



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Bioprospecção de bactérias aeróbias formadoras de endósporos (bafes)  
cultivadas em petróleo e óleo diesel**

Aluno: Maria Júlia Lima Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale

Brasília, DF

março de 2024

Maria Júlia Lima Gonçalves

**Bioprospecção de bactérias aeróbias formadoras de endósporos (bafes)  
cultivadas em petróleo e óleo diesel**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no programa de mestrado em Biologia Microbiana.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique  
Ferreira do Vale

Brasília, DF  
março de 2024

Maria Júlia Lima Gonçalves

**Bioprospecção de bactérias aeróbias formadoras de endósporos (bafes)  
cultivadas em petróleo e óleo diesel**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no programa de mestrado em Biologia Microbiana.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale (UnB-Presidente)

---

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart (UnB)

---

Profa. Dra. Alliny das Graças Amaral (UEG- membro externo)

---

Dr. Jaques Miranda Ferreira de Souza (UnB- suplente)

Dedico à minha família, pelo apoio e incentivo de sempre.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à minha família: meus pais, Maria das Graças e Dilson, que não mediram esforços para oferecer uma educação de qualidade desde os primeiros anos da minha vida. Só foi possível chegar até aqui com seus ensinamentos valiosos sobre a vida, com suporte emocional e financeiro que trilharam meu caminho até o mestrado; aos meus irmãos, Bruno e Miguel, que sempre me apoiaram, sendo com caronas até a UnB ou até mesmo me recebendo em sua casa após longas jornadas de trabalho no laboratório e sala de aula.

Agradeço ao Rafael, meu companheiro que me apoiou em toda minha jornada acadêmica e com seu otimismo, apesar das longas noites de desabafos e reclamações, não me deixou desistir. Acreditando mais em mim do que eu mesma, me ajudou a superar minhas dificuldades quando eu mais precisava.

Agradeço ao Cezar Paranhos, colega de laboratório que juntos compartilhamos ensinamentos, protocolos, desafogos e boas risadas. Foi essencial nessa jornada, tornando-a menos solitária.

Aos meus parceiros de trabalho: Reynaldo Melo, meu primeiro mentor do laboratório que sempre me ensinou com dedicação e cuidado, mesmo quando tão atarefado com suas inúmeras atividades no final do doutorado; Jaques Miranda: com conversas sempre proveitosas, tanto no laboratório como na copa, que me ajudavam a ter uma visão mais ampla do meu trabalho, incentivando a ter um pensamento mais crítico e incisivo que colaboraram na tomada de decisões ao longo do mestrado. Felipe Araújo: meu apoio no laboratório CBafes, prontificado a auxiliar quanto à rotina do laboratório, além das nossas longas conversas sobre vida acadêmica, profissional e científica que nos davam alguns momentos de descontração e decompressão. Aos alunos de Iniciação Científica Vinícius Soares, Isadora Cooke e Rafael Botelho, dedicados ao trabalho e com desejo de aprender, que por muitas vezes mais me ensinaram do que lhes fora ensinado.

Esse trabalho não seria possível sem a participação da professora Marlene Teixeira De-Souza, coordenadora do laboratório LaBafes e da coleção CBafes. Com sua vasta experiência e conhecimento, teve paciência em me ensinar os primeiros passos e cuidados com o laboratório. Disponibilizou para utilização em meu trabalho sua coleção de bactérias, fruto de árduo trabalho com outros alunos que já passaram

pelo LaBafes. Nas nossas longas conversas e discussões, me auxiliou na organização e montagem de experimentos que foram essenciais para meu trabalho, desenvolvimento científico, acadêmico e também pessoal.

Agradeço, principalmente, ao meu orientador Luis Henrique Ferreira do Vale, que abriu as portas da UnB ao me aceitar como sua orientanda. Conduziu junto comigo a nossa pesquisa, sempre se mantendo presente e dedicado. Em meio a conselhos científicos e pessoais, me impulsionou a sempre proporcionar o meu máximo esforço, acreditando no meu sucesso.

## **Apoio financeiro**

Agradeço à FAPDF, pela concessão da bolsa de estudos que permitiu exercer o meu trabalho sem maiores preocupações financeiras, possibilitando minha dedicação integral à pesquisa; pelo financiamento do projeto de demanda espontânea que permitiu o fomento de materiais que foram utilizados neste trabalho.

## RESUMO

As bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) são microrganismos gram-positivos que possuem um baixo teor de guanina-citosina em seu material genético. São capazes de formar o esporo como estratégia de sobrevivência quando se deparam com condições ambientais desfavoráveis. O esporo consiste na unidade celular vegetativa, com metabolismo reprimido e com maior resistência à temperatura, radiações, agentes químicos e predação de organismos superiores. As Bafes possuem diversas aplicabilidades biotecnológicas, estão presentes na produção de bioinseticidas, detergentes, materiais têxteis, biocombustíveis e na biorremediação de metais pesados. A biorremediação traduz-se por remoção, transformação ou redução de agentes poluentes do meio ambiente, como o petróleo. O petróleo consiste em uma mistura complexa de hidrocarbonetos que é utilizado principalmente como combustível e, devido à alta demanda, são frequentes os acidentes petrolíferos que contaminam solos e mares, que perturbam o ciclo de vida desses ecossistemas. Diante desse cenário, encontrar bactérias que sejam capazes de biodegradar o petróleo e óleo diesel é importante para a construção de um sistema biorremediador eficaz. O objetivo deste trabalho foi selecionar Bafes que fossem capazes de utilizar hidrocarbonetos para obtenção de energia quando ofertados petróleo e óleo diesel S10 como única fonte de carbono. As bactérias utilizadas nesse estudo são Bafes isoladas do solo do Distrito Federal (SDF) que fazem parte do acervo da coleção CBafes do Laboratório de Microbiologia/ LaBafes da Universidade de Brasília. Foram selecionadas 50 linhagens SDF para cultivo. Após a primeira triagem, foram cultivadas 46 linhagens SDF em meio mineral sólido suplementado e óleo diesel como única fonte de carbono. De 46, 9 linhagens apresentaram crescimento em óleo diesel S10 e 5 linhagens foram capazes de crescer no meio de cultura contendo petróleo. Foram escolhidas duas linhagens que apresentaram maior crescimento nos meios utilizados e performado testes de quantificação de proteínas totais intracelulares e secretadas, teste qualitativo do consumo bacteriano de petróleo, testes da capacidade de produção de lipases e de biossurfactantes e da habilidade de adesão à hidrocarbonetos. Foram observadas diferenças em relação à concentração de proteínas nos diferentes meios testados, assim como diferenças entre proteínas intracelulares e secretadas. Foi constatada a ausência da formação de biossurfactantes, o que motivou a busca de outro teste que pudesse evidenciar o artifício utilizando pelas linhagens para o contato entre o óleo e a célula, confirmado pelo teste de adesão das linhagens ao óleo diesel. A robusta e extensiva busca por bactérias degradadoras de óleo diesel e petróleo, assim como seus estudos preliminares, proporcionam diversas possibilidades promissoras para pesquisas mais aprofundadas acerca de microrganismos biorremediadores de petróleo e derivados.

**Palavras-chave:** Biorremediação; Microrganismos; Hidrocarbonetos.



## ABSTRACT

Aerobic endospore-forming bacteria (Bafes) are gram-positive microorganisms with low guanine-cytosine content in their genetic material. They can form spores as a survival strategy when faced with unfavorable environmental conditions. The spore consists of the vegetative cellular unit, with repressed metabolism and higher resistance to temperature, radiation, chemical agents, and predation of superior organisms. Bafes have several biotechnological applications: they produce bioinsecticides, detergents, textile materials, biofuels, and bioremediation of heavy metals. Bioremediation translates into removing, transforming, or reducing polluting agents from the environment, such as petroleum. Petroleum consists of a complex mixture of hydrocarbons mainly used as fuel, and, due to the high demand, accidents that contaminate soils and seas are frequent, disturbing the life cycle of these ecosystems. Given this scenario, finding bacteria capable of biodegrading petroleum and diesel oil is essential for building an effective bioremediation system. This work aims to select Bafes that can use hydrocarbons to obtain energy when petroleum and diesel S10 are offered as the only carbon source. The bacteria used in this study are Bafes isolated from the Distrito Federal soil (SDF) that are part of the CBafes collection of the Microbiology Laboratory/LaBafes of the University of Brasília. 50 SDF strains were selected for cultivation. After the first screening, 46 SDF strains were cultivated in a solid mineral medium supplemented with diesel oil as the sole carbon source. Out of 46, 9 strains grew in S10 diesel oil, and five strains were able to grow in the petroleum-containing medium. Two strains that showed more significant growth in the media used were chosen for quantification tests for total intracellular and secreted proteins, qualitative tests for bacterial oil consumption, tests for lipases and biosurfactants production, and the ability to adhere to hydrocarbons. Disparities were observed in the concentration of proteins in the different media tested, as well as the differences between intracellular and secreted proteins. The absence of the biosurfactant formation motivated the search for another test that could reveal the device used by the strains for contact between the oil and the cell, confirmed by the adhesion test of the strains to diesel oil. The robust and extensive search for diesel and petroleum degrading bacteria and their preliminary studies offers several promising possibilities for further research on microorganisms that bioremediate petroleum and derivatives.

**Keywords:** Bioremediation; Microorganisms; Bacteria.

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Fluxograma da biodegradação de um n-alcano por ataque monoterminal. .....	26
<b>Figura 2.</b> Fluxograma da biodegradação de compostos aromáticos. ....	27
<b>Figura 3.</b> Organograma para a seleção de linhagens SDF que foram selecionadas	37
<b>Figura 4.</b> Imagem de placa da linhagem SDF0075 após 24 horas de incubação a 28°C em meio Bushnell-Hass suplementado com extrato de levedura (BH+EXT)....	46
<b>Figura 5.</b> Imagem de placa da linhagem SDF0075 após 7 dias de incubação em meio Bushnell-Hass suplementado com óleo diesel S10 (BH+ODS10) s. ....	46
<b>Figura 6.</b> Imagem da placa da linhagem SDF0075 após 7 dias de incubação em meio Bushnell-Hass suplementado com 0,1% de petróleo (A) e com 1% de petróleo (B). ....	47
<b>Figura 7.</b> Imagem da microscopia por contraste de fase (MCF) da linhagem SDF0075 após 7 dias de incubação a 28°C em meio BH+ODS10. ....	48
<b>Figura 8.</b> Crescimento de <i>Peribacillus simplex</i> (SDF0016) quando inoculada nos meios de cultura Bushnell Haas suplementado com óleo diesel S10 a 1% (BH+ODS10) e extrato de levedura.....	50
<b>Figura 9.</b> Crescimento de <i>Peribacillus simplex</i> (SDF 0075) quando inoculada nos meios de cultura Bushnell Haas suplementado com óleo diesel S10 a 1% (BH+ODS10) e extrato de levedura.....	51
<b>Figura 10.</b> Imagem das placas do inóculo em meio tributirina da linhagem SDF0016 (A) e SDF0075 (C). ....	53
<b>Figura 11.</b> Imagem de microscopia de contraste de fase das células bacterianas da linhagem SDF0016 (A) e SDF0075 (C) aderidas ao óleo diesel S10.....	55
<b>Figura 12.</b> Histograma comparativo da concentração de proteínas intracelulares e secretadas em diferentes meios de cultura da linhagem SDF0016. ....	56
<b>Figura 13.</b> Histograma comparativo da concentração de proteínas intracelulares e secretadas em diferentes meios de cultura da linhagem SDF0075. ....	57
<b>Figura 14.</b> Geis de eletrofose SDS-PAGE da linhagem SDF0016 de proteínas intracelulares e secretadas quando cultivada nos meios BH+ETX, BH+ODS10 e BH+PET.....	58

**Figura 15.** Geis de eletrofose SDS-PAGE da linhagem SDF0075 de proteínas intracelulares e secretadas quando cultivada nos meios BH+ETX, BH+ODS10 e BH+PET.....59

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Crescimento bacteriano nos meios nutriente, LB, BH+EXT e BH+ODS10. .....	44
<b>Tabela 2.</b> Características das linhagens SDF0016 e SDF0075. ....	49
<b>Tabela 3.</b> Comparação entre as absorvâncias da suspensão inicial e após o teste de adesão. ....	54

## Lista de abreviaturas e siglas

Bafes-	Bactérias aeróbias formadoras de endósporos
BH-	Meio de cultura Bushnell-Haas
BH+EXT-	Bushnell Haas com extrato de levedura
BH+ODS10-	Bushnell Haas com óleo diesel S10
BH+PET-	Bushnell Haas com petróleo
CBafes-	Coleção de bactérias aeróbias formadoras de endósporos
DCPIP-	2,6-diclorofenol indofenol
HPA-	Hidrocarbonetos policíclicos
IE-	Índice enzimático
kDa-	kilodalton
LaBafes-	Laboratório Bactérias aeróbias formadoras de endósporos
LB-	Luria Bertania
MCF-	Microscopia de contraste de fase
MMO-	Metano monooxigenase
NAD(P)H-	<i>Nicotanamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NADH-	<i>Nicotanamide adenine dinucleotide</i>
OD-	<i>Optical density</i>
PES-	Membrana de Polietersulfona
pH-	Potencial hidrogeniônico
pMMO-	Metano monooxigenases particuladas
rpm-	Rotações por minuto
SDF-	Solo do Distrito Federal
SDS-PAGE-	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sMMO-	Metano monooxigenases solúveis
UBTE-	Ultrabaixo teor de enxofre
UV-	Luz ultravioleta
v/v-	Relação percentual de volume por volume
w/v -	Relação percentual de peso por volume

## Lista de símbolos

%-	Porcentagem
µg-	Microgramas
µg/µL-	Microgramas por microlitro
µL-	Microlitro
µm-	Micrômetro
cm-	Centímetros
g-	Gramas
g/L-	Gramas por litro
g/m <sup>2</sup> -	Gramas por metro quadrado
M-	Molar
mL-	Mililitro
mm-	Milímetro
mM-	Milimolar
°C-	Graus Celsius

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1	Filo <i>Bacillota</i>	17
1.2	Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes)	18
1.3	Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (CBafes)	19
1.4	Petróleo	19
1.5	Derramamentos de petróleo e seus impactos	21
1.6	Manejo do petróleo	23
1.7	Utilização de hidrocarbonetos por bactérias	24
1.7.1	Degradação de compostos saturados	26
1.7.2	Degradação de compostos aromáticos	27
1.8	Proteômica de organismos biorremediadores	28
1.9	Enzimas que participam do consumo de hidrocarbonetos	29
1.10	Produtos biorremediadores	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>33</b>
3.1	Objetivos específicos	33
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>34</b>
4.1	Microrganismos	34
4.2	Hidrocarbonetos	35
4.3	Meios de cultura	35
4.4	Bioprospecção	36
4.5	Cultivo bacteriano	37
4.6	Curva de crescimento	38
4.7	Biodegradação de hidrocarbonetos	38
4.8	Lipases	39
4.9	Detecção de biossurfactantes	40
4.10	Adesão a hidrocarbonetos	40
4.11	Lise bacteriana física e química	41
4.12	Quantificação de proteínas totais	42
4.13	Eletroforese desnaturante <i>SDS-PAGE</i>	42
4.14	Estatística	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
5.1	Bioprospecção	44

5.2	Curva de crescimento .....	50
5.3	Biodegradação de hidrocarbonetos.....	51
5.4	Lipases.....	52
5.5	Detecção de biossurfactantes .....	54
5.6	Adesão a hidrocarbonetos .....	54
5.7	Quantificação de proteínas totais.....	56
5.8	Eletroforese desnaturante <i>SDS-PAGE</i> .....	57
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Filo *Bacillota*

O filo *Bacillota*, anteriormente designado *Firmicutes*, foi proposto inicialmente em 1978 por Gibbons e Murray para abarcar todas aquelas bactérias com parede celular gram-positiva. Posteriormente, a quantidade de citocina-guanina (G+C) do material genético foi usada para diferenciar o filo em três classes: *Bacilli* e *Clostridia* com baixo teor G+C e *Mollicutes* com alto teor G+C. Porém, devido a suas características fenotípicas serem tão distintas das demais, como ausência de parede celular, peptidoglicano e ácido murâmico, com células flexíveis e altamente pleomórficas, a classe *Mollicutes* foi removida e realocada ao Filo *Mycoplasmata* (anteriormente denominado *Tenericutes*). Atualmente, permanecem no filo as classes *Bacilli* e *Clostridia*, além das incorporadas *Culicoidibacteria*, *Erysipelotrichia*, *Limnochordia*, *Negativicutes* e *Thermolithobacteria* (Schleifer, 2009; *List of Prokaryotic names with Standing Nomenclature*- LPSN).

É um filo fenotipicamente diverso, atualmente compreendendo bactérias com baixo conteúdo G+C, de parede celular rígida, composta de ácido murâmico e por vezes ácido teicóico, sendo gram-positivas ou gram variáveis. Apresentam-se nos formatos de bastões, esféricos, filamentosos ou helicoidais, podendo ser móveis devido a presença de flagelos ou imóveis. São em sua maioria mesófilos, neutrófilos e quimio-organotróficos, porém, possuem representantes termófilos, psicrófilos, acidófilos, alcalífilos, halófitos, fotoheterotróficos. Algumas linhagens são aeróbias, facultativas ou anaeróbias estritas (Schleifer, 2009).

A característica universal deste filo que o diferencia dos demais é o fato de todas as espécies possuírem um conjunto de genes envolvidos no mecanismo de esporulação. No entanto, nem todas as linhagens possuem a capacidade para tal, indicando que esta habilidade foi perdida ao longo da evolução por se tratar de um processo dispendioso (Galperin, 2013).

