

Eixo Temático ET-04-006 - Recuperação de Áreas Degradadas

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES E DINÂMICA DE CRESCIMENTO NO SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO (MICROCOSM) DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Bacillus* E *Pseudomonas*

Rafaela Oliveira Araújo^{1,*}, Thiago Claudino Mendes de Almeida¹, Maria Deise das Dores Costa Duarte², Bruno Oliveira de Veras¹, Giuseppe Gianini Figueirêdo Leite¹, Krystyna Gorch-Lira¹

¹Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Departamento de Biologia Molecular, Laboratório de Biologia de Microrganismos, Cidade Universitária, 58059-900 João Pessoa – PB; *E-mail: rafaela_oa@hotmail.com; ²Instituto Federal de Educação (IFPB), Departamento de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Ciência e Tecnologia, Campus João Pessoa, 58015-435 João Pessoa-PB.

RESUMO

Vários microrganismos podem produzir biossurfactantes e degradar hidrocarbonetos do petróleo. No presente trabalho objetivou-se avaliar a produção de biossurfactantes, degradação do óleo diesel por isolados bacterianos e dinâmica populacional de bactérias introduzidas em ambientes contaminados com óleo diesel em condições laboratoriais (experimento microcosmo). A análise filogenética dos isolados, realizada com base em sequências de RNAr 16S, revelou que os isolados provenientes de água e solo contaminado por petróleo pertenceram aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. A capacidade de produzir biossurfactantes foi analisada através dos testes de emulsificação, hemólise e produção de ramnolipídeos no meio com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A emulsificação do óleo diesel das culturas no meio Bushnell e Haas e caldo nutriente foi observada em quatro isolados, enquanto todos os isolados apresentaram atividade hemolítica e oito produziram ramnolipídeos no meio CTAB. Todos os isolados analisados apresentaram capacidade de degradação do óleo diesel no teste baseado na redução do corante 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP). O crescimento dos isolados mais ativos na produção de biossurfactantes e degradação do óleo diesel, pertencentes à espécie *P. aeruginosa*, foi analisado no microcosmo contendo solo com adição do óleo diesel no período de trinta dias. Houve aumento da densidade dos isolados introduzidos no microcosmo a partir do quinto dia de incubação, indicando que o óleo diesel estimulou o crescimento bacteriano. Os isolados analisados neste estudo exibiram potencial de aplicação em processos de biorremediação.

Palavras-chaves: Biossurfactantes, Bactérias, Óleo diesel, Microcosmo.

INTRODUÇÃO

O petróleo, apesar da grande importância como fonte energética e na indústria, tem sido motivo de grande preocupação mundial tendo em vista que os hidrocarbonetos de petróleo são considerados os contaminantes principais do meio ambiente (PASSOS et al., 2009; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2011; SILVA et al., 2015). Vários microrganismos possuem capacidade enzimática para degradar os hidrocarbonetos provenientes do petróleo e usá-los como fonte de carbono e energia para o crescimento (THAPA; AJAY KUMAR; GHIMIRE, 2012). A via mais conhecida de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo é a que estão envolvidas três principais enzimas que são: alcano hidroxilase (AlkB), rubredoxina (AlkG) e rubredoxina redutase (AlkT) (OLIVEIRA et al., 2012; LUO et al., 2014).

Os biossurfactantes são surfactantes de origem biológica, produzidos por microrganismos, são compostos que consistem em um grupo de moléculas anfipáticas formadas como metabólitos secundários, tem estrutura química diversificada (GUDINÃ et al., 2013), estes compostos reduzem a tensão superficial e tem capacidade emulsificante (HASSAN et al., 2016). Os ramnolipídeos estão entre os biossurfactantes mais estudados, amplamente

produzidos por uma grande diversidade de microrganismos. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* constitui a principal espécie bacteriana produtora de ramnolipídeos (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2007; HENKEL et al., 2012).

