. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, 1 dez. 2020. v. 18, n. 2, p. 1415–1435.
- HAWKINS, S. J. *et al.* Distinguishing globally-driven changes from regional- and local-scale impacts: The case for long-term and broad-scale studies of recovery from pollution. **Marine Pollution Bulletin**, 30 nov. 2017. v. 124, n. 2, p. 573–586.
- HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A. Lipopeptide biosurfactant from Bacillus clausii BS02 using sunflower oil soapstock: Evaluation of high throughput screening methods,

production, purification, characterization and its insecticidal activity. **RSC Advances**, 2015. v. 5, n. 4, p. 2974–2982.

HUSSAIN, A. *et al.* In-situ, Ex-situ, and nano-remediation strategies to treat polluted soil, water, and air – A review. **Chemosphere**, 2022, p. 133252.

IBRAR, M.; YANG, X. Reconstructing polyaromatic hydrocarbons degrading pathways in the enriched bacterial consortium and their biosurfactants characterization. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 1 abr. 2022. v. 10, n. 2.

IMRON, M. F. *et al.* Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. **Journal of Cleaner Production**, 2020, p. 119716.

IMRON; KURNIAWAN, S. B.; TITAH, H. S. Potential of bacteria isolated from diesel-contaminated seawater in diesel biodegradation. **Environmental Technology and Innovation**, 1 maio. 2019a. v. 14.

JABBAR, N. M. *et al.* Challenges in the implementation of bioremediation processes in petroleum-contaminated soils: A review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, 2022, p. 100694.

JAHAN, R. *et al.* Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2020, p. 102061.

JEFFERY, S. *et al.* Oil spill response planning in Pacific Canada: A tool for identifying vulnerable marine biota. **Marine Policy**, 1 fev. 2023. v. 148.

KASHIF, A. *et al.* Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2022, p. 102718.

KOTOKY, R.; OGAWA, N.; PANDEY, P. The structure-function relationship of bacterial transcriptional regulators as a target for enhanced biodegradation of aromatic hydrocarbons. **Microbiological Research**, 2022, p. 127087.

LAI, Q.; LI, W.; SHAO, Z. Complete genome sequence of *Alcanivorax dieselolei* type strain B5. **Journal of Bacteriology**, 2021, p. 6674.

LINDEBERG, M. R. *et al.* Conditions of persistent oil on beaches in Prince William Sound 26 years after the Exxon Valdez spill. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, 1 jan. 2018. v. 147, p. 9–19.

LISIECKI, P. *et al.* Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. **Fuel**, 2014a. v. 116, p. 321–327.

LISIECKI *et al.* Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. **Fuel**, 2014b. v. 116, p. 321–327.

LIU, C.; SHAO, Zongze. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, maio. 2005. v. 55, n. 3, p. 1181–1186.

LIU, J. *et al.* Enhanced degradation of different crude oils by defined engineered consortia of *Acinetobacter venetianus* RAG-1 mutants based on their alkane metabolism. **Bioresource Technology**, 1 maio. 2021. v. 327.

