



RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

METAGENÔMICA DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS PARA
BIORREMEDIAÇÃO DE RESÍDUOS DE PERFURAÇÃO

ALAINE DE BRITO GUERRA

NATAL - RN

FEVEREIRO DE 2018

ALAINE DE BRITO GUERRA

METAGENÔMICA DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS PARA
BIORREMEDIÇÃO DE RESÍDUOS DE PERFURAÇÃO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO,
como um dos pré-requisitos necessários à obtenção
do título de Doutor.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientadora: Lucymara Fassarella Agnez Lima

NATAL - RN

FEVEREIRO DE 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo
Nelson - -Centro de Biociências – CB

Guerra, Alaine de Brito.

Metagenômica de consórcios microbianos para biorremediação de
resíduos de perfuração / Alaine de Brito Guerra. - Natal, 2018.
99 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Orientadora: Profa. Dra. Lucymara Fassarella Agnez-Lima.

1. Resíduo de perfuração - Tese. 2. Consórcio microbiano - Tese. 3.
Biodegradação - Tese. I. Agnez-Lima, Lucymara Fassarella. II.
Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 628.54

ALAINE DE BRITO GUERRA

METAGENÔMICA DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS PARA
BIORREMEDIAÇÃO DE RESÍDUOS DE PERFURAÇÃO

Tese apresentada a Rede Nordeste em Biotecnologia (RENORBIO) para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2018, por:

Prof.^a Dra. Lucymara Fassarela Agnez Lima
Presidente
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Prof.^a Dra. Valéria Maia de Oliveira
Examinadora Externa
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof.^a Dra. Marilene Henning Vainstein
Examinadora Externa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof.^a Dra. Katia Castanho Scortecchi
Examinadora Interna
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Prof.^o Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Examinador Interno
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

DEDICATÓRIA

A Deus e Nossa Senhora por iluminar e cuidar da minha vida e à minha família, especialmente meus pais, meu esposo, minha sobrinha e meus irmãos pelo apoio, amor e cuidado.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa senhora pela presença constante na minha vida, sempre cuidando e guiando meus caminhos, não me deixando desistir ou desanimar.

Aos meus pais, Mauricio e Bernadete, meus irmãos Aline e Thiago, por todo amor, cuidado e compreensão em todos os momentos.

A meu esposo Sergio, por todo amor, compreensão, companheirismo, paciência e apoio incondicional.

À minha sobrinha e afilhada Alice, por iluminar minha vida com tanta paz, amor e alegria.

À minha orientadora, professora Lucymara, pela excelente orientação, oportunidades oferecidas, discussões construtivas e inúmeros ensinamentos.

A CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

A Brasil Química e Mineração Industrial Ltda (BQMIL) pela parceria, apoio e incentivo para a realização desta pesquisa.

Ao Centro de Tecnologias do Gás e Energias Renováveis (CTGAS) pela colaboração na realização das análises.

A toda equipe do Projeto Ciências do Mar, em especial a Professora Marilene, pela troca de experiência e apoio na realização das análises.

A UFRN pela oportunidade de realização do ensino superior de qualidade.

A todos os professores e funcionários que compõe a Rede Nordeste em Biotecnologia (Natal) por todos ensinamentos e disponibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), especialmente do grupo metagenômica por todo apoio e ensinamentos.

Aos membros da banca pelo aceite em compor a banca de defesa da Tese e por todas contribuições.

RESUMO

Resíduos de perfuração de poços de petróleo caracterizam-se como resíduos sem tratamento adequado, que acumulado gera um passivo ambiental de grandes proporções. Assim, conhecimentos da comunidade microbiana do resíduo de perfuração podem ser úteis no desenvolvimento de estratégias de biorremediação. O presente trabalho teve como objetivo identificar microrganismos do resíduo de perfuração de poços de petróleo por abordagem metagenômica e obter consórcios bacterianos/bactérias isoladas que tenham atividade de biodegradação de hidrocarbonetos e/ou produção de biossurfactantes, visando aplicação em estratégias de biorremediação. O DNA total foi extraído diretamente das amostras de resíduos de perfuração e dos consórcios obtidos (enriquecidos em diferentes meios), e sequenciados usando a plataforma Ion Torrent. Bactérias isoladas dos consórcios foram identificadas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, pelo método Sanger. Análises taxonômicas revelaram mudanças em nível de filo e, conseqüentemente, gênero entre as amostras. Enquanto no resíduo de perfuração predominou o gênero *Halomonas*, pertencente ao filo Proteobacteria, nos consórcios, maiores abundâncias foram observadas para gêneros *Paenibacillus* e *Brevibacillus*, ambos do filo Firmicutes. A análise funcional utilizando banco de dados específico para a biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes (BioSurfDB), revelou que a seleção não apenas manteve vias relacionadas a biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes como favoreceu significativamente algumas. Crescimento na presença de petróleo, ensaio qualitativo de biodegradação utilizando o indicador DCPIP, adesão microbiana a hidrocarbonetos, testes de emulsificação, teste de dispersão do óleo e tensão interfacial indicaram capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes pelos consórcios. Ao retornar do resíduo ao qual foram obtidos, os consórcios selecionados em meio *Lysogeny broth* (LB) e *Yeast peptone dextrose* (YPD) foram capazes de biodegradar 66 e 30% de alcanos, respectivamente. Assim, diferenças na composição dos microrganismos, provavelmente devido à etapa de enriquecimento em diferentes meios, refletiram diferentes capacidades metabólicas. O meio LB parece ter selecionado a comunidade microbiana mais adequada à remoção de alcanos no resíduo de perfuração. Sequências de rRNA 16S obtidas de cepas isoladas apresentaram elevada identidade com representantes dos gêneros *Brevibacillus*, *Micrococcus* e *Bacillus*. A metagenômica demonstrou ser uma ferramenta valiosa na análise das comunidades microbianas e na escolha da estratégia de biorremediação. A bioaugmentação autóctone pode ser uma alternativa eficiente na biodegradação hidrocarbonetos. O método de enriquecimento através de diferentes meios pode afetar a composição da comunidade microbiana e a degradação.

Palavras – chave: Resíduo de perfuração. Consórcio microbiano. Metagenoma. Biodegradação. Biossurfactantes.

ABSTRACT

Drill cutting is characterized as a waste without adequate treatment, which has been accumulated generating an environmental liability of large proportions. Thus, knowledge of the microbial community and its functions in the drilling cutting can be useful for the development of bioremediation strategies. The present work aimed to identify microorganisms from drill cutting by metagenomic approach and obtain bacterial consortia and isolated bacteria that have hydrocarbon biodegradation activity and/or biosurfactant production, for further application in strategies of bioremediation. Total DNA was directly extracted from the drill cutting samples and from two consortia (enriched in different culture media) and sequenced using the Ion Torrent PGM platform. Isolated bacteria from the consortia were identified by 16S partial gene rRNA sequencing by the Sanger method. Taxonomic analysis revealed changes at the phylum level and consequently genera among samples. While in the drilling cutting predominated phylum Proteobacteria and genus *Halomonas*, in the consortia greater abundance were observed for the phylum Firmicutes and genera *Paenibacillus* and *Brevibacillus*. Functional analysis using a specific database for hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production (BioSurfDB), revealed that the selection not only maintained routes related to hydrocarbon degradation and biosurfactant production, but also favored some them. Growth curve in the presence of petroleum, qualitative biodegradation test using the DCPIP indicator, microbial adhesion to hydrocarbons assay, emulsification tests, oil spreading Method and interfacial tension indicated capacity of hydrocarbon biodegradation and production of biosurfactants by the consortia and isolated. Returning to the residue to which they were obtained, the consortia selected in *Lysogeny broth* (LB) e *Yeast peptone dextrose* (YPD) medium were able to degrade 66 and 30% of n-alkanes, respectively. So, differences in the composition of microorganisms, probably due to the enrichment stage in different media, reflected different metabolic capacities. LB medium has selected microbial community more adequate to the removal of alkanes in the drill cutting. The 16S rRNA sequences obtained from isolated strains presented high identity with representatives of the genera *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus*. Metagenomics was shown as a powerful tool in the analysis of microbial communities and the choice of bioremediation strategy. Autochthonous bioaugmentation can be an efficient alternative in hydrocarbon biodegradation. Method of enrichment through different medium can affect the composition of the microbial community and degradation ability.

Keywords: Drill cuttings. Microbial consortium. Metagenome. Biodegradation. Biosurfactants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre diferentes tipos de tratamento e seus respectivos custos (dólar) por m ³ de solo. Fonte: EPA modificado por (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).....	21
Figura 2: Esquema com algumas das tecnologias de biorremediação <i>ex situ</i> e <i>in situ</i> . Fonte: (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016) com modificações.	22
Figura 3: Via de degradação aeróbica de alcanos por oxidação terminal e subterminal. Fonte: Fritsche e Hofrichter, (2008) modificado por Cruz e Marsaioli, 2012.....	25
Figura 4: Oxidação de alcanos através da ALKB (a) e citocromo P450 (b). Fonte: Rojo, 2010.	26
Figura 5: Esquema mostrando as etapas principais da degradação de hidrocarbonetos aromáticos sob condições aeróbicas. Fonte: Fritsche e Hofrichter (2008) modificado por Cruz e Marsaioli, 2012.	28
Figura 6: Mecanismos de remoção de hidrocarbonetos por biossurfactantes, em função da massa molecular e concentração micelar crítica (CMC). Fonte: Pacwa-Płociniczak et al., (2011).....	30
Figura 7: Mapa de localização do município de Mossoró onde encontra-se acumulado o resíduo de perfuração.....	37
Figura 8: Fluxograma das etapas metodológicas desenvolvidas ao longo da pesquisa..	38
Figura 9: Crescimento do consórcio L e Y em meio BH na presença de petróleo (+Pet) e controle com meio e petróleo. Meio de cultura turvo indica crescimento, enquanto a redução visual do petróleo e solubilização no meio com os consórcios são indicativos de degradação.	47
Figura 10: Crescimento do consórcio L em meio ASW na presença (+Pet) e ausência (Pet) do petróleo. Meio de cultura turvo (consórcio L+ ASW + Pet) indica crescimento e meio transparente (Consórcio L +ASW – Pet) ausência de crescimento.	47
Figura 11: Efeito da presença de petróleo no crescimento dos consórcios L (a, c) e Y (b). Controle positivo: meio de cultura com os consórcios e sem adição de petróleo. Controle negativo (CTRL): meio de cultura com petróleo e sem adição dos consórcios.	48
Figura 12: Aspecto visual do teste colorimétrico 2,6 – DCPIP. Na ausência de fonte de carbono (consórcio + meio) não há oxidação e a coloração inicial azul permanece. Na presença de fonte de carbono (consórcio + petróleo ou glicose) a oxidação ocorre e é sinalizada pela mudança na coloração.	49
Figura 13: Índice de emulsificação dos consórcios L e Y com hexano, hexadecano, diesel, querosene, tolueno, petróleo, tolueno, xileno, tolueno + xileno, SDS 10% foi utilizado como controle positivo e meio de cultura BH como controle negativo.	50
Figura 14: Teste de dispersão do óleo com sobrenadante obtido após crescimento dos consórcios L e Y. Controle positivo com SDS (10%) e negativo com água. Seta em vermelho representa o deslocamento de óleo formado pela atividade dos surfactantes.	51

Figura 15: Tensão interfacial (N/m ²) ao longo do tempo (10 ⁻³ s) do sobrenadante obtido após crescimento dos consórcios L e Y. Controle negativo consiste no meio de cultura com petróleo e positivo com SDS (0,02%). Em (a) Consórcios L e Y e o Controle negativo (meio BH com petróleo sem os consórcios). Em (b) consórcios L e Y, controle negativo e controle positivo com SDS a 0,02%.	52
Figura 16: Perfil taxonômico comparativo referente a Filos do metagenoma do resíduo de perfuração de poços de petróleo (RP) e consórcio L e Y. Diferenças biológicas significativas calculadas a partir do STAMP (q < 0,05, diferenças entre as proporções mínima de 1%).	54
Figura 17: Diagrama de Venn demonstrando o compartilhamento gêneros entre os metagenomas do resíduo de perfuração (RP), consórcio L e Y.	54
Figura 18: Perfil taxonômico comparativo referente a gêneros do metagenoma do resíduo de perfuração de poços de petróleo (RP) e consórcio L e Y. Diferenças biológicas significativas calculadas a partir do STAMP (q < 0,05, diferenças entre as proporções mínima de 1%)......	56
Figura 19: Perfis funcionais para metabolismo (KEGG) no resíduo de perfuração (RP) e consórcios L e Y, obtidos pelo MEGAN. Valores em proporções de sequências (%). .	57
Figura 20: Perfis funcionais para metabolismo energético para resíduo de perfuração (RP) e consórcios L e Y, obtidos pelo MEGAN. Valores em proporções de sequências (%).	58
Figura 21: Perfil funcional comparativo de vias relacionadas a degradação do resíduo de perfuração de poços de petróleo (RP), consórcio L e Y. Diferenças biológicas significantes calculadas a partir do STAMP (q < 0,05, diferenças entre as proporções mínima de 1%).	60
Figura 22: Perfil funcional comparativo de vias relacionadas a biossíntese de surfactantes do resíduo de perfuração de poços de petróleo (RP), consórcio L e Y, Diferenças biológicas significantes calculadas a partir do STAMP (q < 0,05, diferenças entre as proporções mínima de 1%).	64
Figura 23: Produção acumulada de C-CO ₂ (mg/kg de solo) ao longo de 77 dias de ensaio para os consórcios L e Y. Experimento controle = contém apenas resíduo de perfuração sem adição de microrganismos. Bioaugmentação L e Y = corresponde ao tratamento com resíduo de perfuração e adição dos consórcios L e Y, respectivamente.	65
Figura 24: Percentual de degradação de alcanos totais no resíduo de perfuração após 77 dias de experimento. Experimento controle = contém apenas resíduo de perfuração sem adição de microrganismos. Bioaugmentação L e Y = corresponde ao tratamento com resíduo de perfuração e adição dos consórcios L e Y, respectivamente.....	66
Figura 25: Percentual de degradação das frações de alcanos (C ₁₄ -C ₃₁) utilizando a estratégia de bioaugmentação para o consórcio L após 77 dias de experimento.	66
Figura 26: Percentual de degradação das frações de alcanos (C ₂₅ , C ₂₈ , C ₂₉ , C ₃₀ , C ₃₂) utilizando a estratégia de bioaugmentação para o consórcio Y após 77 dias de experimento.	67
Figura 27: Cladograma resultante do alinhamento da região rDNA 16S mostrando os agrupamentos formados pelos isolados 16.1, 16.3, A2, A3, R12, J5, A4 e os	

microrganismos relacionados. O Cladograma foi construído utilizando o método Neighbour-Joining. Valor do <i>Bootstrap</i> de 1000 réplicas.....	70
Figura 28: Crescimento do isolado 16.1 e 16.3 (DO600) em meio BH + 0,1% de extrato de levedura com e sem petróleo.	71
Figura 29: Crescimento do isolado 16.1 (DO600) e índice de emulsificação (IE) em meio BH + 0,1% de extrato de levedura com e sem petróleo.	72
Figura 30: Hidrofobicidade celular do isolado 16.1 em relação ao hexadecano, diesel, querosene, xileno e tolueno através do método da aderência microbiana a hidrocarbonetos (BATH) após 48 horas de crescimento em meio BH com 0,1% de extrato de levedura e 1% de petróleo.....	73
Figura 31: Hidrofobicidade celular do isolado 16.3 em relação ao hexadecano, diesel, querosene, xileno e tolueno através do método da aderência microbiana a hidrocarbonetos (BATH) após 48 horas de crescimento em meio BH com 0,1% de extrato de levedura e 1% de petróleo.....	73
Figura 32: Teste de dispersão do óleo com sobrenadante obtido após crescimento dos consórcios isolados 16.1 e 16.3.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas do resíduo de perfuração de poços de petróleo.	46
Tabela 2: Análise de degradação de hidrocarbonetos por consórcio microbiano L e Y usando o teste 2,6 – DCPIP.	49
Tabela 3: Distribuição dos domínios no resíduo de perfuração, consórcio L e Y.....	53
Tabela 4: Abundância relativa (%) dos 10 gêneros mais abundantes nas amostras.....	55
Tabela 5: Lista de abundância relativa das vias de degradação para as três amostras (resíduo de perfuração, consórcio L e Y), BioSurfDB.	59
Tabela 6: Principais enzimas das vias cloro-alcanos e cloro-alcenos e microrganismos candidatos correspondentes para os consórcios L e Y, utilizando o banco de dados do KEGG do IMG.	61
Tabela 7: Enzimas envolvidas na degradação de alcanos e número de <i>reads</i> correspondentes nos metagenomas do resíduo de perfuração e consórcios L e Y, de acordo com o BioSurfDB.	61
Tabela 8: Enzimas envolvidas na degradação de metano e número de <i>reads</i> correspondentes nos metagenomas do resíduo de perfuração e consórcios L e Y, de acordo com o BioSurfDB.	62
Tabela 9: Enzimas envolvidas na degradação de envolvidas na degradação de <i>p</i> -xileno, de <i>o</i> -xileno, <i>m</i> -xileno nos metagenomas do resíduo de perfuração e consórcios L e Y, de acordo com o BioSurfDB.	62
Tabela 10: Resultados do alinhamento do gene rDNA 16S dos isolados utilizando o banco de dados do EzTaxon.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH: Bushnell- Haas

LB: Lysogeny Broth

YPD: Yeast Peptone Dextrose

ASW: Artificial seawater

HPAS: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Alk: Alcano hidroxilases

TTC: Cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio

PGM: Personal Genome Machine

DCPIP: 2,6-diclorofenol-indofenol

CMC: Concentração micelar crítica

HTP: Hidrocarbonetos totais do petróleo

STAMP: Statistical Analyses of Metagenomic Profiles

MEGAN: Metagenome Analyzer

BioSurfDB: Biosurfactants and Biodegradation Database

RP: Resíduo de perfuração

EMPARN: Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande no Norte

IE: Índice de emulsificação

SDS: Sulfato de dodecil sódico

MATH: Medida de adesão a hidrocarbonetos

SUMÁRIO

1	Introdução.....	15
2	Objetivos	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	Revisão da Literatura	18
3.1	Resíduo de perfuração	18
3.1.1	Tecnologias de tratamento.....	19
3.1.1.1	Biorremediação	20
3.2	Degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo.....	23
3.2.1	Degradação de hidrocarbonetos alifáticos	23
3.2.2	Degradação de hidrocarbonetos aromáticos	27
3.2.3	Biossurfactantes na degradação.....	29
3.3	Fatores que influenciam a degradação microbiana.....	32
3.3.1	Temperatura.....	32
3.3.2	Tipos de solo.....	32
3.3.3	Nutrientes	32
3.3.4	Salinidade	32
3.4	Metagenômica.....	33
4	Metodologia	37
4.1	Coleta da Amostra	37
4.2	Obtenção dos consórcios indefinidos e bactérias isoladas.....	39
4.2.1	Obtenção dos consórcios	39
4.2.2	Obtenção de bactérias isoladas	40
4.3	Extração de DNA, quantificação e sequenciamento do metagenoma obtido diretamente do resíduo, consórcios e bactérias isoladas.....	40
4.4	Análises computacionais dos metagenomas e bactérias isoladas	41
4.5	Testes funcionais de degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes.....	42
4.5.1	Crescimento em Petróleo.....	42
4.5.2	Teste 2,6 – DCPIP	43
4.5.3	Índice de emulsificação (IE ₂₄).....	43

4.5.4	Espalhamento do óleo.....	43
4.5.5	Hidrofobicidade celular	44
4.5.6	Tensão interfacial	44
4.5.7	Ensaio em microcosmos	45
5	Resultados	46
5.1	Caracterização físico-química do resíduo de perfuração	46
5.2	Avaliação do potencial de degradação de hidrocarbonetos dos consórcios	46
5.2.1	Avaliação do crescimento na presença de petróleo	46
5.2.2	Teste 2,6-DCPIP	48
5.3	Produção de biossurfactantes	50
5.3.1	Índice de emulsificação	50
5.3.2	Teste de dispersão do óleo.....	51
5.3.3	Tensão interfacial	52
5.4	Análises dos metagenomas	53
5.4.1	Análise taxonômica	53
5.4.2	Análise Funcional.....	56
5.4.3	Perfil funcional para metabolismo.....	56
5.4.4	Perfil funcional para degradação de hidrocarbonetos.....	58
5.4.4.1	Enzimas de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.	60
5.5	Síntese de biossurfactantes	63
5.6	Teste em microcosmos.....	64
5.7	Bactérias isoladas.....	67
5.7.1	Análise taxonômica	67
5.7.2	Análise de degradação de hidrocarbonetos	70
5.7.2.1	Crescimento em petróleo.....	70
5.7.3	Produção de biossurfactantes.....	71
5.7.4	Medida de adesão a hidrocarbonetos (BATH)	72
5.7.5	Dispersão do óleo	74
6	Discussão.....	75
7	Conclusão	84
8	REFERÊNCIAS	85
9	Anexos.....	95

1 Introdução

Resíduos de perfuração consistem na mistura de fluido, solo e fragmentos de rochas gerados durante a perfuração de poços de petróleo (LEONARD; STEGEMANN, 2010). Resíduos que apresentam hidrocarbonetos do petróleo, metais pesados e sais em sua composição, são considerados perigosos e rigorosamente regulamentados em alguns países (CHEN et al., 2017).

Estima-se que as atividades de exploração e produção de petróleo e gás *offshore* no Brasil tenham gerado apenas em 2009 cerca de 44.437 toneladas de resíduos sólidos. Dentre estes, os oleosos são os mais abundantes e a destinação final (formas de disposição final ou intermediárias) inclui principalmente as estações de tratamento, rerrefino e coprocessamento (IPEA, 2012).

Os contaminantes diversos e as elevadas quantidades geradas tornam o resíduo de perfuração um grande problema para a Indústria de Petróleo e Gás. Vários métodos físicos, químicos e biológicos têm sido reportados na literatura no seu tratamento (LEONARD; STEGEMANN, 2010; BALL; STEWART; SCHLIEPHAKE, 2012; CHEN et al., 2017; JÚNIOR et al., 2017). Dentre estes, a biorremediação têm sido considerada como uma tecnologia de tratamento promissora, por ser eficiente, ambientalmente sustentável e de baixo custo quando comparada aos processos físicos e químicos convencionais (HOLLIGER et al., 1997; BOOPATHY, 2000; IWAMOTO; NASU, 2001; DZIOŃEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016; LIM; LAU; POH, 2016).

A biorremediação consiste no processo de eliminação de contaminantes através de mecanismos biológicos (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016). No geral, pode ocorrer *in situ* e *ex situ* por técnicas diversas, sendo a maioria dos estudos voltados para atenuação natural, através da bioestimulação e bioaugmentação (SAFDARI et al., 2018; TONGARUN; LUEPROMCHAI; VANGNAI, 2008; YU et al., 2005).

A atenuação natural ocorre quando microrganismos do próprio ambiente atuam naturalmente na degradação de contaminantes. A introdução de nutrientes no ambiente na forma de fertilizantes ou outro fator que favoreça a atividade dos microrganismos do ambiente é chamado de bioestimulação. Quando o ambiente a ser tratado não tem microrganismos apropriados a bioremediação, pode-se optar pela bioaugmentação, que consiste em inocular microrganismos do próprio ambiente (autóctones) ou de outros ambientes (alóctones), com capacidades catalíticas desejadas (IWAMOTO; NASU, 2001;

LIM; LAU; POH, 2016). Alguns autores consideram a bioaumentação autóctone a melhor estratégia por utilizar cepas individuais ou culturas enriquecidas do próprio ambiente a ser biorremediado (BENTO et al., 2005; HOSOKAWA et al., 2009).

Como essas estratégias se baseiam na capacidade metabólica dos microrganismos, seu sucesso depende de estudos que caracterizem a comunidade microbiana e avaliem a sua capacidade de biodegradação e sobrevivência sob determinadas condições ambientais (LOVLEY, 2003; STEFANI et al., 2015).

Apesar do isolamento ser fundamental na caracterização dos microrganismos, apenas uma pequena minoria pode ser cultivada e a maioria das bactérias permanece desconhecida através de métodos de cultivo padrão. Com o desenvolvimento da metagenômica e avanço nas técnicas de sequenciamento do DNA, informações da comunidade microbiana total, incluindo microrganismos não cultiváveis e suas habilidades funcionais, estão sendo obtidas (PUSHPANATHAN et al., 2014). Assim, a metagenômica tornou-se uma poderosa ferramenta em estudos voltados para biorremediação (DEVARAPALLI; KUMAVATH, 2015; DELLAGNEZZE et al., 2014; VASCONCELLOS et al., 2010; YADAV et al., 2015)

Fatores ambientais como temperatura, umidade, pH, matéria orgânica, nutrientes e tipos de solo determinam a eficiência da biorremediação ao afetar o crescimento dos microrganismos. Estes por sua vez, precisam ser adequadamente selecionados quanto à capacidade em biodegradar hidrocarbonetos e sobreviver às condições ambientais. A produção de biossurfactantes também é um importante fator a ser considerado, já que hidrocarbonetos de petróleo são hidrofóbicos e requerem solubilização por surfactantes para aumentar a biodisponibilidade para células microbianas. Assim, microrganismos degradadores de hidrocarbonetos que produzem biossurfactantes provavelmente serão mais adequados a biorremediação (CAMEOTRA; SINGH, 2008).

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo identificar os microrganismos do resíduo de perfuração de poços de petróleo e obter, a partir deste, consórcios bacterianos e bactérias isoladas que tenham atividade de degradação de hidrocarbonetos e/ou produção de biossurfactantes, visando aplicação em estratégias de biorremediação.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar, através da metagenômica, a comunidade microbiana presente no resíduo de perfuração de poços de petróleo no município de Mossoró/RN e obter, a partir deste, consórcios bacterianos e bactérias isoladas que tenham atividade de biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes.

2.2 Objetivos específicos

- Obter consórcios microbianos a partir do resíduo de perfuração de poços de petróleo, relacionados à biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes;
- Analisar a influência de dois meios de cultivo na obtenção dos consórcios microbianos;
- Avaliar se os consórcios selecionados através de métodos de cultivo refletem a comunidade microbiana autóctone da qual foram selecionados;
- Determinar a eficiência da bioaugmentação autóctone, na degradação de alcanos;
- Obter, a partir dos consórcios selecionados, bactérias com capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes;

3 Revisão da Literatura

3.1 Resíduo de perfuração

A perfuração consiste na etapa mais importante da extração do petróleo (CHEN et al., 2017). Durante essa fase, fluidos de perfuração são usados para estabilizar o poço, lubrificar e resfriar a broca e transportar o solo e fragmentos de rochas à superfície do poço. Ao chegar a superfície, essa mistura, denominada de resíduo de perfuração, é submetida a processos de separação para que o fluido seja recuperado e retorne ao poço (LEONARD; STEGEMANN, 2010; THOMAS, 2001).

Após o processo de separação, grande parte do fluido de perfuração permanece aderido ao resíduo, influenciando a composição química, que varia de acordo com o tipo de fluido utilizado e a composição da rocha perfurada. Geralmente inclui hidrocarbonetos, sais solúveis em água e metais pesados (CHEN et al., 2017; NEFF, 2005).

O acúmulo desse tipo de resíduo pode trazer uma série de prejuízos ao meio ambiente, à saúde humana e, sobretudo, ao desenvolvimento sustentável e, como não é possível interromper a cadeia de geração, é preciso avançar no que concerne ao gerenciamento (RIPA et al., 2017).