## 1.2 Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes)

As bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) são microrganismos pertencentes ao filo *Bacillota* e abrangem principalmente as famílias *Bacillaceae* e *Paenibacillaceae*. São ubíquas, podendo habitar o solo, ambientes aquáticos, organismos superiores e ambientes extremos, como águas termais e solos gélidos da Antártida (Chukwudulue *et al.*, 2023; Gomri; Khaldi; Kharroub1, 2018; Hashmi; Bindschedler; Junier, 2020; Vollú *et al.*, 2014).

A característica principal deste grupo de bactérias é a habilidade de formar esporos. Os esporos são formados através do processo de diferenciação celular da célula vegetativa, chamada esporulação, que consiste em uma estratégia de sobrevivência frente ao encontro de condições ambientais desfavoráveis para a sobrevivência da célula. Grandes variações de temperatura, umidade, pH e baixa disponibilidade de nutrientes são alguns dos fatores que podem incitar a formação do esporo (Hutchinson *et al.*, 2014).

O esporo consiste em uma unidade celular dormente, com metabolismo reprimido; são menores, mais leves, desidratadas e com maior resistência à temperatura, radiações UV e gama, agentes químicos e predação de outros organismos (de HOON, 2010). Pode se manter dormente por longos anos e apesar da inatividade relativa, os esporos continuam monitorando o ambiente e ao encontrar condições prósperas, germinam e tornam-se células vegetativas (Mckenney *et al.*, 2012). Os esporos são facilmente carregados através do ar, estando presentes muitas vezes longe do seu local de origem, o que contribui para a ubiquidade destes microrganismos. (Nicholson *et al.*, 2000).

Além da habilidade de habitar diferentes ambientes e de sobreviver às condições mais adversas, as Bafes são capazes de produzir enzimas que clivam polímeros complexos como os lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos, permitindo aos organismos utilizarem esses compostos para sua sobrevivência (Madigan *et al.*, 2016). Portanto, a resistência dessas bactérias ao possuir a habilidade de formar um esporo, em conjunto com a capacidade de produzirem amilases, lipases, hemicelulases e pectinases, tornam esses microrganismos um alvo na indústria biotecnológica. As Bafes estão presentes na produção de bioinseticidas, detergentes, conservantes alimentícios, têxteis, biocombustíveis, probióticos, promotores agrícolas e utilizados também na biorremediação de resíduos industriais e produtos derivados

do petróleo (Cutting, 2010; Grady, 2016; Martínez e Dussán, 2018; Mongkoltharuk, 2012). Estudos utilizando *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Lysinibacillus* revelam uma visão próspera do uso destas bactérias na biorremediação de óleo cru e óleo diesel, bem como a atuação de biossurfactantes produzidos por elas na biodegradação de compostos petrolados (Cubitto *et al.*, 2004; Hernández-Santana e Dussán, 2018; Jimoh e Lin, 2020; Sakthipriya; Doble; Sangwai, 2015).

### 1.3 Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (CBafes)

A coleção Bafes, situada no Laboratório de Microbiologia/Labafes (Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular) dispõe atualmente de um acervo com 312 linhagens SDF (Solo do Distrito Federal) de bactérias aeróbias formadoras de endósporos, designadas SDF0001-0312, além de linhagens *B. cereus* FT9 e linhagens recombinantes de *B. thuringiensis* e *B. circulans* que expressam proteína de fluorescência verde (GFP).

As linhagens bacterianas SDF foram isoladas previamente a partir de amostras de solo coletados de pontos aleatórios do Distrito Federal, selecionadas a partir de choque térmico e armazenadas em papel filtro. O acervo foi caracterizado por abordagens taxonômicas polifásicas, análises filogenéticas por rDNA 16S e genomas completos, análises filoproteômicas por espectrometria de massas (MALDI-TOF), perfil plasmidial, além de análises microbiológicas de capacidade hemolítica, termorresistência de esporos e microscopia eletrônica de transmissão. É importante destacar que a coleta, isolamento e caracterização das Bafes não são de ordem ecológica, não estabelecendo correlações entre comunidades e ecossistemas (Cavalcante, 2014; Orem, 2014).

### 1.4 Petróleo

O petróleo é um líquido escuro, viscoso, inflamável, apolar (hidrofóbico) e de odor característico. É um produto complexo e rico em hidrocarbonetos, composto orgânico formado por átomos de carbono e hidrogênio. Possui traços de enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais como ferro, manganês, cobre, zinco, chumbo, sódio, molibdênio, arsênico, níquel, cromo e vanádio (Thomas *et al.*, 2004). Os

hidrocarbonetos chegam a compor cerca de 98% da constituição total do petróleo e podem ser classificados em alifáticos (alcanos e isoprenoides ou ramificados) e cíclicos (naftenos e aromáticos). O petróleo bruto é constituído principalmente de alcanos, hidrocarbonetos de cadeia aberta e com somente ligações simples entre os átomos de carbono (Tissot, 1984; Unep, 1992).

A origem do petróleo é orgânica, formado através da decomposição de organismos em conjunto aos fenômenos naturais que ocorreram ao longo dos milhões de anos, como erupções vulcânicas, separação dos continentes, movimentação dos oceanos e da crosta terrestre. Esses eventos fizeram com que o material fosse depositado em camadas profundas dos rios e mares, que sob a ação do calor e da pressão, deram origem ao petróleo (Milani *et al.*, 2001; Speight, 2014).

O petróleo pode ser explorado tanto em terra (*onshore*) como nas águas (*offshore*) e encontrado em diversas profundidades. A distribuição das reservas de petróleo pelo mundo é desigual, assim como a sua quantidade e composição (MILANI *et al.*, 2001). A principal aplicação do petróleo é sua utilização como combustível, presente em gasolinas e óleo diesel. O óleo diesel é o derivado do petróleo utilizado como combustível automóvel, marítimo, ferroviário, assim como em maquinário agrícola e em geradores de energia. Possui entre 8 e 16 carbonos e traços de nitrogênio, enxofre e oxigênio. Denominado também de Diesel UBTE (ultrabaixo teor de enxofre), o óleo diesel S10 comercializado atualmente é assim denominado por possuir 10 mg de enxofre a cada 1 quilo de óleo (Petrobrás; Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2020). Portanto, o petróleo é por definição uma fonte de energia fóssil, de origem natural e não renovável. Além de combustível, após o refino do petróleo bruto, originam-se produtos de alto valor agregado, como solventes, lubrificantes, revestimento asfáltico e parafinas, além de produtos cosméticos, farmacêuticos e plásticos (Martins, 2015; Speight, 2014).

O Brasil participa em cerca de 4% da produção mundial de petróleo, com 3 milhões de barris de petróleo por dia, ficando atrás de países como Estados Unidos (15%) Rússia (13%) e Arábia Saudita (13%). Somente no ano de 2022, foram produzidos mundialmente 81 milhões de barris de petróleo por dia (Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás- IBP, 2023). Em 2023, a capitalização do mercado do petróleo combinada das empresas de energia chegou ao marco de 2,5 trilhões de dólares (*U.S. Energy Information Administration- EIA*, 2023).

## 1.5 Derramamentos de petróleo e seus impactos

Devido à crescente utilização do petróleo, sua relevância para a economia mundial e conseqüentemente a necessidade de exploração, armazenamento e de transporte em grandes quantidades ao redor do globo, são cada vez mais frequentes os acidentes que ocasionam derramamentos de petróleo. As fontes de contaminação podem ser classificadas em quatro tipos: exsudação natural, extração, transporte e consumo; podem advir de erupções de poços, vazamento nas plataformas de exploração, rupturas de oleodutos e descarga indiscriminada (Souza Filho, 2006).

O Brasil possui um longo histórico de descargas expressivas de óleo. A primeira referência de grande acidente ocorreu em 1960 com 66.000 m<sup>3</sup> de óleo despejados na costa brasileira. Posteriormente, em 1978, estima-se que até 40.000 m<sup>3</sup> de óleo atingiram o Canal de São Sebastião, em São Paulo. Apenas um ano depois, aproximadamente 12.000 m<sup>3</sup> de óleo acometeram o rio Amazonas (Zacharias *et al.*, 2020). O acidente que atingiu a costa brasileira em 2019 que se espalhou por 2.900 km atingindo 11 estados é considerado atualmente como um dos maiores desastres ambientais envolvendo o petróleo no Brasil. São estimados entre 5.000 e 12.000 m<sup>3</sup> de óleo despejados no mar que custaram aos cofres públicos aproximadamente R\$ 188 milhões de reais destinados à remoção do poluente do mar e praias (Zacharias *et al.*, 2021; Brasil, 2021).

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) no Relatório Anual de Segurança Operacional, no período entre 2013 e 2022 houveram cerca de 498 incidentes operacionais *offshore*, que descarregaram cerca de 694 m<sup>3</sup> de óleo bruto em alto mar. Derramamentos de óleo diesel também são notificados, totalizando 156 eventos durante o mesmo período (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2022). Vazamentos em postos de combustíveis já foram notificados e possuem a capacidade de contaminar o solo, lençol freático e também poços artesianos (Luz *et al.*, 2011).

Estes acidentes e outros contaminam os ares, solos, rios, mares, manguezais, rochas e os lençóis freáticos, trazendo diversos prejuízos ao meio ambiente. Poluentes como o petróleo e seus derivados perturbam todo o ciclo de vida do ecossistema, pois ao entrar em contato com o ambiente, possuem a habilidade de participar de cadeias tróficas e ciclos biogeoquímicos (Jin *et al.*, 2023; Kuppusamy *et al.*, 2020). A exposição do óleo bruto faz com que esse material sofra alterações

físicas, químicas e biológicas condicionadas pelo ambiente. Essas alterações são chamadas de intemperização (*weathering*) e são processos que podem envolver principalmente a dissolução, adsorção, biotransformação, fotoxidação e evaporação do petróleo, que vão depender de fatores como temperatura, umidade, local, salinidade e da composição do petróleo.

Os hidrocarbonetos de cadeia curta, os mais passíveis de intemperização, apresentam-se em forma de vapor na atmosfera, enquanto os hidrocarbonetos de cadeias maiores apresentam-se em forma particulada (Kim *et al.*, 2013). Por ocorrer mais facilmente em compostos de cadeias curtas (menores, portanto, mais leves) a intemperização é responsável por diminuir a abundância relativa de hidrocarbonetos de cadeia curta e consequentemente aumentando a abundância de compostos pesados e recalcitrantes na natureza (Liu *et al.*, 2022). Os hidrocarbonetos incorporados à atmosfera podem ser transportados para locais distantes, ou seja, não somente o local em que ocorreu o derramamento de petróleo é diretamente afetado (Mallah *et al.*, 2022).

O petróleo e seus derivados são extremamente carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, capazes de induzir imunossupressão, destruição de células eritrocitárias e toxicidade à células hepáticas, neurológicas, nefrológicas, assim como infecções bacterianas secundárias (Ossai *et al.*, 2020). A toxicidade do petróleo está relacionada principalmente à dissolução da bicamada lipídica da membrana celular e impactos no DNA (Stepanova *et al.*, 2022).

Nos animais oleados após contato cutâneo ou ingestão, o petróleo pode prejudicar a sua locomoção e alimentação. Foram relatadas mudanças nas razões entre indivíduos macho/fêmea, redução da abundância e riqueza de espécies, anormalidades em estágios iniciais de vida, diminuição do tamanho, aumento da mortalidade, impacto nas relações simbióticas e aumento da população de organismos tolerantes e oportunistas (Soares e Rabelo, 2023).

Em plantas, o petróleo inibe o crescimento ao impedir a incorporação de água e sais minerais, assim como bloqueia a fotossíntese em espécimes cobertos com o óleo. No solo, prejudica a condutividade da água, levando ao desbalanceamento da umidade, aeração e pH, provocando erosões e alterando a disponibilidade de micronutrientes às plantas, invertebrados e microrganismos (Hewelke *et al.*, 2018).

Os acidentes impactam também o turismo e a pesca, setores que estão diretamente ligados à subsistência de uma grande parte da população, além da

qualidade de vida da comunidade que depende dos rios e mares para se alimentar (Araújo, 2020).

## 1.6 Manejo do petróleo

O petróleo e seus derivados são uma grande ameaça ao meio ambiente e se fazem necessárias estratégias eficazes para evitar acidentes e manejar o poluente derramado. O grande acidente envolvendo o navio *Torrey Canyon*, que encalhou em 1967 liberando 120 mil toneladas de óleo cru na costa inglesa e francesa fez com que as autoridades internacionais voltassem suas preocupações para a poluição dos mares. Após esse grande acontecimento, houve o fortalecimento da Organização Marítima Internacional, adoção da Convenção para a Prevenção da Poluição proveniente de Navios (MARPOL), além das Convenções Internacionais INTERVENTION, CLC e FUND, relacionadas às Intervenção em Alto Mar em Incidentes de Poluição por Óleo, responsabilidade civil dos proprietários de navios-tanque e complementação desta responsabilidade pela indústria petrolífera e grandes consumidores, respectivamente (Souza Filho, 2006).

No Brasil, sob o amparo da Lei nº 9.966 de 2000 que dispõe sobre a prevenção, o controle e a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional e o Decreto nº 10.950 de 2022, foi criado o Plano Nacional de Contingência, que fixa responsabilidades e procedimentos, para contenção de acidentes envolvendo óleo. Acionado pela primeira vez em 2019, é executado pelos Ministérios do Meio Ambiente, de Minas e Energia e dos Transportes, do Ministério da Integração Nacional, pelas Secretaria de Portos da Presidência da República e Secretaria Nacional de Defesa Civil, a Marinha, o Ibama e ANP (Brasil, 2000, 2020 e 2022).

O manejo desse material pode ser classificado de três formas: físico, químico ou biológico. O método a ser escolhido deve ser eficiente, com menor custo possível e que ofereça menor impacto no ambiente (Doshi; Sillanpää; Kalliola, 2018). O tipo de óleo, extensão do acidente, o local atingido, assim como condições meteorológicas vão influenciar no método de escolha. São utilizados para o manejo físico redes de contenção, fibras vegetais para a adsorção do óleo, grânulos absorventes e *skimmers*, empregados para a limitação da poluição e posterior remoção, que pode ser feita com

pás ou caminhões-vácuo. Para o manejo químico, são utilizados produtos dispersantes que vão transformar o óleo em pequenas frações para posterior remoção (São Paulo, 2018; EPA, 2023). Essas estratégias por muitas vezes não se mostram totalmente eficientes, pois apenas removem o material de um local para outro e até mesmo gerando subprodutos tóxicos, não biodegradáveis e que permanecem recalcitrantes na natureza (Chase *et al.*, 2013. Doshi; Sillanpää; Kalliola, 2018; Zheng *et al.*, 2014).

Diante deste cenário, é imprescindível a busca de alternativas sustentáveis, de baixo custo e de alta eficácia para a remediação de poluentes. Outro caminho proposto para o tratamento dos resíduos é o biológico, onde há a utilização de microrganismos, que por meio de processos enzimáticos, são capazes de biodegradar o poluente, transformando em elementos simples como dióxido de carbono e água. A utilização de microrganismos para a remoção, redução ou transformação de contaminantes é chamada de biorremediação (Azubuike; Chikere; Okpokwasili, 2016; Yuniati, 2017).

A utilização de microrganismos para a remediação de poluentes se apresenta como uma alternativa sustentável, ecológica e de baixo custo (Wu *et al.*, 2017). Bactérias, fungos filamentosos, leveduras e arqueias são capazes de biodegradar hidrocarbonetos, tornando-se excelentes candidatos à remediação, muito provavelmente devido à sua ampla distribuição e grande variedade nutricional (Abatenh *et al.*, 2017).

### **1.7 Utilização de hidrocarbonetos por bactérias**

A pesquisa em busca de organismos que são capazes de usar agentes poluentes como fonte de carbono tem seu início no começo do século XX quando foi observado a presença de microrganismos em uma fina camada de parafina (Rahn, 1906). Pioneiro na área, Claude ZoBell em 1941 publicou seus primeiros *insights* sobre a ação dos microrganismos no petróleo. Atualmente há mais de 100 gêneros conhecidos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras que são consumidores de hidrocarbonetos presentes tanto em ambiente marinho como no solo (Stepanova *et al.*, 2022). Esses microrganismos têm preferências distintas a cada tipo de hidrocarboneto presente no mesmo petróleo, pois não há um microrganismo que



possua todo o complexo enzimático necessário para degradar o petróleo em sua totalidade (Atlas, 1977).

A solubilidade em água dos hidrocarbonetos cai na medida em que seu peso molecular aumenta, o que reflete na capacidade dos microrganismos de consumirem o óleo. Os alcanos possuem uma maior susceptibilidade de biodegradação, seguido dos alcanos ramificados, aromáticos de baixo peso molecular e por último os cicloalcanos. (Eastcott, 1988; Leahy e Colwell, 1990). Portanto, devido à heterogeneidade do petróleo bruto, a construção ideal de um sistema biorremediador consiste na atuação de diferentes microrganismos na degradação do petróleo (Atlas, 1977).

A utilização dos hidrocarbonetos pelas bactérias como fonte de carbono e de energia é um processo oxidativo catalisado por enzimas e depende de alguns fatores para que ocorra, como 1) disponibilidade de oxigênio e água para facilitar as reações químicas de degradação; 2) contato entre o hidrocarboneto e a água, em razão da característica hidrofóbica dessas moléculas; 3) presença de nutrientes para o desenvolvimento microbiano. Além disso, o pH, a salinidade, a temperatura, o estado físico e composição do petróleo influenciam as taxas de biodegradação (Baird, 2002; Leahy e Colwell, 1990; Moreno e Rojo, 2019).