A biorremediação é uma das tecnologias mais promissoras para a recuperação de áreas contaminadas pelos derivados do petróleo, especialmente o óleo diesel, pois é uma técnica com maior eficiência na remoção dos contaminantes do que técnicas químicas e físicas, além de ter seu custo relativamente mais baixo (ANDRADE; AUGUSTO; FONTES JARDIM, 2010). Muitas bactérias que são capazes de degradar o óleo normalmente produzem biossurfactantes que permitem a emulsificação de alcanos (PENG et al., 2007; SHAO, 2010; WANG; SHAO, 2013), isso é importante, pois, a ação dos biossurfactantes aumenta a solubilidade e remoção dos contaminantes derivados do petróleo melhorando as taxas de biodegradação do óleo.

OBJETIVO

Neste trabalho buscou-se avaliar o potencial de degradação do óleo diesel e a produção de biossurfactantes por isolados de bactérias, além de avaliar a dinâmica de crescimento de bactérias introduzidas em água do mar e no solo com adição do óleo diesel em condições laboratoriais.

Metodologia

Isolados de bactérias e análise molecular

No presente estudo foram utilizados dez isolados obtidos de amostras de solo do aterro dos resíduos contaminados com o petróleo em Icapuí-CE e de amostras da água da Lagoa de Baixo utilizada no descarte de água contaminada com o petróleo no Pólo Industrial de Guamaré-RN, Brasil.

O DNA genômico dos isolados foi extraído pelo método de Cheng e Jiang, com algumas modificações (CHENG; JIANG, 2006). O DNA extraído foi submetido à amplificação do gene RNAr 16S, essa amplificação foi feita utilizando os primers universais, 27F: 5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G - 3' e 1492R: 5' - ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT - 3'31 e um kit PCR Master Mix (Promega), segundo as recomendações do fabricante. A amplificação ocorreu nas condições de: 94 °C por 5 min., 25 ciclos (94°C por 1 min., 55 °C por 2 min. e 72 °C por 2 min.), extensão final a 72 °C por 10 min. O DNA amplificado obtido da de PCR (1500 pb) foi então purificado utilizando um kit EZ-10 Spin Column DNA Clean up Kit (Bio Basic Inc.), segundo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Genômica e Expressão Gênica (Centro de Ciências Biológicas, UFPE), utilizando o primer 26F: 5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G - 3' e o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências geradas foram submetidas à consulta de similaridade com os dados depositadas no GenBank acessado através do site do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando o programa BLAST - "Basic Local Alignment Search Tools".

Produção de biossurfactantes

Para realização do teste de emulsificação, descrito por Batista et al.(2006) e Gaylarde (2000), os isolados foram encubados nos meios Bushnell e Haas com óleo diesel (BHO) e no meio caldo nutriente com adição de óleo diesel (CNO). O óleo diesel utilizado nas culturas como fonte de carbono foi proveniente da refinaria localizada em Guamaré – RN.

Os isolados foram incubados em BHO e em CNO por 12 dias em temperatura de 30 °C sob agitação de 100 rpm, após o período de incubação foram retirados 2 ml de cada cultura e colocados em tubos de ensaio, então foi adicionado em cada tudo 2ml de óleo diesel, os tubos foram agitados em vortex por 2 min. e deixados em repouso. Após 5 min. e 24 h de repouso foram feitas medições da altura da camada emulsificada e a altura total da coluna líquida. As culturas foram centrifugadas (15 min. a 6000 rpm) e o teste foi realizado com o sobrenadante livre de células para verificar a produção de biossurfactantes extracelulares. O teste com o

sobrenadante foi realizado como foi descrito acima. Os índices de emulsificação E5 (%) e E24 (%) foram calculados para todos os resultados obtidos, dividindo-se a altura da camada emulsificada pela altura total da coluna líquida multiplicado por 100. A razão entre o índice E5 e E24 foi utilizada para calcular a estabilidade da emulsão.

O teste de hemólise utilizado como indicador de produção de biossurfactantes, foi realizado com as linhagens inoculadas em placas de Petri contendo meio completo, e incubadas por 48 h, a 30 °C. Em seguida as bactérias foram inoculadas em meio Ágar Sangue (Difco) com 1000 ml de água destilada esterilizada, e 53 ml de sangue de coelho desfibrinado, e incubadas por 48 h/30 °C. A presença de zonas de hemólise foi indicativa de positividade no teste. O diâmetro de zonas de hemólise foi medido em milímetros.