Uma das melhores formas de gerenciar adequadamente os resíduos contaminados com petróleo é através da reutilização. No Brasil, não há uma legislação específica para esse tipo de resíduo. Assim, uma vez produzido é classificado como outros tipos de resíduo pela Norma Brasileira 10.004/2004, quanto à periculosidade para posteriormente elaborar, planejar e efetivar corretamente o gerenciamento em conformidade com os riscos ambientais à saúde pública e meio ambiente.

Os resíduos sólidos industriais e de origem diversa são classificados quanto à periculosidade, segundo a norma técnica Norma Brasileira 10.004/2004, em classe I, que inclui resíduos perigosos; e classe II para os não perigosos, ou seja, que podem ou não causar danos à saúde e ao ambiente, respectivamente. Os não perigosos são subdivididos em não inertes (classe IIA), e inertes (classe IIB).

Assim, uma vez classificados, esses resíduos podem ser submetidos a diversos métodos químicos, físicos e biológicos para reduzir ou eliminar contaminantes e possibilitar a disposição no meio de forma a minimizar impactos ou garantir a reutilização

como substituto parcial do cimento na fabricação de concreto (MOSTAVI; ASADI; UGOCHUKWU, 2015) e materiais para construção de rodovias (HASSAN et al., 2005; TUNCAN, 2000).

3.1.1 Tecnologias de tratamento

Uso de agentes oxidantes, incineração, coprocessamento, micro-ondas, solidificação, estabilização, aterro e estratégias de biorremediação são alguns métodos utilizados para tratamento e/ou disposição de resíduos de perfuração (BALL; STEWART; SCHLIEPHAKE, 2012; JÚNIOR et al., 2017; LEONARD; STEGEMANN, 2010;; LIM; LAU; POH, 2016). A escolha da técnica mais adequada depende das condições físicas, químicas e biológicas do local contaminado, da concentração do contaminante e do tempo necessário para degradação ou remoção do composto alvo (ALMEIDA ANDRADE; AUGUSTO; FONTES JARDIM, 2010).

O peróxido de hidrogênio, reagente fenton e ozônio são alguns agentes oxidantes utilizados na remoção de hidrocarbonetos. A oxidação é um processo simples e rápido em que o agente oxidante é injetado sem que haja formação de subprodutos após a degradação. Em contrapartida, a necessidade de pH baixo e a emissão de calor durante as reações afetam a biota, tornando o processo desvantajoso (LIM; LAU; POH, 2016).

Tecnologias térmicas são eficazes na remoção de hidrocarbonetos. Resíduos de perfuração com teor de hidrocarbonetos entre 10 e 40% são considerados adequados para esse tratamento (BALL; STEWART; SCHLIEPHAKE, 2012). Coprocessamento e incineração são alguns dos métodos térmicos mais frequentemente utilizados. O coprocessamento consiste no reaproveitamento de resíduos industriais sem valor comercial como substituto parcial da matéria-prima ou como combustível na produção de cimento (ROCHA et al., 2011). Na incineração, o resíduo é submetido ao tratamento térmico, sem aproveitamento como combustível. A incineração é um método rápido e confiável, principalmente pela grande efetividade na remoção de materiais perigosos e capacidade em tratar grandes volumes. A principal desvantagem dessa técnica é a emissão de gases; aumentando a poluição ambiental, consumo excessivo de energia e altos custos para realização do processo. Apesar do coprocessamento apresentar menor emissão de gases poluentes na atmosfera, é preciso atentar-se para variações na composição do resíduo, que prejudicam tanto o processo como o produto final (BALL; STEWART; SCHLIEPHAKE, 2012; LIM; LAU; POH, 2016).

Tratamentos como a estabilização/solidificação, que envolvem alterações físicas e químicas concomitantes do material, têm sido frequentemente utilizados (AL-ANSARY; AL-TABBAA, 2007; LEONARD; STEGEMANN, 2010). A estabilização envolve a conversão de contaminantes em uma forma menos tóxica e/ou menos solúvel, enquanto a solidificação envolve o encapsulamento do resíduo na forma sólida com materiais de baixa permeabilidade. Ball e colaboradores (2012) mencionam o pouco espaço requerido e a rapidez no processo como principais vantagens desses métodos, e como desvantagem, os grandes custos na instalação e riscos associados aos longos prazos de estabilização. Para WILLES (1987), as vantagens e desvantagens dessas técnicas variam em função de fatores diversos como o tipo de processo, aglomerantes, características do resíduo, condições locais entre outros.

Aterros continuam sendo um dos destinos mais utilizados para disposição dos resíduos sólidos diversos gerados no Brasil (ABRELPE, 2014). É também um dos principais destinos para resíduos da indústria do petróleo, principalmente os classificados como perigosos (classe I) e não perigosos (classe IIA), segundo a NBR10.004/2004 (IPEA, 2012).

Nos aterros sanitários, os resíduos são dispostos no solo, cuja parte superior e inferior encontram-se impermeabilizadas. Segundo a Norma 10.157 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) a impermeabilização do aterro deve ser realizada através de materiais compatíveis ao resíduo e capaz de resistir a possíveis rupturas. Além disso, se faz necessário a instalação de um sistema de drenagem para remoção de líquido percolado do aterro. As maiores preocupações com uso de aterros são o potencial de contaminação das águas subterrâneas, requisitos de estabilização e monitoramento. Resíduos com teor de óleos e graxas acima de 5% não são recomendados para aterros. O custo relativamente baixo constitui uma das principais vantagens desse método, no entanto, a taxa de biodegradação lenta, monitoramento a longo prazo e a recuperação do local são algumas das principais desvantagens (BALL; STEWART; SCHLIEPHAKE, 2012).

3.1.1.1 Biorremediação

Apesar de desenvolvida em meados de 1940, a biorremediação teve seu destaque apenas em 1989 diante de um dos maiores acidentes ambientais da história: o encalhe do navio Exxon Valdez em Prince William, Alasca (LIM; LAU; POH, 2016). Até 1989,

muitos estudos relatavam o processo de biodegradação do petróleo e as variáveis que o influenciavam, no entanto, esses conhecimentos praticamente se restringiam a academia. Com o acidente, foram disponibilizados no mercado diversos produtos relacionados à biorremediação e surgiu a necessidade de organização de um Comitê para desenvolver e avaliar esses produtos. Assim, começaram a ser elaborados os primeiros protocolos de biorremediação desenvolvidos pela *Agência de Proteção Ambiental* dos Estados Unidos (HOFF, 1993).

A biorremediação consiste na tecnologia em que mecanismos biológicos são utilizados para degradar contaminantes ambientais diversos, embora a maioria dos estudos esteja voltado para os hidrocarbonetos (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016). Conforme pode ser visto na Figura 1, é a tecnologia de menor custo quando comparada a métodos físicos e químicos, como incineração, aterro e lavagem (ANDRADE; AUGUSTO; FONTES JARDIM, 2010). Além disso, é ambientalmente sustentável, pode ser realizada no local onde os resíduos estão acumulados com interrupção mínima em conjunto com tratamentos físicos e químicos (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

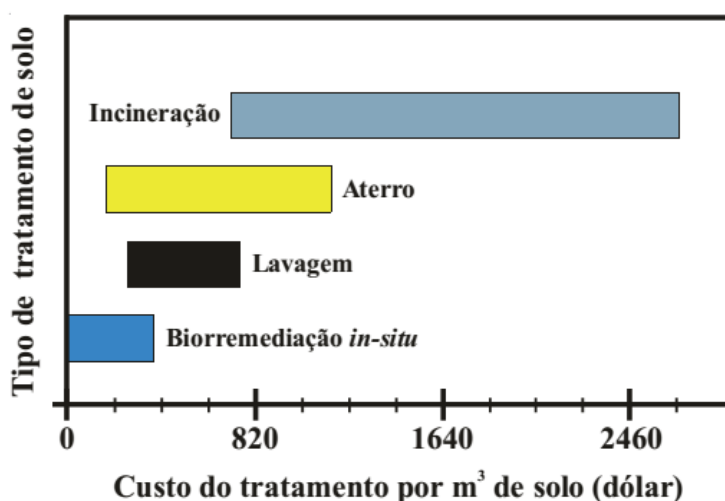


Figura 1: Comparação entre diferentes tipos de tratamento e seus respectivos custos (dólar) por m³ de solo. Fonte: EPA modificado por (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Conforme pode ser visto na Figura 2, existem diversas tecnologias de biorremediação. Algumas, por serem aplicadas no local da contaminação, são

classificadas como *in situ*; outras, são aplicadas em local diferente do contaminado e recebem a denominação de biorremediação *ex situ*. Iwamoto e Nasu (2001) apontam o fato do processo ser realizado no local da contaminação, com interrupção local mínima e ausência de custos no transporte como as principais vantagens da biorremediação *in situ*.

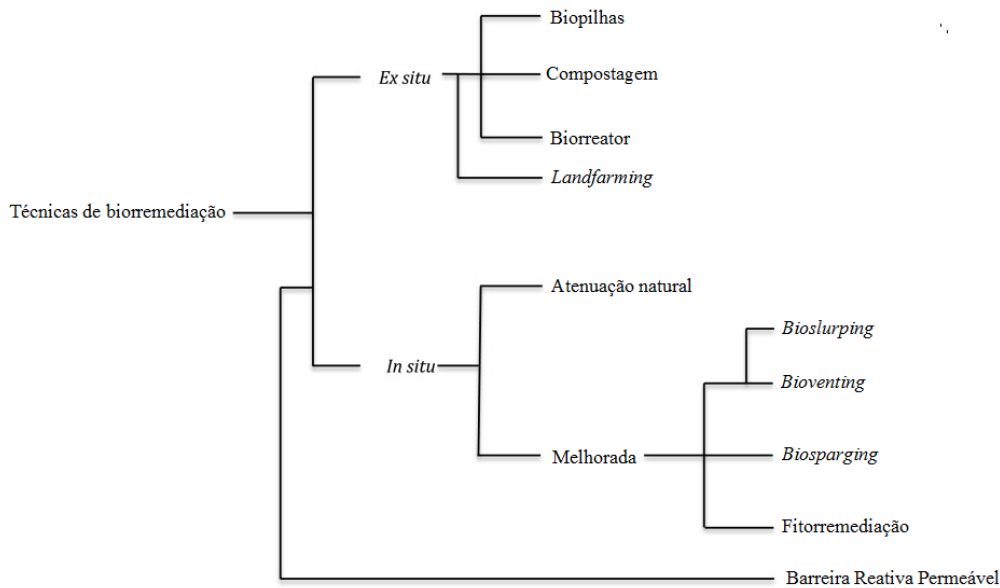


Figura 2: Esquema com algumas das tecnologias de biorremediação *ex situ* e *in situ*. Fonte: (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016) com modificações.

Além da atenuação natural, Boopathy (2000) cita a bioaumentação e bioestimulação como principais técnicas de biorremediação *in situ* e *ex situ*. A atenuação natural é o processo em que contaminantes são eliminados naturalmente pelos microrganismos do próprio ambiente. No entanto, este é um processo lento e muitas vezes precisa ser estimulado através da correção de fatores que favoreçam à atividade dos microrganismos (nutrientes, oxigênio, entre outros), passando a ser denominado de bioestimulação. Outra opção para acelerar a degradação é a bioaumentação, que consiste na introdução de microrganismos do próprio ambiente (autóctone) ou de outros locais (alóctone) com capacidade metabólica desejada (IWAMOTO; NASU, 2001).

Bioestimulação e bioaumentação usados conjuntamente têm apresentado resultados promissores quanto à degradação de hidrocarbonetos (SAFDARI et al., 2017).

Embora alguns autores sugiram que adicionar nutrientes pode ser mais eficiente do que adicionar microrganismos, nem todos os microrganismos encontrados no ambiente são capazes de degradar hidrocarbonetos. Além disso, a adição excessiva de nutrientes pode trazer inúmeros prejuízos ao ambiente, especialmente através do aumento da salinidade. Para evitar isso, tem-se recomendado a utilização da bioaumentação autóctone, através de microrganismos exclusivamente do local a ser remediado (HOSOKAWA et al., 2009).

O sucesso tanto da bioestimulação como da bioaumentação depende de fatores diversos, incluindo estudos voltados para os microrganismos do ambiente a ser bioremediado, quanto à capacidade em degradar de hidrocarbonetos e produzir biosurfactantes (BOOPATHY, 2000).

3.2 Degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo

As elevadas concentrações de carbono disponível têm favorecido o aparecimento de microrganismos que utilizam hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia. Prince et al. (2010) listaram mais de 175 gêneros (publicados) de organismos capazes de crescer usando hidrocarbonetos como única ou principal fonte de carbono e energia. Ainda segundo esses autores, esses valores podem estar subestimados visto que os organismos que metabolizam os hidrocarbonetos geralmente crescem em consórcios mutuamente benéficos.

Microrganismos isolados dificilmente promoverão a degradação completa do petróleo, uma vez que até 17 mil compostos orgânicos foram identificados em sua composição (BJORLYKKE, 2011). Assim, é necessário a atuação de consórcios, que através do metabolismo sinérgico, utilizam produtos intermediários gerados por alguns microrganismos, tornando o processo mais eficiente e rápido (DAS; KAZY, 2014).

3.2.1 Degradação de hidrocarbonetos alifáticos

Alcanos são os hidrocarbonetos saturados que podem constituir a maior parte do petróleo bruto (ROJO, 2009). Bactérias degradadoras de alcanos são muito versáteis em seu metabolismo e costumam preferir vários outros compostos como fonte de energia a alcanos, a exceção de gêneros hidrocarbonoclasticos como *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus*, *Oleispira* e *Thalassolituus* que utilizam esse hidrocarboneto como fonte de carbono e energia preferida (YAKIMOV; TIMMIS; GOLYSHIN, 2007).

Os alcanos, assim como a maioria dos hidrocarbonetos, apresentam baixa solubilidade, o que dificulta a utilização pelos microrganismos. Ainda não se sabe exatamente como os alcanos penetram nas células microbianas, uma vez que fatores ambientais, tipos de alcanos e de espécie microbiana em questão interferem nesse processo. Foi proposto que alcanos de baixa massa molecular possuem solubilidade suficiente para serem absorvidos pela célula, enquanto os de cadeia longa podem ser utilizados por adesão às gotículas de hidrocarbonetos ou facilitada através da utilização de biosurfactantes (ROJO, 2009).

A degradação aeróbica de alcanos pode ocorrer por oxidação terminal ou subterminal. Em ambos os casos, o processo inicia-se por ação das monooxigenases e segue com a formação de álcool primário e secundário, na via terminal e subterminal, respectivamente. Em seguida, por ação da álcool desidrogenase, um aldeído é formado na via terminal e uma cetona na via subterminal. O aldeído formado é convertido a ácido carboxílico por ação da aldeído desidrogenase que é finalmente convertido a ácidos graxos que são conjugados com CoA e processados por β - oxidação para gerar acetil-CoA. A cetona formada na via subterminal é oxidada por uma monooxigenase Baeyer-Villiger e um éster é formado e hidrolisado por uma esterase gerando um álcool e um ácido graxo (Figura 3).

A degradação anaeróbia dos alcanos também desempenha um papel importante na remoção de hidrocarbonetos no meio ambiente. Diversas bactérias foram descritas como capazes de utilizar alcanos na ausência de oxigênio. Para tanto, esses microrganismos utilizam nitrato ou sulfato como aceptor final de elétrons (ROJO, 2009). Muitos avanços são relatados em estudos de biodegradação anaeróbica de alcanos quanto aos microrganismos e vias envolvidas (MBADINGA et al., 2011).

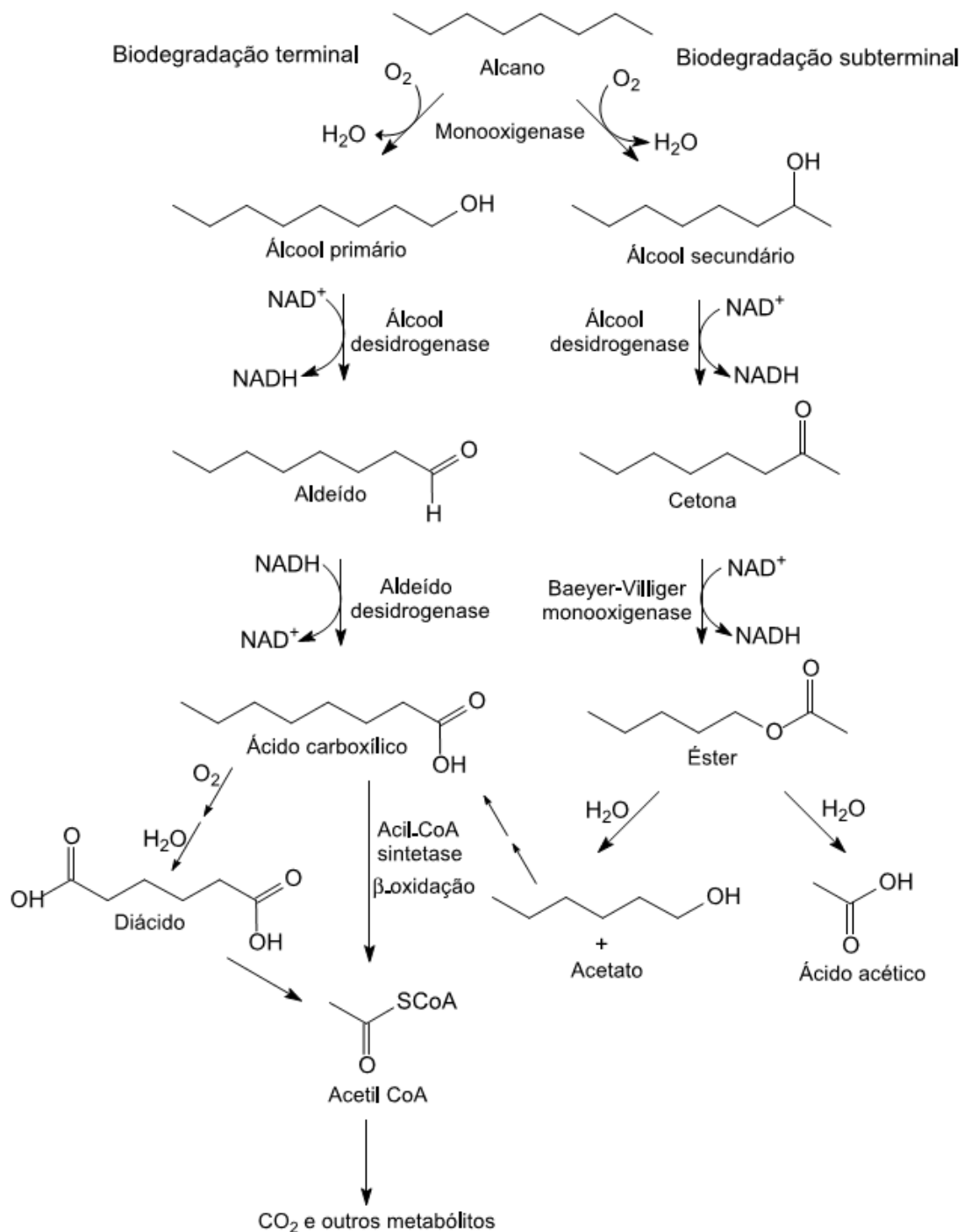


Figura 3: Via de degradação aeróbica de alcanos por oxidação terminal e subterminal. Fonte: Fritsche e Hofrichter, (2008) modificado por Cruz e Marsaioli, 2012.

Alcano hidroxilases (AlkB) são enzimas chaves na degradação aeróbica de alcanos ao hidroxilar estes a álcoois. Uma vez formados, os álcoois são oxidados a ácidos graxos que possui uma metabolização comum entre os microrganismos. As AlkB são monooxigenases mais comumente encontradas e que requerem duas proteínas de transferência de elétrons; uma rubredoxina redutase (AlkT) e uma rubredoxina para a

atividade (AlkG). Nesse caso, a rubredoxina redutase transfere elétrons do NADH para a rubredoxina que faz a transferência para a AlkB. Assim, AlkB transfere um átomo de oxigênio (do O₂) para a molécula de alcano, enquanto o outro oxigênio é reduzido para H₂O utilizando o elétron proveniente de rubredoxina redutase via rubredoxina, conforme observado na Figura 4 (ROJO, 2010).

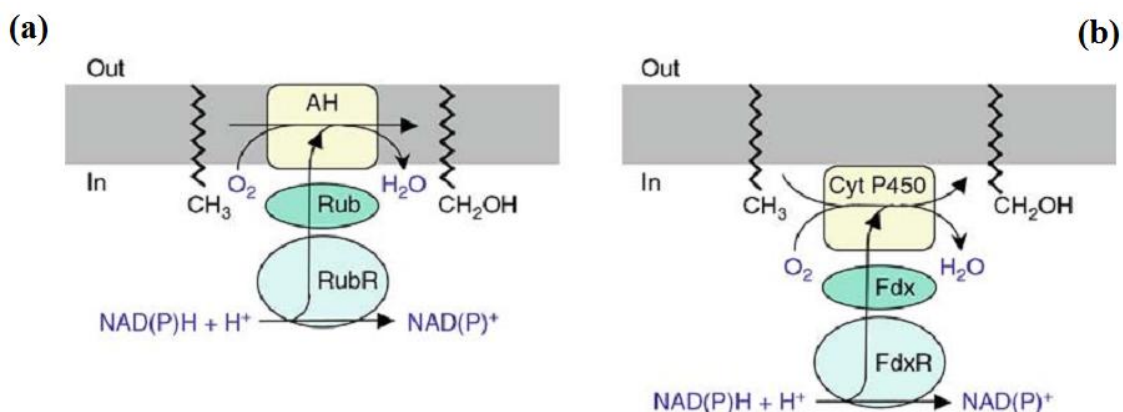


Figura 4: Oxidação de alcanos através da ALKB (a) e citocromo P450 (b). Fonte: Rojo, 2010.

Outro exemplo de alcano hidroxilases é a família citocromo P450, encontrada em bactérias degradadoras de alcanos normalmente na ausência de AlkB, embora possa coexistir em algumas espécies (NIE et al., 2014). Diferentemente da AlkB, esse citocromo utiliza a ferredoxina redutase e a ferredoxina na transferência de elétrons, conforme pode ser visto na Figura 4b (ROJO, 2010). Além da AlkB e citocromo P450, outras alcano hidroxilases têm sido descritas para alcanos de cadeias longas e muitas outras ainda devem ser descritas. Genes *alkB* e *cyp* foram detectados simultaneamente em 38 genomas que pertenciam a 16 gêneros, incluindo *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium* (NIE et al., 2014).

Os alcanos atuam como quimioatratores para alguns microrganismos, facilitando o contato e, conseqüentemente, a degradação. Na bactéria hidrocarbonoclástica *Alcanivorax* foram identificadas maquinarias relacionadas a quimiotaxia (WANG; SHAO, 2013).

3.2.2 Degradação de hidrocarbonetos aromáticos

Hidrocarbonetos aromáticos são moléculas orgânicas, caracterizadas pela presença de um ou mais anel aromático, que podem causar diversos problemas ao ambiente e à saúde humana devido suas propriedades recalcitrantes, tóxicas e cancerígenas (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2016). Embora estruturalmente apresentem elevada estabilidade química, muitas bactérias são capazes de desestabilizar o anel e assim degradar esses compostos que apresentam ampla distribuição na natureza (GHOSAL et al., 2016).

Diversos microrganismos pertencentes aos gêneros *Stenotrophomonas*, *Bacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Raoultella*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, *Paenibacillus* e *Brevibacillus* foram relatados na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SEO; KEUM; LI, 2009; REDDY et al., 2010; WU et al., 2013).

Os mecanismos de degradação aeróbia exigem a presença de oxigênio molecular, tanto comoceptor final de elétrons como para desestabilização do anel aromático, ao atuar como co-substrato para ação das monooxigenases ou dioxigenases (CHIKERE; OKPOKWASILI; CHIKERE, 2011; VARJANI; UPASANI, 2017a). Na degradação anaeróbia outros mecanismos, como as reações redutoras, são utilizados para desestabilizar o anel aromático. Nesse caso, outros aceptores finais de elétrons, como nitrato e sulfato, são utilizados em substituição ao oxigênio (VARJANI; UPASANI, 2017a).

A degradação aeróbia dos hidrocarbonetos aromáticos inicia-se com o ataque das oxigenases, enzimas capazes de incorporar um ou dois átomos de oxigênio ao anel aromático e que recebem a denominação de mono e dioxigenases, respectivamente. As dioxigenases do anel aromático atuam na formação de duas hidroxilas e, por conseguinte, do composto cis-diol que é rearomatizado e oxidado a catecol (Figura 5). Uma vez formado, o catecol é substrato para as dioxigenases que atuam na clivagem do anel aromático e formação de metabólitos intermediários centrais, como acetil-CoA, succinil-CoA e piruvato, todos utilizados pelos microrganismos nas vias comuns de geração de carbono e energia para o crescimento microbiano. Gás carbônico (CO₂) e água (H₂O) são gerados ao final dessa reação (Figura 5) (DAS; CHANDRAN, 2011; LADINO-ORJUELA et al., 2016).

Diversos motivos estão associados à baixa taxa de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, tais como a baixa solubilidade, problemas associados à produção de metabólitos tóxicos, repressão por metabólitos, presença de substratos preferidos e falta de substratos co-metabólicos (KANALY; HARAYAMA, 2000; VAN HAMME et al., 2003).

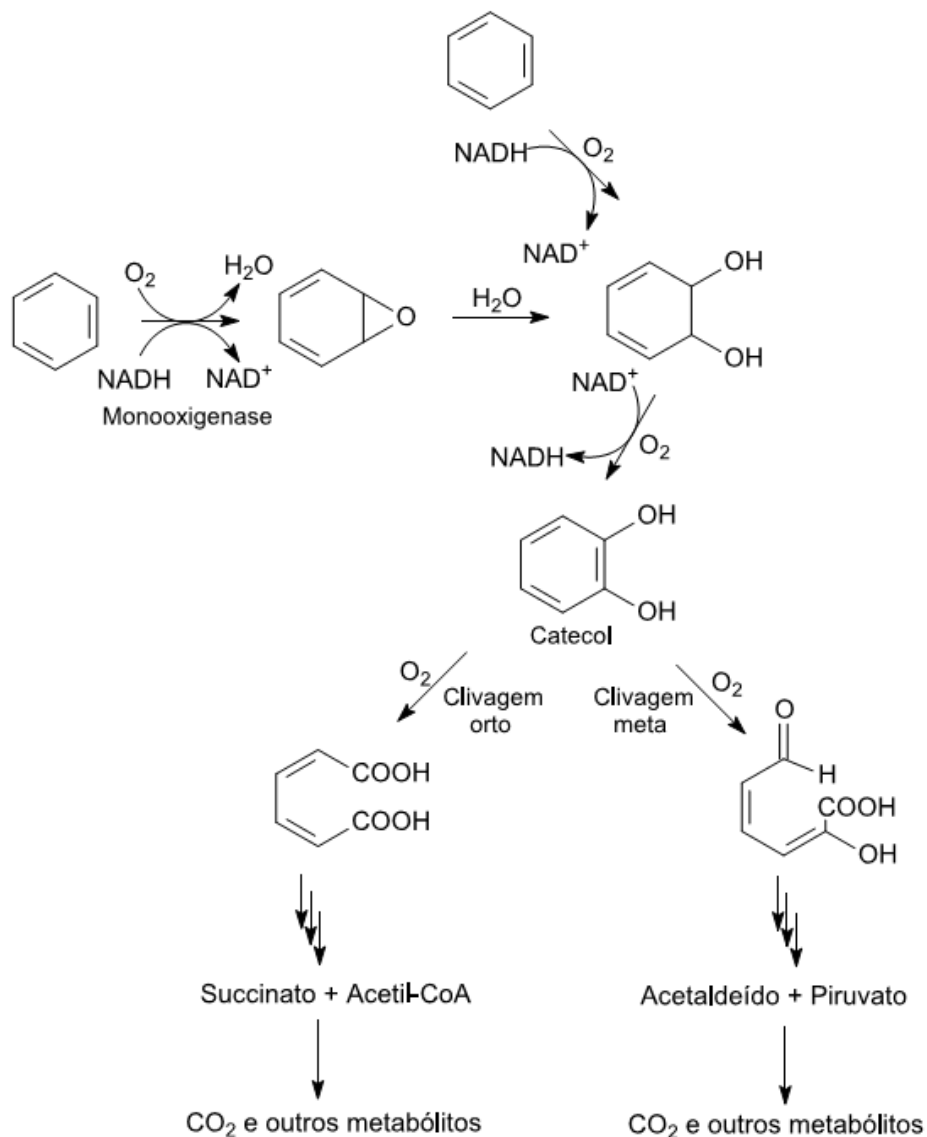


Figura 5: Esquema mostrando as etapas principais da degradação de hidrocarbonetos aromáticos sob condições aeróbicas. Fonte: Fritsche e Hofrichter (2008) modificado por Cruz e Marsaioli, 2012.