Para que o petróleo seja biodegradado pelos microrganismos, é necessário que a célula tenha acesso às moléculas de hidrocarboneto. Para isso, os organismos produzem surfactantes, moléculas de característica anfipática (possuem porções apolares e polares) que reduzem a tensão superficial e aumentam a área de superfície do contato entre o óleo e a água. Os biosurfactantes são responsáveis pela formação e estabilização da emulsão, fazendo com que o acesso dos microrganismos aos hidrocarbonetos seja facilitado (Desai e Banat, 1997; Ron e Rosenberg, 2001). Os biosurfactantes produzem microgotículas que envolvem hidrocarbonetos através de micelas (Watkinson e Morgan 1990). A produção de biosurfactantes é muito importante devido à característica hidrofóbica do petróleo, onde somente uma quantidade muito pequena de hidrocarbonetos é capaz de acessar a célula, como os alcanos de baixo peso molecular (Moreno e Rojo, 2019).

Após o contato óleo-bactéria, a forma em que o hidrocarboneto é incorporado na célula para ser degradado ainda é pouco elucidada, pois pode variar entre os vários tipos de hidrocarboneto, o seu tamanho e também pode diferir entre as espécies bacterianas. Há três possíveis formas de transporte do petróleo para dentro das

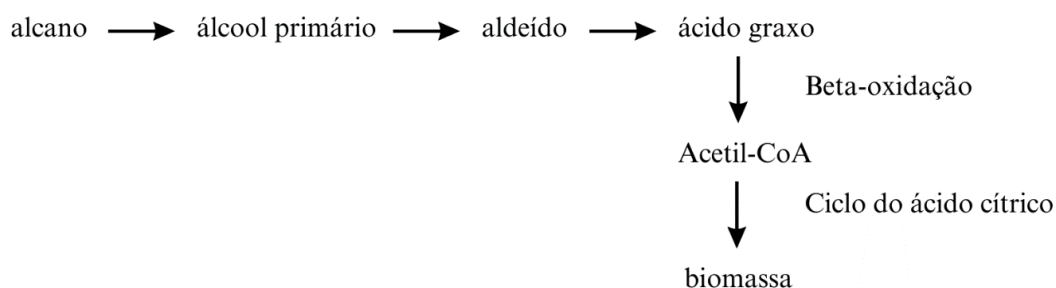
células: 1) difusão passiva; 2) difusão facilitada através de proteínas transportadoras e 3) transporte ativo (Hua e Wang, 2013; Moreno E Rojo, 2019).

### 1.7.1 Degradação de compostos saturados

Os alcanos constituem a maior parte dos hidrocarbonetos presentes no petróleo bruto. Podem ser classificados como lineares (n-alcanos), ramificados e cíclicos (cicloalcanos) e são encontrados em três estados físicos: gasoso (C1-C4), líquido (C5-C16) e sólido (>C17) (Labinger e Bercaw, 2002; Singh *et al.*, 2012).

Os n-alcanos compreendem o grupo molecular de hidrocarbonetos que possuem cadeia aberta e apenas ligações simples entre os átomos de hidrogênio e carbono (saturados). O sucesso da biodegradação dos n-alcanos, assim como de outros hidrocarbonetos, depende diretamente do tamanho da cadeia molecular. Ao mesmo passo que a biodegradação ocorre mais facilmente em cadeias menores (C10-C20) e a complexidade vai aumentando de acordo com o tamanho da molécula, os n-alcanos de cadeia curta (C5-C9) são tóxicos e podem dissolver a camada lipídica da membrana microbiana (Seabra, 2008; Sikkema *et al.*, 1995).

A degradação de n-alcanos geralmente ocorre pela oxidação da parte monoterminar de um grupo metil, que origina um álcool primário, que será oxidado em aldeído e convertido em ácido graxo por outra oxidação (Figura 1). O ácido graxo formado seguirá pela via de  $\beta$ -oxidação e dará origem ao acetil-CoA, que seguirá pela via do ácido cítrico (Rojo, 2009; Watkinson e Morgan, 1990; Wentzel *et al.*, 2007;). Ataques subterminais são menos comuns e ocorre a formação de um álcool secundário. Oxidações terminais e subterminais podem coexistir no mesmo microrganismo (Singh *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Fluxograma da biodegradação de um n-alcano por ataque monoterminar que resulta na formação de biomassa.

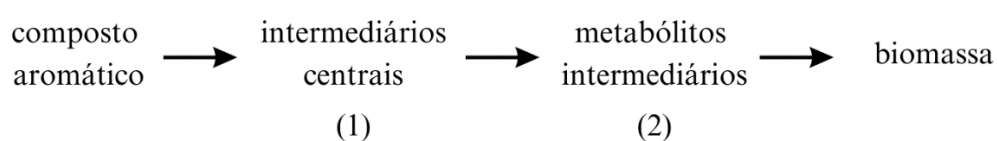
Os alcanos que possuem ramificações são menos susceptíveis à degradação microbiana que os n-alcanos e apesar das vias metabólicas desses hidrocarbonetos não serem totalmente compreendidos, sabe-se que há participação das vias de  $\beta$ -oxidação e  $\omega$ -oxidação (Singh *et al.*, 2012; Stepanova *et al.*, 2022). Alcanos altamente ramificados e os cicloalcanos são recalcitrantes na natureza (Watkinson e Morgan 1990; Atlas, 1981).

### 1.7.2 Degradação de compostos aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos são aqueles que possuem cadeia fechada e com seis átomos de carbono com ligações duplas alternadas, formando anéis benzênicos. Podem possuir 1 anel (monocíclicos) como o benzeno, ou vários anéis (policíclicos) como os pirenos. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são moléculas altamente tóxicas e carcinogênicas (Varjani, 2017).

Os compostos aromáticos menores são degradados mais facilmente. Os mais leves estão sujeitos à evaporação e biodegradação no estado dissolvido (Kappeler e Wuhrmann, 1978; Rosato, 1997).

A maior dificuldade que os microrganismos enfrentam ao biodegradar os compostos aromáticos é superar a energia de ressonância da molécula, a qual a confere grande estabilidade e inatividade (Fuchs; Boll; Heider, 2011). Para isso, o processo de biodegradação inicia por meio da inserção de oxigênio ( $O_2$ ) na molécula do hidrocarboneto. A monooxigenase catalisa a separação da ligação entre os átomos de oxigênio, inserindo um átomo no anel aromático enquanto o outro átomo é reduzido a  $H_2O$ . Após esse primeiro passo, a degradação dos compostos aromáticos pode ser separada em duas grandes vias: a via periférica e a via central (Figura 2).



**Figura 2.** Fluxograma da biodegradação de compostos aromáticos que resultam na formação de biomassa, onde: (1) catecóis ou não-catecóis; (2) Acetil-CoA, Succinil-CoA e piruvato.

A via periférica caracteriza-se pela transformação dos substratos em intermediários centrais, que podem ser catecóis ou compostos não-catecóis (ácidos carboxílicos aromáticos substituído por hidroxila).

Já a via central consiste na desaromatização dos compostos intermediários centrais e quebra do anel benzênico, convertendo os intermediários centrais em metabólitos intermediários, como Acetil-CoA, Succinil-CoA e piruvato (Fuchs; Boll; Heider, 2011; Ladino-Orjuela *et al.*, 2016).

## 1.8 Proteômica de organismos biorremediadores

Define-se “proteômica” como um conjunto de estudos acerca das proteínas ou proteomas. Os proteomas por sua vez são definidos como o conjunto de proteínas de um organismo que são expressas em determinados momentos e condições (Aebersold e Mann, 2003; Zimmer *et al.*, 2006). A proteômica surge na era pós-genômica e estuda a expressão, estrutura e função das proteínas, sendo fundamental para a observação de fenótipos, que são diretamente resultantes da ação das proteínas, e não da sequência de genes (Chauhan e Jain, 2010; Singh e Nagaraj, 2006). É estimado que somente entre 50 e 80% dos genes codificados por um genoma são expressos sob condições específicas e que dependem de estímulos externos à célula. A composição proteica de um organismo pode mudar com o tempo, assim como de acordo com o ambiente (Anderson, 2006).

A proteômica busca elucidar mecanismos moleculares, vias metabólicas, modificações pós-traducionais e tem sido utilizada para estudar a mudança no proteoma de organismos expostos a contaminantes derivados de atividades antropogênicas, onde diferentes proteínas podem ser expressas ou suprimidas (Pandey *et al.*, 2019; Singh e Nagaraj, 2006).

O trabalho conduzido por Swati e colaboradores (2020) utilizando técnicas proteômicas como géis de eletroforese e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) revelou a presença de enzimas como aldeído-desidrogenase, ftalato-dioxigenase e F420-dependente oxiredutases, expressas por *Pseudomonas sp.* em resposta à exposição ao pireno, um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), considerado uma das classes de hidrocarbonetos mais danosas ao meio ambiente. Macchi e colaboradores (2018) estudaram os efeitos da exposição da

bactéria *Sphingomonas paucimobilis* ao fenantreno (HPA), onde foram encontradas 17 proteínas relacionadas à transformação de fenantreno em ácido tricloroacético, como aldeído, benzaldeído, acetaldeído e catecol desidrogenases, assim como hidrolases e aldolases.

### **1.9 Enzimas que participam do consumo de hidrocarbonetos**

As enzimas envolvidas no processo de biodegradação de hidrocarbonetos são pertencentes à classe Oxirredutase subclasse das oxigenases. As oxigenases são enzimas que catalisam uma reação de oxidação, transferindo oxigênio (O<sub>2</sub>) para o substrato, podendo transferir um átomo de oxigênio por meio das enzimas monooxigenases, ou os dois átomos de oxigênio através das enzimas chamadas dioxigenases (Leahy *et al.*, 2003; Rojo, 2010; Pérez-Pantoja *et al.*, 2010).

Segundo Ayala e Torres (2004) são três principais grandes grupos enzimáticos responsáveis pelos processos de biodegradação dos alcanos: metano monooxigenases (MMO), alcano-hidroxilases (Alk) e citocromo P450 monooxigenases.

O grupo metano-monooxigenases (MMO) é formado por duas formas enzimáticas, a forma particulada (pMMO) e a forma solúvel (sMMO). Essas enzimas são expressas em microrganismos metanotróficos, ou seja, que possuem a capacidade de utilizar metano como fonte de energia. pMMO é uma proteína membranar produzida por todos os organismos metanotróficos que é capaz de oxidar somente um grupo restrito de alcanos de cadeia curta. Não são bem caracterizadas devido à sua instabilidade. Já o sistema sMMO é expresso apenas por alguns microrganismos metanotróficos e pode oxidar uma grande variedade de compostos, como os aromáticos, alicíclicos e heterocíclicos. São enzimas que participam do sistema sMMO: oxigenase, reductase e proteínas de acoplamento.

O grupo das alcano-hidroxilases é composto por três monooxigenases: hidroxilase, rubredoxina e rubredoxina reductase. São capazes de oxidar hidrocarbonetos lineares de cadeias médias e longas.

O grupo citocromo P450 possui dois componentes, hidroxilase e reductase. Esse sistema não é tão presente em bactérias, sendo predominante em fungos. São

proteínas heme e catalisam os substratos utilizando NAD(P)H como cofator (Ayalla e Torres, 2004; Fuchs; Boll; Heider, 2011).

Para a degradação de compostos aromáticos, duas famílias são principais na atuação da catálise: oxigenases Rieske não-heme e monooxigenases difero solúveis.

A família das enzimas Rieske não-heme oxigenases são importantes para a ativação e degradação de compostos aromáticos como benzoato, naftaleno, bifenil, tolueno e outros. Geralmente catalisa a incorporação de dois átomos de oxigênio no anel aromático, apesar da família também possuir monooxigenases (Pérez-Pantoja *et al.*, 2010). São NADH dependentes e compostos por flavoproteína redutase e ferredoxina ferro-sulfurico (Barry e Charles, 2013).

A família das enzimas das monooxigenases solúveis difero consistem em um complexo formado por redutases, cofatores orgânicos ou íons não metálicos e hidroxilases. Possuem estrutura quaternária e o centro com dois átomos de ferro em cada subunidade alfa. São classificadas de acordo com a subunidade, sendo dividida em metano-monooxigenases solúveis (sMMO), fenol hidroxilase e alceno monooxigenases. São capazes de monooxigenar benzeno e tolueno em fenóis e posteriormente para catecois (Leahy *et al.*, 2003).

## **1.10 Produtos biorremediadores**

No Brasil, os produtos biorremediadores são regulamentados pela Portaria Ibama nº 241 de 2023, que institui orientações técnicas-normativas sobre a classificação de produtos remediadores registráveis junto ao Ibama e a pela Resolução CONAMA nº 463 de 2014, que realiza o controle ambiental de produtos remediadores. A regulamentação é necessária pois estes produtos podem ocasionar desequilíbrio no ecossistema e danos ao meio ambiente, em razão de suas peculiaridades e/ou o uso inadequado. Segundo a CONAMA 463, serão considerados remediadores quando “visarem à redução da massa de contaminantes no efluente tratado a ser despejado em corpo hídrico receptor ou no solo, particionando/degradando e reduzindo as concentrações do contaminante, de modo que haja transformação das substâncias contaminantes”. Portanto, além da regulamentação do registro e classificação de produtos biorremediadores, estes ainda

não poderão ser utilizados livremente, dependendo da autorização do órgão ambiental competente (Brasil, 2014, 2023a).

Atualmente, existem 56 produtos remediadores registrados junto ao Ibama e destes, 73% são produtos biorremediadores (41). Produtos biorremediadores voltados para o tratamento de efluentes de resíduos agroindustriais, de indústria alimentícia, de papel e celulose, de efluentes de esgotos domésticos e corpos d'água contaminados com matéria orgânica, representando 67% (38) dos produtos registrados, enquanto produtos voltados para biorremediação de petróleo abrangem 5% (3). Dos três produtos voltados para o petróleo, um utiliza extrato de *Sacharomyces cerevisiae* livre de células (Accell Clean Swa®), e outros dois utilizam coquetéis de *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (Bio Liq Wta® e Bio Cubo Hc®) (Brasil, 2023b).

## 2 JUSTIFICATIVA

É inegável a importância biotecnológica das Bafes. São microrganismos que possuem diversas aplicabilidades, que vão desde a área médica com a produção de antimicrobianos, até a agricultura com a atuação biocida e promotora de crescimento de várias plantas (Grady, 2016). São bactérias que têm um alto potencial de exploração, que porventura podem ultrapassar as atuais barreiras físicas da construção de um sistema biorremediador eficaz por se tratar de microrganismos que suportam condições adversas (Mongkoltharuk, 2012; Atlas, 1977).

Portanto, levando em consideração o atual cenário dos constantes acidentes de origem petrolífera e a falta de iniciativas que efetivamente resolvem o problema de contaminação dos solos, mares e rochas afetados, faz-se necessário mais estudos acerca da maquinaria bioquímica produzida para o consumo de hidrocarbonetos e como o metabolismo do carbono se porta frente ao consumo desse material, a fim de desenvolver novas estratégias de utilização dessas bactérias como potenciais biorremediadoras.

Dessa forma, encontrar microrganismos que sejam capazes de biodegradar o petróleo, analisar o perfil de degradação e as proteínas envolvidas no processo são de suma importância para uma futura implementação de um novo protocolo de biorremediação, assim como explorar as novas possibilidades de utilização biotecnológica das bactérias que estão presentes no solo do Cerrado do Distrito Federal. Essa descoberta proporciona melhor entendimento sobre os mecanismos bioquímicos das Bafes, além de impactar diretamente na maneira em que os acidentes de derramamento de petróleo são gerenciados, trazendo benefícios não somente ambientais, mas também para toda a comunidade.



### 3 OBJETIVO GERAL

Testar a capacidade de utilização de petróleo e/ou óleo diesel pelas bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes).

#### 3.1 Objetivos específicos

- I. Bioprospectar BAFES em meio sólido contendo óleo diesel S10 e petróleo como fontes de carbono únicas;
- II. Analisar a biodegradação parcial do petróleo e óleo diesel S10 via testes de biodegradação de hidrocarbonetos em cultivos microbianos líquidos;
- III. Analisar a capacidade de produção lipases através de cultivos sólidos em meio com tributirina (fonte de gordura) e determinar o índice enzimático;
- IV. Avaliar a forma de contato óleo-célula através de testes que avaliam a capacidade de produção de biossurfactantes e adesão a hidrocarbonetos;
- V. Avaliar a composição proteica do secretoma e proteoma intracelular quando BAFES bioprospectadas forem cultivadas em presença de petróleo e/ou óleo diesel como única fonte de carbono, através de análises proteômicas iniciais (quantificação e eletroforeses).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Microrganismos

As linhagens bacterianas utilizadas neste estudo, denominadas linhagens SDF (Solo do Distrito Federal) fazem parte do acervo da coleção CBafes do Laboratório de Microbiologia/ LaBafes da Universidade de Brasília coordenada pela Profa. Dra. Marlene Teixeira De-Souza (UnB, Instituto de Biologia), responsável por orientar projetos que culminaram na obtenção prévia das linhagens através da coleta de amostras do solo do Distrito Federal.