Produção de ramnolipídeos foi analisada no meio CTAB – azul de metileno (Siegmund, 1991). Os isolados de bactérias incubadas no meio BHO e CNO a 30 °C, por 12 dias sob agitação de 100 rpm foram submetidas a centrifugação, por 15 min. a 6000 rpm em temperatura ambiente, foi retirado 3 µl do sobrenadante e adicionado dentro de poços perfurados no meio CTAB-azul de metileno, a produção de ramnolipídeos foi avaliada através da formação de um halo azul escuro em volta das colônias, considerada indicativo de positividade, após incubação a 30 °C por 21 dias.

Degradação do óleo diesel

O potencial de degradação do óleo diesel foi analisado seguindo Hanson et al. (1993), baseado na redução do corante 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP). As bactérias foram cultivadas em meio mineral de Bushnell e Haas (pH 7), com a adição de 1% de óleo diesel, em placas de 96 poços. Para estes testes, as cepas foram inoculadas em 10 mL de meio completo e incubadas a 30°C sob agitação durante 24 h. Em seguida, as culturas foram centrifugadas (8 000 rpm, 10 min) e as células foram ressuspensas em solução de NaCl a 0,9% para obter um padrão de turbidez de McFarland 3. Os testes foram realizados em placas de microtitulação usando 172 µL de meio Bushnell e Haas, 2 µL de óleo diesel, 6 µL de 2,6-DCPIP 0,05% e 20 µL da suspensão celular colocada em poços em duplicata. As microplacas foram incubadas a 30°C por 72 h. Foram utilizados dois tipos de controles negativos: controle sem inóculo e controle sem óleo diesel. As microplacas foram observadas diariamente, verificando se ocorreu a mudança de cor de azul (2,6 DCPIP oxidado) para incolor (redução de 2,6-DCPIP).

Avaliação do crescimento de bactérias no solo contaminado com óleo diesel no experimento microcosmo

Para avaliar o crescimento de isolados de bactérias ativas na degradação de óleo diesel foi preparado o experimento microcosmo, baseando-se nos trabalhos de Singh (2006). O solo utilizado no experimento foi retirado do Campus I da Universidade Federal da Paraíba (entre as coordenadas de 7° 8' 30,3" S e 34° 50' 44,5" W). O solo foi peneirado através de uma peneira com orifícios de 2 mm, e autoclavado três vezes, por 40 min., em três dias subsequentes. Posteriormente, foi determinada 55% da capacidade de saturação do solo e o déficit de umidade do solo. No experimento foram utilizados 30 Béqueres de 100 ml, contendo 50 g de solo cada, para a realização do experimento foram selecionados dois isolados mais ativos na degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes.

O solo utilizado no experimento foi previamente deixado para secagem em temperatura ambiente por 72 h. Na realização do experimento foi adicionado, ao solo, 1 ml de óleo diesel estéril sem aditivos; 12 ml de água destilada estéril, para atingir 55% da capacidade de saturação do solo e 100 µl de solução de 2% NH₄NO₃. Os componentes foram então homogeneizados com espátula de metal por 5 min. Após a homogeneização foi adicionado 1 ml de solução padronizada de células de bactérias (McFarland 4), essas células foram obtidas a partir do cultivo em meio líquido completo por 24 h à 30 °C, seguida por centrifugação das culturas a 6.000 rpm e suspensão em NaCl 0,9%. Com o intuito de separar os efeitos da perda de hidrocarbonetos resultante da biodegradação foram preparados cinco controles sem a adição de inóculo, sendo adicionado ao solo nesses controles 1 ml de óleo diesel, 12 ml de água destilada

estéril e 100 µl de NH₄NO₃ (2%), então foi realizada a homogeneização por cinco minutos. Os béqueres foram vedados com duas camadas de papel filme e incubados em caixa úmida, no escuro, sob temperatura de 30 °C.