- LJEŠEVIĆ, M. *et al.* Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by *Oerskovia* sp. followed by comprehensive GC×GC-TOF MS. **Journal of Hazardous Materials**, 5 fev. 2019. v. 363, p. 227–232.
- LOURENÇO, R. A. *et al.* Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. **Marine Pollution Bulletin**, 1 jul. 2020. v. 156.
- MAGALHÃES, K. M. *et al.* Oil spill + COVID-19: A disastrous year for Brazilian seagrass conservation. **Science of the Total Environment**, 10 abr. 2021. v. 764.
- MAGALHÃES *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. **Marine Pollution Bulletin**, 1 fev. 2022. v. 175.
- MELO, A. P. Z. *et al.* Disasters with oil spills in the oceans: Impacts on food safety and analytical control methods. **Food Research International**, 2022, p. 111336.
- MNIF, I. *et al.* Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, 2017. v. 109, p. 72–81.
- MUTHUKUMAR, B. *et al.* Influence of bioaugmentation in crude oil contaminated soil by *Pseudomonas* species on the removal of total petroleum hydrocarbon. **Chemosphere**, 1 jan. 2023. v. 310.
- NAYAK, N. S. *et al.* Biosurfactant production and engine oil degradation by marine halotolerant *Bacillus licheniformis* LRK1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 1 out. 2020. v. 29.
- NG, Y. J. *et al.* Recent advances of biosurfactant for waste and pollution bioremediation: Substitutions of petroleum-based surfactants. **Environmental Research**, 1 set. 2022. v. 212.
- NIXON, Z.; MICHEL, J. A Review of distribution and quantity of lingering subsurface oil from the Exxon Valdez Oil Spill. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, 1 jan. 2018. v. 147, p. 20–26.
- NOHATA, Y.; AZUMA, J.-I.; KURANE, R. Structural studies of a neutral polysaccharide produced by *Alcaligenes latus*. **Carbohydrate Research**. [S.l.]: ELSEVIER, 1996.
- NOR, F. H. M. *et al.* Production of lipopeptide biosurfactant by *Kurthia gibsonii* KH2 and their synergistic action in biodecolourisation of textile wastewater. **Environmental Technology and Innovation**, 1 maio. 2021. v. 22.
- OLIVEIRA, D. W. F., FRANÇA, Í. W. L., FÉLIX, A. K. N., MARTINS, J. J. L., GIRO, M. E. A., Melo, V. M. M., & GONÇALVES, L. R. B. (2013). Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 101, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.011>
- OLIVERA, N. L. *et al.* Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. **Research in Microbiology**, jan. 2009. v. 160, n. 1, p. 19–26.
- PYDIMALLA, M. *et al.* Sustainable biodiesel: A comprehensive review on feedstock, production methods, applications, challenges and opportunities. **Materials Today: Proceedings**, 2023.

QIAO, N.; SHAO, Z. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. **Journal of Applied Microbiology**, abr. 2010. v. 108, n. 4, p. 1207–1216.

RAHMATI, F. *et al.* A Review on Biotechnological Approaches Applied for Marine Hydrocarbon Spills Remediation. **Microorganisms**, 2022, v. 10, p. 1289.

RAHUL, K. *et al.* *Alcanivorax xenomutans* sp. nov., a hydrocarbonoclastic bacterium isolated from a shrimp cultivation pond. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 1 out. 2014. v. 64, p. 3553–3558.

RATHOD, V. P. *et al.* Effect of bioremediation technique on engineering properties of crude oil-contaminated soil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 1 ago. 2022. v. 43.

RAVINDRAN, A.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Revealing the effect of lipopeptide on improving the probiotics characteristics: Flavor and texture enhancer in the formulated yogurt. **Food Chemistry**, 1 maio. 2022. v. 375.

REDDY, C. M. *et al.* Synergy of Analytical Approaches Enables a Robust Assessment of the Brazil Mystery Oil Spill. **Energy and Fuels**, 17 nov. 2022.

REHMAN, R. *et al.* Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma* sp. **Journal of Hazardous Materials**, 15 set. 2021. v. 418.

RIVAS, R. *et al.* *Alcanivorax balearicus* sp. nov., isolated from Lake Martel. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, jun. 2007. v. 57, n. 6, p. 1331–1335.

RIZZO, C. *et al.* Native bilge water bacteria as biosurfactant producers and implications in hydrocarbon-enriched wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, 1 out. 2021a. v. 43.

RIZZO *et al.* Native bilge water bacteria as biosurfactant producers and implications in hydrocarbon-enriched wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, 1 out. 2021b. v. 43.

ROCHA, M. V. P. *et al.* Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, dez. 2006. v. 22, n. 12, p. 1295–1299.

ROJO, F. Genetic Features and Regulation of n-Alkane Metabolism. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, 2010, p. 1141–1154.

ROSENBERG, M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, 1984. v. 22, n. 3, p. 289–295.

SADRAZODI, S. M. *et al.* Biodegradation of long chain alkanes in halophilic conditions by *Alcanivorax* sp. strain Est-02 isolated from saline soil. **3 Biotech**, 1 abr. 2019a. v. 9, n. 4.

SARUBBO, L. A. *et al.* Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, 2016, v. 7, p. 1646.

SATTAR, S. *et al.* Composition, impacts, and removal of liquid petroleum waste through bioremediation as an alternative clean-up technology: A review. **Heliyon**, out. 2022. v. 8, n. 10, p. e11101.