As amostras foram obtidas através da coleta de solo superficial, entre 5 e 8 cm de profundidade, em pontos aleatórios. Após a coleta, amostras de solo passaram por pré-tratamento térmico a 80°C em estufa por 5 horas. O solo pré-tratado foi agitado com solução NaCl 8% por 1 minuto, deixado em repouso e coletado o sobrenadante. O sobrenadante foi submetido ao tratamento de choque térmico a 80° por 10 minutos e incubados em gelo por 5 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi inoculado em meio nutriente (Peptona 0,5%, extrato de carne 0,3% e MnSO<sub>4</sub> 0,010 g) de 24 a 72 horas a 28°C. As células foram induzidas à esporulação a 28°C, com agitação de 200 rpm em meio nutriente ou HCT (Tryptona 0,5%, hidrolisado de caseína 0,2%, 50 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M; 10 mL de solução de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 50 mM, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1 mM, e ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4 mM, 10 mL de solução de Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 7 mM e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M, 10 mL de solução de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1 M, glicose 0,3%, volume final de 1 L, pH 7,25). As amostras esporuladas passaram por tratamento de choque térmico a 80°C por 10 minutos e incubadas em gelo por 5 minutos. Alíquotas da suspensão de esporos foram armazenadas em tubos de preservação de microrganismos com tiras de papéis filtro, que foram secos em estufa a 37°C e estocados à temperatura ambiente (Cavalcante, 2014).

Para os inóculos, foram utilizadas as suspensões de esporos secas resuspendidas em água destilada autoclavada, armazenadas a 4°C.

## 4.2 Hidrocarbonetos

O óleo diesel S10 (ODS10) foi adquirido comercialmente em Brasília, Distrito Federal. O óleo foi esterilizado em sistema de filtração a vácuo (Kasvi, membrana PES e poros de 0,22  $\mu\text{m}$ ), separado em alíquotas de 10 mL em tubos Falcon estéreis, tratado com luz UV por 30 minutos e armazenado em uma temperatura de  $-22^{\circ}\text{C}$ .

A amostra de petróleo utilizada neste estudo foi fornecida pelo Laboratório LEPETRO (Excelência em Geoquímica, Petróleo e Meio Ambiente) do Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia, coletado do Campo Dom João, localizado no Recôncavo Bahiano. Para verificar se havia contaminação, o petróleo foi inoculado em placas com meio e Luria-Bertani e incubado a  $28^{\circ}\text{C}$  por 7 dias e não houve crescimento de qualquer microrganismo. Foi armazenado a  $-22^{\circ}\text{C}$ .

## 4.3 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura nas subseqüentes composições:

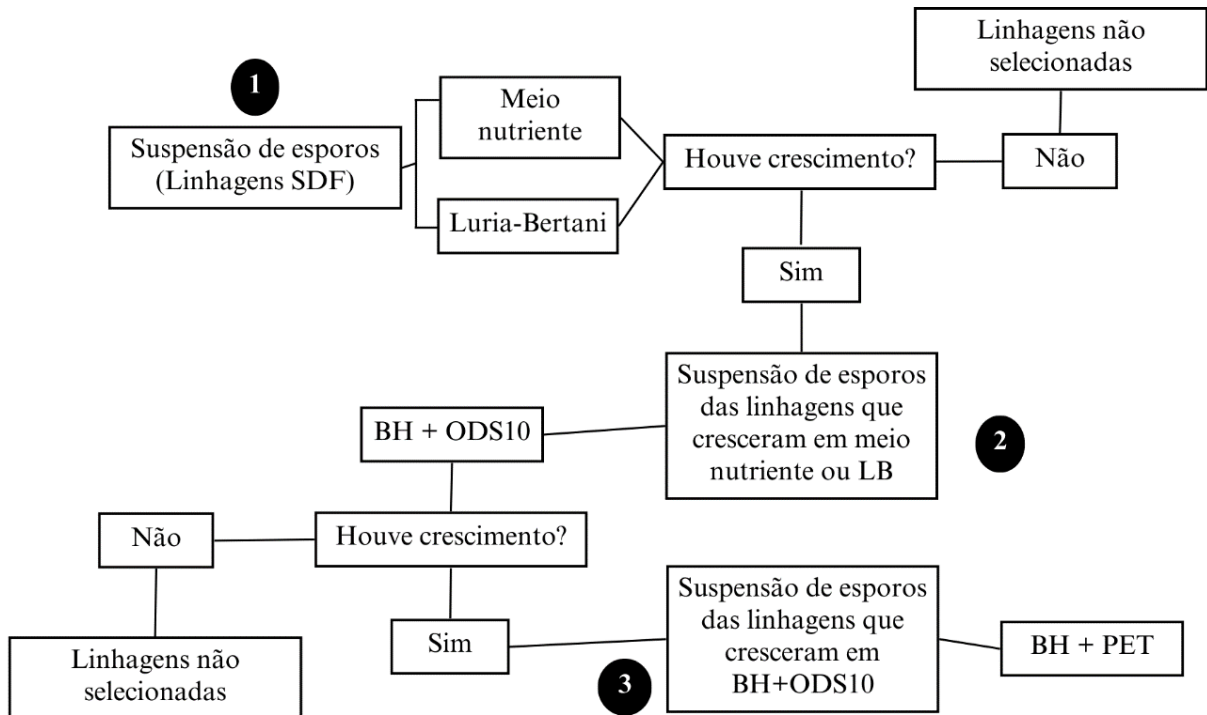
- Meio nutriente- 5 g/L de digestão enzimática de gelatina, 3 g/L de extrato de carne, 18g de ágar bacteriológico, pH  $6,8 \pm 0,2$  (Acumedia);
- Luria Bertani (LB)- 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona de caseína, 10 g/L de NaCl e 18 g/L de ágar bacteriológico, pH 7,2;
- Bushnell-Haas- 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L de  $\text{NaNO}_3$ , 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g/L de  $\text{FeCl}_3$ , 0,02 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 g/L de ágar bacteriológico pH  $7 \pm 0,2$  (Himedia);
- Bushnell-Hass + extrato de levedura (BH+EXT) - Meio BH suplementado com 1% de extrato de levedura (p/v); Meio controle;
- Bushnell-Hass + óleo diesel S10 (BH+ODS10) - Meio BH suplementado com 1% de óleo diesel S10 (v/v); adicionados em uma temperatura de aproximadamente  $80^{\circ}\text{C}$  após autoclavar a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos;
- Bushnell-Hass + petróleo (BH+PET) - Meio BH suplementado com 1% de petróleo (v/v) adicionados em uma temperatura de aproximadamente  $80^{\circ}\text{C}$  após autoclavar a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos;

- Tributirina- 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona de caseína, 15 g/L de ágar bacteriológico e 10 g/L de tributirina, pH  $7.5 \pm 0,2$ , autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos (Atlas, 1993).

As placas de meio de cultura BH+PET receberam tratamento de luz UV por 30 minutos para esterilização. Para os cultivos líquidos, somente foram removidos o ágar da composição dos meios de cultivo.

#### **4.4 Bioprospecção**

A bioprospecção consiste na busca de bactérias que sejam capazes de formarem colônias em meios de cultura onde a única fonte de carbono presente advém dos hidrocarbonetos do petróleo e/ou óleo diesel e, portanto, capazes de degradarem esse composto para sua metabolização. Para isto, as linhagens selecionadas foram cultivadas em meio nutriente, LB ou BH+EXT e incubadas por 24 horas a  $28^\circ\text{C}$ , com a finalidade de testar se haveria crescimento a partir da suspensão de esporos. Após essa primeira triagem, as linhagens que apresentaram crescimento em pelo menos algum dos três meios testados foram cultivadas em meio BH+ODS10. A capacidade das linhagens SDF formarem colônias em meio contendo óleo diesel S10 1% foi utilizada como critério para escolha das linhagens que seriam inoculadas em meio com petróleo (Figura 3).



**Figura 3.** Organograma para a seleção de linhagens SDF que foram selecionadas, onde: LB= meio de cultura Luria-Bertani, BH + ODS10 = meio de cultura Bushnell-Haas suplementado com óleo diesel S10, BH + PET = meio de cultura Bushnell-Haas suplementado com petróleo, crescimento=presença de colônias bacterianas. Os números 1, 2 e 3 indicam a ordem cronológica dos inóculos realizados.

Para a fase de bioprospecção em hidrocarbonetos, as linhagens foram cultivadas em meios sólidos (BH+ODS10 e BH+PET), utilizando a suspensão de esporos bacterianos com o auxílio de alça descartável de 10 µL, incubados a 28°C na estufa bacteriológica por 7 dias.

Para visualização das estruturas bacterianas foi utilizada a microscopia de contraste de fase (MCF), onde permite a visualização das estruturas sem coloração, baseando-se no princípio da difração da luz.

Ao todo, foram inoculadas 46 linhagens SDF em meio BH+ODS10 sólido.

#### 4.5 Cultivo bacteriano

Após a fase de bioprospecção, as linhagens selecionadas para o seguimento do estudo que foram positivas para o crescimento em óleo diesel e petróleo foram cultivadas a fim de coletar as células bacterianas e o material secretado. Para isso, foram realizados cultivos líquidos.

Partindo de um pré-inóculo em meio sólido BH+EXT, as células foram inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultura BH+EXT, BH+ODS10 e BH+PET. Os inóculos foram incubados a 28°C na incubadora Tecnal TE-4200 com agitação de 200 rpm por 7 dias. Após esse período, os cultivos foram filtrados separadamente utilizando o aparato composto por Kitassato com bomba à vácuo, funil de porcelana tipo Buchner 55mm e papel filtro Qualy® (80 g/m<sup>2</sup> e poros de 14 µm). O material filtrado foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 gravidades em temperatura de 4°C e então separado o sobrenadante (material secretado) e o pellet. O material secretado foi armazenado em -20°C, enquanto os pellets passaram por três lavagens utilizando PBS (10 mM tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7,4) centrifugadas por 10 minutos cada lavagem, a 14.000 gravidades em temperatura de 4°C e armazenadas a -80°C.

#### **4.6 Curva de crescimento**

Para a curva de crescimento as linhagens SDF selecionadas para o estudo foram cultivadas em meio Bushnell-Haas líquido com 1 - extrato de levedura, ou 2 - petróleo, ou 3 - óleo diesel S10 na concentração de 1%, a fim de comparar o padrão de crescimento nessas três diferentes fontes de carbono utilizadas. As linhagens foram cultivadas em microplacas de 12 poços com volume final de 1 mL em cada poço, em triplicata. A incubação e leitura de absorbância foram feitas em equipamento CLARIOstar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha).

#### **4.7 Biodegradação de hidrocarbonetos**

O potencial dos microrganismos em degradar o petróleo e o óleo diesel foi analisado a partir da utilização do corante 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP), que indica colorimetricamente a degradação de hidrocarbonetos. O princípio do teste desenvolvido por Hanson et al (1993) baseia-se que durante a oxidação dos hidrocarbonetos utilizados pelos microrganismos, elétrons são transferidos para aceptores de elétrons como oxigênio, nitratos e sulfatos. Ao incorporar no meio um aceptor de elétrons como o DCPIP, torna possível analisar a habilidade do microrganismo em utilizar o hidrocarboneto observando a mudança de cor do meio de azul (reduzido) para sem coloração (oxidado).

As linhagens SDF0016 e 0075 foram cultivadas em meio líquido BH+ extrato de levedura a 28°C por 24 horas. Após esse período, as células foram coletadas e corrigidas de forma que cada cultivo tivesse a OD=1. A suspensão de células corrigida foi inoculada em triplicatas nos seguintes meios líquidos: BH+OD, BH+PET e BH+EXT, todos adicionados 10 mg/mL de corante DCPIP. Os cultivos foram incubados a 28°C com agitação de 200 rpm por 7 dias. Ao final do período determinado, foi observado se havia a mudança de cor do meio de azul (reduzido) para incolor (oxidado). Além dos cultivos com inóculo, foram incubados em triplicata meios BH sem adição de qualquer fonte de carbono, sem inóculo bacteriano e com o corante, a fim de verificar se haveria oxidação do meio mesmo sem qualquer tipo de ação microbiana (controle negativo).

#### 4.8 Lipases

O teste de detecção de lipases consiste na avaliação semiquantitativa da capacidade dos microrganismos de degradarem compostos lipídicos. Descrito por Sierra (1953), as linhagens SDF0016 e SDF0075 foram inoculadas utilizando 10 µL de suspensão de esporos com alça bacteriológica em meio tributirina. Os inóculos foram feitos em triplicatas nas placas, depositando os 10 µL em três pontos distintos da placa, em três placas. Os inóculos foram incubados a 28°C por 7 dias e após o tempo de incubação, foi verificado o aspecto e o diâmetro das colônias. O índice enzimático é calculado pela equação da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia:

$$IE = \frac{DH}{DC} \quad (1)$$

Na qual:

IE= índice enzimático

DH= diâmetro do halo em centímetros

DC= diâmetro da colônia

Determina-se que são negativas para o teste as linhagens que não apresentarem halo, enquanto serão consideradas boas produtoras de lipases as linhagens que possuem índice enzimático  $\geq 2$ .

#### 4.9 Detecção de biossurfactantes

A detecção de biossurfactantes consiste na avaliação semiquantitativa da capacidade das bactérias em produzirem surfactantes através do teste de emulsificação (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008). As bactérias foram cultivadas em meio Bushnell-Haas com 1% de óleo diesel e/ou petróleo (v/v) por 7 dias em temperatura de 28°C em agitação de 200 rpm. Após esse período, 2 mL de cultura e 2 mL de hidrocarboneto foram adicionados em tubo de ensaio de fundo reto. A solução é agitada por 2 minutos e deixada em repouso por 5 minutos. Então, é calculado o índice de emulsificação descrito por Cooper e Goldenberg (1986). O índice será obtido após 5 minutos (E5) e 24 horas (E24) e calculado através da equação (3) onde a medida da altura da camada emulsificada é dividida pela altura total da coluna do tubo vezes 100, tornando o resultado expresso em porcentagem.

$$I = He/Ht \times 100 \quad (2)$$

Na qual:

I = índice de emulsificação

He = altura da camada emulsificada

Ht= altura total da coluna do tubo

As linhagens serão consideradas positivas no teste de emulsificação quando os índices de emulsificação foram iguais ou superiores a 10%.

#### 4.10 Adesão a hidrocarbonetos

Desenvolvido por Rosenberg e colaboradores (1980) o teste de adesão microbiana a hidrocarbonetos (do inglês *Microbial Adhesion to Hydrocarbons*- MATH) é um ensaio rápido que avalia a interação entre as células com hidrocarbonetos líquidos através do uso de diferentes tempos de homogeneização e repouso.

Foram cultivadas em meio sólido BH + extrato de levedura 10 µL de suspensão de esporos das linhagens SDF0016 e 0075 por 48 horas a 28°C. Após esse período, as células bacterianas foram coletadas e lavadas em 1 mL de tampão FUM, composto por 22,2 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,26 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O e 1,8 g/L de



Ureia. As soluções foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos e repetido o processo de lavagem e centrifugação. Posteriormente, as células foram resuspendidas no mesmo tampão. A OD da suspensão de células foi corrigida para 0,4 a 400 nm (A0). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 2,4 mL da suspensão de células com a OD corrigida e 0,4 mL de óleo diesel S10 e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, os tubos foram homogeneizados no vórtex por 2 minutos e deixado em repouso por 15 minutos. A fase aquosa foi recolhida para leitura em 400 nm e microscopia (A1). A hidrofobicidade é calculada segundo a equação:

$$H\% = \left(1 - \frac{A1}{A0}\right) \times 100 \quad (3)$$

Na qual:

H%= hidrofobicidade expressa em porcentagem

A1= Absorbância da fase aquosa após o teste de aderência

A0= Absorbância da suspensão de células inicial (0,4)

A diminuição da OD é correlacionada com a hidrofobicidade do microrganismo, que não está mais presente na fase aquosa, e sim aderido ao hidrocarboneto. O teste não foi performed utilizando o petróleo bruto, pois devido à suas características físicas como cor e espessura, não seria possível visualizar em microscopia as células aderidas, bem como realizar a leitura espectrofotométrica da fase aquosa.

#### **4.11 Lise bacteriana física e química**

O rompimento da membrana celular para o extravasamento do material proteico para análise proteômica foi obtido através de dois métodos utilizados em conjunto: lise física e química. Para a lise química, os pellets foram lavados em tampão de lise (100mM de Tris HCl, SDS 4% suplementado com comprimido de inibidor de protease Roche®, pH 7,6). Posteriormente, foram submetidos a lise física no Beadbeater (Biospec®) por 5 minutos e então centrifugados por 15 minutos a 20 mil gravidades, onde o sobrenadante é coletado e armazenado a -80°C.

#### 4.12 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de amostras de proteínas intracelulares e secretadas das linhagens SDF0016 e SDF0075 foi realizada a partir do lisado de células dos cultivos líquidos e o meio secretado, utilizando BH+EXT como controle, BH+ODS10 e BH+PET. A concentração de proteínas totais presentes nas amostras foram quantificadas utilizando o kit de quantificação Pierce Micro BCA (ThermoFisher).

A quantificação pelo método BCA baseia-se na redução de íons de cobre na presença de proteína em meio alcalino (propiciado pelo carbono de tartarato) conhecida como reação do biureto, combinada com a adição do ácido bicinconínico (BCA) que reage ao cobre reduzido, produzindo a cor púrpura. A intensidade da cor produzida foi analisada no espectrofotômetro CLARIOstar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha) em comprimento de onda de 562 nanômetros. Após a construção da curva padrão utilizando a concentração de albumina sérica bovina (BSA), a intensidade da cor produzida é correlacionada com a concentração de proteínas presente na amostra. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços seguindo as orientações do kit e o resultado expresso em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

#### 4.13 Eletroforese desnaturante *SDS-PAGE*

A análise de perfil das proteínas secretadas e das proteínas intracelulares foram realizadas por géis eletroforéticos (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Eletrophoresis-SDS-PAGE*) de acordo com Laemmli (1970). O marcador utilizado foi o *Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad, Califórnia) que abrange proteínas entre 10 e 250 kDa. Foram adicionados à amostra o tampão de amostra (glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl 0,0625 M) que foram aquecidos por 5 minutos a 100°C e aplicadas no gel de poliacrilamida-bisacrilamida (30%) na concentração final de 12% e 1 mm de espessura. Para as corridas, foram aplicados 25 mA com voltagem constante em sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Califórnia) por aproximadamente 50 minutos. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie azul brilhante e nitrato de prata de acordo com Candiano e colaboradores (2004) e Chevallet (2006). Posteriormente foram escaneados digitalmente utilizando o fotodocumentador de géis L- PIX Chemi (Loccus).