Foram feitas análises da quantificação de bactérias no tempo de 0 dias, 5 dias, 10 dias, 15 dias e 30 dias, essa análise foi realizada utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade no meio completo modificado²⁹, para cada análise foram utilizadas duas amostras do solo. As diluições decimais de cada amostra do solo analisado foram feitas utilizando 5 g do solo e solução salina 0,9% de NaCl. Alíquotas de 0,1 ml das diluições do solo foram adicionadas em uma placa estéril e posteriormente ocorreu a adição do meio completo. Após a incubação das placas por 5 dias na estufa, a 30 °C, foi realizada a contagem de colônias. O número de bactérias foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco.

Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados referentes ao experimento de microcosmo foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95%, realizado através do programa GraphPad Prism na sua versão 7, os dados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de biossurfactantes e degradação do óleo diesel por isolados de bactérias

O alinhamento das sequencias parciais dos isolados analisados e das sequencias depositadas no banco NCBI (National Center for Biotechnology Information), pela ferramenta BLAST – “Basic Local Alignment Search Tools” revelou que cinco isolados pertenceram ao gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. endophyticus*, *B. aerius*, *B. cereus*, com 98-100% de similaridade do gene RNAr 16S) e cinco isolados ao gênero *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* e *P. putida* com 99% de similaridade do gene RNAr 16S) (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos isolados de bactérias com base nas análises do BLAST das sequencias do RNAr 16S.

Isolados	Alinhamento mais significativo	Código de acesso -NCBI	E-value	Identidade máxima (%)
AG8	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_113265.1	0,0	99
AG10	<i>Bacillus endophyticus</i>	NR_025122.1	0,0	99
AG11	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	0,0	100
P1R13	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1	0,0	98
P3R30	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_112686.1	0,0	99
P1R14; P1R16; P1R21; P1R42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_074828.1 NR_117678.1 NR_114471.1	0,0	99
AG13	<i>Pseudomonas putida</i>	NR_074739.1	0,0	99

Todos os isolados apresentaram crescimento em meio de Bushnell e Haas com óleo diesel (BHO) e também em meio caldo nutriente com óleo diesel (CNO). Em meio BHO com culturas de bactérias a capacidade de emulsificação após 24 h (E24) foi observada em 30% dos

isolados e com o sobrenadante livre de células em 40% dos isolados. A estabilidade de emulsão no meio BHO variou de 0,5 a 0,9 (Tabela 2). No meio CNO com as culturas de bactérias e o sobrenadante livre de células a capacidade de emulsificação após 24 horas (E24) foi observada em 40% e 20% dos isolados, respectivamente. A estabilidade de emulsão no meio CNO variou de 0,6 a 1,0 (Tabela 2).

No teste de hemólise todos os isolados bacterianos apresentaram halo hemolítico que variou em diâmetro de 13,5 mm a 37,5 (Tabela 2). Este teste é amplamente utilizado para rastrear os isolados envolvidos na produção de biossurfactantes (THAVASI et al., 2013; SHAVANDI et al., 2011). Todos os isolados testados nesse trabalho foram positivos em relação ao teste de hemólise, indicando a produção de dois tipos de biossurfactantes que são: surfactina ou ramnolipídeos (YOUSSEF et al., 2004; THAVASI et al., 2013).

Nos testes de hemólise podem ocorrer resultados falso positivos, devido ao fato de que outros fatores como a produção de hemolisinas pelos microrganismos ou fatores de virulência podem lisar as células sanguíneas interferindo assim nos resultados (YOUSSEF et al., 2004; LEITE et al., 2016), ainda assim Carrillo et al. (1996) afirmam haver associação entre atividade hemolítica e a produção de biossurfactantes e recomendaram o uso do teste de hemólise como um método primário para rastrear a produção destes compostos.

Tabela 2. Emulsificação do óleo diesel, produção de ramnolipídeos, hemólise e degradação do óleo diesel.