3.2.3 Biossurfactantes na degradação

Biossurfactantes são moléculas anfifílicas constituídas por uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica que conferem uma ampla gama de propriedades, incluindo a capacidade de diminuir tensão superficial e interfacial de líquidos e formar micelas e microemulsões entre diferentes fases (VARJANI; UPASANI, 2017b). Estes compostos podem ser divididos em duas classes principais: compostos de baixa massa molecular (biossurfactantes) como glicolípideos, lipopeptídeos e proteínas, e compostos de alta massa molecular (bioemulsificantes), como proteínas lipopolissacarídicas ou lipoproteínas (JOY; RAHMAN; SHARMA, 2017; UZOIGWE et al., 2015).

Os glicolípideos são carboidratos ligados a ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxi alifáticos por um grupo éster. Entre os biossurfactantes e os microrganismos descritos como produtores incluem ramnolípideos (*Pseudomonas*), trehalolípideos (*Mycobacterium* sp) e soforolípideos (*Torulopsis bombicola*) (MUKHERJEE; DAS, 2010).

Lipopeptídeos consistem em lipídeos ligado a uma cadeia polipeptídica. O mais conhecido é a surfactina produzido por *Bacillus subtilis*, cujo nome deve-se à grande atividade surfactante apresentada. Além de surfactante, estudos indicam funções antivirais, antimicoplasma, antitumorais, anticoagulantes e como inibidor de enzimas (MUKHERJEE; DAS, 2010). A iturina, outro tipo de lipopeptídeo, é descrito como potente agente antifúngico capaz de substituir pesticidas químicos atualmente utilizados na agricultura (KALAI-GRAMI et al., 2016).

Na biorremediação, o uso de biossurfactantes têm como principal função a capacidade de aumentar a solubilidade e, assim, disponibilizar para os microrganismos substratos insolúveis em água, como é o caso dos hidrocarbonetos. Esses compostos podem ser extraídos e adicionados durante a biorremediação ou através da introdução do microrganismo produtor. Em ambos os casos, a degradação pode ser melhorada (DAS; CHANDRAN, 2010; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

A adição de biossurfactantes pode melhorar a degradação através da mobilização, solubilização ou emulsificação. O tipo de mecanismo utilizado depende da massa molecular do biossurfactante e concentração no meio, conforme observado na Figura 6 (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Para os biossurfactantes de baixa massa molecular, a mobilização acontecerá quando a concentração estiver abaixo da concentração micelar crítica (CMC), que consiste na concentração do surfactante onde se inicia o processo de formação das micelas. As micelas são agregados formados em solução aquosa a partir de uma determinada concentração de surfactantes. É a configuração das moléculas de surfactantes com melhor estabilidade na solução, com as cadeias hidrofóbicas agrupadas entre si e a parte hidrofílica das moléculas voltada para a água. Assim, o efeitos dos surfactantes é maior quando uma quantidade significativa de micelas encontra-se presente (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Quando os biossurfactantes de baixa massa molecular estiverem em uma concentração acima da CMC ocorrerá o processo de solubilização, que consiste no processo de incorporação de moléculas orgânicas hidrofóbicas em uma micela. Assim, nessas concentrações, as moléculas de biossurfactantes se associam para formar as micelas e, conseqüentemente, aumentar a solubilidade de compostos orgânicos cuja solubilidade em água é baixa (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Os biossurfactantes de alta massa molecular apresentam propriedades emulsificantes eficientes na biorremediação de hidrocarbonetos. Nesse processo são formadas as emulsões contendo pequenas gotículas de óleo suspensas em um fluido (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

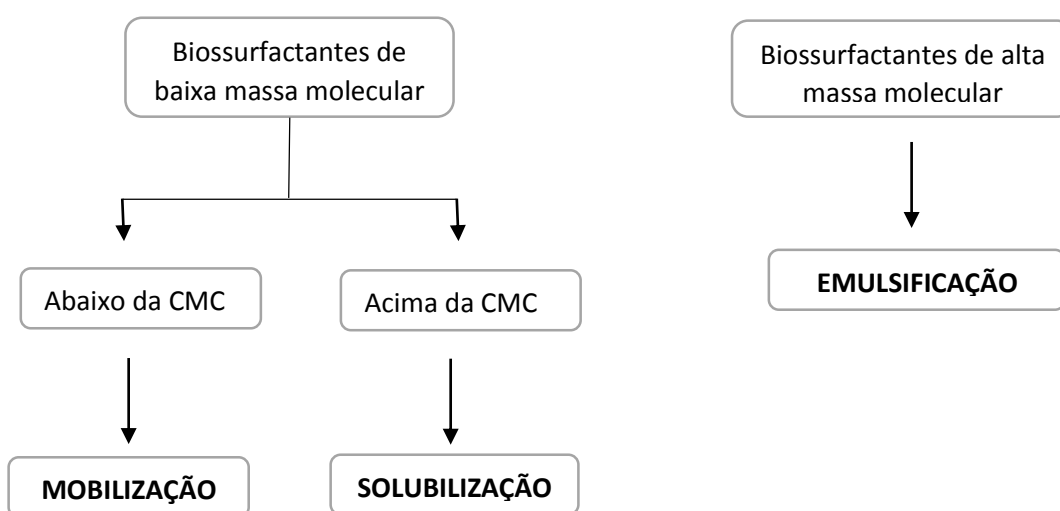


Figura 6: Mecanismos de remoção de hidrocarbonetos por biossurfactantes, em função da massa molecular e concentração micelar crítica (CMC). Fonte: Pacwa-Płociniczak et al., (2011).

Alguns autores consideram os bioemulsificantes como biossurfactantes (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). Outros, como Uzoigwe e colaboradores (2015), consideram que bioemulsificantes não são biossurfactantes. Para esses últimos autores, embora ambos sejam produzidos por microrganismos, existem diferenças físico-químicas e fisiológicas entre eles. Os biossurfactantes apresentam como principal atividade a redução da tensão superficial e interfacial e formação de emulsão estáveis, os bioemulsificantes também apresentam uma alta capacidade de emulsificação de compostos hidrofóbicos, mesmo em baixas concentrações, no entanto, reduzem muito pouco a tensão superficial e interfacial.

As várias funções apresentadas por um biossurfactante podem ser exclusivas da fisiologia e ecologia do microrganismo sendo, portanto, impossível identificar uma ou mais funções comuns a todos (CAMEOTRA *et al.*, 2010). O motivo exato pelo qual alguns microrganismos produzem biossurfactantes ainda não é claro. Em geral, a produção de biossurfactantes para os microrganismos tem como principais funções a adesão, emulsificação, biodisponibilidade, dessorção e estratégia de defesa (CAMEOTRA *et al.*, 2010).

A produção de alguns biossurfactantes, como surfactina por *Bacillus* e ramnolipídeos por *Pseudomonas* é reguladas pelos mecanismos de *quorum sensing* e controlada por parâmetros ambientais (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008). O tipo, a qualidade e a quantidade produzida são influenciadas pela fonte de carbono, concentração de nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio de cultura, bem como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995). A produção em muitos casos melhora com o aumento da salinidade e na presença de ureia. A fonte de nitrogênio pode ser fator chave para a síntese de biossurfactantes (MULLIGAN, 2014).

As principais vantagens de se utilizar os surfactantes produzidos por microrganismos em substituição aos sintéticos incluem a não toxicidade ao ambiente, estabilidade em temperaturas extremas, pH e salinidade, o que é desejável em vários processos industriais como processamento de alimentos, formulações farmacêuticas, recuperação melhorada de petróleo e biorremediação ambiental (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

3.3 Fatores que influenciam à degradação microbiana

3.3.1 Temperatura

A temperatura desempenha papel fundamental na degradação ao afetar o estado físico dos hidrocarbonetos e a taxa de crescimento dos microrganismos. O aumento da temperatura reflete em aumento da solubilidade de poluentes hidrofóbicos e diminuição da viscosidade, enquanto a baixas temperaturas a viscosidade do óleo aumenta, a volatilização de alcanos tóxicos de cadeia curta é reduzida e a solubilidade na água diminui, retardando a biodegradação (VARJANI; UPASANI, 2017a). Além disso, os microrganismos são capazes de suportar até determinados limites de temperatura. A maioria das bactérias encontradas no solo são mesófilas, com uma temperatura ótima que varia de 30 a 40 °C (DAS; CHANDRAN, 2011).

3.3.2 Tipos de solo

Solos com baixa permeabilidade, como os argilosos, podem apresentar baixa biodegradação ao retardar o transporte de oxigênio e nutrientes, enquanto solos arenosos por serem mais porosos permitem uma melhor transferência de oxigênio no solo. Haghollahi et al. (2016) observaram remoção de 70% de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) para solo arenoso e cerca de 20% para solo argiloso.

3.3.3 Nutrientes

Concentrações de nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo precisam ser suficientes para o crescimento dos microrganismos e conseqüente sucesso do processo de degradação. Proporções requeridas desses nutrientes variam de acordo com o tipo de bactéria, fonte de carbono metabolizada e tipo de ambiente. Relação de Carbono: Nitrogênio: Fósforo de 100:10:1, respectivamente, tem sido em geral utilizada para assegurar um meio equilibrado para crescimento microbiano (LEAHY; COLWELL, 1990; VARJANI; UPASANI, 2017a).

3.3.4 Salinidade

Os hidrocarbonetos são menos disponíveis em ambientes hipersalinos, uma vez que os sais solúveis reduzem a solubilidade dos compostos orgânicos hidrofóbicos na água. Além disso, a disponibilidade de oxigênio é comprometida, uma vez que sua solubilidade diminui à medida que a concentração de sal aumenta. No entanto, de modo geral, o aumento na concentração de sais não é, necessariamente, um impedimento à biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. A atividade microbiana é afetada por flutuações nas concentrações de sal abaixo ou acima para o crescimento ótimo do microrganismo em estudo (MARTINS; PEIXOTO, 2012).

3.4 Metagenômica

A maioria dos microrganismos encontrados na natureza não pode ser cultivada pelos métodos tradicionais (STEFANI et al., 2015). Vartoukian e colaboradores (2010) apontam diversas razões para isso. A primeira é que muitos microrganismos por apresentar crescimento lento, ou baixa prevalência, acabam não sendo considerados durante a análise das culturas. A segunda é que ao se utilizar métodos bioquímicos convencionais na identificação, microrganismos geneticamente distintos acabam sendo agrupados juntos. Além disso, muitos microrganismos não crescem quando as necessidades nutricionais e ambientais necessárias ao crescimento não são atendidas artificialmente. Outro fator, apresentado pelos autores, é a quebra de interações estabelecidas entre os microrganismos através da formação de biofilmes e mecanismos de *quorum-sensing*.

Avanços no crescimento de espécies de difícil cultivo foram obtidos através de métodos que incluem simulação do ambiente e co-cultivo com outras bactérias do ambiente (STEWART, 2012). No entanto, ainda são baixos os números de microrganismos validamente descritos (ACHTMAN; WAGNER, 2008). Assim, para superar as dificuldades e limitações associadas as técnicas de cultivo, várias técnicas moleculares independentes de cultivo têm sido desenvolvidas.

Para Vaz-Moreira et al. (2011) as abordagens dependente e independente de cultivo são complementares. Enquanto as abordagens dependentes de cultivo permitem, através do isolamento de espécies bacterianas, caracterizar os microrganismos totalmente, os métodos independentes de cultivo possibilitam o conhecimento de inúmeras espécies

microbianas desconhecidas de uma ampla gama de *habitat* (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010).

Métodos independentes de cultivo baseados na análise de genes 16S rRNA fornece informações acerca de táxons e espécies presentes em um ambiente. No entanto, esses dados geralmente fornecem pouca ou nenhuma informação sobre o papel funcional dos microrganismos (STREIT; SCHMITZ, 2004). Em contrapartida, a metagenômica consiste em um dos métodos independentes de cultivo em que são realizadas análises genômicas total das comunidades de microrganismos de uma amostra. Ao sequenciar os genomas de todos os organismos, em vez de um único gene marcador, informações taxonômicas e funcionais de uma comunidade microbiana e suas interações são conhecidas (HANDELSMAN et al., 1998). No entanto, como trata-se de uma análise baseada em DNA, genes expressos e não expressos não podem ser diferenciados (SOREK; COSSART, 2010).

Na última década, a metagenômica baseada em dados de sequenciamento de nova geração (NGS) gerou um enorme volume de dados e tornou-se um campo de pesquisa de rápido crescimento, principalmente pelo baixo custo, tornando esta tecnologia acessível para mais pesquisadores (DUDHAGARA et al., 2015; ESCOBAR-ZEPEDA; DE LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015; JÜNEMANN et al., 2017).

Para acompanhar o rápido progresso, a bioinformática cresceu de forma semelhante, oferecendo até agora diversas ferramentas de análise para identificar essas informações. O MEGAN e o MGRAST, por exemplo, geram informações taxonômicas e funcionais. No entanto, em nenhum desses bancos é possível analisar a função no contexto da filogenia ou vice e versa (HUSON et al., 2007). Outros bancos de dados que permitem a análise específica voltada à degradação de hidrocarbonetos e produção de Biosurfactantes (BioSurfDB) foram desenvolvidos (OLIVEIRA et al., 2015). Assim, dado o tamanho cada vez maior dos conjuntos de dados metagenômicos, o desempenho e a capacidade de tais ferramentas tornam-se essencial (SU et al., 2012).

As análises metagenômicas geralmente são iniciadas pelo isolamento do DNA, que pode ser obtido diretamente do ambiente (solo, água, sedimento entre outros) ou do enriquecimento de microrganismos no laboratório (STREIT; SCHMITZ, 2004). Em seguida, pode-se realizar o sequenciamento e análise, por bioinformática, ou utilizar o DNA para construção de bibliotecas ao clonar fragmentos de DNA em vetor adequado. O vetor é escolhido em função do tamanho de fragmento que se deseja clonar, geralmente são utilizados plasmídeos (até 15kb), cosmídeos ou fosmídeos (ambos até 40kb) (SIMON;

DANIEL, 2011). A abordagem clássica inclui a construção de bibliotecas de pequenos insertos (<10 kb) e de *Escherichia coli* como cepa hospedeira (HENNE et al., 1999). A principal desvantagem desse tipo de biblioteca consiste no fato dos pequenos insertos não permitir a detecção de grandes grupos de genes ou operons. Nesse sentido, muitos pesquisadores têm optado por utilizar bibliotecas de grandes insertos como cosmídeos e fosmídeos (VASCONCELLOS et al., 2010).

Duas estratégias são geralmente utilizadas para pesquisar e identificar genes de bibliotecas: abordagens com análise baseada em função ou na sequência. A análise baseada em função tem o potencial para identificar classes completamente novas de genes que codificam funções novas ou conhecidas. A maioria dos testes para seleção de genes que codificam novas biomoléculas, baseia-se nas atividades metabólicas de clones presentes nas bibliotecas metagenômica. A aplicação de abordagens baseadas em sequências envolve o desenho de iniciadores (*primers*) derivados de regiões conservadas de genes ou famílias de proteínas já conhecidas. Assim, apenas novas variantes de classes funcionais de proteínas conhecidas podem ser identificadas (HANDELSMAN, 2005; HANDELSMAN, et al., 1998).

Desde a sua introdução, a metagenômica tem sido utilizada para fins diversos como a identificação de um número significativo de genes novos que codificam biocatalisadores, ou moléculas com alto potencial, na produção de produtos para fins diversos como transplante de órgãos, tratamento de câncer, controle de colesterol, com atividade fungicida, inseticidas entre outros (STREIT; SCHMITZ, 2004; LORENZ; ECK, 2005; DEMAINE; SANCHEZ, 2009), detecção de sistemas *quorum sensing* (KIMURA, 2014), identificação de microrganismos relacionados a diversos tipos de câncer (BANERJEE; MISHRA; DHAS, 2015), monitoramento ambiental, biorremediação (TECHTMANN; HAZEN, 2016) e produção de biossurfactantes (JACKSON et al., 2015).

Na biorremediação, mudanças na composição da comunidade microbiana pode afetar o destino de um contaminante no ambiente (LOVLEY, 2003). Assim, além de informação das taxas de degradação é importante compreender as comunidades microbianas envolvidas para estimular de forma mais eficiente esse processo.

Diversos estudos têm relatado a importância do uso de abordagens metagenômicas na biorremediação. Vasconcellos e colaboradores (2010) demonstraram o potencial da abordagem metagenômica para a prospecção da diversidade microbiana através de biblioteca metagenômica obtida de reservatórios de petróleo. Os autores

encontraram clones com capacidade de degradação de hexadecano acima de 70%. Aplicação desses clones com cepas microbianas também derivadas de reservatórios de petróleo foram avaliadas em microcosmos artificiais com água do mar usando petróleo como fonte de carbono e energia. Os resultados mostraram que cepas isoladas bem como clones metagenômicos eram capazes de degradar vários compostos de petróleo, revelando uma estratégia inovadora com grande potencial na biorremediação (DELLAGNEZZE et al., 2014).

Bao et al. (2017) também demonstram através da metagenômica o grande potencial dos microrganismos em solos contaminados com petróleo em área de campo petrolífero na China. As análises taxonômicas e funcionais revelaram elevada diversidade na comunidade microbiana e a presença de vias envolvidas na degradação de vários compostos xenobióticos como tolueno, xileno, clorobenzoato, aminobenzoato.

Yadav et al. (2015) utilizaram abordagem metagenômica comparativa para demonstrar os efeitos das variações sazonais e condições ambientais na composição da comunidade microbiana. Os autores sugeriram a utilização das informações da estrutura da comunidade e das vias de degradação geradas no estudo, na escolha da melhor estratégia biorremediação.

A maioria dos estudos voltados para a produção de biossurfactantes ainda estão relacionados ao isolamento de culturas (DHASAYAN; KIRAN; SELVIN, 2014; JOY; RAHMAN; SHARMA, 2017; REDDY et al., 2010). No entanto, pesquisas com bibliotecas metagenômicas baseadas em função oferecem a promessa de descoberta de novas enzimas ou funções. Thies et al. (2016), ao realizarem triagem funcional com biblioteca metagenômica, identificaram várias lipases, proteases e dois clones com atividades biossurfactantes e hemolíticas.

Jackson et al. (2015) citam que os poucos trabalhos utilizando abordagem metagenômica para moléculas de biossurfactantes deve-se aos complexos mecanismos relacionados à sua produção e a falta de pesquisas para essas atividades, muito embora diversos métodos de triagem adequado para rastrear clones de bibliotecas para essa atividade estejam disponíveis (KENNEDY et al., 2011). Assim, a presença de DNA metagenômico de ambiente associados a *screenings* e hospedeiros heterólogos apropriados facilitarão o surgimento de novas moléculas com propriedades de biossurfactantes (JACKSON et al., 2015).

4 Metodologia

4.1 Coleta da Amostra

A amostra estudada consiste no resíduo obtido durante a perfuração de poços de petróleo no município de Mossoró, Rio Grande do Norte (Figura 7), cujo montante está na ordem de milhares de toneladas acumuladas. A amostra foi coletada pela empresa *Brasil Química e Mineração Industrial Ltda*, durante a perfuração das fases de poços. A coleta das amostras foi realizada do início até o fim da perfuração da fase de um poço terrestre. As quantidades amostradas de resíduos impregnados com fluidos base parafinas e ésteres foram de 50 kg. Após a coleta, esses resíduos foram dispostos em embalagens plásticas e transportadas até o laboratório para caracterização e obtenção dos consórcios. Análises físico-químicas desse resíduo foram realizadas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande no Norte (EMPARN).



Figura 7: Mapa de localização do município de Mossoró onde encontra-se acumulado o resíduo de perfuração

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração do DNA total, seguido de sequenciamento e análise taxonômica e funcional. Paralelamente, o mesmo resíduo utilizado na extração de DNA foi utilizado para obtenção dos consórcios em diferentes meios de enriquecimento. Após seleção, os consórcios foram avaliados quanto à degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes e, em seguida, submetidos à extração de DNA total, sequenciamento e quantificação. Uma vez selecionados e avaliados, os consórcios foram utilizados para isolamento de bactérias relacionadas à degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes. Na Figura 8 um fluxograma da sequência metodológica desenvolvida durante as etapas experimentais resume todas as etapas do trabalho. Informações detalhadas de cada fase são descritas nos itens a seguir.

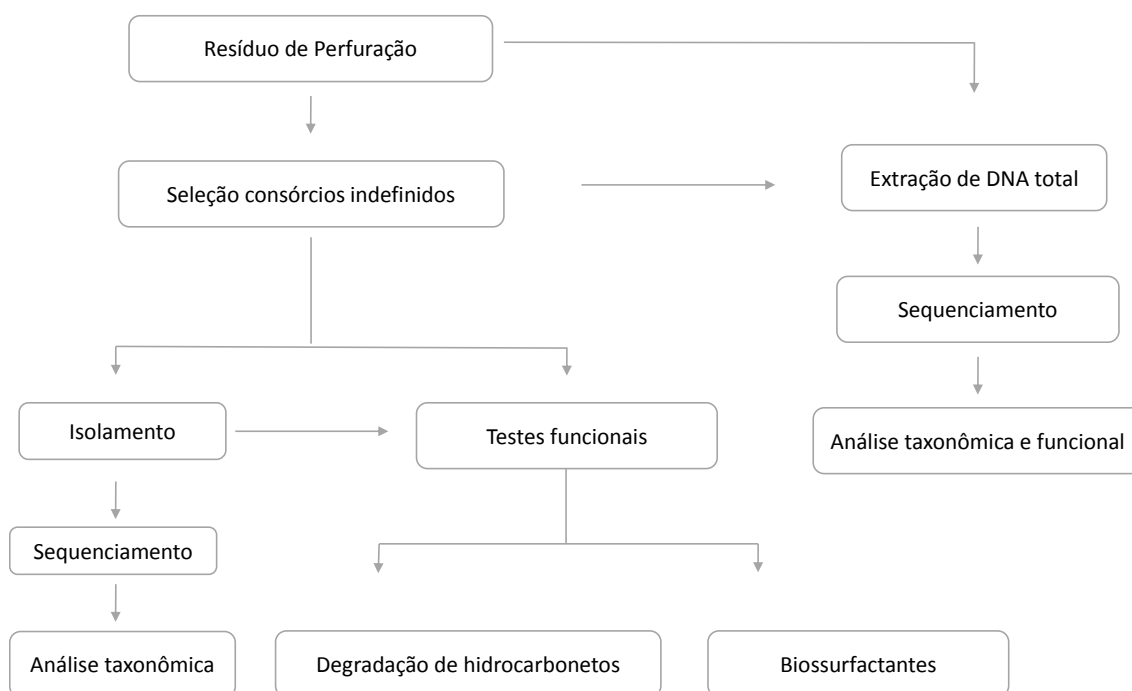


Figura 8: Fluxograma das etapas metodológicas desenvolvidas ao longo da pesquisa.

4.2 Obtenção dos consórcios indefinidos e bactérias isoladas

4.2.1 Obtenção dos consórcios

Os microrganismos presentes no resíduo de perfuração foram selecionados em duas etapas. A primeira, denominada de etapa de enriquecimento, teve como objetivo o crescimento do maior número de microrganismos possível através dos meios ricos *Lysogeny Broth* (LB) e *Yeast Peptone Dextrose* (YPD). Essa etapa consistiu em pesar 8 g de resíduo de perfuração e transferir para frascos *Erlenmeyer* contendo 50 mL de LB (composição em g/L: triptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 10) e 50 mL de YPD (composição em g/L: extrato de levedura, 10; peptona ou triptona, 20 e glicose, 20), ambos com pH 7 e com 1% (v/v) de petróleo bruto estéril. Em seguida, esses frascos foram transferidos para *shaker* a 180 rpm e 37 °C por 7 dias. Após esse período, 1 % da cultura crescida foi transferida para um novo frasco *Erlenmeyer* contendo meio de cultura (LB e YPD) e 1 % de petróleo e foram transferidos para *shaker* sob as mesmas condições (agitação e temperatura) descritas anteriormente. Essa etapa de enriquecimento ocorreu durante 3 semanas consecutivas.

Na segunda fase de obtenção dos consórcios, denominada de etapa de seleção, foi utilizado meio de cultura Bushnell-Haas com petróleo como única fonte de carbono, para que um maior número de microrganismos degradadores de petróleo pudesse ser selecionado. Assim, as duas amostras obtidas a partir dos diferentes meios (LB e YPD) na etapa de enriquecimento foram centrifugadas (4500 xg por 15 minutos) e o *pellet* obtido suspenso e 2% de seu volume transferido para frascos *Erlenmeyer* com 50 mL de meio Bushnell-Haas (BH) (composição em g/L: 0,2 de MgSO₄; 0,02 de CaCl₂; 1,0 de KH₂PO₄; 1,0 de K₂HPO₄; 1,0 de (NH₄)₂SO₄ e 0,05 de FeCl₃) contendo 1 % (v/v) de petróleo como única fonte de carbono. As amostras foram incubadas sob as mesmas condições descritas previamente (agitação e temperatura) por 10 dias e, em seguida, 2% da cultura crescida foi transferida para frasco *Erlenmeyer* contendo meio BH e petróleo como única fonte de carbono e energia. Essa etapa se repetiu durante 3 semana e, após esse período, os dois consórcios indefinidos independentes obtidos, denominados de consórcio L (pré-enriquecimento em meio LB) e Y (pré-enriquecimento em meio YPD), foram estocados em glicerol (50 %) a -20 °C e - 80 °C até seu uso.