#### **4.14 Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software PAST (Palaeontological Statistics). Os dados foram primeiramente submetidos ao teste Shapiro Wilk para observação da normalidade e, posteriormente, aos testes One Way Anova e Tukey's Parwise Comparisions, todos com níveis de significância  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Bioprospecção

Foram selecionadas 50 linhagens SDF para cultivo e destas, 46 obtiveram crescimento nos meios nutriente, LB ou BH+EXT, utilizados para indicar presença de material nas amostras de suspensão. As 46 linhagens SDF foram testadas no meio BH+ODS10 sólido e após o tempo de incubação 7 dias a 28°C, 09 linhagens SDF apresentaram formação de colônias a partir do inóculo da suspensão de esporos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Crescimento bacteriano nos meios nutriente, LB, BH+EXT (Controle) e BH+ODS10.

Linhagem SDF	Meio nutriente	Meio LB	BH+EXT	BH+ODS10
0002	NT	NT	+	-
0007	-	-	-	NT
0008	NT	NT	+	-
0009	+	+	+	+
0010	+	-	+	+
0011	+	+	+	-
0013	NT	+	+	-
0015	+	+	+	-
0016	+	+	+	+
0017	+	+	+	-
0020	NT	NT	-	-
0023	NT	NT	+	-
0024	-	+	+	+
0025	-	-	-	NT
0027	+	+	+	-
0028	+	+	+	-
0037	-	+	-	-
0055	+	+	+	+
0063	-	-	-	-
0065	+	+	+	-
0068	+	+	+	+
0075	+	+	+	+
0080	NT	NT	+	-
0095	+	-	-	NT
0119	+	+	+	+
0133	+	NT	+	-
0141	NT	NT	+	-
0160	-	+	+	-

<b>0161</b>	+	+	+	-
<b>0162</b>	NT	NT	-	-
<b>0163</b>	+	+	+	-
<b>0164</b>	NT	NT	-	-
<b>0168</b>	+	+	+	-
<b>0174</b>	NT	NT	-	-
<b>0180</b>	NT	NT	-	-
<b>0188</b>	NT	NT	-	-
<b>0191</b>	NT	NT	+	-
<b>0195</b>	NT	NT	+	-
<b>0197</b>	+	+	+	-
<b>0214</b>	-	-	-	NT
<b>0216</b>	+	+	+	-
<b>0220</b>	+	+	+	-
<b>0227</b>	NT	NT	+	-
<b>0236</b>	+	+	+	-
<b>0256</b>	+	+	-	-
<b>0259</b>	-	NT	-	-
<b>0265</b>	NT	NT	-	-
<b>0288</b>	+	+	+	-
<b>0297</b>	+	+	+	-
<b>0302</b>	+	+	+	+

NT:

não

testado; (+): formação de colônias; (-): não houve crescimento bacteriano.

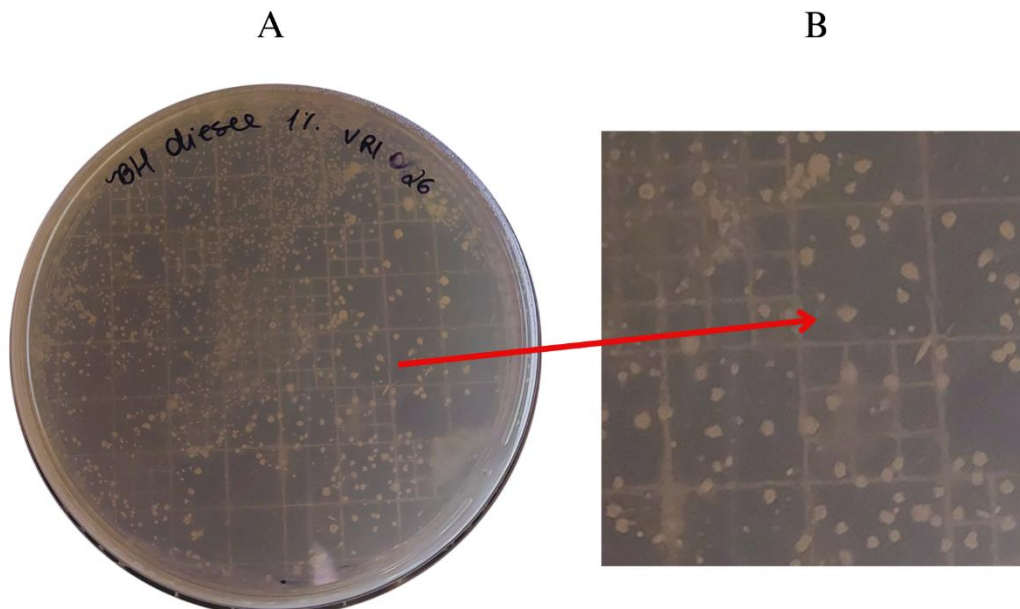
As linhagens SDF que identificamos tendo efetividade no consumo de óleo diesel S10 foram em sua maioria as bactérias da espécie *Peribacillus simplex* (anteriormente denominada *Bacillus simplex*). Desta espécie, foram 5 linhagens com crescimento positivo: SDF0009, SDF0016, SDF0024, SDF0068 e SDF0075. Além dessas, espécies como *Bacillus clausii* (SDF0010), *Bacillus aryabhatai* (SDF055), *Bacillus cereus* (SDF0119) e *Bacillus amyloliquefaciens* (SDF0302) também formaram colônias no meio BH+ODS10.

Na caracterização morfológica das colônias presentes no meio BH+EXT (controle) pode-se observar colônias grandes de 3 a 6 mm de diâmetro e amareladas, com aspecto cremoso e brilhante, forma circular, umbonada e com as bordas inteiras (Sociedade Americana de Microbiologia, 2007). No período de 24 horas de incubação é possível observar as colônias dispersas por toda a placa (Figura 4).



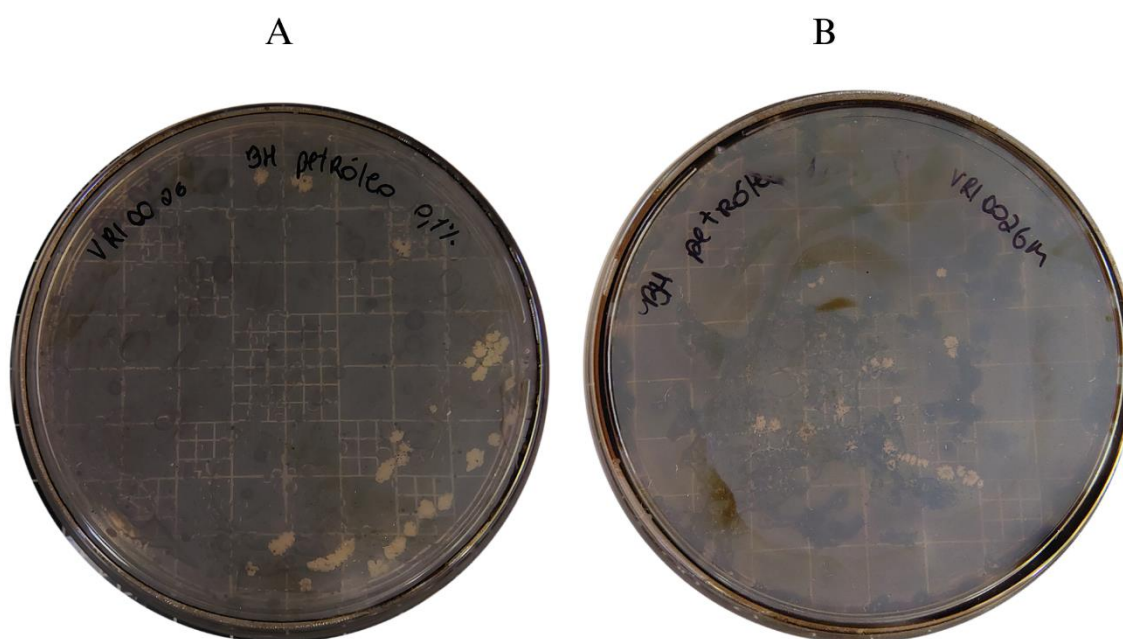
**Figura 4.** Imagem de placa da linhagem SDF0075 após 24 horas de incubação a 28°C em meio Bushnell-Hass suplementado com extrato de levedura (BH+EXT) apresentando formação de colônias bacterianas de *Peribacillus simplex*. Fotografia realizada sob contador de colônias.

Quando comparadas ao meio BH+EXT, as colônias do meio BH+ODS10 são menores, esbranquiçadas com bordas e tamanho irregulares (Figura 5).



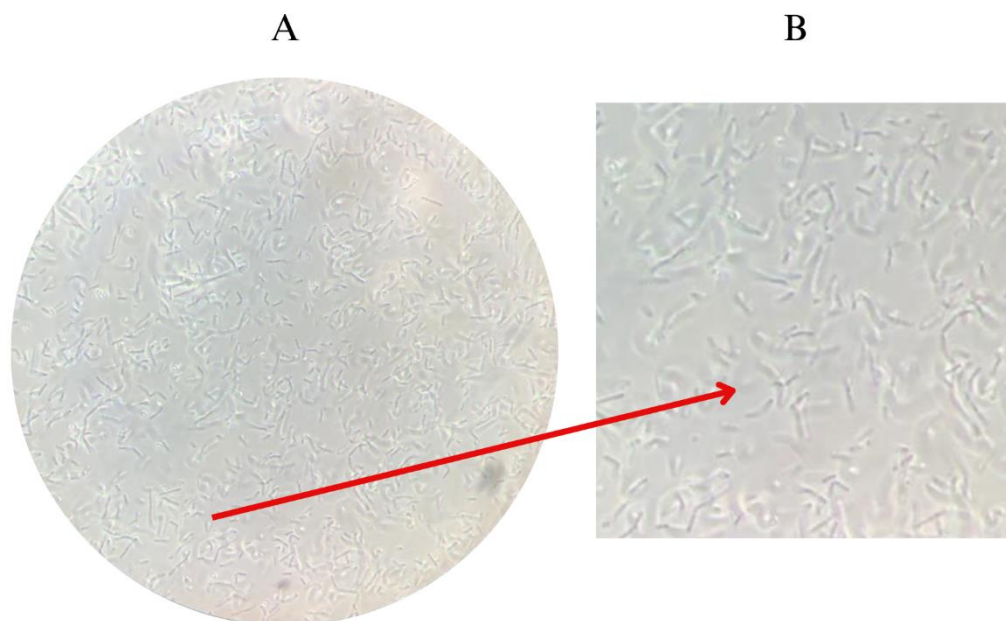
**Figura 5.** Imagem de placa da linhagem SDF0075 após 7 dias de incubação em meio Bushnell-Hass suplementado com óleo diesel S10 (BH+ODS10) apresentando formação de colônias bacterianas de *Peribacillus simplex*, onde (A): fotografia da placa realizada sob contador de colônias, (B): imagem ampliada das colônias bacterianas indicadas pela seta vermelha. Fotografia realizada sob contador de colônias.

Das 09 linhagens SDF que cresceram em meio BH+ODS10 e assim foram selecionadas para o cultivo em petróleo, 05 apresentaram formação de colônias, tanto na concentração de 1% como 0,1%, todas pertencentes à mesma espécie *Peribacillus simplex* (SDF0009, SDF0016, SDF0024, SDF0068 e SDF0075). As colônias apresentam padrão de crescimento e características semelhantes às colônias no óleo diesel S10, sendo ligeiramente maiores (Figura 6).



**Figura 6.** Imagem da placa da linhagem SDF0075 após 7 dias de incubação em meio Bushnell-Hass suplementado com 0,1% de petróleo (A) e com 1% de petróleo (B) apresentando formação de colônias bacterianas de *Peribacillus simplex*. Fotografia realizada sob contador de colônias.

Ao final dos sete dias de incubação foi averiguado através da microscopia de contraste de fase (MCF) que as bactérias ainda não tinham entrado em processo de esporulação (Figura 7). Este fato pode ser correlacionado à boa utilização dos hidrocarbonetos como fonte de carbono, onde os microrganismos provavelmente não consideraram a falta de um nutriente convencional como fator determinante para a esporulação (Setlow, 2014).



**Figura 7.** Imagem da microscopia por contraste de fase (MCF) da linhagem SDF0075 após 7 dias de incubação a 28°C em meio BH+ODS10, onde: (A) fotografia realizada no microscópio com aumento de 100x e (B) imagem ampliada da microscopia para visualização das células bacterianas indicadas pela seta vermelha.

*Peribacillus simplex*, anteriormente denominada *Bacillus simplex* (GARRITY e OREN, 2020) é uma espécie bacteriana onde a maioria das suas linhagens são aeróbias estritas e móveis. É gram-variável, possui formato bacilar com diâmetro entre 0,7-0,9  $\mu\text{m}$  e os indivíduos podem se agrupar em cadeias, em pares ou permanecer sozinhas. Os esporos desta espécie são esféricos ou elipsoidais e podem ser localizados na posição central, terminal ou subterminal. Possuem crescimento ótimo entre 20-30°C e na faixa de pH entre 7 e 9. São oxidase-negativos e catalase-positivos (LOGAN e de VOS, 2009). A Tabela 2 sumariza algumas das características principais das linhagens SDF0016 e SDF0075.



**Tabela 2.** Características das linhagens SDF0016 e SDF0075.

	<b>SDF0016</b>	<b>SDF0075</b>
<b>Índice de similaridade</b>	98%	99%
<b>Hemólise</b>	Negativa	Negativa
<b>Motilidade</b>	Positiva	Negativa
<b>Posição do esporo</b>	Central/terminal	Terminal
<b>Formato do esporo</b>	Elíptico	Oval
<b>Coloração de Gram</b>	positivo	Variável
<b>Número de acesso NCBI</b>	MH356301	MH356342

Fonte: Elaborado pelo autor com base em Magalhães (2019) e Martins (2020).

Lipinska e colaboradores (2021) realizaram um estudo utilizando *P. simplex* em consórcios microbianos e obtiveram êxito na aceleração da biodegradação de um HPA presente no petróleo, o pireno. Além do pireno, Rabodonirina *et al.* (2019) avaliaram a biodegradação de fluoreno e fenantreno por um consórcio contendo *P. simplex* e obtiveram taxas de biodegradação de 65–86% e 86–95% para fluoreno e fenantreno, respectivamente. A biodegradação de naftalenos, um hidrocarboneto aromático, também foi realizada por espécies de *P. simplex* (Nair *et al.*, 2008).

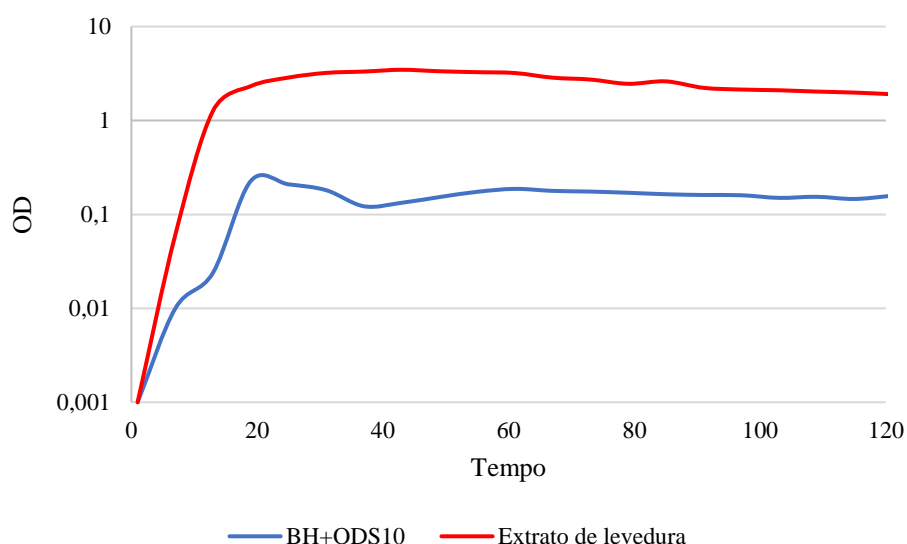
Os consórcios microbianos são mais vantajosos em relação ao emprego de somente um microrganismo na degradação de petrolatos, pois possuem diversa e extensa capacidade metabólica oferecida pelos diferentes microrganismos utilizados. Os diferentes indivíduos disponibilizam um arsenal enzimático necessário para o ataque dos diferentes componentes do petróleo e seus derivados, visto que dificilmente um organismo sozinho possui todo o maquinário enzimático necessário para a completa degradação de um conjunto de hidrocarbonetos (Varjani, 2017). Em contraponto, a adição de microrganismos diferentes para a atuação de um mesmo processo metabólico pode resultar na produção de compostos que inibem o crescimento ou desenvolvimento de culturas bacterianas, o que pode comprometer os resultados esperados (Rosenberg *et al.*, 2016).

Portanto, a utilização de diferentes linhagens da mesma espécie pode superar o problema de culturas microbianas mistas, onde a competição entre as espécies pode afetar o metabolismo dos microrganismos envolvidos (Atlas, 1977).

Os experimentos seguiram com as linhagens SDF0016 e SDF0075, pois foram capazes de crescer em ambos os meios testados.