Isolado	Emulsificação do óleo diesel				Meio CTAB-AM ^c	Hemólise (mm)	Degradação do óleo diesel ^d
	Cultura/ Sobrenadante livre de células						
	Meio BHO ^a		Meio CNO ^b				
	E24 (%) ^e	S ^f	E24 (%)	S			
<i>Bacillus</i>							
AG8	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	-	19.0	-
AG10	32.0/32.0	0.5/0.5	46.0/33.3	1.0/0.9	+	13.5	+ (48 h)
AG11	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	-	21.0	+ (48 h)
PIR13	0.0/0.0	0.0/0.0	34.0/0.0	0.7/0.0	-	37.5	+ (48 h)
P3R30	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	+	28.0	+ (48 h)
<i>Pseudomonas</i>							
AG13	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	+	15.0	-
PIR14	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0	+	27.5	+ (48 h)
PIR16	52.0/45.0	0.9/0.8	0.0/0.0	0.0/0.0	+	18.0	+ (48 h)
PIR21	60.0/48.3	0.8/0.6	51.0/41.0	0.6/0.5	+	20.0	+ (24 h)
PIR42	46.6/50.0	0.9/0.9	50.0/0.0	0.6/0.0	+	15.0	+ (48 h)

^a BHO: Meio de Bushnell and Haas contendo 1% de óleo diesel e 1% de extrato de levedura.

^b CNO: Caldo nutriente contendo 1% de óleo de diesel.

^c Produção de ramnolipídeos no meio agar CTAB-azul de metileno (formação de halo azul)

^d Tempo de incubação necessário para redução do 2,6-DCPIP indicado em parêntese.

^e E24 (%): Índice de emulsificação.

^f S: Estabilidade de emulsão.

A produção de biossurfactantes por isolados bacterianos é muito importante devido ao grande potencial que essas substâncias apresentam em processos de biorremediação, já que podem atuar facilitando a biodegradação e aumentando a biodisponibilidade de hidrocarbonetos do petróleo (MNIF et al., 2011). A produção de ramnolipídeos tem sido investigada principalmente em espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (WIGNESWARAN et al., 2016).

Dos isolados testados quanto à produção de ramnolipídeos sete (70%) formaram halo azul em volta da colônia, indicativo de positividade para a produção de biosurfactantes (Tabela 2). A formação de halo azulado em volta da colônia ocorre pela formação de um par iônico insolúvel na presença de CTAB, azul de metileno e um biosurfactante aniônico (SIEGMUND, 1991).

O teste para produção de ramnolipídeos em meio CTAB-azul de metileno revelou que grande parte dos isolados testados foram positivos. Outros trabalhos como os de Walter, Syldatk e Hausmann (2010), Kumar et al. (2012) e Plociniczak et al. (2014) também fizeram uso deste teste para rastreamento de linhagens produtoras de biosurfactantes e especialmente de ramnolipídeos. Sarafin et al. (2014) detectaram ramnolipídeos produzidos por espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* utilizando o método CTAB-azul de metileno.

Crescimento de bactérias introduzidas no solo com óleo diesel (Microcosmo)

O microcosmo com solo contaminado com óleo diesel foi realizado com dois isolados de *P. aeruginosa* (P1R16 e P1R42), utilizados separadamente.

Os resultados mostram que a densidade do isolado P1R16 no solo atingiu valores máximos após 5 e 10 dias de experimento, e do isolado P1R42 após 5 dias (Tabela 3, Figura 1). Após 15 dias de incubação, porém, as contagens de todos os isolados apresentaram um leve decréscimo que se acentuou no tempo de 30 dias. De acordo com o teste de Kruskal-Wallis as diferenças nas densidades ao longo do experimento foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para ambas linhagens testadas. No experimento de microcosmo realizado por Asadirad et al. (2016), as linhagens bacterianas após o período de 30 dias de incubação no solo contaminado com petróleo apresentaram morte celular.