4.2.2 Obtenção de bactérias isoladas

As bactérias isoladas foram obtidas a partir dos consórcios indefinidos L e Y. Para tanto, inicialmente, 50 mL de meio Bushnell-Haas, 1 % da cultura dos consórcios e 1 % de petróleo foram adicionados em frascos *Erlenmeyer*. Em seguida, foram levados ao *shaker* a 180 rpm e 37 °C durante 24 horas. Após esse período, 100 µL da cultura foi utilizada no plaqueamento da cultura pelo método *spread plate* em placas com BH ágar, 1 % de petróleo e cloreto de 2,3,5 - trifeniltetrazólio (TTC) (10 mL de solução a 1 %/L), reagente indicador da atividade de degradação do petróleo (OLGA et al., 2008). Em seguida, as placas foram transferidas para a estufa a 37 °C durante 7 dias. Após esse período, as colônias com coloração rósea (indicativo de degradação) foram selecionadas e transferidas para tubo Falcon contendo 2 mL de meio rico (LB ou YPD) e levado ao *shaker* a 37°C e 180 rpm. Após 48 horas (período com maior crescimento), os isolados foram novamente plaqueados em meio rico no qual foram inicialmente selecionados (LB ou YPD) contendo ágar, visando à confirmação do isolamento mediante a observação das colônias. Após a confirmação do isolamento das culturas, estoques em glicerol (50%) foram preparados e em seguida foram armazenados a -20°C até a utilização.

4.3 Extração de DNA, quantificação e sequenciamento do metagenoma obtido diretamente do resíduo, consórcios e bactérias isoladas

O DNA do metagenoma obtido diretamente do resíduo de perfuração e dos consórcios selecionados (L e Y) foram extraídos através dos *Kits Power Soil DNA Kit* (MoBioLaboratories, Inc.) e *UltraClean® Microbial DNA Isolation* (MoBioLaboratories, Inc.), respectivamente. Todas as etapas de extração seguiram as recomendações do fabricante. A qualidade e quantidade de DNA foi estimada através de gel de agarose (0,8%) e *Qubit® 2.0 Fluorometers*. Após confirmação da qualidade e quantidade do DNA, foi realizado o sequenciamento através da *Plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine®* (PGM™) (Thermo Fisher Scientific), no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) em Petrópolis, Rio de Janeiro, sob supervisão da Professora Ana Tereza Vasconcelos. Cada amostra foi sequenciada em um único Chip

318 (600 Mb – 2Gb de sequências) considerando fragmentos de 200 bp. Todas as etapas do sequenciamento foram realizadas seguindo os protocolos da *Life Technologies*.

A extração do DNA das bactérias isoladas seguiu o mesmo procedimento de extração de DNA dos consórcios através do *Kit UltraClean® Microbial DNA Isolation* (MoBioLaboratories, Inc.). Gel de agarose a 0,8% também foi utilizado para verificar a qualidade do DNA. Após essa etapa, a reação de amplificação do gene 16S rDNA de bactéria foi realizada com uso de iniciadores específicos 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTGAG) e 1525R (AAGGAGGTGWTCARCC). As reações foram realizadas para um volume de 25 µL, contendo 1µL de DNA genômico, 2,5µL de tampão de PCR 10X, 0,75µL de solução de MgCl₂ (50mM), 0,5 de dNTPs (10mM), 1,25µL do iniciador 27F, 1,25µL do iniciador 1525R (10mM), 0,1µL de *Taq* polimerase. As reações de amplificação foram submetidas a um termociclador, programado para realizar uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguindo de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C; 1 minutos a 55°C; 2 minutos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados usando o kit *CleanSweep™ PCR Purification*. Em seguida, foram quantificados no Qubit® 2.0 Fluorometers. A identificação inicial dos isolados foi realizada no laboratório de Biologia Molecular e Genômica, UFRN usando o ABI 3500x1 da Life Technologies, sequenciador que utiliza o método Sanger.

4.4 Análises computacionais dos metagenomas e bactérias isoladas

Reads dos três metagenomas passaram pela etapa de controle de qualidade através do *software* FASTQC versão 0.11.2. O alinhamento foi realizado com *software* LAST, utilizando como *input query reads*, e como alvo as sequencias *RefSeq Microbial Protein Sequence* do NCBI. O *output* desse alinhamento é um arquivo no formato blast contendo os alinhamentos.

Análise estatística para níveis taxonômicos utilizando o MEGAN foi realizado através do *software Statistical Analyses of Metagenomic Profiles* (STAMP) (PARKS; BEIKO, 2010). A significância das diferenças na proporção relativa na distribuição taxonômica foi realizada utilizando o *two-sides Fisher's exact test* com *Newcombe-Wilson* método do intervalo de confiança, usando o *Storey's false Discovery rate* (FDR), o método *Benjamin-Hochberg FDR* era aplicado para correção. Resultados com $q < 0,05$

foram considerados significativos. A relevância biológica das taxas estatísticas foi determinada aplicando a diferença entre as proporções de pelo menos 1% e uma razão de duas vezes entre as proporções.

O Banco de dados *Biosurfactants and Biodegradation Database* (BioSurfDB) foi utilizado na análise funcional (OLIVEIRA et al., 2015). Esse banco tem uma conexão entre cada proteína e uma ou mais vias metabólicas, permitindo a criação de um histograma como as vias metabólicas mais abundantes em cada amostra.

Em relação a análise dos isolados, após sequenciamento *contigs* foram gerados através da montagem das sequências *Forward* e *Reverse*, usando o programa Geneious. Todos os *contigs* formados foram identificados usando o banco de dados de 16S rDNA EZ Taxon (<http://eztaxone.ezbiocloud.net/>).

Os melhores *hits* obtidos foram alinhados utilizando o *clustalw* e utilizados na construção de um Cladograma através do algoritmo *neighbour-joining* através do *software* MEGA versão 5.0. Análise de bootstrap foi realizada com 1000 repetições.

4.5 Testes funcionais de degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes

4.5.1 Crescimento em Petróleo

O crescimento dos consórcios na presença de petróleo foi determinado em meio Bushnell-Haas e ASW (água do mar artificial, composição (g/L): 23,4 de NaCl, 0,75 de KCl, 7,0 de MgSO₄ .7H₂O, 0,7 de K₂HPO₄, 0,3 de KH₂PO₄ e 1,0 de NH₄NO₃). Inicialmente foi realizado a ativação dos consórcios (pré-inóculo) em frascos *Erlenmeyer* contendo 1% do consórcio estoque, 1% de petróleo como única fonte de carbono para um volume final de 50 mL de meio de cultura BH e ASW. Os frascos *Erlenmeyer* foram transferidos para *shaker* a 180 rpm e 37 °C. Após 48 horas, 1% do pré-inóculo de cada consórcio foi transferido para novo frasco do tipo *Erlenmeyer* contendo 1% de petróleo e volume final de 50mL de meio e condições de temperatura e agitação conforme descrito acima. A cada 24 horas a densidade óptica a 600 nm era medida em espectrofotômetro. Os controles foram preparados nas mesmas condições das amostras, entretanto, sem petróleo ou nenhuma outra fonte de carbono adicional.

4.5.2 Teste 2,6 – DCPIP

No presente estudo, esse teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Kubota et al. (2008) com algumas modificações, conforme descrito a seguir. Culturas provenientes dos consórcios indefinidos L e Y foram inoculadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio BH e ASW suplementado com diferentes fontes de hidrocarbonetos (hexadecano, diesel, querosene, petróleo), glicose como controle positivo, e ausência de fonte de carbono no controle negativo. As culturas foram crescidas *overnight* e incubadas a 37°C e 180 rpm até alcançar densidade óptica de 1,0 (DO 600nm). Em seguida, foram centrifugadas a 4.000xg por 5 minutos, lavada duas vezes com meio BH e a densidade óptica foi ajustada para 1,0. Assim, 800 µL de meio BH estéril, 100 µL da solução de 2,6-DCPIP (37.5 µg/ml), 80 µL da suspensão celular e 5 µL de substrato estéril foram adicionados em um microtubo e transferidos para *shaker* a 37 °C e 180 rpm por 7 dias. A cor do meio foi observada e considerada positiva para a capacidade em degradar, quando se apresentava incolor (degradado) e negativo para a degradação quando apresentava coloração azul (não degradado).

4.5.3 Índice de emulsificação (IE₂₄)

A atividade de emulsificação foi determinada de acordo com Cooper e Goldenberg, (1987) com modificações conforme descrito a seguir. Inicialmente, 2 mL de querosene foram adicionadas em 2 mL de cultura crescida em diferentes fontes de hidrocarbonetos (hexano, hexadecano, diesel, querosene, petróleo, tolueno, xileno e tolueno + xileno) e, em seguida, agitado com vórtex a alta velocidade durante 2 min deixando-se repousar durante 24 h. A atividade de emulsificação foi calculada como percentagem a partir da altura da camada emulsificada dividido pela altura total da coluna de líquido multiplicado por 100.

4.5.4 Espalhamento do óleo

O teste de espalhamento do óleo foi realizado de acordo com Morikawa et al. (2000). Segundo os autores é um método simples, rápido e capaz de medir a atividade do

biossurfactante em quantidades baixas. Para realização do teste, foram adicionados em uma placa de Petri 40 mL de água, e em seguida, 10 µL de petróleo o qual formou uma fina camada. Por último, foram adicionados gentilmente sob essa camada 10 µL de amostra e SDS (10%) como controle positivo.

4.5.5 Hidrofobicidade celular

A hidrofobicidade celular dos microrganismos isolados foi determinada através da medida de adesão a hidrocarbonetos (MATH), seguindo o protocolo descrito por Rosenberg (1984) com modificações, conforme descrito a seguir. Para tanto, inicialmente os isolados foram crescidos e as células lavadas em tampão fosfato/ureia/Mg (composição: 22,2 g/L de $K_2HPO_4 \cdot H_2O$; 7,26g/L de KH_2PO_4 ; 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1,8g/L de ureia). Esse mesmo tampão foi utilizado para suspensão das células dos isolados após lavagem para correção da densidade óptica inicial (DO600) entre 0,6 a 0,8. Foram adicionados 2,4 mL de suspensão celular em tubos de vidro contendo 0,4 mL de cada hidrocarboneto testado (hexadecano, diesel, querosene, xileno, tolueno). Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos e repousaram durante 20 minutos. Após esse tempo, a densidade óptica foi novamente determinada e os valores de hidrofobicidade calculados, em percentagem, através da seguinte equação:

$$100 \times \{1 - (DO \text{ da fase aquosa} / DO \text{ da suspensão celular inicial})\}$$

4.5.6 Tensão interfacial

A tensão interfacial foi determinada através do tensiômetro do volume da gota - DVT50 de KRÜSS. Através desse método é possível determinar a velocidade na qual os emulsificantes produzem seus efeitos e reduzem a tensão interfacial. Isso ocorre através da medida do tempo entre o desprendimento de duas gotas, medido por uma barreira de luz a uma taxa de fluxo ajustada. Isso permite que o tempo entre o início de formação da gota até o desprendimento (*interface age*) seja predeterminada variando o fluxo. Assim, a tensão interfacial é medida como função da idade da interface. Para realização do teste inicialmente, os consórcios L e Y foram cultivados em *shaker* a 180rpm e 37°C durante 72 horas em meio BH contendo 1% de petróleo como única fonte de carbono. Para

determinação da tensão interfacial foram utilizados o petróleo e o sobrenadante obtido após centrifugação da cultura bacteriana a 4.000xg durante 5 minutos.

4.5.7 Ensaio em microcosmos

Resíduo de perfuração de poços de petróleo, do qual os consórcios indefinidos foram obtidos, foi utilizado para avaliar a eficiência dos consórcios L e Y na degradação dos hidrocarbonetos (bioaugmentação autóctone). Inicialmente, os consórcios em estoques foram transferidos (1%) para frascos Erlenmeyer contendo 1% de petróleo como única fonte de carbono e um volume final de 50 mL de meio de cultura BH. Em seguida, foram transferidos para *shaker* a 180 rpm e 37 °C. Após 48 horas de incubação, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm por um minuto, o sobrenadante descartado e as células suspensa em solução salina (NaCl 0,9%) com correção da densidade óptica 600nm para 1,0. Assim, 40 mL dessa suspensão celular foi transferida para frascos herméticos contendo 400 g de resíduo de perfuração. No controle do experimento foi adicionado solução salina sem os consórcios. Os respirômetros foram armazenados em temperatura ambiente no escuro durante 77 dias.

A determinação da biodegradação foi realizada semanalmente (a cada 7 dias) pela produção de CO₂ e os hidrocarbonetos no tempo 0 e após 77 dias através da cromatografia gasosa. Em relação à determinação de CO₂, inicialmente foi adicionado a cada respirômetro um recipiente contendo NaOH (0,5 M) para que o gás produzido (CO₂) fosse dissolvido. Assim, a quantificação do CO₂ foi realizada pela titulação da alcalinidade residual da solução de NaOH na presença de cloreto de bário (BaCl₂) a 3 %. Após cada leitura, cada respirômetro tinha o resíduo de perfuração revolvido visando à oxigenação e, posteriormente, eram adicionados NaOH no recipiente e os microcosmos vedados novamente até uma nova leitura.

As análises de alcanos (C9 a C39) foram realizadas pelo Centro de Tecnologias do Gás e Energias Renováveis (CTGAS-ER) de acordo com adaptação do método 8015D – *Nonhalogenated Organics* usando GC/FID e foram realizadas em um cromatógrafo a gás, da marca Thermo Scientific, modelo Trace 1310, com detector por ionização de chama. A coluna capilar utilizada foi de sílica fundida TG-5SILMS 30 m x 0.32 mm x 0.50 µm.

5 Resultados

5.1 Caracterização físico-química do resíduo de perfuração

O resíduo de perfuração em estudo classifica-se como predominantemente arenoso, salino, pH neutro e elevada quantidade de matéria orgânica e carbono orgânico (assumindo que 50% da matéria orgânica é carbono orgânico) (Tabela 1).

Tabela 1: Características físico-químicas do resíduo de perfuração de poços de petróleo.

Características de resíduo de perfuração	
pH	7,53
Carbono orgânico (g.dm ⁻³)	60,12
Matéria orgânica (g.dm ⁻³)	120,25
Nitrogênio (g.dm ⁻³)	1,06
Fósforo (mg.dm ⁻³)	1
Areia (g.kg ⁻¹)	690
Silte (g.kg ⁻¹)	290
Argila (g.kg ⁻¹)	20
Cálcio (cmol _c .dm ⁻³)	59,75
Sódio (mg.dm ⁻³)	3090
Potássio (mg.dm ⁻³)	793

5.2 Avaliação do potencial de degradação de hidrocarbonetos dos consórcios

5.2.1 Avaliação do crescimento dos consórcios na presença de petróleo

Os consórcios L e Y, obtidos a partir do resíduo de perfuração após seleção, apresentaram crescimento (determinado pela densidade óptica) em dois meios de cultura com petróleo como única fonte de carbono, sugerindo sua metabolização. Diferentes aspectos visuais apresentados pelos consórcios L e Y durante o crescimento na presença de petróleo foram sugestivos de que os meios seletivos usados na etapa de enriquecimento influenciaram na seleção das comunidades microbianas (Figura 9 e 10). Consórcio L em meio BH com petróleo apresentou densidade óptica máxima de 0,4 após 24 horas e manteve até 96 horas. Na ausência de petróleo, esse valor foi reduzido ao longo do tempo

a valores próximos de zero. Esse mesmo consórcio apresentou DO máxima de 0,6 em meio ASW entre 24 e 48 horas e nenhum crescimento na ausência do petróleo, indicando portanto, a utilização de petróleo no crescimento e sobrevivência em ambientes com maior salinidade (Figura 11).

O consórcio Y apresentou valores de densidade óptica próximos de 0,6 após 24 horas, com progressivo aumento ao longo das 96 horas. O controle desse consórcio na ausência de petróleo alcançou densidade óptica próxima a 0,4 sugerindo utilização de outra fonte de carbono (fixação de CO₂), além do petróleo, visto que não foi adicionada nenhuma fonte de carbono ao sistema (Figura 11). O consórcio Y parece ser sensível a elevada salinidade, uma vez que não foi observado crescimento em meio ASW (dados não mostrados).



Figura 9: Crescimento do consórcio L e Y em meio BH na presença de petróleo (+Pet) e controle com meio e petróleo. Meio de cultura turvo indica crescimento, enquanto a redução visual do petróleo e solubilização no meio com os consórcios são indicativos de degradação.

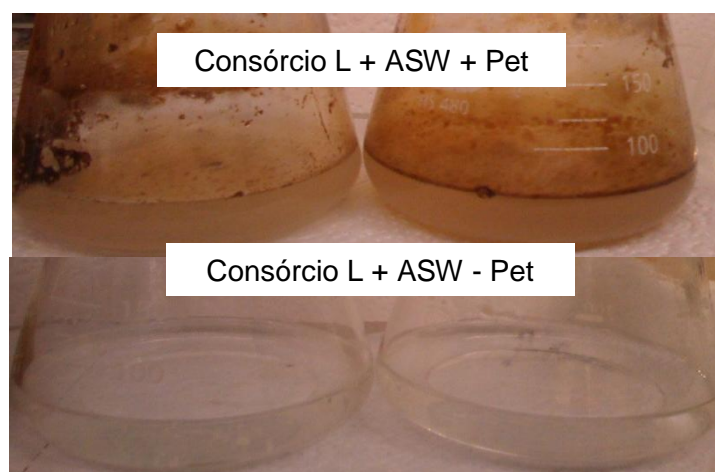


Figura 10: Crescimento do consórcio L em meio ASW na presença (+Pet) e ausência (Pet) do petróleo. Meio de cultura turvo (consórcio L+ ASW + Pet) indica crescimento e meio transparente (Consórcio L +ASW – Pet) ausência de crescimento.

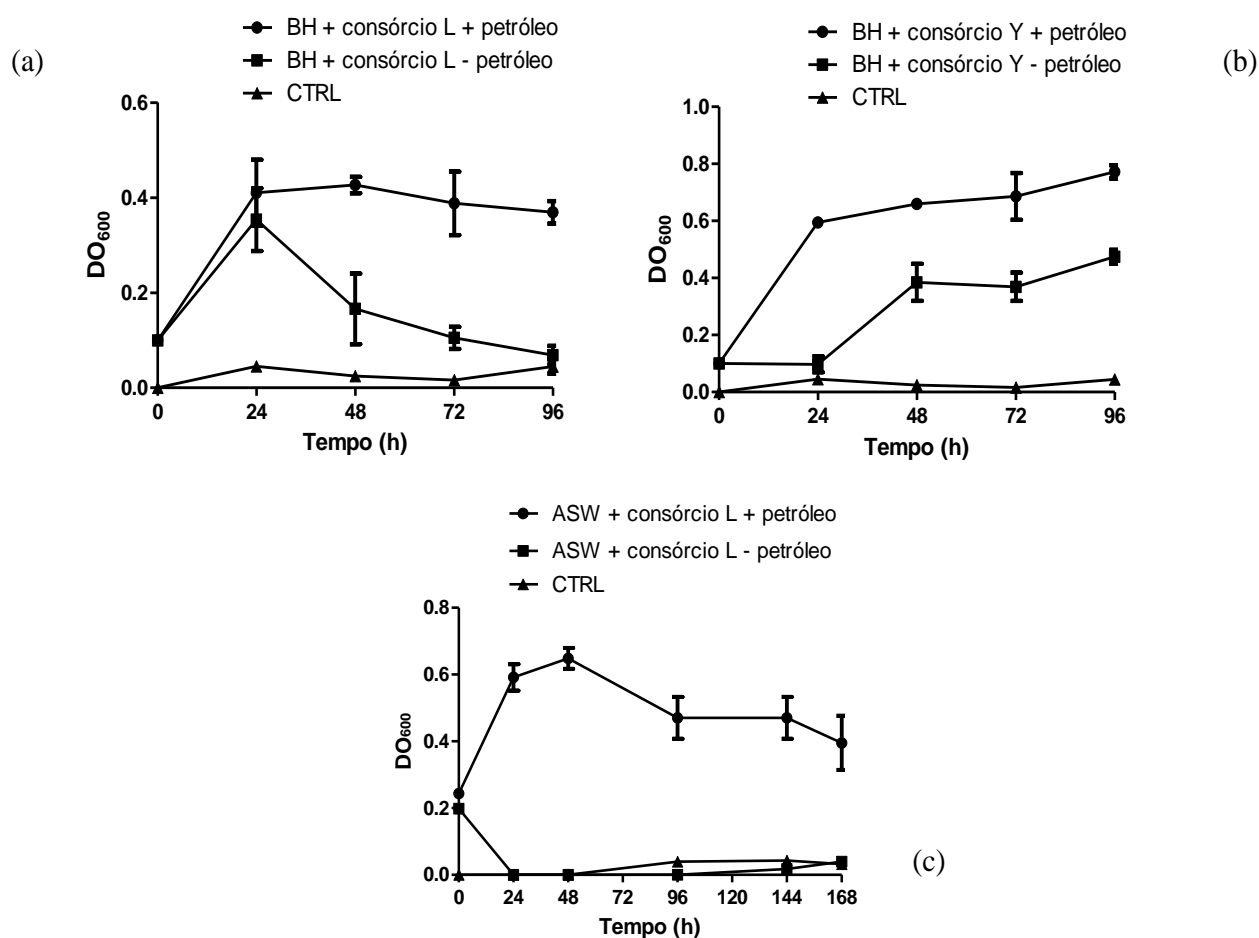


Figura 11: Efeito da presença de petróleo no crescimento dos consórcios L (a, c) e Y (b). Controle positivo: meio de cultura com os consórcios e sem adição de petróleo. Controle negativo (CTRL): meio de cultura com petróleo e sem adição dos consórcios.

5.2.2 Teste 2,6-DCPIP

Hexadecano consiste em um hidrocarboneto alifático (alcano) com 16 carbonos enquanto o petróleo, diesel e querosene são constituídos pela mistura de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos. Todos foram utilizados como fonte de carbono para avaliar a degradação com os consórcios L e Y pelo teste 2,6-DCPIP. Resultados positivos para esses hidrocarbonetos foram obtidos para os dois consórcios em meio BH, indicando capacidade em degradá-los. Em meio ASW, apenas diesel não apresentou resultados positivos para o teste (Tabela 2). O 2,6-DCPIP funciona comoceptor artificial de elétrons. Assim, ao utilizar os hidrocarbonetos como substratos, esse receptor passa do estado oxidado para reduzido com mudança de coloração de azul para incolor, respectivamente.

Tabela 2: Análise de degradação de hidrocarbonetos por consórcio microbiano L e Y usando o teste 2,6 – DCPIP.

Substrato (1%)	Meio Bushnell - Hass		Meio ASW
	Consórcio L	Consórcio Y	Consórcio L
	2,6-DCPIP	2,6-DCPIP	2,6-DCPIP
Hexadecano	+	+	+
Diesel	+	+	-
Querosene	+	+	+
Petróleo	+	+	+
Meio	-	-	-
Glucose	+	+	+
DCPIP + meio	-	-	-

O símbolo + e – indicam presença e ausência de degradação, respectivamente.

Análise qualitativa durante o teste pode ser visualizado pela Figura 12, em que na ausência de fonte de carbono não há oxidação e a coloração inicial azul permanece. Quando o petróleo e a glicose foram adicionados como fonte de carbono, estes passam a apresentar-se incolor, indicando degradação (Figura 12).

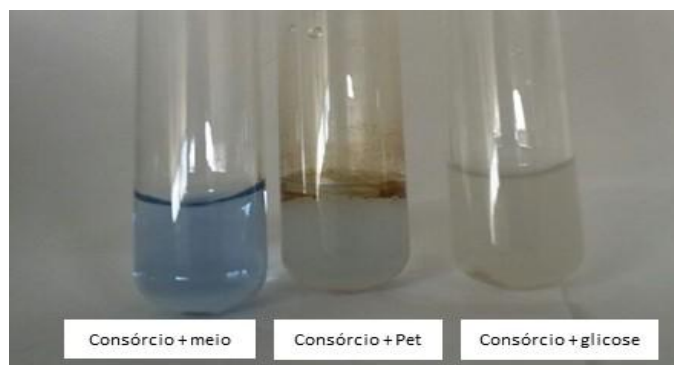


Figura 12: Aspecto visual do teste colorimétrico 2,6 – DCPIP. Na ausência de fonte de carbono (consórcio + meio) não há oxidação e a coloração inicial azul permanece. Na presença de fonte de carbono (consórcio + petróleo ou glicose) a oxidação ocorre e é sinalizada pela mudança na coloração.

5.3 Produção de biossurfactantes

5.3.1 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação superior a 30% e estável (manutenção da emulsificação após 24 horas) foi apresentado pelo consórcio L para a maioria das fontes de carbono testadas, exceto petróleo e xileno, cuja atividade após 24 horas apresentou-se ausente e baixa, respectivamente. Índice mais próximo e/ou superior ao surfactante sintético Dodecil sulfato de sódio (SDS) para esse consórcio foi observado quando utilizado querosene, tolueno e xileno + tolueno. A emulsificação do consórcio Y apresentou valores próximo e/ou acima de 50% para a maioria dos hidrocarbonetos testados. Índices maiores que os apresentados pelo SDS para esse consórcio foram observados quando utilizado hidrocarbonetos alifáticos como hexadecano, mistura de alifáticos e aromáticos como querosene e aromáticos como tolueno e xileno + tolueno como substratos, conforme pode ser visto na Figura 13.

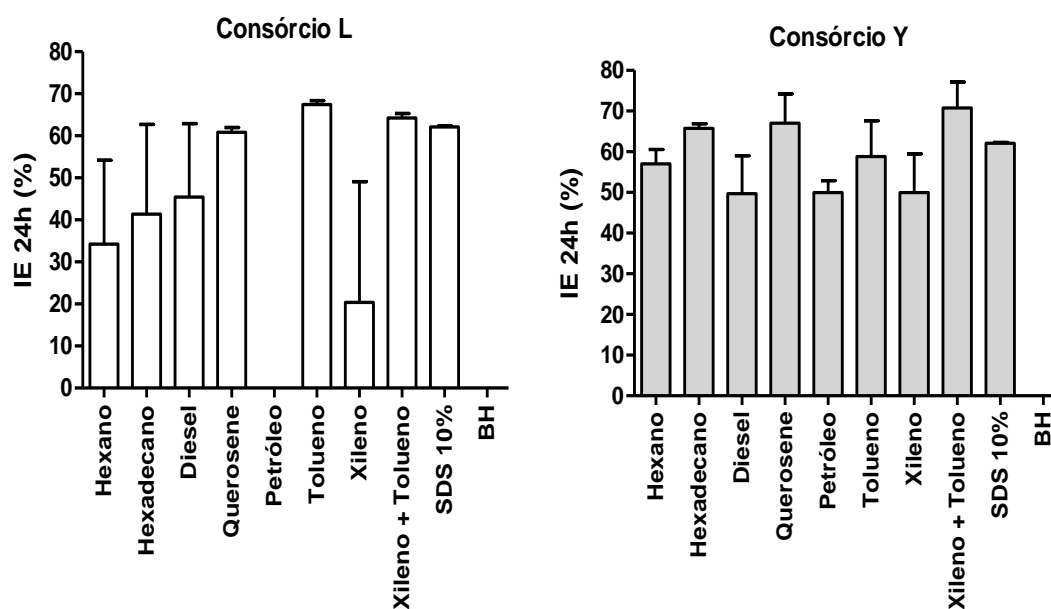


Figura 13: Índice de emulsificação dos consórcios L e Y com hexano, hexadecano, diesel, querosene, tolueno, petróleo, tolueno, xileno, tolueno + xileno, SDS 10% foi utilizado como controle positivo e meio de cultura BH como controle negativo.