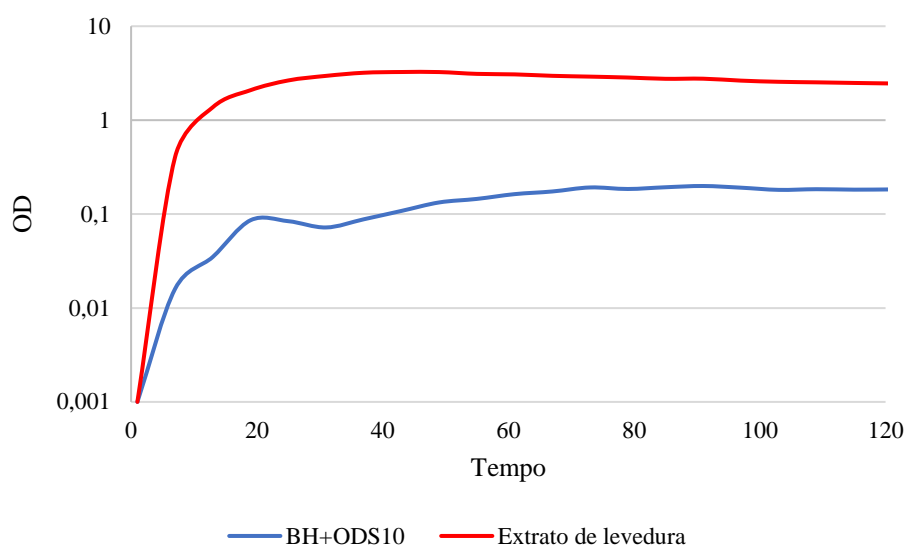
## 5.2 Curva de crescimento

O crescimento bacteriano foi avaliado em duas linhagens de *Peribacillus simplex*, SDF0016 e SDF0075 em dois meios diferentes, BH+ODS10 e extrato de levedura (controle). Foram incubados por 5 dias e as leituras foram realizadas a cada 1 hora, por 120 horas. É possível observar que o crescimento em meio com óleo diesel (BH+ODS10) é menor quando comparado ao meio controle rico em nutrientes (extrato de levedura). O crescimento da linhagem SDF0016 (Figura 8) no meio controle apresentou OD maior do que 1, enquanto no meio BH+ODS10 não ultrapassou 0,2.



**Figura 8.** Crescimento de *Peribacillus simplex* (SDF0016) quando inoculada nos meios de cultura Bushnell Haas suplementado com óleo diesel S10 a 1% (BH+ODS10) e extrato de levedura onde OD= densidade óptica obtida através da leitura espectrofotométrica e tempo= leituras realizadas no tempo total de incubação da bactéria.

O mesmo padrão de crescimento pode ser visualizado na linhagem SDF0075 (Figura 9), porém no meio contendo óleo diesel a OD não ultrapassa 0,1, enquanto no meio rico a OD supera 1. Essa linhagem também entrou em fase estacionária mais rapidamente quando comparada com a SDF0016.



**Figura 9.** Crescimento de *Peribacillus simplex* (SDF 0075) quando inoculada nos meios de cultura Bushnell Haas suplementado com óleo diesel S10 a 1% (BH+ODS10) e extrato de levedura, onde OD= densidade óptica obtida através da leitura espectrofotométrica e tempo= leituras realizadas no tempo total de incubação da bactéria.

A diferença entre o crescimento observado quando cultivado em *Erlenmeyers* (dados não mostrados) durante a bioprospecção e quando inoculado na leitora de placas pode ser devido à falta de controle de aeração adequada, já que são microrganismos que dependem de grande disponibilidade de oxigênio para se desenvolver. A entrada rápida em fase estacionária (menos de 20 horas depois da inoculação) indica que as bactérias podem ter iniciado o processo de esporulação. A disponibilidade de oxigênio deverá ser um dos fatores a serem corrigidos nos próximos experimentos realizados para que se obtenham valores mais próximos ao que é observado quando cultivado de forma manual.

### 5.3 Biodegradação de hidrocarbonetos

O reagente utilizado para o teste de biodegradação de hidrocarbonetos, o DCPIP, possui coloração azul em seu estado reduzido, e quando oxidado pela ação das bactérias, o meio torna-se incolor. Ao final dos 7 dias de incubação, não foi possível observar a mudança da cor esperada, de azul (reduzida) para incolor (oxidado) nos meios testados. Porém, a ausência da mudança de cor durante os 7 dias testados não pode ser determinante para considerar que os microrganismos não são biodegradadores de hidrocarbonetos.

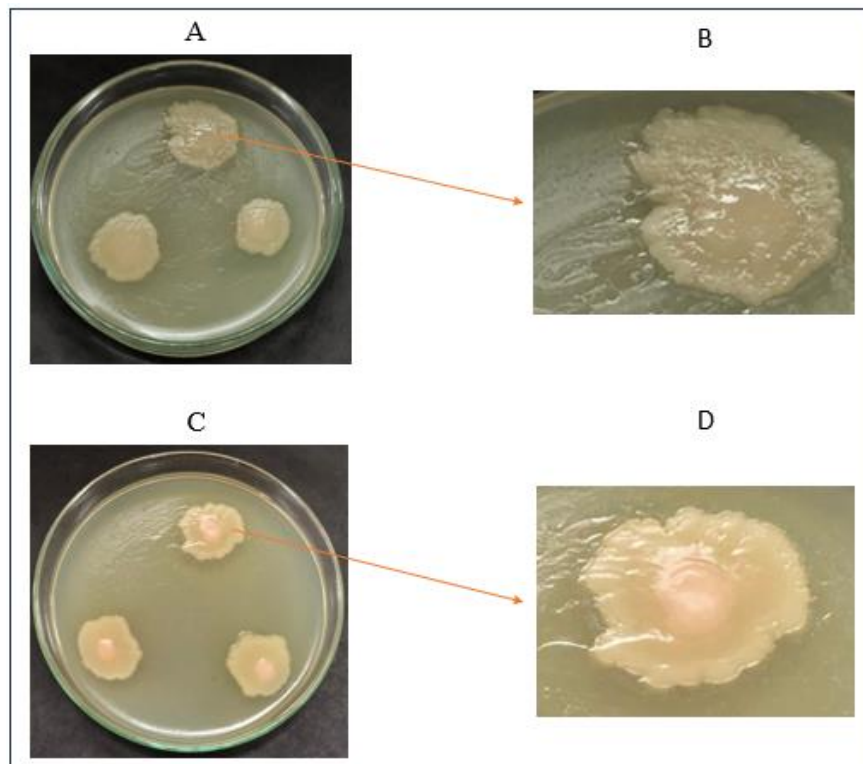
Alguns autores consideram que o tempo de aclimação e longos períodos de incubação são necessários para observar os primeiros sinais de biodegradação realiza por bactérias. Lipinska et al., (2021) constatou que os microrganismos utilizados, entre eles *P. simplex* também utilizado no presente estudo, levaram até 8 semanas para degradar o carbono presente no pireno. De acordo com Abdulsalam et al (2011), os microrganismos podem necessitar de pelo menos 10 dias para adaptar-se ao ambiente poluído (aclimatização) e levar até 70 dias para apresentarem bons indícios de biodegradação. Utilizando petróleo cru, o as bactérias do estudo de Marinescu et al (2017) levaram pelo menos 21 dias para que a biodegradação pudesse ocorrer, enquanto Liu e seu grupo (2012) constataram que os maiores níveis de biodegradação de óleo diesel ocorrem nos primeiros 100 dias, sendo os 38 primeiros os mais críticos.

Portanto, não é possível concluir com indubitabilidade que as linhagens utilizadas no presente estudo não degradam petróleo bruto e óleo diesel S10. Possivelmente, realizar este mesmo experimento com modificações poderão propor novos resultados frente a essas duas linhagens. São modificações futuras que são sugeridas, pois entre os experimentos realizados por diversos autores, não há um consenso entre tempo de cultura e concentração de corante DCPIP (Habib et al., 2017; Kubota, 2008; Oliveira, 2021). Esses dois fatores podem ser trabalhados para que se obtenha resultados promissores frente a biodegradação de hidrocarbonetos.

#### 5.4 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas da classe hidrolase que catalisam reações de hidrólise, esterificações, alcoólises e aminólises. Estão envolvidas também na sinalização celular, na adaptação celular incitada por implicações externas e mudanças da composição da membrana celular. São alvos biotecnológicos utilizados na indústria química, alimentícia, farmacêutica e cosmética. A atividade lipásica em linhagens de *Bacillus* já foram estudadas (Bala et al., 2020; Femi-Ola et al., 2018; Mahale et al., 2015) assim como o aumento da atividade em solo contaminado com óleo diesel (Margesin; Walder; Schinner, 1999) e o uso da atividade como monitoração de biodegradação de óleo diesel (Margesin; Zimmerbauer; Schinner, 2000).

Ao final dos 7 dias de incubação em meio tributirina 1% (fonte de gordura) foi verificado que havia crescimento com formação de colônias, porém os halos (zonas claras ao redor da colônia) estavam ausentes. Ambas linhagens apresentaram colônias de aproximadamente  $1,5 \pm 0,2$  centímetros, com aspecto brilhoso, de cor clara, com forma circular, bordas irregulares e elevação puntiforme rosada (Figura 10). Na imagem representada por (B), é possível observar uma ligeira zona clara ao redor da colônia, porém, devido ao tamanho da colônia, espera-se de uma bactéria produtora de lipase um halo de aproximadamente 3 cm de diâmetro (Índice Enzimático  $\geq 2$ ).



**Figura 10.** Imagem das placas do inóculo em meio tributirina da linhagem SDF0016 (A) e SDF0075 (C) e suas respectivas imagens das colônias ampliadas (B e D) indicadas pela seta em vermelho.

Como não houve a presença de halos, considera-se que as linhagens testadas não são produtoras da enzima lipase pelo método de estriamento em placa.

## 5.5 Detecção de biossurfactantes

O teste de produção de biossurfactantes foi realizado utilizando as linhagens SDF0016 e SDF0075 em meio contendo ODS10, PET e extrato de levedura como controle de crescimento. Não foi possível observar camada emulsificante nos tubos testes com 5 minutos (E5) e nem com 24 horas de teste (E24). Esse resultado propõe que essas duas linhagens podem possuir outra forma de entrar em contato com os hidrocarbonetos para então utilizá-los como fonte de energia, como por exemplo o contato direto com o óleo. Um estudo conduzido por Bouchez-Naitali e Vandecasteele (2008) mostrou que 47% dos isolados de uma mesma amostra de solo contaminado por petróleo faziam contato direto com o óleo, enquanto o restante (53%) produzia biossurfactantes, evidenciando que as duas formas são possíveis de coexistir em um mesmo ambiente.

## 5.6 Adesão a hidrocarbonetos

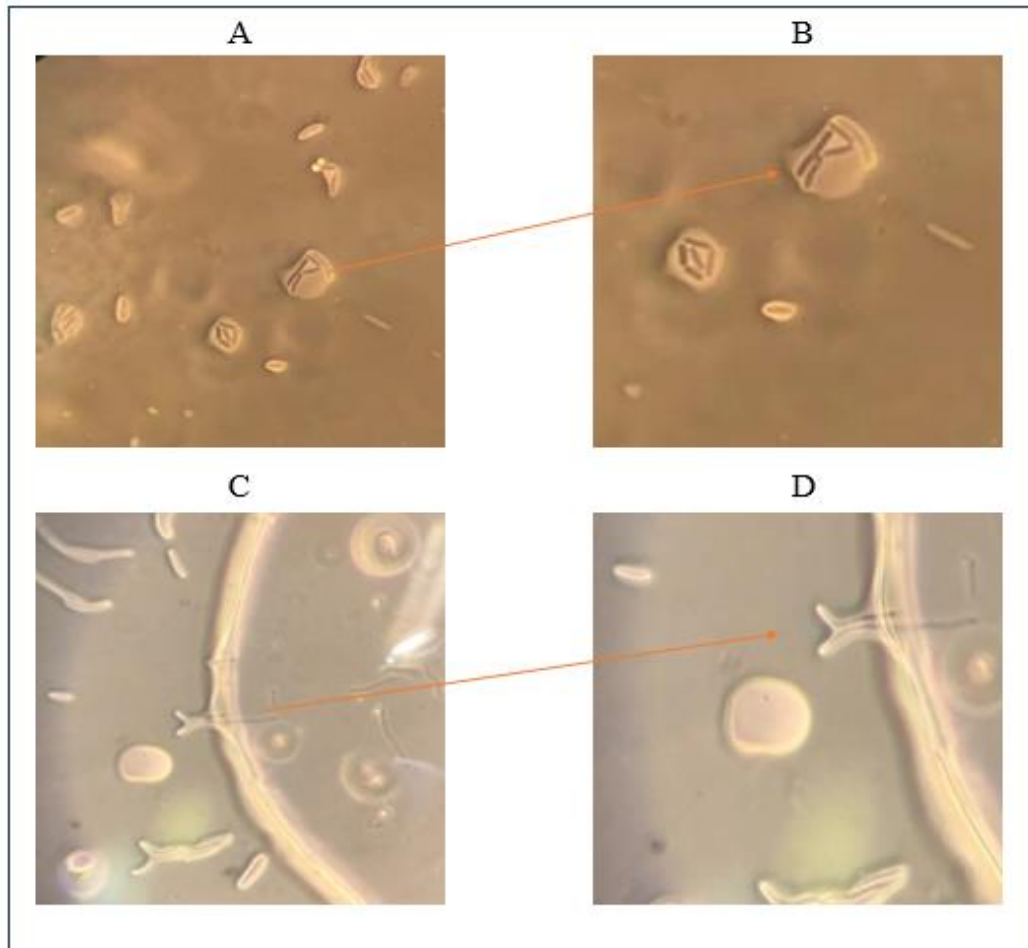
O teste de aderência a hidrocarbonetos (MATH) é uma forma rápida de verificar a hidrofobicidade das células e se há interação com os hidrocarbonetos. No teste, quando homogeneizados no vórtex, forma-se rapidamente duas fases: a fase aquosa, composta por a suspensão de células e a fase emulsificada, onde o hidrocarboneto utilizado fica sobreposto. Para que o teste seja positivo, a absorbância (correlacionada com a massa de células) da fase aquosa (A1) deve ser diminuída, considerando que se há interação positiva entre óleo-célula, as células deverão estar presentes na fase emulsificada pelo vórtex. No teste performado utilizando as duas linhagens SDF0016 e SDF0075, foi observado que as absorbâncias de A1 não diminuíram conforme o esperado quando as células bacterianas aderem ao hidrocarboneto (Tabela 3).

**Tabela 3.** Comparação entre as absorbâncias da suspensão inicial e após o teste de adesão.

Linhagem SDF	A0	A1
SDF0016	0,41±0,02	0,583±0,06
SDF0075	0,42±0,04	0,660±0,06

A0: OD da suspensão inicial; A1: OD da suspensão após o teste de adesão.

O aumento da absorvância se deve provavelmente pela interferência do óleo diesel. Apesar disso, na microscopia de contraste de fase (MCF) foi possível observar células aderidas ao óleo diesel (Figura 11).



**Figura 11.** Imagem de microscopia de contraste de fase das células bacterianas da linhagem SDF0016 (A) e SDF0075 (C) aderidas ao óleo diesel S10 e suas respectivas imagens das colônias ampliadas (B e D) indicadas pela seta em vermelho. Aumento de 1000 vezes.

Na imagem acima é possível observar as células englobadas por microgotas de óleo diesel após serem submetidas a sucessivas agitações no vórtex, indicando o contato direto entre as células e o óleo diesel.

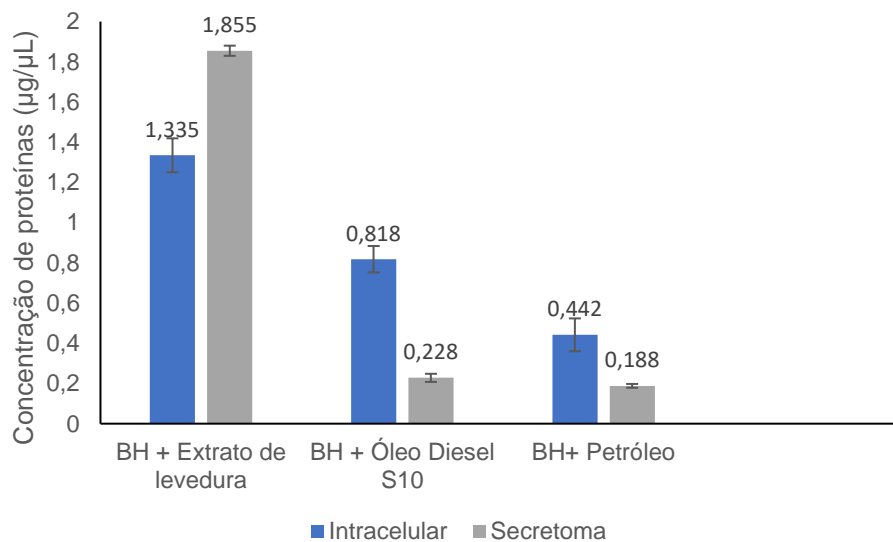
A biodisponibilidade, ou seja, o nível de interação entre os compostos e os organismos, é de extrema importância para a rápida utilização do hidrocarboneto pelos microrganismos, pois a diminuição da distância entre o organismo e o substrato é uma vantagem para a utilização deste como fonte de energia. A adesão das células

a superfícies hidrofóbicas é uma estratégia que os organismos utilizam para superar a baixa biodisponibilidade dos hidrocarbonetos (Abbasnezhad *et al.*, 2011).

O uso de contador de células poderia superar o problema causado pela interferência do hidrocarboneto ao estimar as células não aderidas (Zoueki *et al.*, 2010).