- SHAIKHULOVA, S. *et al.* Worms eat oil: *Alcanivorax borkumensis* hydrocarbonoclastic bacteria colonise *Caenorhabditis elegans* nematodes intestines as a first step towards oil spills zooremediation. **Science of the Total Environment**, 20 mar. 2021. v. 761.
- SHARMA, S.; PANDEY, L. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. **Bioresource Technology**, 1 jul. 2020. v. 307.
- SHEN, X. *et al.* Experimental study on the biodegradation of naphthalene and phenanthrene by functional bacterial strains in the riparian soil of a binary system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 15 out. 2021. v. 223.
- SOARES, M. O. *et al.* The most extensive oil spill registered in tropical oceans (Brazil): the balance sheet of a disaster. **Environmental Science and Pollution Research**, 1 mar. 2022. v. 29, n. 13, p. 19869–19877.
- SOUSA, M. *et al.* Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: Study of the phase behaviour of emulsified systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 1 jul. 2014. v. 31, n. 3, p. 613–623.
- SOUZA, L. M. DE *et al.* Quantification of residual automotive lubricant oil as an adulterant in Brazilian S-10 diesel using MIR spectroscopy and PLS. **Fuel**, 15 ago. 2014. v. 130, p. 257–262.
- SREENU, N. Impact of crude oil price uncertainty on indian stock market returns: Evidence from oil price volatility index. **Energy Strategy Reviews**, 2022, p. 101002.
- SUN, Y. *et al.* Nutrient depletion is the main limiting factor in the crude oil bioaugmentation process. **Journal of Environmental Sciences (China)**, 1 fev. 2021. v. 100, p. 317–327.
- TAVARES, J. *et al.* Design and validation of an expeditious analytical method to quantify the emulsifying activity during biosurfactants/bioemulsifiers production. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 1 dez. 2021. v. 208.
- 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**, 1 ago. 2018a. v. 133, p. 595–605.
- TITAH, H. S. *et al.* Isolation and screening of diesel degrading bacteria from ship dismantling facility at Tanjungjati, Madura, Indonesia. **Journal of Engineering and Technological Sciences**, 2018. v. 50, n. 1, p. 99–109.
- VIEIRA, I. M. M. *et al.* An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2021, p. 01-18.
- WANG; SHAO. The long-chain alkane metabolism network of *Alcanivorax dieselolei*. **Nature Communications**, 2014. v. 5.
- WHITEHEAD, A. *et al.* Genomic and physiological footprint of the Deepwater Horizon oil spill on resident marsh fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 11 dez. 2012. v. 109, n. 50, p. 20298–20302.
- YALAOUI-GUELLEL, D. *et al.* The petroleum-degrading bacteria *Alcaligenes aquatilis* strain YGD 2906 as a potential source of lipopeptide biosurfactant. **Fuel**, 1 fev. 2021. v. 285.

ZACHARIAS, D. C.; GAMA, C. M.; FORNARO, A. Mysterious oil spill on Brazilian coast: Analysis and estimates. **Marine Pollution Bulletin**, 1 abr. 2021. v. 165.

ZADJELOVIC, V. *et al.* A mechanistic understanding of polyethylene biodegradation by the marine bacterium *Alcanivorax*. **Journal of Hazardous Materials**, 15 ago. 2022. v. 436.

ZHANG, J.; FENG, W.; XUE, Q. Biosurfactant production and oil degradation by *Bacillus siamensis* and its potential applications in enhanced heavy oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 1 abr. 2022. v. 169.

ZHANG, L. *et al.* The impact of agricultural chemical inputs on environment: Global evidence from informetrics analysis and visualization. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, 1 dez. 2018. v. 13, n. 4, p. 338–352.

ZHANG, Y; MILLER, R. M. Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. **Applied and Environmental Microbiology**, 1994.

ZHAO, Z.; SELVAM, A.; WONG, Jonathan Woon Chung. Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. **Bioresource Technology**, mar. 2011. v. 102, n. 5, p. 3999–4007.

ZHONG, H. *et al.* Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, nov. 2007. v. 77, n. 2, p. 447–455.

ZHU, L. *et al.* *Alcanivorax limicola* sp. nov., isolated from a soda alkali-saline soil. **Archives of Microbiology**, 1 jan. 2022. v. 204, n. 1.