5.3.2 Teste de dispersão do óleo

Morikawa e colaboradores (2000) definem o teste de dispersão do óleo como um método eficaz para medir a atividade do biossurfactante, mesmo quando a atividade e a quantidade são baixas. O teste de espalhamento do óleo realizado nesse estudo com o sobrenadante obtido do crescimento dos consórcio L e Y mostrou-se positivo quanto à capacidade de dispersão do óleo indicando, portanto, possível produção de biossurfactantes com essa propriedade (Figura 14). A confiabilidade do teste foi confirmada através do uso de água e SDS (10%) como controles negativos e positivos, respectivamente, conforme pode ser visto na Figura 14.

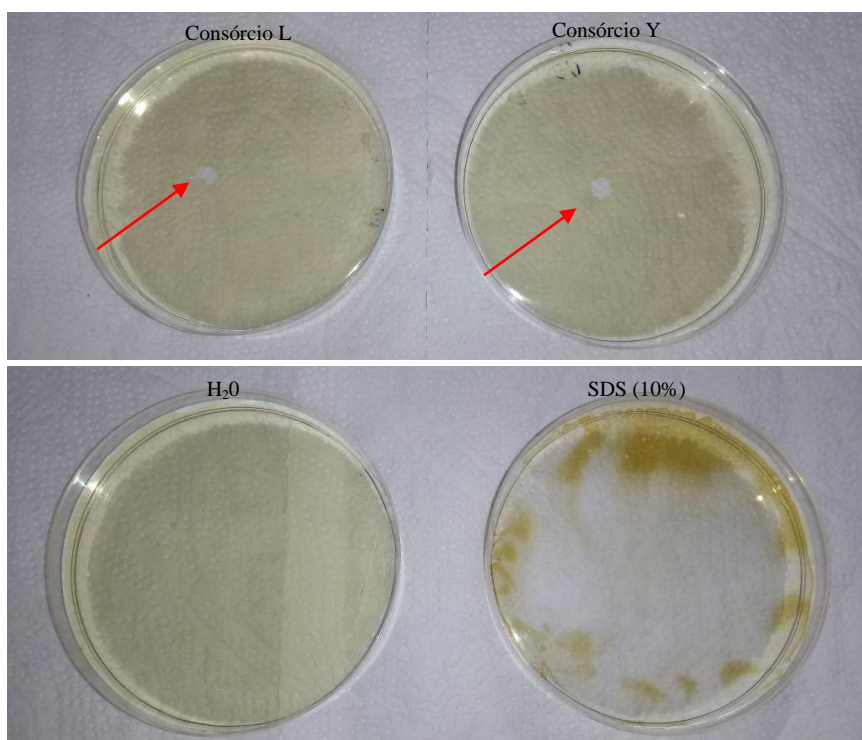


Figura 14: Teste de dispersão do óleo com sobrenadante obtido após crescimento dos consórcios L e Y. Controle positivo com SDS (10%) e negativo com água. Seta em vermelho representa o deslocamento de óleo formado pela atividade dos surfactantes.

5.3.3 Tensão interfacial

Na Figura 15 observa-se os valores de tensão interfacial dos compostos produzidos durante o crescimento dos consórcios L e Y, controle negativo (meio de cultura com petróleo) e positivo (SDS 0,02%). Como podemos observar, o sobrenadante, obtido através do crescimento dos consórcios L e Y, apresentou redução significativa da tensão interfacial em relação ao controle negativo, sugerindo, portanto, possível presença de biossurfactantes. Como a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial depende da concentração do surfactante e as amostras utilizadas nesse estudo consistem no sobrenadante obtido após crescimento dos consórcios, é possível que aumento na redução da tensão interfacial possam ser observados ao realizar procedimentos específicos de extração de surfactantes.

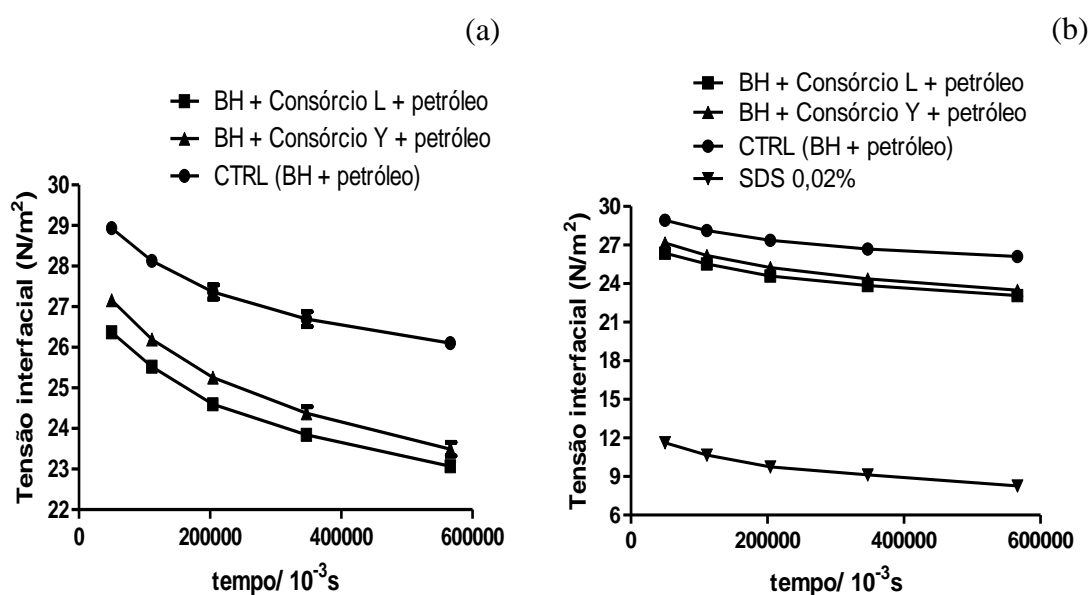


Figura 15: Tensão interfacial (N/m²) ao longo do tempo (10³s) do sobrenadante obtido após crescimento dos consórcios L e Y. Controle negativo consiste no meio de cultura com petróleo e positivo com SDS (0,02%). Em (a) Consórcios L e Y e o Controle negativo (meio BH com petróleo sem os consórcios). Em (b) consórcios L e Y, controle negativo e controle positivo com SDS a 0,02%.

5.4 Análises dos metagenomas

5.4.1 Análise taxonômica

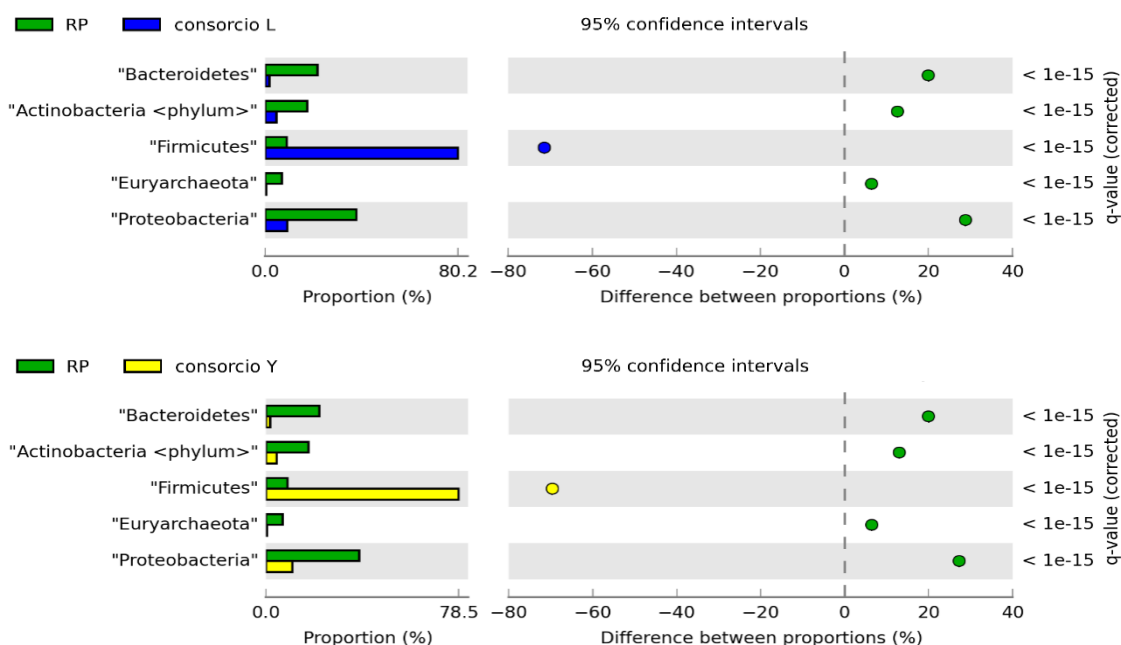
A análise comparativa do metagenoma do resíduo de perfuração e a metagenômica dos consórcios L e Y referente a domínio mostrou que *Bacteria* predominou em todas as amostras analisadas, com pequeno aumento na abundância após seleção. Em seguida, predominaram as sequências não definidas ou não reconhecidas (*not assigned*), cuja abundância manteve-se elevada mesmo após seleção, e *Archaea*, esta última com abundância bastante reduzida após seleção (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos domínios nos metagenomas do resíduo de perfuração, consórcio L e Y.

Domínio	Abundância (%)		
	RP	Consórcio L	Consórcio Y
<i>Bacteria</i>	75.48	83.31	81.82
<i>Archaea</i>	5.83	0.37	0.38
<i>Eukarya</i>	0.50	0.33	0.32
<i>Not assigned</i>	18.20	15.99	17.48

Análise taxonômica dos filos revelou predomínio significativo de *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* no resíduo e de *Firmicutes* nos consórcios L e Y (Figura 16).

Outros filos como *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Euryarchaeota*, observados em maior abundância no resíduo de perfuração, passaram a apresentar abundância mínima após seleção, sugerindo perda de diversidade de alguns grupos.



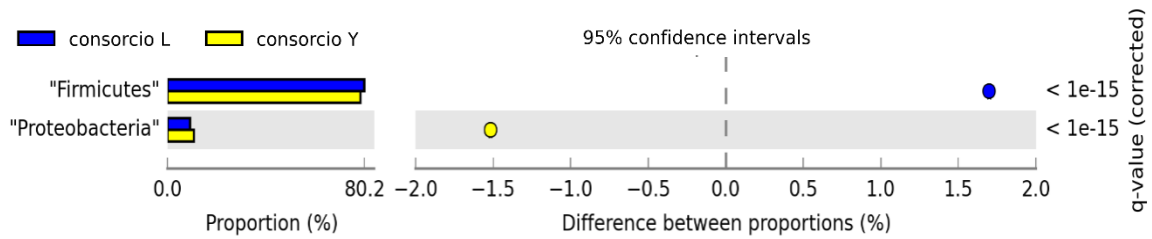


Figura 16: Perfil taxonômico comparativo referente a Filos do metagenoma do resíduo de perfuração de poços de petróleo (RP) e consórcio L e Y. Diferenças biológicas significativas calculadas a partir do STAMP ($q < 0,05$, diferenças entre as proporções mínima de 1%).

Do total de gêneros identificados no resíduo de perfuração de poços de petróleo, 97,2% permaneceram após enriquecimento tanto em meio de cultivo LB como YPD (Figura 17). Dos 19 gêneros exclusivos do resíduo de perfuração de poços de petróleo, apenas 3 são de bactéria os demais são fungos ou leveduras.

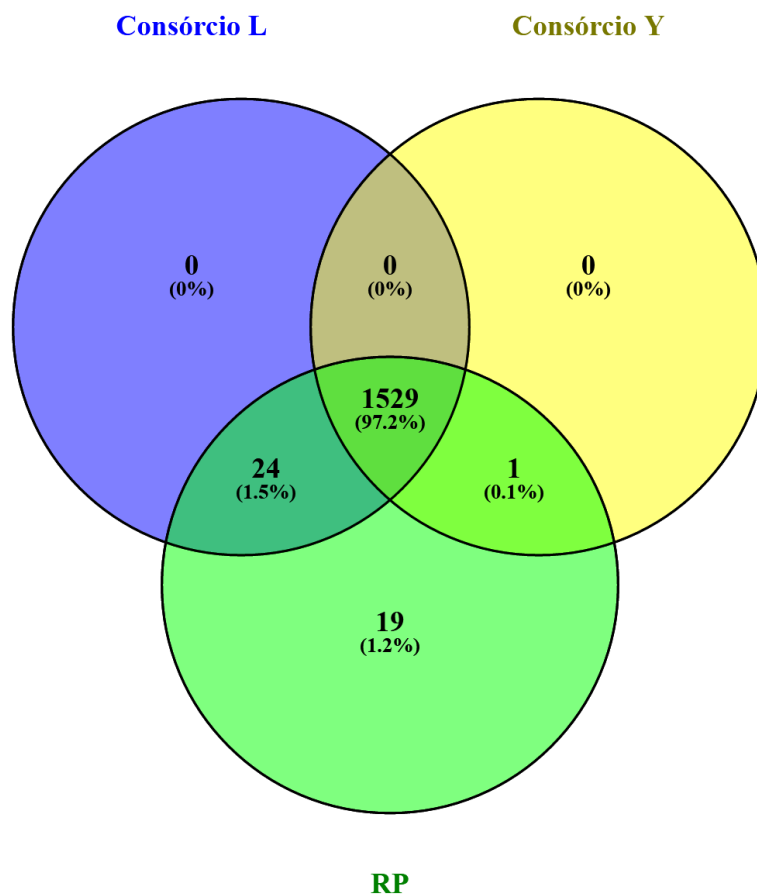


Figura 17: Diagrama de Venn demonstrando o compartilhamento gêneros entre os metagenomas do resíduo de perfuração (RP), consórcio L e Y.

Embora praticamente todos os gêneros presentes no resíduo de perfuração tenham se mantido nos consórcios após seleção (Figura 17), foi observado grandes variações quanto a abundância relativa (Tabela 4) tornando a estrutura de comunidade diferente entre resíduo e consórcios e entre consórcios.

Tabela 4: Abundância relativa (%) dos 10 gêneros mais abundantes nas amostras.

Resíduo de Perfuração		Consórcio L		Consórcio Y	
<i>Halomonas</i>	3.49	<i>Paenibacillus</i>	24.92	<i>Brevibacillus</i>	38.17
<i>Streptomyces</i>	2.99	<i>Bacillus</i>	14.72	<i>Bacillus</i>	14.82
<i>Pseudomonas</i>	2.24	<i>Brevibacillus</i>	14.44	<i>Paenibacillus</i>	3.40
<i>Flavobacterium</i>	2.02	<i>Lysinibacillus</i>	2.20	<i>Clostridium</i>	3.38
<i>Amycolatopsis</i>	1.91	<i>Clostridium</i>	1.21	<i>Lysinibacillus</i>	2.61
<i>Bacillus</i>	1.42	<i>Streptomyces</i>	1.19	<i>Streptomyces</i>	1.23
<i>Marinobacter</i>	1.36	<i>Cohnella</i>	1.06	<i>Geobacillus</i>	1.16
<i>Bacteroides</i>	1.24	<i>Geobacillus</i>	0.95	<i>Pseudomonas</i>	0.94
<i>Saccharomonospora</i>	1.12	<i>Lactobacillus</i>	0.79	<i>Staphylococcus</i>	0.84
<i>Mycobacterium</i>	0.93	<i>Staphylococcus</i>	0.72	<i>Lactobacillus</i>	0.83

No resíduo de perfuração *Halomonas*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Flavobacterium* foram os gêneros estatisticamente mais abundantes quando comparado aos consórcios L e Y que apresentaram *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Lysinibacillus* como predominantes. Quando comparado os consórcios selecionados em diferentes meios observa-se abundância significativa de *Paenibacillus* e *Lysinobacillus* para consórcio L e *Brevibacillus* para consórcio Y (Figura 18).

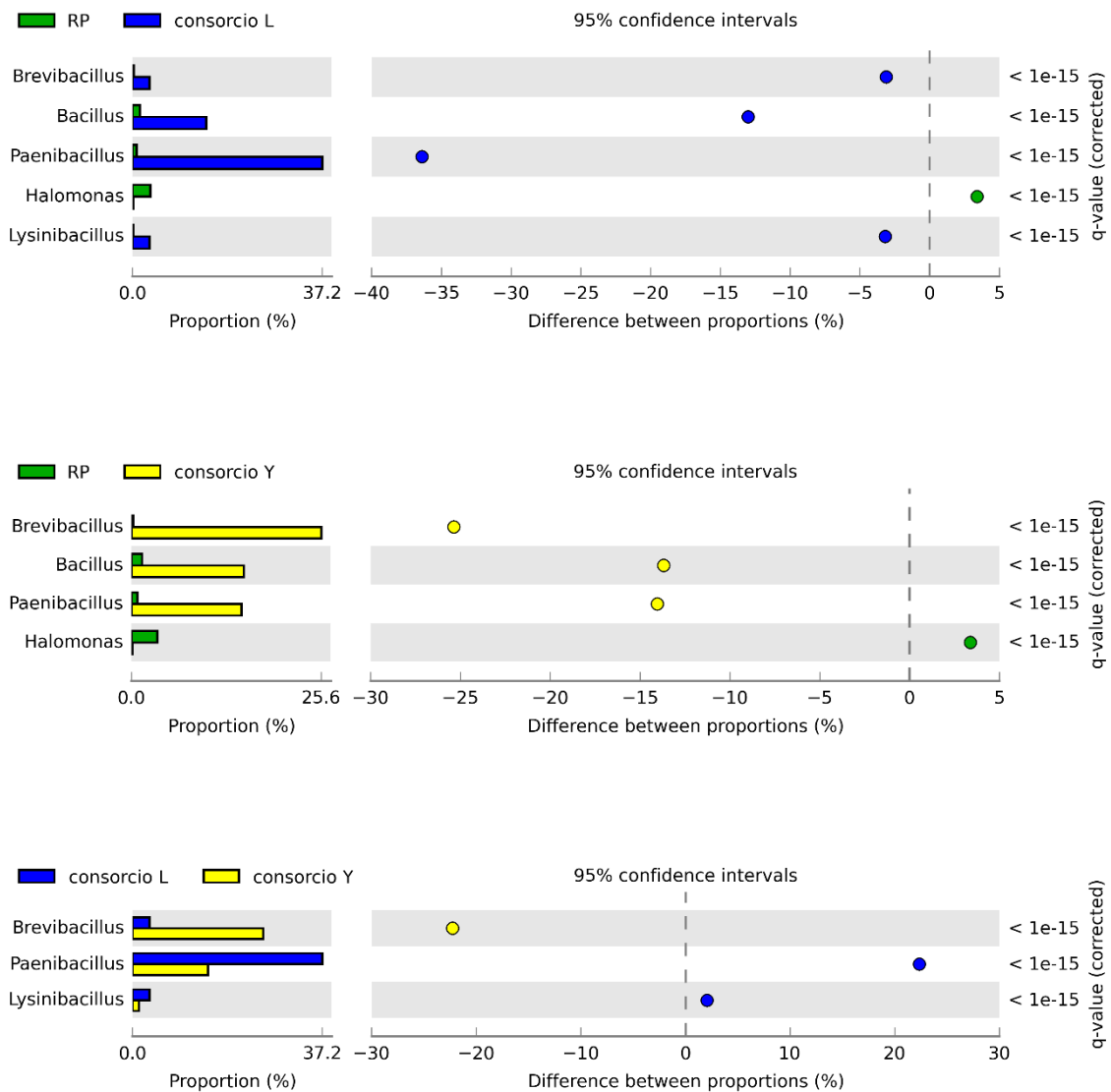


Figura 18: Perfil taxonômico comparativo referente a gêneros do metagenoma do resíduo de perfuração de poços de petróleo (RP) e consórcio L e Y. Diferenças biológicas significativas calculadas a partir do STAMP ($q < 0,05$, diferenças entre as proporções mínima de 1%).

5.4.2 Análise Funcional

5.4.3 Perfil funcional para metabolismo

Sequências relativas a metabolismos primário e secundário diversos, analisadas a partir do MEGAN, foram observadas para as três amostras e indicaram o quão complexo são os metagenomas estudados. As maiores proporções de sequências observadas no resíduo, consórcio L e Y foram para metabolismos de aminoácidos (20%, 21% e 22%,

respectivamente), carboidratos (20, 22 e 19%, respectivamente) e energia (17%, 14% e 16%, respectivamente). Outros metabolismos como lipídeos, outros aminoácidos, biodegradação de xenobióticos apresentaram menor proporção em relação aos primeiros. Embora tenham sido observadas variações entre as proporções, seqüências observadas no resíduo se mantiveram presentes nos consórcios, sugerindo manutenção das funções metabólicas após seleção (Figura 19).

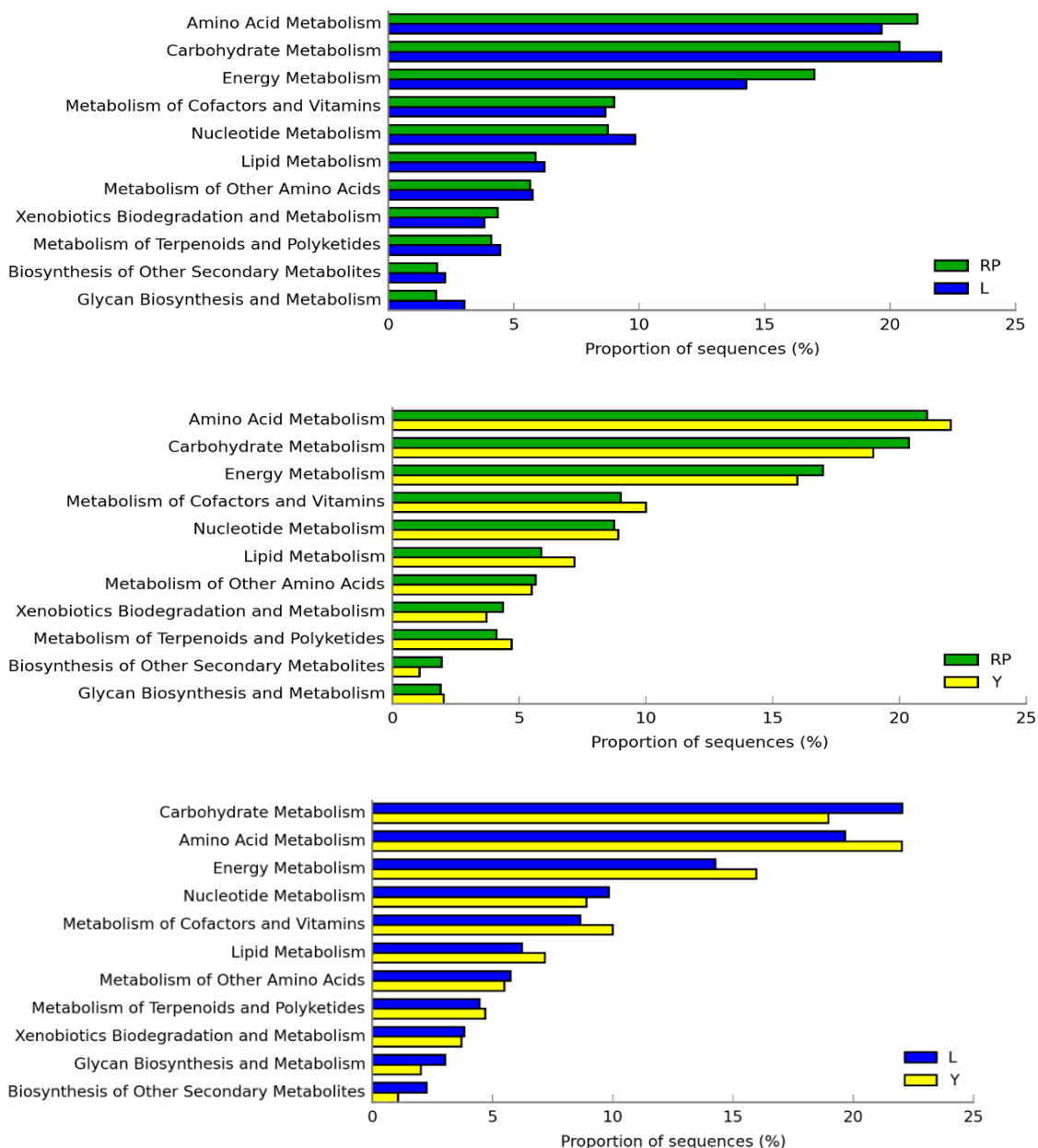


Figura 19: Perfis funcionais para metabolismo (KEGG) no resíduo de perfuração (RP) e consórcios L e Y, obtidos pelo MEGAN. Valores em proporções de seqüências (%).

Ao analisar as sequências do metabolismo energético observa-se o predomínio de sequências relacionadas às vias de fixação de CO₂, cuja maior abundância foi observada para consórcio Y (38%), justificando, portanto, seu crescimento na ausência de petróleo (Figura 11). Em seguida, predominam o metabolismo de nitrogênio (22%, 22% e 28% para RP, consórcios L e Y, respectivamente) e fosforilação oxidativa (20%, 25% e 25% para RP, consórcios L e Y, respectivamente) (Figura 20).

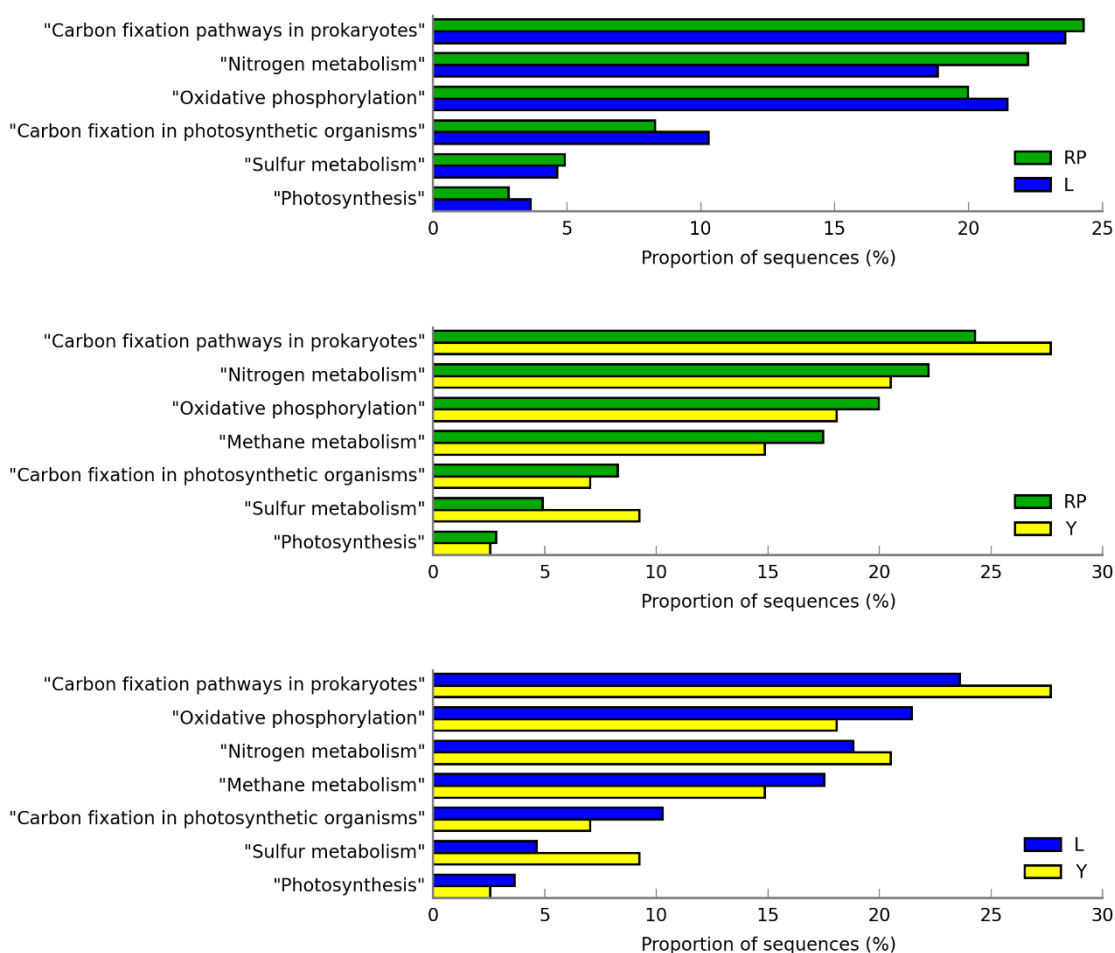


Figura 20: Perfis funcionais para metabolismo energético para resíduo de perfuração (RP) e consórcios L e Y, obtidos pelo MEGAN. Valores em proporções de sequências (%).