Bento et al. (2005) demonstram que a maior taxa de degradação de óleo diesel, em experimento microcosmo no solo contaminado, é observada nas primeiras semanas, pois, após esse período a maior parte dos hidrocarbonetos já foram degradados, portanto, a diminuição de disponibilidade de nutrientes pode limitar o crescimento microbiano, é possível também que a os produtos intermediários tóxicos formados na degradação de hidrocarbonetos possa inibir a o crescimento e ação de microrganismos (BENTO et al., 2005).

Tabela 3. Contagens de bactérias (UFC/g de solo seco) dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidos no solo com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.

Isolados	Dias de incubação				
	0	5	10	15	30
P1R16 A*					
Média	$0,48 \times 10^6$	$22,5 \times 10^6$	$20,7 \times 10^6$	$19,9 \times 10^6$	$12,2 \times 10^6$
D. P.**	$0,06 \times 10^6$	$9,29 \times 10^6$	$8,03 \times 10^6$	$2,94 \times 10^6$	$4,43 \times 10^6$
P1R16 B					
Média	$0,21 \times 10^6$	$14,6 \times 10^6$	$35,1 \times 10^6$	$25,8 \times 10^6$	$14,0 \times 10^6$
D. P.	$0,03 \times 10^6$	$4,36 \times 10^6$	$1,06 \times 10^6$	$3,09 \times 10^6$	$2,56 \times 10^6$
P1R42 A					
Média	$0,94 \times 10^6$	$19,0 \times 10^6$	$17,2 \times 10^6$	$12,5 \times 10^6$	$12,0 \times 10^6$
D.P.	$0,06 \times 10^6$	$3,14 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6$	$3,64 \times 10^6$	$1,24 \times 10^6$
P1R42 B					
Média	$0,14 \times 10^6$	$11,5 \times 10^6$	$13,1 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$
D.P.	$0,38 \times 10^6$	$2,03 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$	$3,64 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$

* O experimento foi conduzido em duplicata (A e B); **D.P. - Desvio Padrão.

A adição de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 como fontes de nitrogênio e fósforo pode estimular o crescimento de bactérias que precisam de macro nutrientes para garantir a degradação efetiva do

óleo (ATLAS, 1995). Millioli et al. (2008) constata que o nitrogênio em forma de NH_4 ou NH_3 é facilmente assimilado pelos microrganismos, estimulando a biodegradação dos contaminantes.

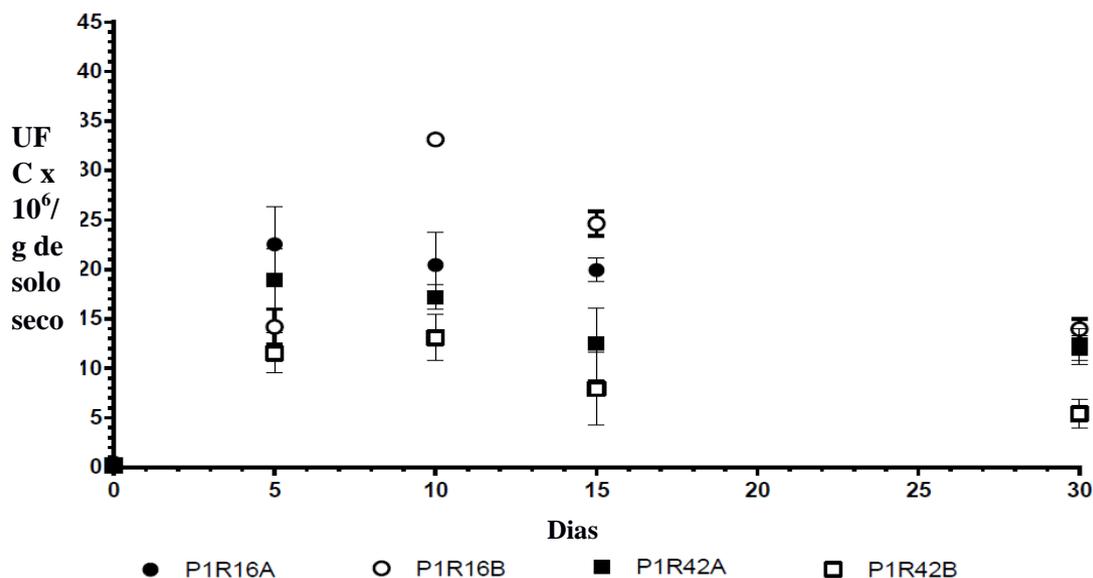


Figura 1. Contagens de bactérias dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidos no solo com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.