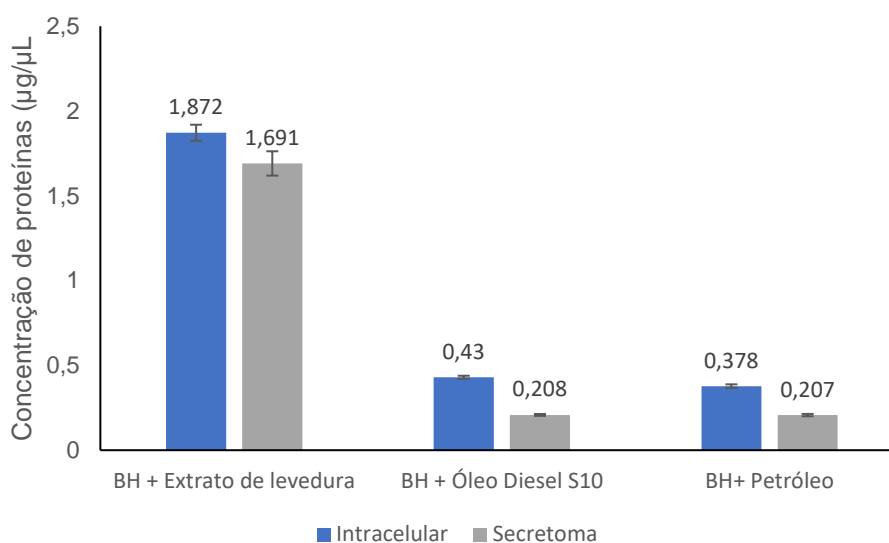
### 5.7 Quantificação de proteínas totais

Foram realizadas as quantificações das amostras de proteínas intracelulares e secretadas das linhagens SDF0016 (Figura 12) e SDF0075 (Figura 13).



**Figura 12.** Histograma comparativo da concentração de proteínas intracelulares e secretadas em diferentes meios de cultura da linhagem SDF0016.





**Figura 13.** Histograma comparativo da concentração de proteínas intracelulares e secretadas em diferentes meios de cultura da linhagem SDF0075.

A linhagem SDF0016 apresentou concentrações médias de proteínas intracelulares de  $1,33 \pm 0,15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+EXT),  $0,82 \pm 0,11 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+ODS10) e  $0,44 \pm 0,14 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+PET). As proteínas secretadas apresentaram as concentrações de  $1,85 \pm 0,02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+EXT),  $0,22 \pm 0,02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+ODS10) e  $0,18 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+PET).

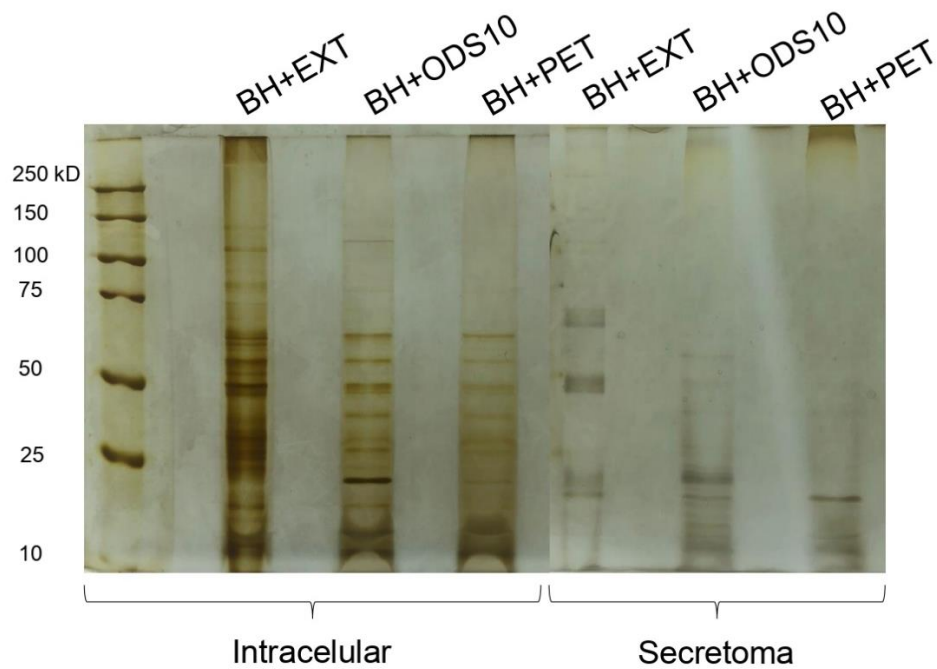
Já a linhagem SDF0075 apresentou concentrações médias de proteínas intracelulares de  $1,87 \pm 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+EXT),  $0,43 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+ODS10) e  $0,38 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+PET). As proteínas secretadas apresentaram as concentrações de  $1,69 \pm 0,07 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+EXT),  $0,20 \pm 0,005 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+ODS10) e  $0,20 \pm 0,006 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (BH+PET).

É possível observar a diminuição da concentração das proteínas totais intracelulares e secretadas quando as duas linhagens são cultivadas na presença de hidrocarbonetos, tanto óleo diesel como o petróleo, em relação ao meio controle. Esse padrão observado pode fornecer dados importantes em análises proteômicas mais robustas.

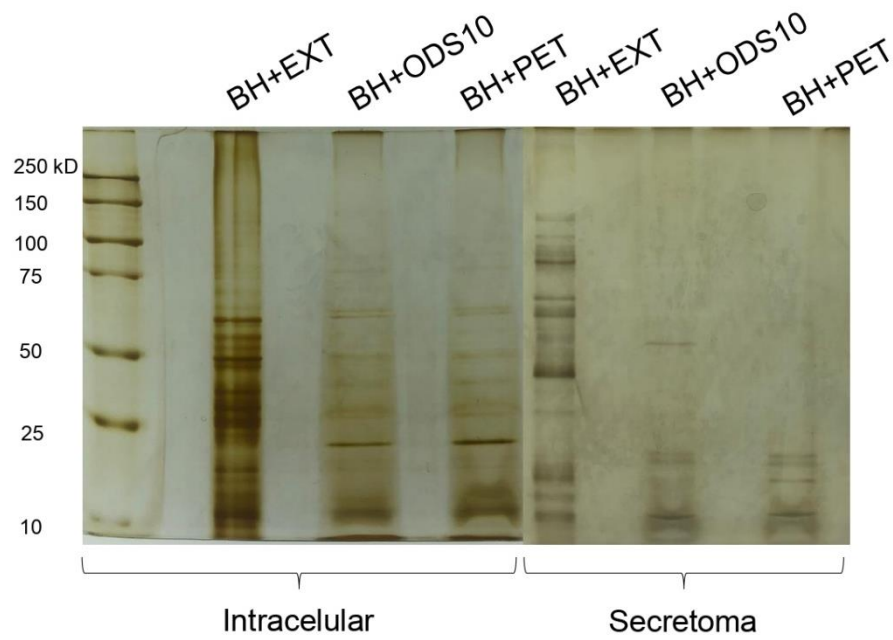
## 5.8 Eletroforese desnaturante SDS-PAGE

As amostras lisadas e secretadas foram aplicadas no gel de eletroforese SDS-PAGE utilizando  $10 \mu\text{g}$  de proteínas e  $30 \mu\text{g}$  de proteínas, respectivamente. As

linhagens SDF0016 (Figura 14) e SDF0075 (Figura 15) apresentaram diferenças no perfil proteômico tanto entre as linhagens, como entre os tipos de proteomas analisados.



**Figura 14.** Geis de eletrofose SDS-PAGE da linhagem SDF0016 de proteínas intracelulares e secretadas quando cultivada nos meios BH+ETX, BH+ODS10 e BH+PET.



**Figura 15.** Geis de eletrofose SDS-PAGE da linhagem SDF0075 de proteínas intracelulares e secretadas quando cultivada nos meios BH+EXT, BH+ODS10 e BH+PET.

Observa-se por estes géis de eletroforese as diferenças, tanto no proteoma intracelular quanto no secretado. Esse achado inicial é importante para futuros testes que identifiquem os perfis proteômicos das bactérias biodegradadoras, como a espectrometria de massas.

## 6 CONCLUSÃO

É possível observar esforços para a utilização de microrganismos como remediadores de petróleo desde o início do século XX que se permeiam até o presente, uma vez que atualmente no Brasil há apenas 3 produtos registrados que podem ser utilizados em casos de derramamentos de petróleo. Por isso, a investigação a procura de novas bactérias hidrocarbonoclásticas e entender seus mecanismos regulatórios são de suma importância para o andamento da busca de um sistema biorremediador eficaz e sua devida implementação.

Das 50 bactérias utilizadas neste estudo, 9 apresentaram capacidade de formar colônias em meio contendo óleo diesel S10 (9) e petróleo (5). Foi observado que essas linhagens se aderem ao hidrocarboneto para então degradá-los. As diferenças entre meios de cultivo tradicional e os suplementados com hidrocarbonetos foram evidenciadas pelas colônias presentes nos meios, a concentração de proteínas e os perfis proteômicos nos géis de eletroforese.

As limitações de tempo de cultivo disponível utilizada para a bioprospecção das bactérias em petróleo e óleo diesel foi um dos fatores considerados como entrave para a descoberta de mais linhagens degradadoras de petróleo. Apesar disso, as expectativas iniciais impostas sobre este estudo foram cumpridas, onde foram encontradas 9 linhagens que consomem hidrocarbonetos.

Dentre as diversas caracterizações já feitas das linhagens das Bactérias aeróbias formadoras de endósporos presentes na coleção CBafes, a capacidade de crescer em meio contendo petróleo e óleo é adicionada.

## 7 PERSPECTIVAS

A robusta e extensiva busca por bactérias degradadoras de óleo diesel e petróleo, onde foram utilizadas uma grande quantidade de linhagens bacterianas, em conjunto com os estudos preliminares acerca dos mecanismos de biodegradação e a proteômica inicial composta pela quantificação da concentração de proteínas e géis de eletroforese, proporcionam diversas possibilidades promissoras de estudos aprofundados utilizando as duas principais linhagens aqui trabalhadas.

Ainda existem melhorias e modificações a serem feitas na metodologia aqui apresentada, sobretudo na identificação de atividade enzimática e perfil de biodegradação. É necessário compreender melhor os mecanismos utilizados por estas bactérias ao apresentarem a capacidade de crescer em diferentes meios, assim como explorar a possibilidade da atuação sinérgica entre as linhagens aqui trabalhadas.

Portanto, em relação à proteômica, a possibilidade de identificar as proteínas presentes nas diferentes condições testadas através de espectrometria de massas, tanto em presença do óleo diesel como do petróleo, integra os estudos aqui obtidos, possibilitando o entendimento acerca dos processos envolvidos na biodegradação do petróleo pelas linhagens SDF.

A biblioteca de bactérias utilizada ainda possui uma vasta possibilidade de estudos acerca da biodegradação de petróleo. A descoberta de novas bactérias, pesquisas proteômicas aprofundadas, assim como a construção de um consórcio bacteriano utilizando as linhagens aqui estudadas são idealizações para a continuidade do trabalho iniciado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, Ruedi.; MANN, Matthias. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Óleo Diesel. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/oleo-diesel#>.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Relatório Anual De Segurança Operacional Das Atividades De Exploração e Produção De Petróleo e Gás Natural. 2022.

ABATENH, Endeshaw; GIZAW, Birhanu; TSEGAYE, Zerihun; WASSIE, Misganaw. The role of microorganisms in bioremediation- a review. *Open Journal of Environmental Biology*. v. 1. n. 1. p. 38-36. 2017.

ABBASNEZHAD, Hassan; GRAY, Murray; FOGHT, Julia. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 92. P. 653–75. 2011.

ABDULSALAM, S; BUGAJE, M; ADEFILA, S; IBRAHIM, S. Comparison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *International Journal Environmental Science and Techonoly*. v. 8. n.1. p.187-94. 2011.

ANDERSON, Robert. DOE Genomics: Applications to In Situ Subsurface Bioremediation. *Remediation*. 2006.

ARAÚJO, Maria E.; RAMALHO, Cristiano WN; de MELO, PW. Pescadores artesanais, consumidores e meio ambiente: consequências imediatas do vazamento de petróleo no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública*. n. 36, v. 1. 2020.

ATLAS, Ronald M. *Handbook of Microbiological Media*. 4th Ed. CRC Press.1993.

ATLAS, Ronald M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*. v 45, p. 180-209. 1981

ATLAS, Ronald M. Stimulated petroleum biodegradation. *Critical Review in Microbiology*, v. 5, p. 371-386. 1977.

AYALA, Marcela; TORRES, Eduardo. Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. *Applied Catalysis A: General*. v. 272, p. 1-13. 2004.

AZUBUIKE, Christopher C; CHIKERE, Chioma B; OKPOKWASILI, Gideon C. Bioremediation techniques- classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. World J Microbiology Biotechnology. v. 32, n. 180. 2016.

BAIRD, C. Química Ambiental. Ed. Bookman. São Paulo. P. 662. 2002.  
BALA, J; AUTA, H; ABDULLAHI, M; BIRMA, G; ADEDEJI, A; ENEJIYON, S; JYA, J. Optimization of lipase from bacteria isolated from soil. Lapai Journal of Science and Technology. V. 6, N. 1.2020.

BARRY, Sarah; CHALLIS, Gregory. Mechanism and Catalytic Diversity of Rieske Non-Heme Iron-Dependent Oxygenases. ACS Catalysis. v. 3, n. 10, p. 2362-2370. 2013.

BENTO, Fátima; CAMARGO, Flavio; GAYLARDE, Christine. Biossurfactantes. In: Microbiologia Ambiental. Microbiologia Ambiental. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPMA). Jaguariúna, SP. p. 151-184. 2008.

BRASIL. [Decreto nº 10.950, de 27 de janeiro de 2022](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2019-2022/2022/decreto/d10950.htm). Brasília, DF: presidência da república, 2022. Dispõe sobre o plano nacional de contingência para incidentes de poluição por óleo em águas sob jurisdição nacional. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ato2019-2022/2022/decreto/d10950.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2019-2022/2022/decreto/d10950.htm)

BRASIL. Lei nº 9.966, de 28 de abril de 2000. Brasília, DF: presidência da república, 2000. Dispõe sobre a prevenção, o controle e a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional e dá outras providências. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19966.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19966.htm)

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. RESOLUÇÃO Nº 463, DE 29 de julho de 2014 Dispõe sobre o controle ambiental de produtos destinados à remediação.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Plano Nacional de Contingência para Incidentes de Poluição por óleo em Águas sob Jurisdição Nacional (PNC). 27 de abril de 2020. Disponível em: [https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=749&catid=130&Itemid=629](https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=749&catid=130&Itemid=629)

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria IBAMA nº 241. de 23 de novembro de 2023a. Instituir a Orientação Técnica Normativa sobre classificação de produtos remediadores registráveis junto ao Ibama, a ser aplicada em processos administrativos na forma do Anexo desta Portaria.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Registro de produtos biorremediadores. 08 de dezembro de 2023b. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/produtos-remediadores/registro-de-produtos-remediadores#lista>

BRASIL. PF conclui investigações sobre a origem das manchas de óleo que atingiram o litoral brasileiro entre 2019 e 2020. Polícia Federal. 30 de novembro de 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/pf/pt-br/assuntos/noticias/2021/12/pf-conclui-investigacoes-sobre-a-origem-das-manchas-de-oleo-que-atingiram-o-litoral-brasileiro-entre-2019-e-2020>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2024.

CANDIANO, et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. v. 25. p. 1327–1333. 2004.

CAVALCANTE, Danilo. Ultraestrutura e termorresistência de esporos e identificação de proteínas de bactérias aeróbias de solo do Distrito Federal. 2014. Dissertação de mestrado em Biologia Microbiana. Universidade de Brasília.

CÁUPER, Luciana; CÁUPER, Fábio; NADIONARA, Cassiane; de OLIVEIRA JUNIOR, Paulo OLIVEIRA, Luiz. Potencial de biodegradação de petróleo por rizobactérias isoladas de solos amazônicos, usando o indicador diclorofenol indofenol – DCPIP.

CHASE, Darcy A; EDWARDS, Donn S; QIN, Guangqiu; WAGES, Mike R; WILLIMING, Morgan M; ANDERSON, Todd A; MAUIL, Jonathan D. Bioaccumulation of petroleum hydrocarbons in fiddler crabs (*Uca minax*) exposed to weathered MC-252 crude oil alone and in mixture with oil dispersant. *Science of the Total Environment*. n. 444, p. 121-127. 2013.

CHAUHAN, Archana; JAIN, Rakesh. Biodegradation: gaining insight through proteomics. *Biodegradation*. v. 21. p. 861-79. 2010.

CHEVALLET, Mirreile; LUCHE, Sylvie; RABILLOUD, Thierry. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*. v. 1.n. 4 p. 1852-8. 2006.

CHUKWUDULUE, Uche; BARGER, Natalia; DUBOVIS, Michael; KNAAN, Tal. Natural Products and Pharmacological Properties of Symbiotic Bacillota (Firmicutes) of Marine Macroalgae *Marine Drugs*. v. 21. n. 569. 2023.

COOPER, David G; GOLDENBERG Beena G. Surface-active agentes from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 53, n. 2, p. 224-229. 1987.

CUBITTO, Maria; MORÁN, Ana; COMMENDATORE, Marta; CHIARELLO, Maria; BALDINI, Mónica; SIÑERIZ, Faustino. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*. V. 15. p.281-7. 2004.

CUTTING, Simon. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. n. 28. p. 214-22. 2011.

de HOON, Michiel JL; EICHENBERGER, Patrick; VITKUP, Denis. Hierarchical Evolution of the bacterial sporulation network. *Current Biology*. v. 20, n.17. 2010.