5.4.4 Perfil funcional para degradação de hidrocarbonetos

Análise comparativa funcional, utilizando o Banco de dados específico de degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes (BioSurfDB), indica que

o enriquecimento em meio LB e YPD não apenas manteve as rotas relacionadas à degradação (Tabela 5), como favoreceu significativamente algumas, tais como ácidos graxos, cloroalcanos e cloro alquenos.

Tabela 5: Lista de abundância relativa das vias de degradação para as três amostras (resíduo de perfuração, consórcio L e Y), BioSurfDB.

Vias de degradação	Abundância relativa (%)		
	RP	Consórcio L	Consórcio Y
Ácidos graxos	26,20	30,52	32,45
Cloroalcanos e cloroalquenos	21,05	29,28	25,68
Clorociclohexano e clorobenzeno	6,64	3,96	7,49
Metano	14,98	13,09	10,86
Benzoato	3,94	2,67	2,43
Naftaleno	10,99	9,41	6,91
HPA	1,33	1,17	0,83
Tolueno	5,90	3,43	7,10
Xileno	0,54	0,38	0,47
Fluorobenzoato	2,68	2,01	2,01
Etilbenzeno	1,43	1,07	0,40
Estireno	4,32	3,01	3,36

O resíduo de perfuração apresentou significativamente maior abundância para vias relacionadas à degradação de metano e naftaleno (Figura 21). Quando comparados os consórcios L e Y, observa-se em geral que o meio YPD selecionou melhor vias relacionadas à degradação de clorociclohexano, clorobenzeno e tolueno enquanto o meio LB ácidos graxos.

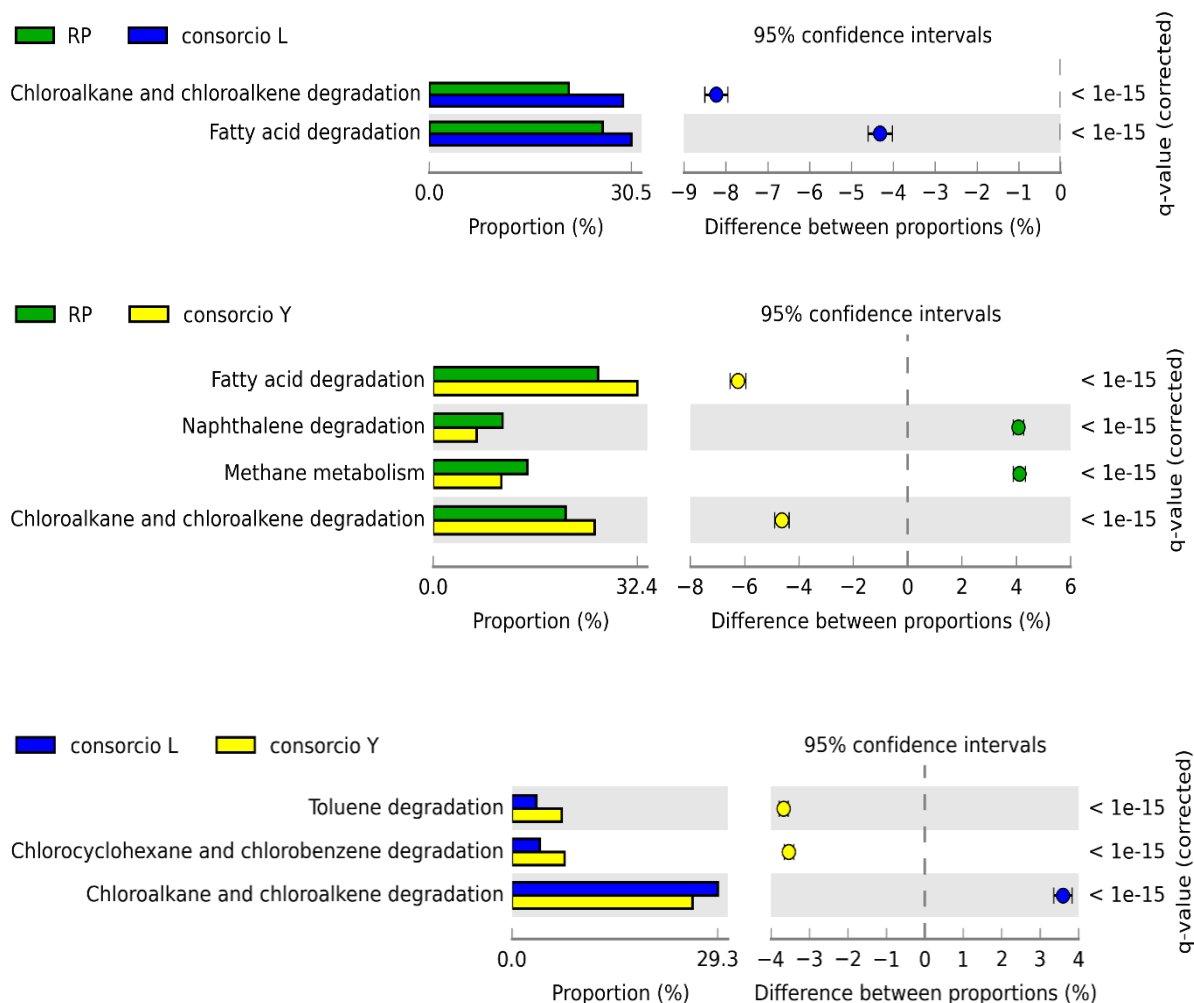


Figura 21: Perfil funcional comparativo de vias relacionadas a degradação do resíduo de perfuração de poços de petróleo (RP), consórcio L e Y. Diferenças biológicas significantes calculadas a partir do STAMP ($q < 0,05$, diferenças entre as proporções mínima de 1%).

5.4.4.1 Enzimas de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

Microrganismos candidatos a atuar nas vias de degradação mais abundantes dos consórcios L e Y (cloroalcanos, cloroalquenos, clorociclohexano e clorobenzeno) foram analisadas no KEGG, utilizando o banco de dados *Integrated Microbial Genomes* (IMG). Para tanto, enzimas que atuam nessas vias, foram selecionadas e analisadas quanto aos possíveis microrganismos candidatos.

Conforme pode ser visto na Tabela 6, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Dietzia*, *Brevibacillus* e *Lysinibacillus* foram anotados como os gêneros candidatos a apresentar as enzimas haloalcano dealogenase (EC:3.8.1.5) e 2-haloácido dealogenase (EC:3.8.1.2), tanto no consórcio L como no Y. Para confirmar a contribuição dos microrganismos mais

abundantes dos consórcios L e Y (*Paenibacillus* e *Brevibacillus*) na degradação, estão sendo realizadas análises nos genomas de referência desses gêneros.

Tabela 6: Principais enzimas das vias de degradação de cloro-alcanos e cloro-alcenos e microrganismos candidatos correspondentes para os consórcios L e Y, utilizando o banco de dados do KEGG do IMG.

Enzimas	Consórcio L	Consórcio Y
Haloalcano dealogenase (EC:3.8.1.5)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
2-haloácido dealogenase (EC:3.8.1.2)	<i>Bacillus</i> <i>Lysinibacillus</i> <i>Dietzia</i> <i>Paenibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i> <i>Bacillus</i> <i>Lysinibacillus</i>

Vias relacionadas à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos foram analisadas e o número de *reads* para cada enzima estão apresentadas nas tabelas a seguir. Considerando a via aeróbica dos alcanos, cuja abundância encontra-se significativamente mais alta nos consórcios, observa-se que enzimas chaves como alcano monoxigenase (EC 1.14.15.3) e rubredoxina redutase (EC 1.18.1.1) estiveram presentes em todas as amostras com algumas variações em número de *reads*, considerando o banco de dados BioSurfDB. Na ausência da alcano monoxigenase e rubredoxina tem-se a citocromo P450, que requer a presença da ferredoxina redutase (EC 1.18.1.3) como enzima acessória doadora de elétrons. Essas e outras enzimas que participam da oxidação terminal de alcanos como álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1) e aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3) foram observadas nas três amostras com variações no número de *reads* entre as amostras (Tabela 7).

Tabela 7: Enzimas envolvidas na degradação de alcanos e número de *reads* correspondentes nos metagenomas do resíduo de perfuração e consórcios L e Y, de acordo com o BioSurfDB.

Enzimas	Número de reads		
	RP	Consórcio L	Consórcio Y
Alkane monooxygenase	622	592	639
Ferredoxin reductase	2838	883	121
Rubredoxin reductase	202	680	195
Alcohol dehydrogenase	3666	7890	5679
Aldehyde dehydrogenase	11141	6795	6403
Cytochrome P450	354	801	60

Em relação ao metano, via significativamente mais abundante no resíduo, observa-se que enzimas que atuam na conversão do metano a metanol, como a metano monooxigenase (EC 1.14.13.25), estão presentes não apenas no resíduo de perfuração como nos consórcios obtidos durante enriquecimento. Outras enzimas dessa via, como metanol desidrogenase (EC 1.1.1.244), formaldeído desidrogenase (EC 1.2.1.46) e formate desidrogenase (EC 1.2.1.2), foram observadas (Tabela 8).

Tabela 8: Enzimas envolvidas na degradação de metano e número de *reads* correspondentes nos metagenomas do resíduo de perfuração e consórcios L e Y, de acordo com o BioSurfDB.

Enzimas	Número de <i>reads</i>		
	RP	Consórcio L	Consórcio Y
Methane monooxygenase	154	65	205
Methanol dehydrogenase	776	486	153
Formaldehyde dehydrogenase	570	1391	1166
Formate dehydrogenase	3273	934	3955

Apesar do xileno apresentar-se em menor abundância em relação a outros hidrocarbonetos (Tabela 5), *reads* de todas as enzimas que participam da degradação desse composto foram observados nas três amostras, indicando a presença de uma via completa para degradação de hidrocarboneto aromático (Tabela 5).

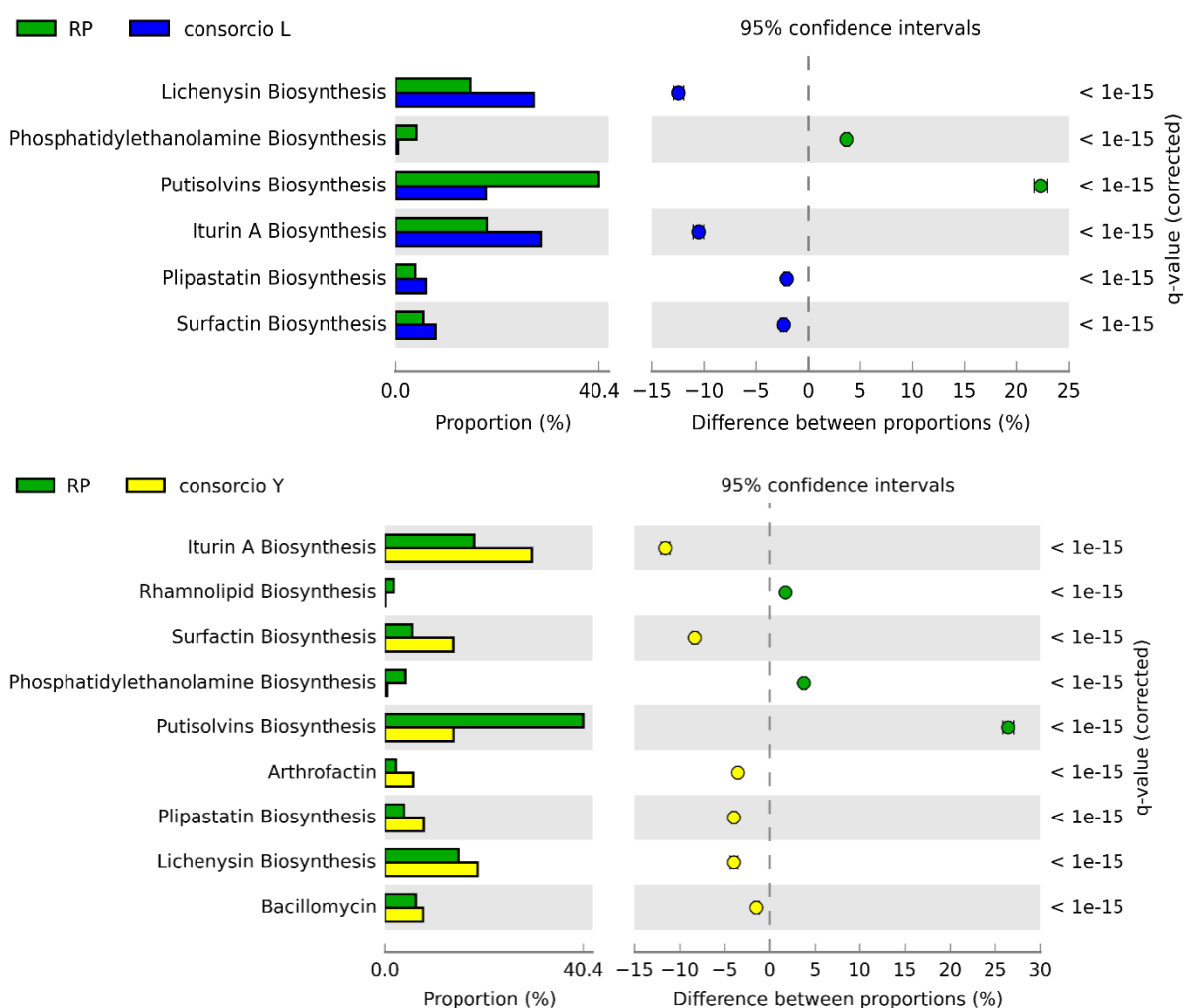
Tabela 9: Enzimas envolvidas na degradação de *p*-xileno, de *o*-xileno, *m*-xileno nos metagenomas do resíduo de perfuração e consórcios L e Y, de acordo com o BioSurfDB.

Enzimas	Número de <i>reads</i>		
	RP	Consórcio L	Consórcio Y
Xylene monooxygenase	61	104	48
Benzyl alcohol dehydrogenase	261	400	50
Benzaldehyde dehydrogenase	87	384	124
Benzoate/toluene 1,2 dioxygenase	418	453	335
1,2-dihydroxy-6-methylcyclohexa-3,5-dienecarboxylate dehydrogenase	207	126	165
Phenol hydroxylase	3863	3812	13629
2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase	171	285	302
2-hydroxyhexa-2,4-dienoate hydratase	9	3	3
2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase	25	5	53
4-oxalocrotonate tautomerase	50	91	14
4-oxalocrotonate decarboxylase	129	132	695
4-hydroxy-2-oxohexanoate aldolase	877	1341	1901

5.5 Síntese de biosurfactantes

A análise das vias de síntese de biosurfactantes demonstrou que o enriquecimento usado na obtenção dos consórcios favoreceu o predomínio de diversas vias em menor abundância no resíduo de perfuração de poços de petróleo (Figura 22).

O resíduo de perfuração apresentou condições mais favoráveis a presença de vias de biossíntese de putisolvinas, fostatidiletanolamina e ramnolipídeos. Nos consórcios L e Y, lichenisina, iturina A, *plipastin*, *arthrofactin*, *bacillomycin* e surfactina foram as vias mais abundantes (Figura 22).



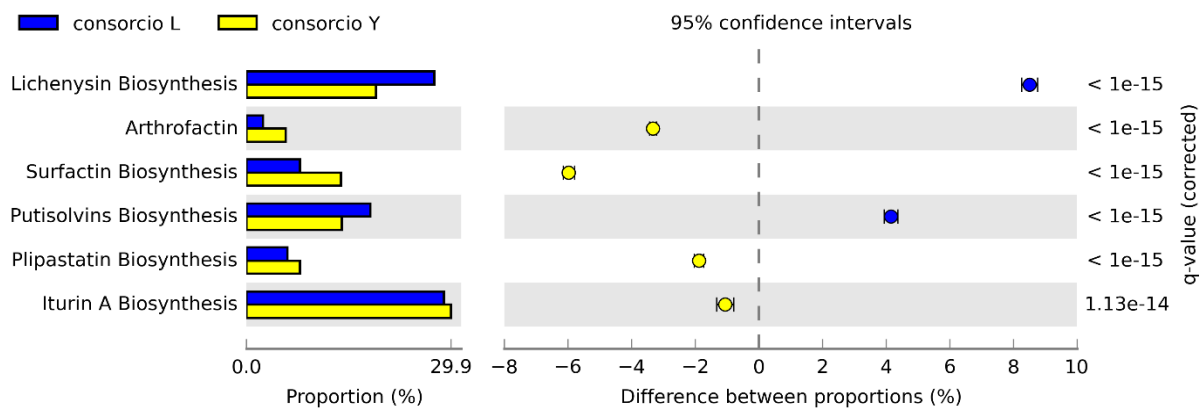


Figura 22: Perfil funcional comparativo de vias relacionadas a biossíntese de surfactantes do resíduo de perfuração de poços de petróleo (RP), consórcio L e Y, Diferenças biológicas significantes calculadas a partir do STAMP ($q < 0,05$, diferenças entre as proporções mínima de 1%).

5.6 Teste em microcosmos

A capacidade dos consórcios L e Y de retornar ao ambiente do qual foram selecionados e degradar hidrocarbonetos foi avaliada através da evolução de CO_2 e cromatografia gasosa em microcosmos. As análises da avaliação de C- CO_2 produzido durante os 77 dias de experimento são apresentadas na Figura 23. Durante esse período, observa-se que o microcosmo controle (apenas com resíduo) apresentou evolução de C- CO_2 semelhante a apresentada pelos dois consórcios ao longo de todo período estudado. Assim, através da medida da evolução de C- CO_2 não foi possível observar diferenças expressivas entre tratamentos (bioaugmentação L e Y) e controle.

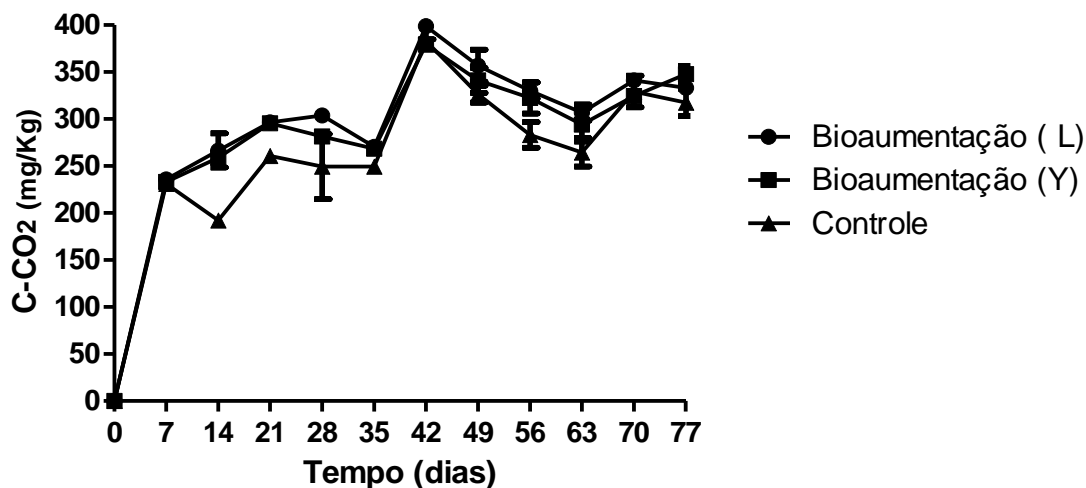


Figura 23: Produção acumulada de C-CO₂ (mg/kg de solo) ao longo de 77 dias de ensaio para os consórcios L e Y. Experimento controle = contém apenas resíduo de perfuração sem adição de microrganismos. Bioaugmentação L e Y = corresponde ao tratamento com resíduo de perfuração e adição dos consórcios L e Y, respectivamente.

Quando avaliado a remoção do total de alcanos e suas frações (C₁₄-C₃₂), por cromatografia, nos mesmos microcosmos em que foi determinada a evolução de CO₂, observa-se que apenas os consórcios L e Y foram capazes de degradar alcanos. Assim, a elevada produção de CO₂ observada na respirometria da amostra controle não refletiu a degradação de alcanos. Os consórcios L e Y removeram cerca de 66% e 30% de alcanos, respectivamente. Embora o resíduo tenha sido bastante homogeneizado antes de iniciar os experimentos, variações de coloração foram observados visualmente nos diferentes microcosmos, justificando os desvios padrões elevados (Figura 24).

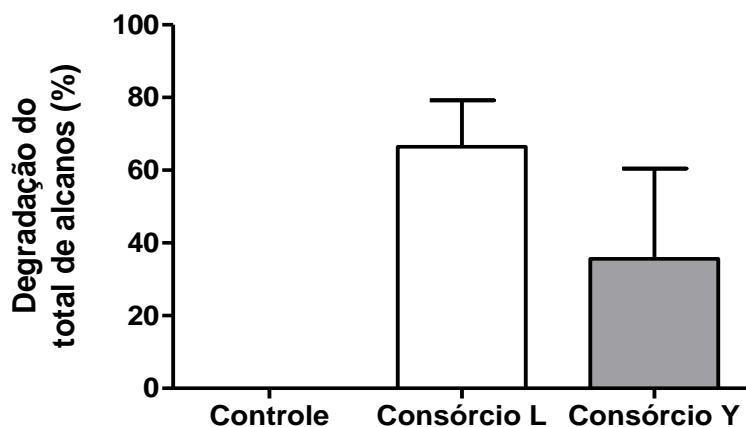


Figura 24: Percentual de degradação de alcanos totais no resíduo de perfuração após 77 dias de experimento. Experimento controle = contém apenas resíduo de perfuração sem adição de microrganismos. Bioaugmentação L e Y = corresponde ao tratamento com resíduo de perfuração e adição dos consórcios L e Y, respectivamente.

Quando analisadas as frações de alcanos, observa-se que o consórcio L removeu cerca de 70% dos alcanos de cadeias médias e longas (Figura 25), enquanto que para o consórcio Y, as maiores remoções foram observados apenas para os alcanos de cadeia longa, com remoções médias que variaram cerca de 40% (C30) a 70% (C29) (Figura 26).

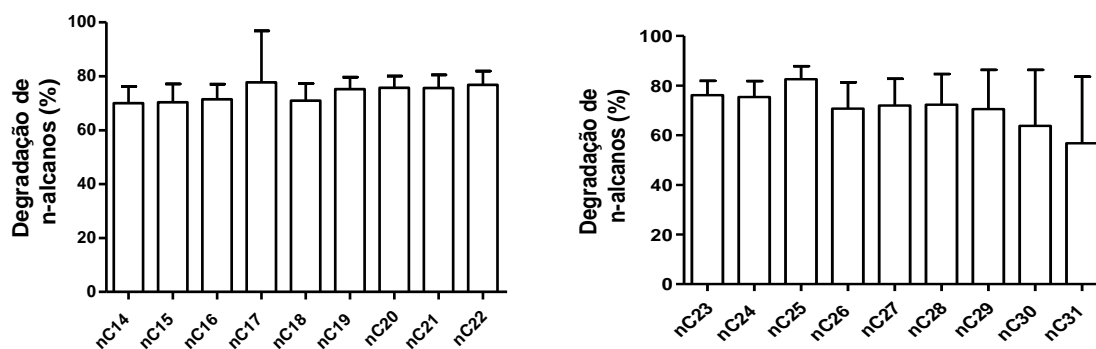


Figura 25: Percentual de degradação das frações de alcanos (C14-C31) utilizando a estratégia de bioaugmentação para o consórcio L após 77 dias de experimento.

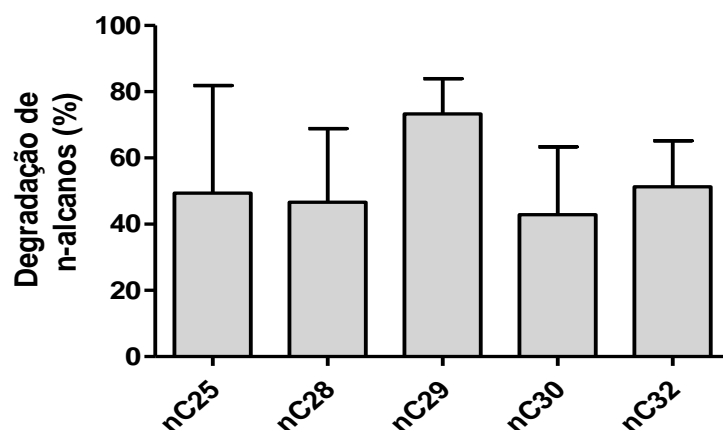


Figura 26: Percentual de degradação das frações de alcanos (C25, C28, C29, C30, C32) utilizando a estratégia de bioaugmentação para o consórcio Y após 77 dias de experimento.

5.7 Bactérias isoladas

Isolados obtidos na tentativa de validar os dados dos metagenomas dos consórcios foram sequenciados e analisados taxonomicamente, conforme apresentado a seguir. Além disso, testes de degradação de hidrocarbonetos e produção de biosurfactantes foram realizados para dois isolados e os resultados serão apresentados na sequência.

5.7.1 Análise taxonômica

Com base na análise da sequência do gene rRNA 16S, o isolado 16.1 apresentou maior identidade com espécies do gênero *Brevibacillus*; com sequências de maior semelhança para *Brevibacillus formosus* DSM 9885 (97,2%), seguido por *Brevibacillus brevis* NBRC 15304 (97,1%) e *Brevibacillus gelatini* (96,9%) (Tabela 10).

O isolado 16.3 apresentou maior identidade para *Micrococcus aloeverae* AE-6 (97,5%), *Micrococcus yunnanensis* YIM 65004 (97,4%) e *Micrococcus luteus* NCTC 2665 (97%). Conforme pode ser visto na Tabela 10, os isolados R12, A4, J5, A3 e A2 apresentaram diferentes identidades para as espécies de *Bacillus anthracis*, seguida de *Bacillus cereus* e *Bacillus wiedmannii*.

Tabela 10: Resultados do alinhamento do gene rRNA 16S dos isolados utilizando o banco de dados do EzTaxon.