Lin et al. (2011) verificou que embora o nitrogênio seja sugerido como o principal nutriente inorgânico limitante na biorremediação do solo a taxa de degradação de petróleo aumenta substancialmente com o aumento da concentração de fósforo (P) no solo.

Nesse trabalho buscou-se encontrar isolados capazes de utilizar o óleo diesel como fonte de carbono e que podem oferecer potencial de utilização em processos de biorremediação de ambientes contaminados com óleo diesel. Em ambientes contaminados pelos hidrocarbonetos do petróleo o êxito no processo de biorremediação além de depender de fatores ambientais e da composição do contaminante, depende também da disponibilidade de microrganismos adequados (JARAMILLO; PABA; OSPINO, 2010).

CONCLUSÃO

Os isolados analisados nesse estudo foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, a maioria dos isolados bacterianos apresentaram capacidade de emulsificação do óleo diesel e produção de biossurfactantes. O experimento microcosmo do solo com adição de 1% de óleo diesel revelaram que a densidade máxima dos isolados bacterianos de *P. aeruginosa* P1R16 e P1R42 foi atingida após 5 dias do experimento. Os isolados *P. aeruginosa* P1R16 e P1R42 analisados neste estudo são promissores para uso em processo de biorremediação, sendo necessária a realização de pesquisas mais detalhadas utilizando os consórcios microbianos e otimização de condições nutricionais e físico-químicas de microcosmo.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; FONTES JARDIM, I. C. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, v. 35, p. 17-43, 2010.
- ASADIRAD, M. H. A., MAZAHARI ASSADI, M., RASHEDI, H.; NEJADSATTARI, T., Effects of indigenous microbial consortium in crude oil degradation: a microcosm experiment. *International Journal of Environmental Research*, 10, 491-8, 2016.
- ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 317-27, 1995.

ATLAS, R. M., AND HAZEN, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. History. **Environmental Science & Technology**, 45, 6709–6715, 2011.

BATISTA, S. B., MOUNTEER, A. H., AMORIM F. R., TOTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, 97, 868-75, 2005.

BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C., FRANKENBERGER, W. T., Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, 96, 1049-55, 2005.

BUSHNELL, L.D., HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, 41, 653–673, 1941.

CARRILLO, P. G., MARDARAZ, C., PITTA-ALVAREZ, S. I., GIULIETTI, A. M., 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 12, 82-4.

CHENG, H. R., JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters**, 28, 55-9, 2006.

GAYLARDE, C. C. Seleção de microrganismos produtores de surfactantes e avaliação da base fisiológica da produção. in: Silva, C. M. M. S.; Roque, M. R.; Melo, I. S. Microbiologia ambiental: Manual de laboratório. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 98p., 2000.

GUDIÑA, E. J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, 2013.

HANSON, K.G., DESAI, J.D., DESAI, A.J., A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnol. Tech.**, 7, 745, 1993.

HASSAN, M., ESSAM, T., YASSIN, A. S., SALAMA, A. Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using plackett–burman design. **International Journal of Biological Macromolecules**, 82, 573-9, 2016.

HENKEL, M., MULLER, M. M., KUGLER, J. H., LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J., SYLDAK, C., HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, 47, 1207-19, 2012.

JARAMILLO, G. E. E.; PABA, G. M.; OSPINO, M. C. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. **Nova: Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**, v. 8, n. 13, p. 1-120, 2010.

KUMAR, C. G.; MAMIDYALA, S. K.; SUJITHA, P.; MULUKA, H.; AKKENAPALLY, S. Evaluation of critical nutritional parameters and their significance in the production of rhamnolipid biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 6, p. 1507-16, 2012.