DESAI, Jitendra; BANAT, Ibrahim. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. p. 47-64. 1997.



DOSHI, Bhairavi; SILLANPÄÄ, Mika, KALLIOLA Simo. A review of bio-based materials for oil spill treatment. *Water Research*. v. 135, p. 262-277. 2018.

EASTCOTT, Linda; SHIU, Wan Y; MACKAY, Donald. Environmentally Relevant Physical-Chemical Properties of Hydrocarbons: A Review of Data and Development of Simple Correlations. *Oil & Chemical Pollution*. v. 4, p. 191-216. 1988.

EPA (United States Environmental Protection Agency). Oil Spills Response Techniques. 28 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.epa.gov/emergency-response/epas-response-techniques>

FEMI-OLA, T. ODEYEMI, A; OLAIYA B; OJO, O. Characterization of Lipase from *Bacillus subtilis* Isolated from Oil Contaminated Soil. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. v. 6, n. 1. p.10-17. 2018.

FUCHS Georg; BOLL, Matthias; HEIDER, Johannn. Microbial degradation of aromatic compounds-from one strategy to four. *Nature reviews*. v. 9, p. 803-816. 2011.

GALPERIN, Michael Y. Genome diversity of spore-forming Firmicutes. *Microbiology Spectrum*. v. 1, n. 2, p. 1-15. 2013.

GARRITY, George; OREN, Aharon. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 70, part 1 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 70. n.4. 2020.

GIBBONS, NE; MURRAY, GE. Proposals Concerning the Higher Taxa of Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 28. N. 1. 1978.

GOMRI, Mohamed; KHALDI, Tedj; KHARROUB, Karima. Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural and non-cultural methods. *Annals of Microbiology* v 68. p. 915–29. 2018.

GRADY, Elliot N; MACDONAL, Jacqueline; LIU, Linda; RICHMAN, Alex; YUAN, Ze-Chun. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cekk Fact*. v. 15, n. 203. 2016.

HABIB, Syahir; JOHARI, Wan Lutfi; ABD SHUKOR, Mohd Yunus; YASID, Nur Adeela. Screening of hydrocarbon-degrading bacterial isolates using the redox application of 2,6-DCPIP. *Bioremediation Science and Technology Research*. v. 5. n. 2. p. 13-16. 2017

HANSON, KG; DESAI, Jitendra D; DESAI, Anjana J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*. v. 7, n. 10, p. 745-748. 1993.

HASHMI, Isha; BINDSCHEDLER, Saskia; JUNIER, Pilar. Firmicutes. Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi. p. 363-96. 2020.

HERNÁNDEZ-SANTANA, Alejandra; DUSSÁN, Jenny. Lysinibacillus sphaericus proved to have potential for the remediation of petroleum hydrocarbons. Soil and Sediment Contamination: An International Journal. 2018.

HEWELKE, Edyta; SZATYŁOWICZ, Jan; HEWELKE, Piotr; GNATOWSKI, Tomasz; AGHALAROV, Rufat. The Impact of Diesel Oil Pollution on the Hydrophobicity and CO<sub>2</sub> Efflux of Forest. Water Air Soil Pollut. v. 229. n. 51. 2018.

HUA, Fei. WANG, Qi. Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. Biotechnology Equip. v. 28, n. 2, p. 165–175. 2014.

HUTCHISON, Elizabeth A; MILLER, David. A; ANGERT, Esther R. Sporulation in Bacteria: beyond the standard model. Microbiological spectrum, v. 2, n. 5. 2014.

Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás. Maiores produtores mundiais de petróleo em 2022. Disponível em: <https://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/snapshots/maiores-produtores-mundiais-de-petroleo/>

JIMOH, Abdullahi; LIN, Johnson. Bioremediation of contaminated diesel and motor oil through the optimization of biosurfactant produced by Paenibacillus sp. D9 on waste canola oil. Bioremediation Journal. 2020.

JIN, Shuaichen; CAO, Shengkai; LI, Ruijing; GAO, Hui; NA, Guangshui. Trophic transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons through the food web of the Fildes Peninsula, Antarctica. Environmental. Science and Pollution Research. 2023.

KAPPELER, T; WUHRMANN, K. Microbial degradation of the water-soluble fraction of gas oil. Water Research. v. 12, n. 12, p. 327-334. 1979.

KIM, Ki-Hyun; JAHAN, Shamin; KABIR, Ehsanul; BROWN, Richard. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA) and their human health effects. Environment International. v. 60. p. 71-80. 2013.

KUBOTA, Kenzo; KOMA, Daisuke; MATSUMIYA, Yoshiki; CHUNG, Seon-Yong; KUBO, Motoki. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. Springer Science+Business Media B.V. n. 19. p. 749-757. 2008

KUPPUSAMY, Saranya; MADDELA, Naga; MEGHARAJ, Mallavarapu; VENKATESWARLU, Kediya. Total Petroleum Hydrocarbons: Environmental fate, toxicity and remediation. Capítulo 5: Ecological Impacts of Total Petroleum Hydrocarbons. Springer. p. 95-138. 2020.

LABINGER, Jay; BERCAW, John. Understanding and exploiting C-H bond activation. Nature. v. 417. p. 507-514. 2002.

LADINO-ORJUELA, Guillermo; GOMES, Eleni; da SILVA, Roberto; SALT, Christopher; PARSONS, John. Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. v. 237. P. 105-21. 2016.

LAEMMLI. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. v. 227. 1970.

LEAHY, Joseph; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, V. 54, p. 305-315. 1990.

LEAHY, Joseph; BATCHELOR, Patricia; MORCOMB, Suzanne. Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 27. p. 449-479. 2003.

LIPÍŃSKA, Aneta; WYSZKOWSKA, Jadwiga; KUCHARSKI, Jan. Microbiological and biochemical Microbiological and Biochemical Activity in Soil Contaminated with Pyrene Subjected to Bioaugmentation. *Water, Air and Soil Pollution*. v. 232. n. 45. 2021.

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Phylum *Bacillota*. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/phylum/bacillota>.

LIU, Pao-Wen; WANG, Sih-Yu; HUANG, Shen-Gzhi; WANG, Ming-Zhi. Effects of soil organic matter and ageing on remediation of diesel-contaminated soil. *Environmental Technology*. v. 33. n. 23. p. 2661-2672 2012

LIU, Yuqin, SUN, Zongquan, JI, Longjie, SHEN, Jialun, LI, Shupeng, LONG, Jie, MA, Fujun; GU, Qingbao. Systematic study on dynamic pyrolysis behaviors, products, and mechanisms of weathered petroleum-contaminated soil with Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Science of the Total Environment*. V. 834. 2022.

LOGAN, Niall; de VOS, Paul. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>a</sup> Ed. Vol. 3. Firmicutes. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872. p. 21-127.

LUZ, Cleber C. SANTOS, Elisângela A; SANTOS, Maria OS; MUSSY, Marília Y; YAMASHITA, M; BASTOS, Wanderley R et al. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho- RO, Amazônia. *Quím. Nova*. V. 34, n. 5. p. 775-9. 2011.

MACCHI, M; MARTINEZ; TAUILL, R; VALACCO, M; MORELLI, S; COPPOTELLI, B. Insights into the genome and proteome of *Sphingomonas paucimobilis* strain 20006FA involved in the regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 34. n. 7. 2018.

MADIGAN, Michael T. *Microbiologia de Brock*. Ed. ArtMed. 14<sup>o</sup> edição. Porto Alegre. 2016. p. 495.

MAGALHÃES, Inês. Avaliação do perfil toxigênico da Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 2019.

MAHALE, P; DESAI, S. HOMBALIMATH, V; ACHAPPA, S. Isolation, Screening and Characterization of Lipase Producing Strain from Oil Contaminated Soil of Hubballi, Karnataka. *International Journal of Basic and Applied Biology* V. 2, N. 4. p. 198-201. 2015.

MALLAH, Manthar; CHANGXING, Li; MALLAH, Mukhtiar; NOREEN, Sobia; LIU, Yang; SAEED, Muhammad et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: an overview. *Chemosphere*. v. 296. 2022.

MARINESCU, Mariana; LACATUSU, Anca; GAMENT, Eugenia; PLOPEANU, Georgiana; CARABULEA, Vera. Bioremediation potential of native hydrocarbons degrading bacteria in crude oil polluted soil. *Bulletin USAMV Series Agriculture*. n. 73. p. 20-25. 2016.

MARGESIN, ROSA; ZIMMERBAUER, Astrid; SCHINNER, Franz. Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnology Techniques* V. 13. P. 859–63. 1999.

MARGESIN, R; WALDER, G; SCHINNER, F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnology*. v. 20. p. 313-33. 2000.

MARTÍNEZ, Sergio; DUSSÁN, Jenny. *Lysinibacillus sphaericus* Plant Growth Promoter Bacteria and Lead Phytoremediation Enhancer with *Canavalia ensiformis*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. v. 37. n.1. 2018.

MARTINS, Paulo. Ampliação, caracterização fenotípica e estruturação da Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos nativas do solo do Distrito Federal. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, 2020.

MARTINS, S; SILVA, P; AZEVEDO, MO; SILVA, VP. Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. *HOLOS*, v. 6, p. 54-76. 2015.

MCKENNEY, Peter T; DRIKS Adam.; EICHENBERGER, Patrick. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, 33-34. 2013.

MILANI, EJ; BRANDÃO, JASL; ZALÁN, PV; GAMBOA, LAP. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. *Brazilian Journal of Geophysics*. v. 18, n. 3. 2000.

MONGKOLTHANARUK, Wiyada. Classification of bacillus beneficial substances related to plants, humans and animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 22, n. 12, p. 1597-1604. 2012.

MORENO, Renata; ROJO, Fernando. Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes in Bacteria. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. p. 117-142. 2019.

NAIR, D; FERNÁNDEZ-ACERO, F; GARCIA-LUQUE, E; RIBA, I; VALLS, T. Isolation and Characterization of Naphthalene Degrading Bacteria from Sediments of Cadiz Area (SW Spain). *Environmental Toxicology*. 2008.

NICHOLSON, Wayne L; MUNAKATA, Nobuo; HORNECK, Gerda; MELOSH, Henry J; SETLOW, Peter. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.64, n. 3, p-548-572. 2000.

OREM, Juliana. Filogenia e perfil plasmidial de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo. 2014. Dissertação de mestrado em Biologia Microbiana. Universidade de Brasília.

OSSAI, Innocent C., AHMED, Aziz.; HASSAN, Auwalu.; HAMID, Fauziah.; Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*. v. 17. 2020.

PANDEY, Anupam; TRIPATHI, Priyanka; TRIPATHI, Ankita; PANDEY, Satish; GANGOLA, Saurabh. Omics technology to study bioremediation and respective enzymes. *Smart Bioremediation Technologies: Microbial Enzymes*. P. 23-43. 2019.

PÉREZ-PANTOJA, D; GONZALEZ, B.; PIEPER, D. Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. p. 799-837. 2010.

Petrobras. Óleo Diesel Petrobras. Disponível em: <https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/produtos/industriais/oleo-diesel/>.

RABODONIRINA, S; RASOLOMAMPIANINA, R; KRIER, F; DRIDER, D; MERHABY, D; NET, S; OUDDANE, B. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. *Journal of Environmental Management*. V. 22. N. 15. 2019.

RAHN, O. 1906 Ein Paraffin zersetzender Schimmelpilz. *Zentr. Bakt. Parasitenk. Infek.*, II, 16, 382-384. 1906.

ROJO, Fernando. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol*. v. 11, n. 10, p.2477–2490. 2009.

RON, Eliora Z; ROSENBERG, Eugene. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*. v. 3, n. 4, p. 229-236. 2001.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: Microbiologia Ambiental. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPMA). Jaguariúna, SP. p. 307-334. 1997.

ROSENBERG, Gili; STEINBERG, Nitai; OPPENHEIMER-SHAANAN, Yaara; OLENDER, Tsvia; DORON, Shany; BEM-ARI, Julius; et al. Not so simple, not so subtle: the interspecies competition between *Bacillus simplex* and *Bacillus subtilis* and its impact on the evolution of biofilms. *Biofilms and Microbiomes*. n. 15027. p. 1-11. 2016.

ROSENBERG, M; GUTNICK, D; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. V. 9. p. 29-33. 1980.

SAKTHIPRIYAA, N; DOBLEB, Mukesh; SANGWAI, Jitendra. Bioremediation of Coastal and Marine Pollution due to Crude Oil using a Microorganism *Bacillus subtilis*. 8th International Conference on Asian and Pacific oast (APAC 2015). *Procedia Engineering*. V.116 P. 213-20. 2015.

SÃO PAULO. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Vazamentos de óleo. Ação de resposta. Contenção e Remoção. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/tipos-de-acidentes/vazamentos-de-oleo/acoes-de-resposta/contencao-e-remocao/>

SCHLEIFER, Karl-Heinz. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Terceira edição. p. 19. 2009.

SEABRA, Paulo Negrais. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. P. 547-570. In: *Microbiologia Ambiental*. Microbiologia Ambiental. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPMA). Jaguariúna, SP. 2008.

SETLOW, Peter. Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know *Journal of Bacteriology* v. 196, n. 7, p. 1297–1305. 2014.

SIERRA, Gonzalo. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observation on the influence of the contact between cell and fatty substrates. 1957.

SIKKEMA, Jan; DE BONT, Jan A.M.; POOLMAN, Bert. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. v. 59, p.201-222. 1995.

SINGH, Om; NAGARAJ, Nagathihalli. Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Briefings In Functional Genomics And Proteomics*. v. 4. n. 4. p. 355-62. 2006.

SINGH, SN; KUMARI, B; MISHRA, Shweta. Microbial degradation of alkanes. *Microbial Degradation of Xenobiotics. Environmental Science and Engineering*. P. 439-469. 2012.

SOARES, Marcelo; RABELO, Emanuelle. Severe ecological impacts caused by one of the worst orphan oil spills worldwide. *Marine Environmental Research* v. 187. 2023.

Sociedade Americana de Microbiologia. *Colony Morphology Protocol*. 2007.

SOUZA FILHO, André. Planos nacionais de contingência para atendimento a derramamento de óleo: análise da experiência de países representativos das américas para implantação no caso do Brasil. 2006. Dissertação de mestrado em Ciências em Planejamento Ambiental. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SPEIGHT, James G. *The chemistry and technology of Petroleum*, 5<sup>a</sup> ed.

STEPANOVA, Anna; GLADKOV, Evgeny; OSIPOVA, Ekaterina; GLADKOVA, Olga; TERESHONOK, Dmitry. Bioremediation of Soil from Petroleum Contamination. *Processes*. v. 10, n. 1224. 2022.

SWATI; KUMARI, Moni; GHOSH, Pooja; THAKUR, Indu. Evaluation of a biosurfactant producing bacterial strain *Pseudomonas* sp. ISTPY2 for efficient pyrene degradation and landfill soil bioremediation through soil microcosm and proteomic studies. *Bioresource Technology Reports* v. 12. 2020.

THOMAS, J. E. et al. *Fundamentos de engenharia de petróleo*. Rio de Janeiro: ed. Interciência, 2004.

TISSOT, B. P. & WELTE, D. H. 1984. *Petroleum formation and occurrence*. Second revised and enlarged edition. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p. 699.

U.S. Energy Information Administration (EIA). *Financial Review: third-quarter 2023*. Disponível em: <https://www.eia.gov/finance/review/>

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME). 1991. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments. *Reference methods for marine pollution studies*, no 20, p. 97.

VANDERCASTEELE, Jean-Paul; BOUCHEZ-NAÏTALI, Murielle. Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. *World J Microbiol Biotechnol*. v. 24, p. 1901-1907. 2008.

VARJANI, Sunita. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*. v. 223. p. 277-286. 2017.

VOLLU, Renata; JURELEVICIUS, Diogo; RAMOS, Larissa; PEIXOTO, Raquel;



ROSADO, Alexandre; SELDIN, Lucy. Aerobic endospore-forming bacteria isolated from Antarctic soils as producers of bioactive compounds of industrial interest. *Polar Biology*. v. 37. p. 1121–131. 2014.

WATKINSON, Robert J; MORGAN, Philip. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation* v. 1, p. 79–92. 1990.

WENTZEL, Alexander; ELLINGSEN, Trond; KOTLAR Hans-Kristian; ZOTCHEV, Sergey; THRONE-HOLST, Mimi. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 76, p. 1209–21. 2007.

WU, Manli. LI, Wei. DICK, Warren; YE, Xiqiong. CHEN, Kaili; KOST, David; CHEN, Liming. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*. v. 169. p.124-130. 2017.

YUNIATI, MD. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A review. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* v. 118. 2018.

ZACHARIAS, Daniel Constantino; FORNARO, Adalgiza. Brazilian offshore oil exploration areas: an overview of hydrocarbon pollution. *Ambiente e Água*. v. 15 n. 5. 2020.

ZACHARIAS, Daniel Constantino; GAMA, Carine Malagoni; FORNARO, Adalgiza. Mysterious oil spill on Brazilian coast: Analysis and estimates. *Marine Pollution Bulletin* n. 165. 2021.

ZIMMER, Jenniger; MONROE, Matthew; QLAN, Wei-Jun; SMITH, Richard. Advances in proteomics data analysis and display using an accurate mass and time tag approach. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 25, n. 3, p. 450–482, 2006.

ZHENG, Mengyuan; AHUJA, Manuj; BHATTACHARYA, Dwipayana; CLEMENT, TP; HAYWORTH, Joel S; DHANASEKARAN, Muralikrishnan. Evaluation of differential cytotoxic effects of the spill dispersant Corexit 9500. *Life Sciences*. v. 96, p. 108-117. 2014.