Amostra	Nome da espécie	Identidade (%)
16.1	<i>Brevibacillus formosus</i>	97,2
	<i>Brevibacillus brevis</i>	97,1
	<i>Brevibacillus gelatini</i>	96,9
16.3	<i>Micrococcus aloeverae</i>	97,5
	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	97,4
	<i>Micrococcus luteus</i>	97,0
R12	<i>Bacillus anthracis</i>	98,7
	<i>Bacillus cereus</i>	98,7
	<i>Bacillus wiedmannii</i>	98,6
A4	<i>Bacillus anthracis</i>	98,0
	<i>Bacillus cereus</i>	97,9
	<i>Bacillus wiedmannii</i>	97,9
J5	<i>Bacillus anthracis</i>	98,1
	<i>Bacillus cereus</i>	98,1
	<i>Bacillus wiedmannii</i>	98,1
A3	<i>Bacillus anthracis</i>	98,0
	<i>Bacillus cereus</i>	98,0
	<i>Bacillus wiedmannii</i>	97,9
A2	<i>Bacillus anthracis</i>	97,6
	<i>Bacillus cereus</i>	97,5
	<i>Bacillus wiedmannii</i>	97,4

Na

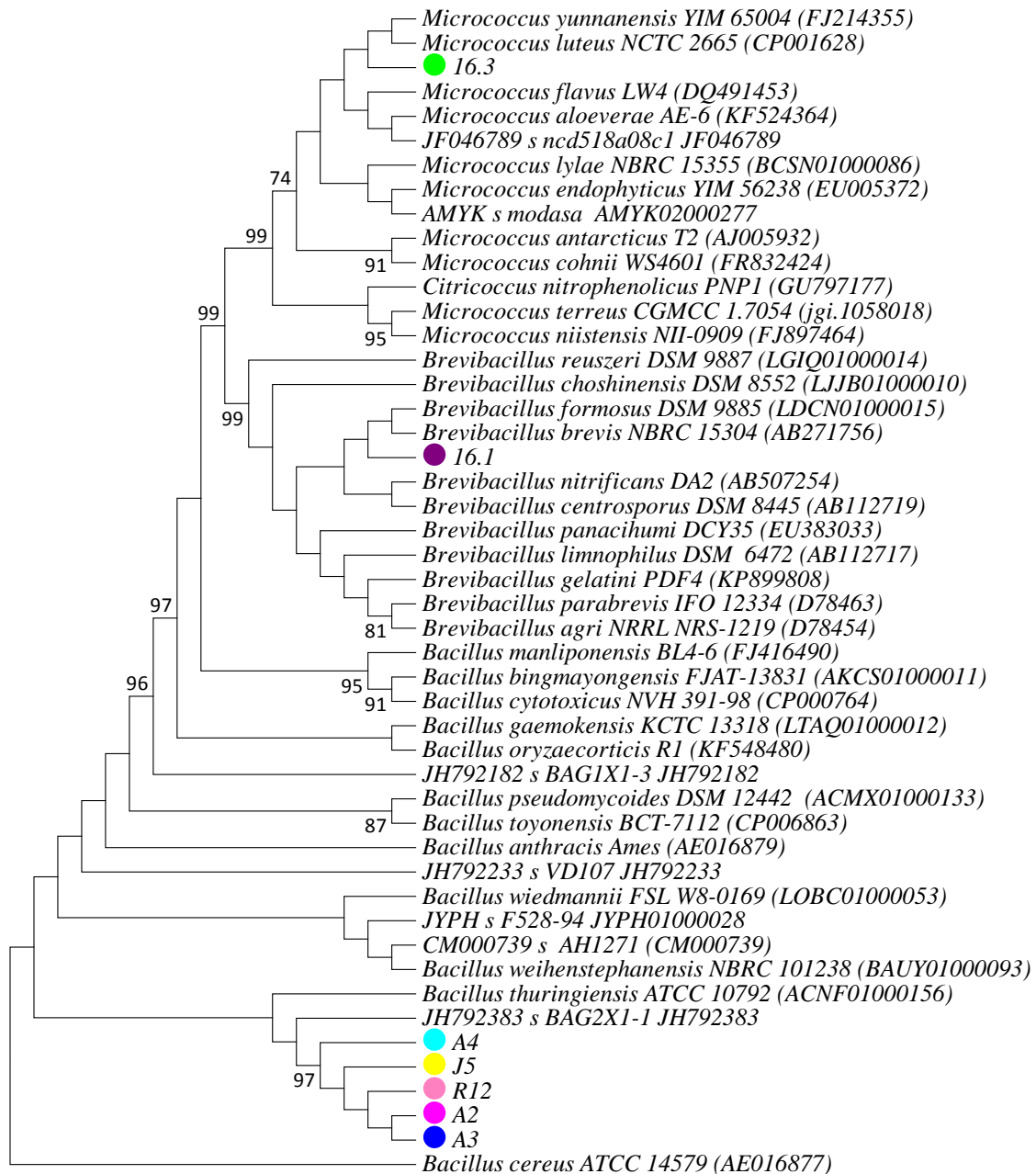


Figura 27, observa-se que a maioria dos isolados pertence ao filo *Firmicutes*, ou seja, filo mais abundante na amostra. No entanto, um isolado obtido pertence ao filo *Actinobacteria*, mostrando que nem sempre são selecionados apenas os microrganismos mais abundantes. As seqüências do rDNA 16S dos isolados sequenciados não apresentaram agrupamento consistente (valores de *bootstrap* abaixo de 70%). Desta forma, pode-se observar que o sequenciamento do rDNA 16S não foi eficiente na identificação desses isolados, sendo, portanto, necessário, estudos complementares para esclarecer quais clados pertencem tais isolados (

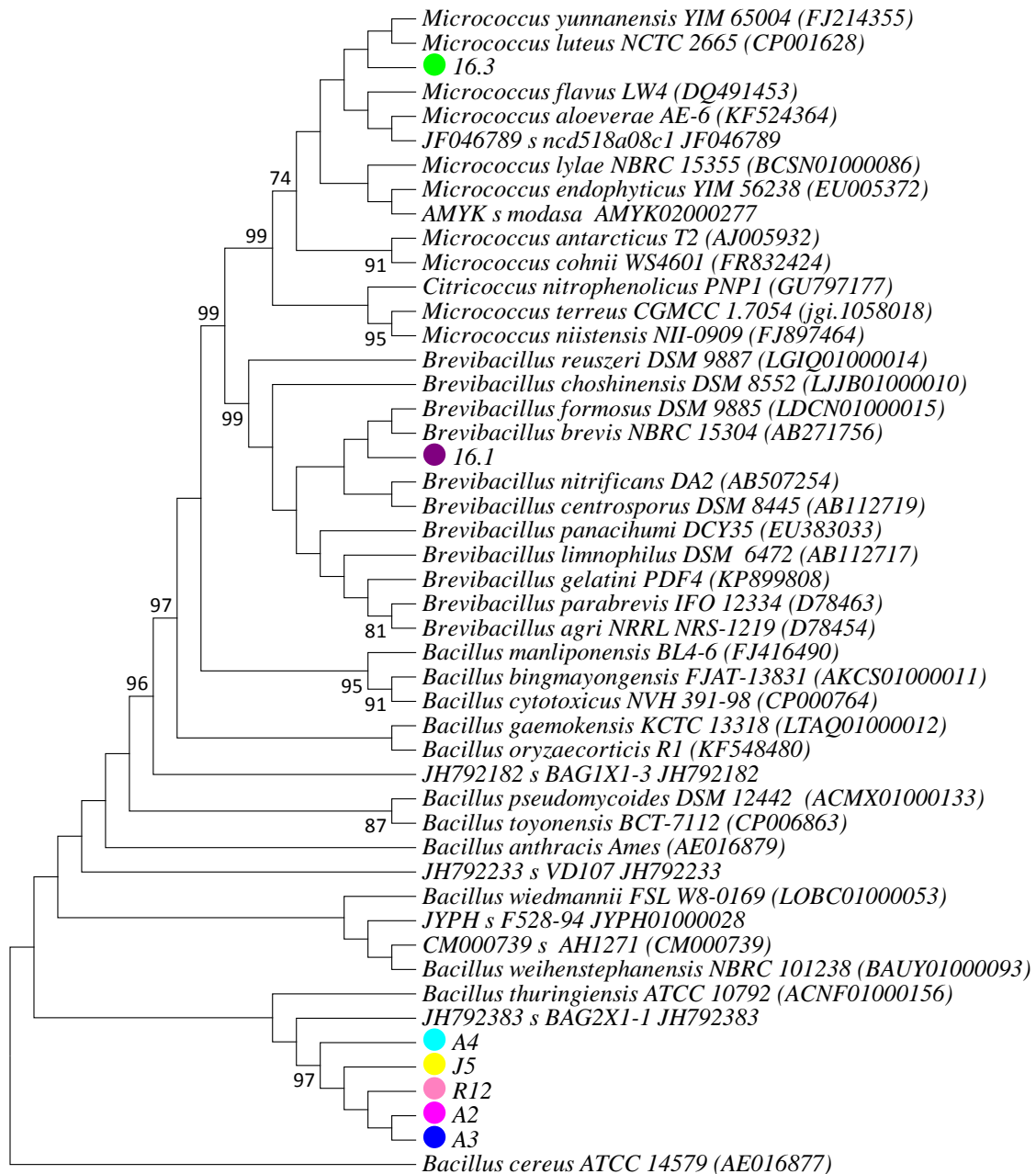


Figura 27).

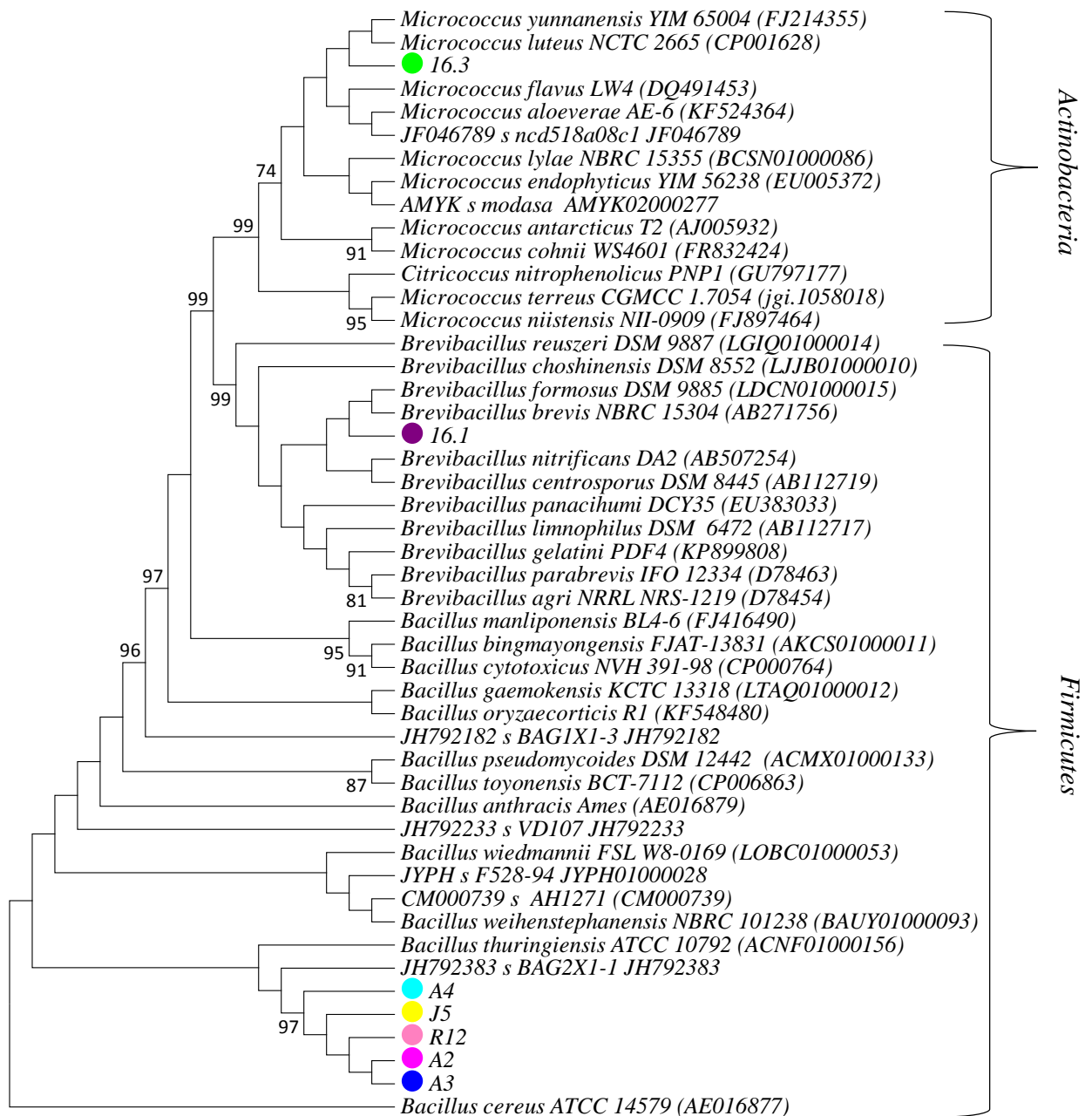


Figura 27: Cladograma resultante do alinhamento da região rDNA 16S mostrando os agrupamentos formados pelos isolados 16.1, 16.3, A2, A3, R12, J5, A4 e os microrganismos relacionados. O Cladograma foi construído utilizando o método Neighbour-Joining. Valor do Bootstrap de 1000 réplicas.

5.7.2 Análise de degradação de hidrocarbonetos

5.7.2.1 Crescimento em petróleo

Avaliação do crescimento dos isolados 16.1 e 16.3 revelou aumento do crescimento na presença de petróleo e diminuição na sua ausência, sugerindo provável utilização deste como fonte de carbono e energia (Figura 28). O isolado 16.1 após 48 horas de crescimento na presença de petróleo, encontra-se em fase estacionária, enquanto na ausência de petróleo para esse mesmo período é observado declínio na turbidez, típico da fase de morte em curvas de crescimento. O isolado 16.3, apresentou maior diferença na turbidez na presença e ausência de petróleo em 24 horas de crescimento, onde fica claro o maior crescimento quando o petróleo é utilizado. Em 48 horas, há uma convergência na densidade óptica entre os tratamentos, com diminuição da turbidez na presença de petróleo e aumento na ausência.

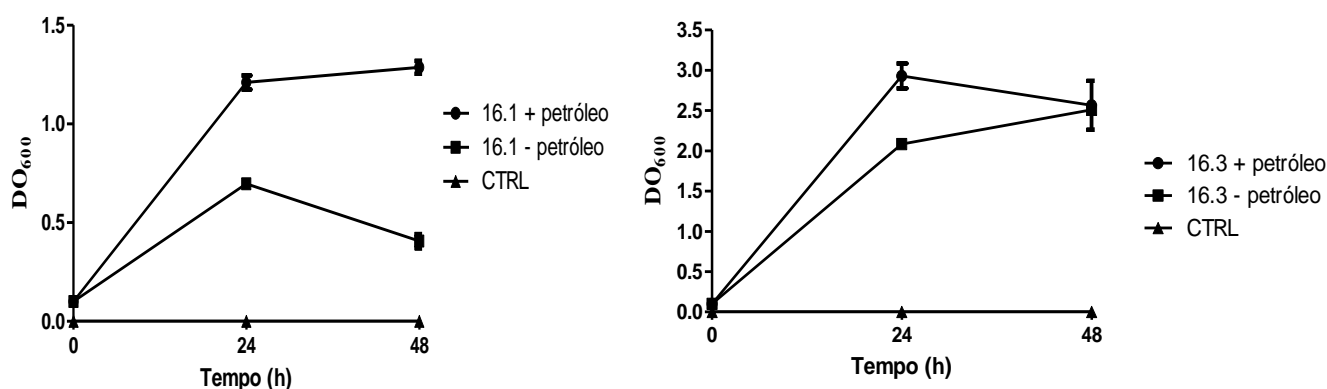


Figura 28: Crescimento do isolado 16.1 e 16.3 (DO₆₀₀) em meio BH + 0,1% de extrato de levedura com e sem petróleo.

5.7.3 Produção de biossurfactantes

O teste de emulsificação foi realizado para avaliar a produção de biossurfactantes com propriedades emulsificantes pelos isolados. Esse teste foi realizado inicialmente durante avaliação do crescimento (determinado a cada 24 horas – item 5.7.2) para avaliar a fase de maior produção. Para o isolado 16.1, a fase de maior produção de biossurfactante com propriedade emulsificante ocorreu em 48 horas de crescimento. Nesse tempo, o índice de emulsificação médio para esse isolado foi de 68%, quando o petróleo foi adicionado ao crescimento. Na ausência de petróleo (controle), o índice de emulsificação

foi reduzido para 59%. O SDS (10%), utilizado como controle, apresentou valor médio de 71% (Figura 29). O isolado 16.3 não apresentou atividade de emulsificação em nenhum dos tempos amostrados para o querosene.

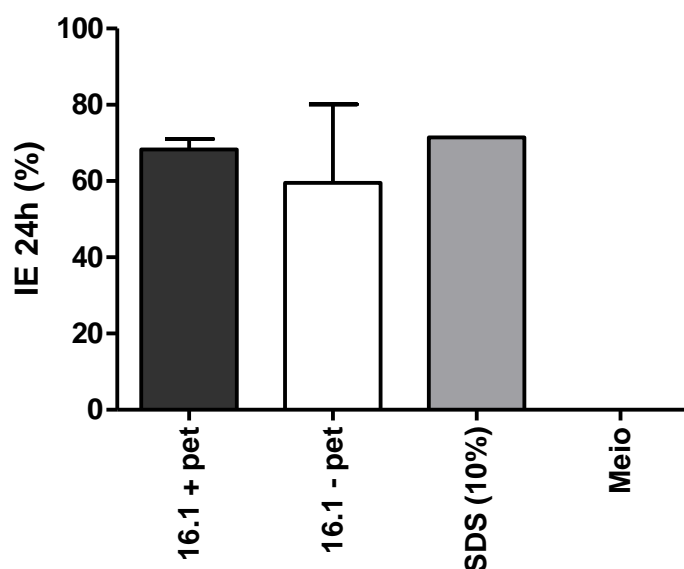


Figura 29: Crescimento do isolado 16.1 (DO600) e índice de emulsificação (IE) em meio BH + 0,1% de extrato de levedura com e sem petróleo.

5.7.4 Medida de adesão a hidrocarbonetos (BATH)

Células dos isolados 16.1 e 16.3 foram avaliadas quanto a aderência a hexadecano, diesel, querosene, xileno e tolueno. Conforme pode ser visto na Figura 30, o isolado 16.1 apresentou diferenças na aderência em função de cada substrato testado. Melhores resultados para o isolado 16.1 foram observados quando utilizado os compostos aromáticos xileno (46%) e tolueno (50%). Menores percentuais de hidrofobicidade foram obtidos para hidrocarbonetos alifáticos como hexadecano (27%) e compostos formados pela mistura de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, como diesel (17%) e querosene (22%), conforme visto na Figura 30.

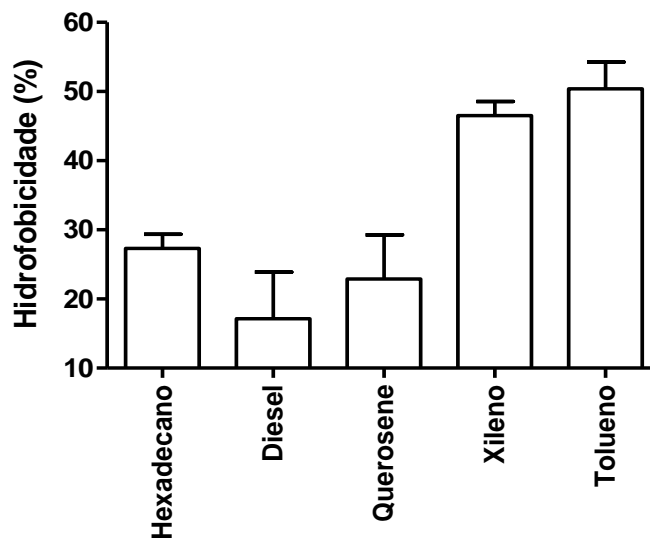


Figura 30: Hidrofobicidade celular do isolado 16.1 em relação ao hexadecano, diesel, querosene, xileno e tolueno através do método da aderência microbiana a hidrocarbonetos (BATH) após 48 horas de crescimento em meio BH com 0,1% de extrato de levedura e 1% de petróleo.

O isolado 16.3 não apresentou hidrofobicidade para hexadecano, diesel e querosene. Os compostos aos quais esse isolado apresentou hidrofobicidade foram os aromáticos, com valor médio de 38% para xileno e 35% para tolueno (Figura 31).

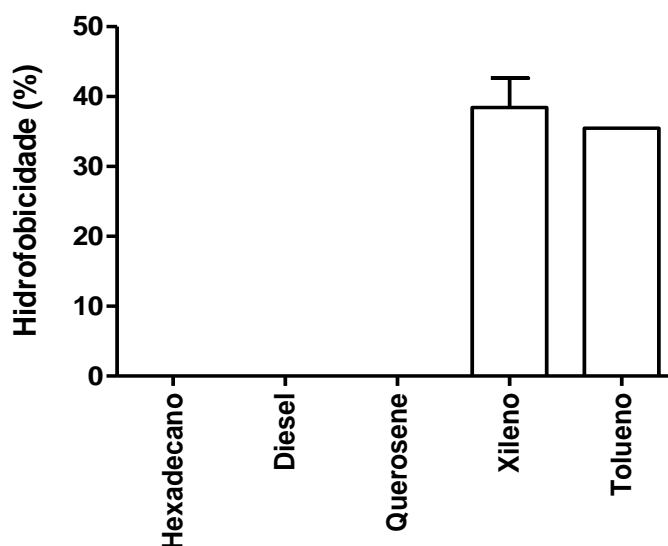


Figura 31: Hidrofobicidade celular do isolado 16.3 em relação ao hexadecano, diesel, querosene, xileno e tolueno através do método da aderência microbiana a hidrocarbonetos (BATH) após 48 horas de crescimento em meio BH com 0,1% de extrato de levedura e 1% de petróleo.

5.7.5 Dispersão do óleo

Conforme pode ser visto na Figura 32, o teste de dispersão do óleo realizado com o sobrenadante dos isolados revelou uma discreta dispersão do óleo para os isolados 16.1 e 16.3. Como o sobrenadante foi utilizado para a realização do teste, é possível que após extração desses compostos de superfície ativa ocorra formação de um halo maior. Além disso, é preciso atentar-se a mudanças nas condições de cultivo para que uma maior concentração de biossurfactantes seja produzida.

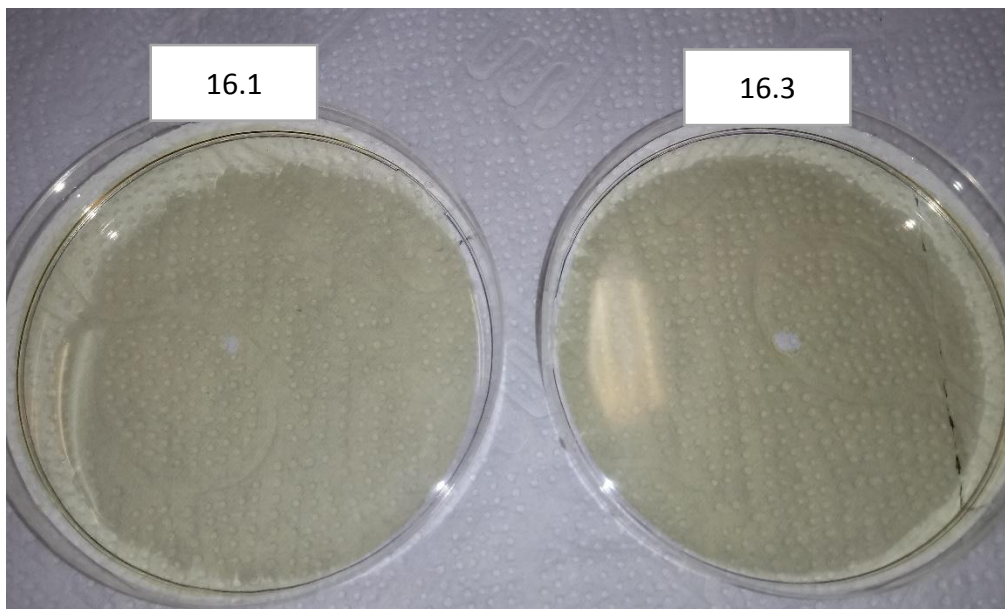


Figura 32: Teste de dispersão do óleo com sobrenadante obtido após crescimento dos consórcios isolados 16.1 e 16.3.

6. Discussão

No presente estudo dois meios de enriquecimento (LB e YPD) foram utilizados para obtenção de consórcios microbianos, a partir do resíduo de perfuração de poços de petróleo. Abordagens metagenômicas foram utilizadas para avaliar os microrganismos presentes no resíduo de perfuração e consórcios microbianos obtidos, quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes. Além disso, foram avaliados se esses consórcios refletiam a comunidade microbiana a partir da qual foram selecionados e, se ao retornarem ao ambiente, eram capazes de apresentar ou estimular à capacidade de degradação. Bactérias provenientes dos consórcios foram isoladas e avaliadas quanto à degradação e produção de biossurfactantes.

A maioria das estratégias de biorremediação utiliza microrganismos para remoção de contaminantes (WATANABE, 2001; DZIOŃEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016). Assim, o uso dessa técnica depende de uma compreensão mais profunda dos microrganismos envolvidos no processo (WATANABE, 2001; LIM; LAU; POH, 2016).

Mais de 99% dos microrganismos que existem no ambiente não podem ser facilmente cultivados (AMANN et al., 1995; HANDELSMAN et al., 1998), o que significa que para se obter uma maior estimativa da diversidade microbiana são necessárias modificações nos métodos de cultivo (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010).

Mudanças no meio de cultura, por exemplo, têm refletido em diferenças na composição e diversidade microbiana (WU et al., 2013). A análise dos consórcios selecionados no presente estudo também sugere influência do meio de enriquecimento durante a seleção. Diferenças na densidade óptica e no aspecto visual dos consórcios L e Y foram observadas durante o crescimento nos meios BH e ASW na presença do petróleo como única fonte de carbono e energia, sugerindo seleção diferencial. Por apresentar em sua composição NaCl, é possível que o meio LB tenha favorecido melhor o crescimento de microrganismos halofílicos em comparação ao meio YPD. Tal fato é sugerido inicialmente, ao se observar crescimento apenas do consórcio em L em água do mar sintética (ASW).

A presença de petróleo parece ser essencial tanto para o consórcio L como o Y, uma vez que maiores crescimentos foram alcançados ou se mantiveram na presença deste. A confirmação da utilização do petróleo e outros derivados pelos consórcios L e Y foram obtidas através da realização de testes com o acceptor artificial de elétrons 2,6- DCPIP.

Vários trabalhos confirmaram a capacidade de degradação de hidrocarbonetos de cepas microbianas através desse teste (HANSON, 1993; EL HANAFY et al., 2016; KUBOTA et al., 2008; VAN HAMME et al., 2000). Kubota e colaboradores (2008), por exemplo, observaram correspondência entre os resultados obtidos do teste 2,6- DCPIP e da cromatografia gasosa.

Um passo crítico no processo de biodegradação é o acesso dos microrganismos aos compostos hidrofóbicos do petróleo. Para superar essa limitação, a degradação de hidrocarbonetos é muitas vezes acompanhada pela produção de biossurfactantes/bioemulsificantes, compostos que atuam reduzindo a tensão superficial e interfacial e/ou emulsionando e, conseqüentemente, facilitando o acesso aos hidrocarbonetos (BANAT et al., 2010; UZOIGWE et al., 2015). Muitos autores consideram os bioemulsificantes como biossurfactantes, embora existam diferenças entre ambos. Enquanto os biossurfactantes são conhecidos pela redução da tensão interfacial e superficial, os bioemulsificantes são conhecidos por sua atividade emulsificante, entretanto, algumas moléculas podem apresentar ambas funções (UZOIGWE et al., 2015). Diversos métodos são utilizados na detecção dos biossurfactantes/bioemulsificantes durante o crescimento microbiano, tais como o índice de emulsificação, dispersão do óleo, tensão interfacial e superficial (ELLAIAH et al., 2000; HABA et al., 2000; SATPUTE et al., 2008; UZOIGWE et al., 2015).