LEITE, G. G., FIGUEIRÔA, J. V., ALMEIDA, T. C., VALÕES, J. L., MARQUES, W. F., DUARTE, M. D., GORLACH-LIRA, K. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. **Biotechnology Progress** 32, 262-70, 2016.

LIN, T. C., PAN, P. T., YOUNG, C. C., CHANG, J. S., CHANG, T. C., CHENG, S. S. Evaluation of the optimal strategy for *ex situ* bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, 18, 1487-96, 2011.

LUO, C., LIU, X., ZHOU, H., WANG, X., CHEN, Z. Identification of four nrps gene clusters in *Bacillus subtilis* 916 for four families of lipopeptides biosynthesis and evaluation of their intricate functions to the typical phenotypic features. **Applied and Environmental Microbiology**, 81, 422-31, 2014.

MILLIOLI, V. S., SOBRAL, L. G. S., SÉRVULO, E. F. C., CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfatantes. **Série Tecnologia Ambiental**, 50, 1-95, 2008.

MNIF, S.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; SAYADI, S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 525-36, 2011.

- NITSCHKE, M., COSTA, S. G., CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: na update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, 21, 1593-600, 2007.
- OLIVEIRA, P. F. L., VASCONCELLOS, S. P., ANGOLINI, C. F. F., CRUZ, G. F., MARSAIOLI, A. J., SANTOS NETO, E. V., OLIVEIRA, V. M. Taxonomic diversity and biodegradation potential of bacteria isolated from oil reservoirs of an offshore southern brazilian basin. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, 3, 1-14, 2012.
- PASSOS, C. T., BURKERT, J. F. M., KALIL, S. J., BURKERT, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do brasil. *Química Nova* 32, 950-4, 2009.
- PENG F., LIU, Z., WANG, L., SHAO Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3c-9 and its biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, 102, 1603-11, 2007.
- PLOCINICZAK, M., KUKLA, M., WĄTROBA, R., PIOTROWSKA-SEGET, Z., Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, 9385-95, 2014.
- SARAFIN, Y., DONIO, M.B., VELMURUGAN, S., MICHAELBABU, M., CITARASU, T. *Kocuria marina* Bs-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 21, 511-9, 2014.
- SHAO, Z. **Trehalolipids**. In: Biosurfactant: from genes to application. Ed. Soberon-Chavez G., Berlin: Springer, 121-44, 2010.
- SHAVANDI, M., MOHEBALI, G., HADDADI, A., SHAKARAMI, H., NUHI, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**, 82, 477-82, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.005>
- SIEGMUND, I., WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5, 265-8, 1991.
- SILVA, D. S. P., CAVALCANTI, D. L., MELO, E. J. V., SANTOS, P. N. F., LUZ, E. L. P., GUSMAO, N. B., SOUSA, M. F. V. Q. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 97, 85-9, 2015.
- SINGH, H. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. John Wiley & Sons, Hoboken, 2006.
- THAPA, B., AJAY KUMAR, K. C., GHIMIRE, A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Journal of Science Engineering and Technology**, 8, 164-70, 2012.
- THAVASI, R., SHARMA, S., JAYALAKSHMI, S. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, 2011. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7463.S1-001>.
- TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 231-41, 2011.
- WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 1-13, 2010.
- WANG, X. B., NIE, Y., TANG, Y. Q., WU, G., WU, X, L. N-Alkane chain length alters *Dietzia* sp. strain DQ12-45-1B biosurfactant production and cell surface activity. **Applied and Environmental Microbiology**, 79, 400-2, 2013.
- WIGNESWARAN, V.; NIELSEN, K. F.; STERNBERG, C.; JENSEN, P. R.; FOLKESSON, A.; JELSBÄK, L. Biofilm as a production platform for heterologous production of rhamnolipids by the non-pathogenic strain *Pseudomonas putida* KT2440. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 181, p. 1-13, 2016.
- YOUSSEF, N. H., DUNCAN, K. E., NAGLE, D. P., SAVAGE, K. N. K., NAPP, R. M., MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, 56, 339-47, 2004.