O índice de emulsificação consiste na medida da capacidade de emulsão de uma molécula de superfície ativa (biossurfactante ou bioemulsificantes) com diferentes hidrocarbonetos (SATPUTE et al., 2008). Bosch et al. (1988) consideram cepas como boas na produção de biossurfactantes com propriedade emulsificante aquelas que formam emulsões superiores a 40%. Para Willumsen e Karlson (1997) a estabilidade de uma emulsão pode ser definida através da manutenção de pelo menos 50% do índice de emulsificação inicial após 24 horas. Além da cepa produtora, a composição e atividade emulsionante do biossurfactante depende de fatores diversos, como fonte de carbono, nitrogênio, temperatura, pH, aeração (FAKRUDDIN, 2012). No geral, fontes de carbono como petróleo, diesel, glicose, sacarose e glicerol são considerados bons substratos para produção de biossurfactantes (DESAI; BANAT, 1997).

Nesse estudo, foram observados índices de emulsificação próximos e/ou acima de 50% para o consórcio Y ao crescer em diferentes fontes de hidrocarbonetos, sugerindo produção de biossurfactantes/bioemulsificantes. O consórcio L também demonstrou atividade de emulsificação para a maioria dos hidrocarbonetos testados. No entanto,

quando utilizado o petróleo como substrato, a atividade de emulsificação apresentou-se instável e não se manteve após 24 horas. O crescimento e a produção de biossurfactantes/bioemulsificantes capaz de emulsificar a maioria dos hidrocarbonetos testados indicam que os consórcios podem ser usados na recuperação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos diversos. Além disso, estudos com diversas fontes de carbono pode ser importante para aumentar a produção desses compostos. Microrganismos, tanto isolados como na forma de consórcios, têm mostrado diferenças nos índices de emulsificação para diferentes hidrocarbonetos testados como substrato para o crescimento ou para formação da emulsão (DHASAYAN; KIRAN; SELVIN, 2014; PETER; RAO; KUMARI, 2014).

Um dos melhores métodos para detectar a presença de biossurfactantes, especialmente quando a atividade e a quantidade são baixas, é o teste de dispersão do óleo (MORIKAWA; HIRATA; IMANAKA, 2000; SATPUTE et al., 2008). Morikawa e colaboradores (2000) mostraram relações lineares entre a área deslocada pela atividade dos surfactantes em uma camada de petróleo e a quantidade de surfactante testada. Os consórcios selecionados no presente estudo apresentaram deslocamento do óleo, indicando a produção de biossurfactantes. Não foram observadas diferenças no tamanho da área deslocada para cada consórcio, sugerindo produção semelhante. Excelente deslocamento do óleo foi observado quando adicionado surfactante sintético SDS (10%). No entanto, é importante destacar que o SDS é um surfactante sintético puro e a amostra obtida dos consórcios para realização do teste consiste apenas no sobrenadante obtido após crescimento dos consórcios.

Outro método utilizado para medir a atividade de biossurfactantes é a tensão superficial/interfacial, uma vez que uma característica marcante dos biossurfactantes e que os diferencia dos bioemulsificantes é a sua capacidade em reduzir tensões interfaciais e superficiais (UZOIGWE et al., 2015). Isso ocorre devido à natureza anfifílica dos biossurfactantes aumentar a solubilidade das moléculas hidrofóbicas, reduzindo assim as tensões superficiais e interfaciais na interface óleo/água (SANTOS et al., 2016). Redução da tensão interfacial em relação ao controle foi observada ao utilizar o sobrenadante dos consórcios após crescimento, reforçando ainda mais a possível presença de biossurfactantes durante o crescimento dos consórcios em petróleo.

Muitos microrganismos isolados e descritos como degradadores eficientes não são necessariamente os melhores a se utilizar na bioaugmentação. Isso porque, em muitos casos, esses microrganismos são selecionados de outros ambientes (bioaugmentação

alóctone) e ao se deparar com novos ambientes muito complexos não conseguem sobreviver ou competir com a comunidade indígena (HOSOKAWA et al., 2009). Alguns autores defendem e recomendam o uso da bioaugmentação autóctone com consórcios microbianos ou isolados indígenas melhores adaptados aos ambientes contaminados (HOSOKAWA et al., 2009; UENO et al., 2007). No entanto, como os microrganismos selecionados nem sempre são os mesmos mais representativos do ambiente, seu desempenho tem sido questionado (STEFANI et al., 2015). Assim, estudos que avaliem mudanças na diversidade entre os microrganismos selecionados e os presentes no ambiente, e se quando inoculados no ambiente são capazes de atuar eficientemente na remoção de contaminantes, são essenciais.

Análise taxonômica do metagenoma do resíduo de perfuração e consórcio L e Y mostrou predomínio do domínio *Bacteria*. Comportamento semelhante foi observado para metagenomas de ambientes diversos, inclusive contaminados com petróleo (JOSHI et al., 2014; PACCHIONI et al., 2014; YADAV et al., 2015). O aumento na abundância do domínio *Bacteria* nos consórcios, quando comparado ao resíduo, foi associado a uso de meios de enriquecimento durante a seleção. Viñas et al. (2002) observaram aumento nas populações microbianas ao incubar consórcios indefinidos em meio de enriquecimento. Redução de *Archaea* após seleção pode estar associada ao método de seleção e à presença do petróleo. Para Röling et al. (2003) e Wang et al. (2011), a riqueza de *Archaea* parece sofrer influência negativa do petróleo, tornando-a menos abundante.

Uma possível interpretação para as elevadas proporções de sequências não classificadas, mesmo após seleção, pode ser atribuída à presença de espécies não cultivadas/novas ou não reconhecidas. Diferentes métodos de cultivo podem aumentar a proporção de microrganismos cultiváveis (VESTER; GLARING; STOUGAARD, 2015). Avanços quanto ao cultivo dessas espécies incluem cultivo com outras bactérias do mesmo ambiente (cocultura), uma vez que muitos desses microrganismos demonstraram crescer apenas na presença de outras bactérias do mesmo ambiente (STEWART, 2012; UENO et al., 2007). Assim, é possível que o método de enriquecimento e seleção utilizado no presente estudo tenha sido importante para o cultivo desses microrganismos.

A contaminação com hidrocarbonetos afeta a composição e diversidade microbiana. Amostras sem esses contaminantes têm apresentado maior diversidade quando comparado com amostras contaminadas (SUTTON et al., 2013). No entanto, é importante ressaltar que além dos contaminantes, fatores diversos como, tipos de solo, pH e matéria orgânica influenciam a composição das comunidades microbianas

(GIRVAN et al., 2003; LAUBER et al., 2009; SUTTON et al., 2013). Nesse estudo, as condições de cultivo, tais como, uso de meios ricos, petróleo, temperatura, parece ter influenciado na redução da abundância de alguns filos e favorecimento de outros, como *Firmicutes*. Com as mudanças de filos, gêneros predominantes no resíduo como *Halomonas*, *Streptomyces* e *Pseudomonas* foram substituídos em abundância por outros, como *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*, que também crescem usando hidrocarbonetos como fonte de carbono e são facilmente cultiváveis (PRINCE et al., 2010). Alguns são relatados como mais tolerantes a níveis elevados de hidrocarbonetos no solo, possivelmente em função da formação de endósporos resistentes (GHAZALI et al., 2004; MANDIC-MULEC; PROSSER, 2011).

Apesar dos métodos dependentes de cultivo serem conhecidos na literatura pela baixa recuperação da diversidade do solo, mesmo quando diferentes meios de cultura são utilizados (STEFANI et al., 2015), o tipo e as condições de seleção utilizadas nesse estudo foram importantes na manutenção dos organismos autóctones, já que os resultados mostram que cerca de 97% dos gêneros classificados e presentes no resíduo foram recuperados após enriquecimento.

É possível que a recuperação da diversidade microbiana, associada à mudanças na abundância dos microrganismos, sejam os fatores principais para a manutenção e aumento de vias relacionadas a metabolismos diversos. Maior abundância de vias relacionadas à fixação de CO₂ no consórcio Y pode justificar o crescimento desse consórcio mesmo na ausência de petróleo como fonte de carbono durante o crescimento.

Vias relacionadas à degradação de ácidos graxos e hidrocarbonetos alifáticos halogenados, como cloroalcanos e cloroalquenos, foram as mais favorecidas durante a obtenção dos consórcios. Esses haloalcanos são compostos obtidos pela substituição de pelo menos um hidrogênio da molécula de alcano por um átomo de halogênio, que nos cloroalcanos e cloroalquenos é o cloro. Por trazer uma série de riscos na água ou solo, agências reguladoras como EPA (*Environmental Protection Agency*) consideram esses compostos como poluentes prioritários (BELKIN, 1992).

A biodegradação dos haloalcanos e haloácidos é realizada através de enzimas chaves como haloalcano dealogenases (EC 3.8.1.5) e 2-haloácida dealogenase (EC:3.8.1.2), respectivamente. Ambas da família das hidrolases, que catalisam a clivagem de ligações carbono-halogênio. Haloalcanos dealogenases são uma das melhores famílias de enzimas caracterizadas que atuam sobre hidrocarbonetos halogenados e seus derivados. Por serem estáveis, fácil de manusear e apresentarem mecanismo catalítico

exclusivo, com ampla especificidade de substrato, essas enzimas são bastante pesquisadas e aplicadas, especialmente na biorremediação em função de seus substratos naturais serem compostos alifáticos e cíclicos clorados (JANSSEN, 2004). Essas enzimas foram observadas nos consórcios L e Y e anotadas para os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* e *Dietzia* principalmente. Além disso, a análise preliminar realizada para os genomas de representantes de gêneros *Paenibacillus* e *Brevibacillus*, utilizando o BiosurfDB, revelou *reads* relacionados às vias de cloroalcanos e cloroalcenos, sugerindo portanto, que esses organismos apresentam tais enzimas e estão contribuindo com o aumento da abundância nos consórcios.

Em relação às vias de síntese de biosurfactantes, também foram observadas correlações entre os microrganismos mais abundantes e suas respectivas vias de síntese predominantes. *Pseudomonas*, por exemplo, é um dos gêneros mais abundantes no resíduo e bem relatado quanto à produção de putisolvinas, fostatidiletanolamina e ramnolipídio por alguns autores. *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Brevibacillus* abundantes em ambos os consórcios, têm sido associados à produção de liquesina, iturina A, *plipastina*, *arthrofactin*, *bacillomycin* e surfactina. Além disso, gêneros observados em maior abundância nos consórcios são também conhecidos por apresentar índice de emulsificação similar aos apresentados pelos consórcios L e Y durante a degradação. Reddy et al. (2010) obtiveram um índice máximo de emulsificação de 57% para o biosurfactante produzido por uma espécie *Brevibacillus* durante a degradação do fenantreno durante 24 h. Mnif et al. (2011) obtiveram atividades emulsionantes de 49%, 55% e 67% para os biosurfactantes produzidos por *Geobacillus*, *Brevibacillus* e *Bacillus*, respectivamente. Pathak e Keharia (2014) observaram emulsão eficiente por uma mistura de lipopeptídeos cíclicos (surfactina, iturina e fengicina) produzida por *Bacillus subtilis*.

Além do conhecimento acerca dos microrganismos, o controle e otimização da biorremediação depende também das características da amostra a ser remediada (VIDALI, 2001). Nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo desempenham papéis fundamentais no crescimento microbiano e, por conseguinte, na degradação (VARJANI; UPASANI, 2017a). Proporções consideradas adequadas à degradação (100:10:1) são sugeridas por alguns autores. No entanto, não há um consenso acerca dessas proporções uma vez que valores acima ou abaixo deste tem se mostrado efetiva (CERQUEIRA, 2011). Relações abaixo dessa proporção foram observadas no resíduo a ser biorremediado. No entanto, é preciso atentar-se às quantidades excessivas de nitrogênio e fósforo, as quais têm sido relatados como prejudiciais à degradação ao aumentar a

salinidade (LEYS, 2005) e, conseqüentemente, interromper o crescimento microbiano, exceto quando os microrganismos são tolerantes (FATHEPURE, 2014).

Microrganismos halófilos ou halotolerantes foram sugeridos no resíduo de perfuração, em função da elevada salinidade apresentada, e confirmados após análise taxonômica ao evidenciar *Halomonas* e *Marinobacter* como predominantes, ambos já bem descritos na literatura quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos e necessidade de meios com elevadas concentrações de sais (DASTGHEIB et al., 2012; FATHEPURE, 2014).

Uma das maiores dificuldades na utilização de estratégias de biorremediação consiste em alcançar os bons resultados do laboratório em campo (JUHASZ; STANLEY; BRITZ, 2000). Consórcios inoculados em solos dos quais foram selecionados são descritos na literatura como mais eficazes na degradação de hidrocarbonetos do que consórcios selecionados de outros solos (WU et al., 2013). Para avaliar a degradação do solo, diversas técnicas são descritas. O método de evolução de CO₂ é frequentemente utilizado para avaliar a degradação de compostos orgânicos no solo. Para Lors e Mossmann (2004) monitorar apenas a produção de CO₂ ou o consumo de O₂ não é suficiente para avaliar a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. No presente estudo, não foi observada correlação entre produção de CO₂ e a degradação de alcanos. A evolução de CO₂ sugeriu atividade de degradação tanto para os tratamentos com os consórcios L e Y como no controle (sem adição de bactérias), sugerindo atividade dos microrganismos indígenas. No entanto, a cromatografia para alcanos não confirmou esses resultados, cuja degradação foi observada apenas ao utilizar os consórcios L e Y.

Alcanos correspondem a cerca de 50% do petróleo bruto, sendo fundamental estudos que avaliem a sua remoção (ROJO, 2009). Taxas de degradação de frações de alcanos alcançada pelo consórcio L (66%) durante 77 dias, foi semelhante à observada por Rahman et al. (2003) em amostra de solo não estéril contaminada com lama de petróleo após 56 dias. No entanto, para alcançar esses percentuais de remoção, os autores adicionaram além do consórcio bacteriano, biossurfactante (ramnolipídeo) e solução de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio). Os resultados de degradação apresentados no presente estudo são promissores uma vez que foi inoculado em amostra proveniente do resíduo de perfuração, uma microbiota que apesar de autóctone, estava em diferente abundância da observada inicialmente no ambiente. Além disso, alguns fatores que podem afetar a degradação (umidade, nutrientes) não foram controlados ou levados em consideração durante o estudo, e mesmo assim, foi observada remoção acima de 50%.

Apesar da metagenômica ser uma ferramenta fundamental nas análises taxonômicas e funcionais, o isolamento é fundamental na caracterização das propriedades específicas dos microrganismos (VARTOUKIAN et al., 2010). Além disso, alguns autores utilizam o isolamento na validação dos dados metagenômicos (JOSHI et al., 2014). Assim, isolados obtidos a partir dos consórcios foram identificados e analisados quanto à degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes visando à corroboração dos resultados obtidos.

Sequências de rDNA 16S obtidas de cepas isoladas foram analisadas e apresentaram maior identidade com os gêneros *Brevibacillus*, *Micrococcus* e *Bacillus*. Todos presentes nos consórcios L e Y, corroborando assim os dados metagenômicos obtidos. *Bacillus* e *Brevibacillus* são os gêneros mais abundantes nos consórcios L e Y, enquanto *Micrococcus*, apesar de presente, não aparece entre os mais abundantes. Para Stefani e colaboradores (2015), os microrganismos isolados nem sempre são os mais representativos do ambiente. Gênero *Brevibacillus* atualmente apresenta 22 espécies, *Micrococcus* 17 e *Bacillus* 347 espécies com nome validamente publicado (<http://www.bacterio.cict.fr/>) a maioria isolados do solo. Testes preliminares realizados para *Brevibacillus* e *Micrococcus* sugerem potencial de degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes.

Trabalhos relatando biodegradação por esses microrganismos foram descritos. A exemplo de Reddy et al. (2010) que isolaram nova cepa de *Brevibacillus* que degrada hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como antraceno e fluoreno e produz biossurfactantes com capacidade de reduzir a tensão superficial. Santhini et al. (2009) também isolaram *Micrococcus* sp do solo e observaram capacidade em degradar hidrocarbonetos e produzir biossurfactantes (SANTHINI et al., 2009). O crescimento, produção e atividade emulsificante observada para os isolados na ausência do petróleo podem estar associadas à fixação de CO₂. Sundaram e Thakur (2015) relataram fixação de CO₂ e produção de biossurfactantes por uma cepa do gênero *Bacillus*. Os autores sugerem fixação de CO₂ por essa cepa como substrato indutor a produção de biossurfactantes, embora resultados melhores tenham sido obtidos ao utilizar hexadecano. Teste específicos que comprovem essa atividade devem ser realizados para esses isolados.

Nesse contexto, os resultados desse estudo mostram que a metagenômica associada a conhecimentos do ambiente a ser remediado são fundamentais nos estudos de biorremediação, ao permitir acesso a informações taxonômicas e funcionais das comunidades microbianas conhecidas e desconhecidas, nativas e/ou selecionadas e as

condições ambientais aos quais os microrganismos serão expostos. O potencial da metagenômica em estudos de biorremediação também foram observados por Zafra *et al.* (2016), ao obter novos conhecimentos sobre o potencial metabólico de microrganismos degradadores de HPA através dessa abordagem.

O método de enriquecimento utilizado neste estudo, mostrou-se eficiente na manutenção e favorecimento de microrganismos e vias relacionadas à degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes, mesmo que em abundâncias diferentes da observada inicialmente. Para Zanaroli *et al.* (2010), a seleção de consórcios mediante enriquecimento com hidrocarbonetos também pode refletir em melhorias na biorremediação. Além disso, através desse método, foi possível manter em laboratório a maioria dos microrganismos presentes no resíduo sem a necessidade de retornar ao ambiente e isolar microrganismos de interesse.

6 Conclusão

Resíduo de perfuração apresentou microrganismos e vias relacionadas a degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes, sendo, portanto, um resíduo de grande interesse para estudos relacionados a biorremediação.

Embora a abundância dos microrganismos presentes no resíduo de perfuração tenha sido modificada após obtenção dos consórcios, estes continuaram a apresentar microrganismos e vias relacionadas a essas funções, em alguns casos, inclusive, em maior abundância. Além disso, os testes funcionais indicam que os consórcios obtidos degradam diferentes hidrocarbonetos e produzem biossurfactantes/ bioemulsificantes.

Mudanças no meio de cultivo influenciou a comunidade microbiana selecionada e consequentemente à degradação. Ao retornar ao resíduo ao qual foi selecionado (bioaumentação autóctone), o consórcio enriquecido em meio LB apresentou maior capacidade de degradação de alcanos do que o consórcios selecionado em meio YPD, deixando claro a importância de utilizar diferentes meios de cultura.

Método de enriquecimento utilizado neste trabalho foi importante na manutenção da maioria dos gêneros presentes no resíduo de perfuração. Conhecimentos da microbiota existente nos consórcios podem contribuir no direcionamento do isolamento de microrganismos específicos. Isolados obtidos visando a degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes/bioemulsificantes mostraram-se promissores para essas funções e consequente aplicação em estudos de biorremediação.

Análise metagenômica mostrou-se como uma ferramenta poderosa para os estudos de biorremediação, ao revelar microrganismos e vias relacionadas à degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes no resíduo de perfuração e consórcios obtidos.

7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107–123, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS (ABRELPE). **Panorama de Resíduos Sólidos no Brasil**. p.18-114, 2014.
- ACHTMAN, M.; WAGNER, M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 431–440, 2008.
- AL-ANSARY, M. S.; AL-TABBAA, A. Stabilisation/solidification of synthetic petroleum drill cuttings. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, n. 2, p. 410–421, 2007.
- AMANN, R. I. et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**. v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.
- AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1–18, 2016.
- BALL, A. S.; STEWART, R. J.; SCHLIEPHAKE, K. A review of the current options for the treatment and safe disposal of drill cuttings. **Waste Management & Research**, v. 30, n. 5, p. 457–473, 2012.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1–12, 1995.
- BANAT, I.M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, 87. 427, 2010.
- BANERJEE, J.; MISHRA, N.; DHAS, Y. Metagenomics: A new horizon in cancer research. **Meta Gene**, v. 5, p. 84–89, 2015.
- BAO, Y. J. et al. High-throughput metagenomic analysis of petroleum-contaminated soil microbiome reveals the versatility in xenobiotic aromatics metabolism. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 56, p. 25–35, 2017.
- BELKIN, S. Biodegradation of haloalkanes. **Biodegradation**, v. 3, n. 2-3, p. 299–313, 1992.
- BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p. 1049–1055, 2005.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 63–67, 2000.

BOSCH, M.P., et al. Surface-active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfactants Detergents**. 25 (4): 208-211, 1988.

BJORLYKKE, K., 2011. **Petroleum Geoscience: From Sedimentary Environments to Rock Physics**. Springer, New York, p.517, 2011.

CAMEOTRA, S. S.; SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, n. 3, p. 274–280, 2008.

CAMEOTRA, S.S, et al. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind, In: Sen, Ramkrishna (Eds.). **Biosurfactants**. pp. 54-64, 2010.

CERQUEIRA, V. S. **Biorremediação de borra oleosa proveniente de indústria petroquímica em microcosmos**. 2011. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e Ambiental). Instituto de Ciências Básicas e da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

CHEN, Z. et al. Supercritical water oxidation of oil-based drill cuttings. **Journal of Hazardous Materials**, v. 332, p. 205–213, 2017.

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

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. **Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Genetic Regulations of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 25, n. 1, p. 165–186, 2008.

DAS, R.; KAZY, S. K. Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: Prospects for in situ bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 12, p. 7369–7389, 2014.

DASTGHEIB, S. M. M. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 789–798, 2012.

DE ALMEIDA ANDRADE, J.; AUGUSTO, F.; FONTES JARDIM, I. C. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Ecletica Química**, v. 35, n. 3, p. 17–43, 2010.

DELLAGNEZZE, B. M. et al. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, n. 1-2, p. 191–200, 2014.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009.

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

DEVARAPALLI P., KUMAVATH, R.N. Metagenomics — A Technological Drift in Bioremediation. **Intech**. p. 73–91, 2015.

DHASAYAN, A.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Production and Characterisation of Glycolipid Biosurfactant by Halomonas sp. MB-30 for Potential Application in Enhanced oil Recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 7, p. 2571–2584, 2014.

DUDHAGARA, P. et al. Web Resources for Metagenomics Studies. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 296–303, 2015.

DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U. Natural carriers in bioremediation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 28–36, 2016.

EL HANAFY, A. A. E. M., et al. Isolation and identification of bacterial consortia responsible for degrading oil spills from the coastal area of Yanbu, Saudi Arabia. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 1, p. 69–74, 2016.

ELLAIHAH, P., et al. Production of glycolipids containing biosurfactants by Pseudomonas species. **Ind. J. Exp. Biol.** 40, 1083–1086, 2002.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; DE LEÓN, A. V. P.; SANCHEZ-FLORES, A. The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1–15, 2015.

FATHEPURE, B. Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–16, 2014.

FAKRUDDIN, M. D. Biosurfactant: Production and Application. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 03, n. 04, 2012.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 54, n. 1, p. 61–67, 2004.

GHOSAL, D., et al. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

GIRVAN, M. S. et al. Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1800–1809, 2003.

HABA E., et al. Screening and production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal Applied Microbiology** 88: 379–387, 2000.

HAGHOLLAHI, A.; FAZAEIPOOR, M. H.; SCHAFFIE, M. The effect of soil type on

the bioremediation of petroleum contaminated soils. **Journal of environmental management**, v. 180, p. 197–201, 2016.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 195–195, 2005.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.

HASSAN, H.F. et al. Potential uses of petroleum-contaminated soil in highway construction. **Construction and Building Materials**. 19, 646–652, 2005.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 1, p. 745–748, 1993.

HENNE, A. et al. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4- hydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3901–3907, 1999.

HOFF, R. Z. Bioremediation - an Overview of Its Development and Use for Oil-Spill Cleanup. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, n. 9, p. 476–481, 1993.

HOLLIGER, C. et al. Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: Organic contaminants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3-4, p. 517–523, 1997.

HOSOKAWA, R. et al. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1519–1528, 2009.

HUSON, D. et al. MEGAN analysis of metagenome data. **Genome Research**., v. 17, p. 377–386, 2007.

IWAMOTO, T.; NASU, M. Current bioremediation practice and perspective. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 1–8, 2001.

INSTITUTO DE PESQUISA APLICADA (IPEA). **Diagnóstico da Situação Atual dos Resíduos Sólidos das Atividades de Exploração e Produção de Petróleo e Gás Natural nas Bacias Sedimentares Marítimas do Brasil**, 2012.

JACKSON, S. A. et al. Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, n. Figure 2, p. 176–182, 2015.

JANSSEN, D. B. Evolving haloalkane dehalogenases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 2, p. 150–159, 2004.

JOSHI, M. N. et al. Metagenomics of petroleum muck: revealing microbial diversity and depicting microbial syntrophy. **Archives of Microbiology**, p. 531–544, 2014.

JOY, S.; RAHMAN, P. K. S. M.; SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and

- hydrocarbon contaminated environments. **Chemical Engineering Journal**, v. 317, p. 232–241, 2017.
- JUHASZ, A. L.; STANLEY, G. A.; BRITZ, M. L. Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacterial consortium: Effects on microtox and mutagenicity bioassays. **Bioremediation Journal**, v. 4, n. 4, p. 271–283, 2000.
- JÜNEMANN, S. et al. Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. **Journal of Biotechnology**, v. 261, p. 10–23, 2017.
- JÚNIOR, I. P. et al. Microwave drying remediation of petroleum-contaminated drill cuttings. **Journal of Environmental Management**, v. 196, p. 659–665, 2017.
- KALAI-GRAMI, L. et al. Production and identification of iturin A lipopeptide from *Bacillus methylotrophicus* TEB1 for control of *Phoma tracheiphila*. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 8, p. 864–871, 2016.
- KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. **Journal Bacteriology** 182, 2059–2067, 2000.
- KENNEDY, J. et al. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 787–799, 2011.
- KIMURA, N. Metagenomic approaches to understanding phylogenetic diversity in quorum sensing. **Virulence**, v. 5, n. 3, p. 433–442, 2014.
- KUBOTA, K. et al. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, v. 19, n. 5, p. 749–757, 2008.
- LADINO-ORJUELA, G. et al. Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In: VOOGE, W. P. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 237, p.105–121, 2016.
- LAUBER, C. L. et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111–5120, 2009.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 3, p. 305–315, 1990.
- LEONARD, S. A.; STEGEMANN, J. A. Stabilization/solidification of petroleum drill cuttings: Leaching studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, n. 1-3, p. 484–491, 2010.
- LEYS, N. Influence of the Carbon / Nitrogen / Phosphorus Ratio on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in Soil. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 66, p. 726–736, 2005.
- LIM, M. W.; LAU, E. V; POH, P. E. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 1, p. 14–45, 2016.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature**, v. 3, p. 510–516, 2005.

LORS, C.; MOSSMANN, J. R. Contribution of microcosm and respirometric experiments to PAHs' intrinsic biodegradation in the soil of a former coke site. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 24, n. 2, p. 91–105, 2004.

LOVLEY, D. R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 35–44, 2003.

MANDIC-MULEC, I.; PROSSER J, I. Diversity of endospore-forming bacteria in soil: characterization and driving mechanisms. In: LOGAN N.A, DE VOS, P (Ed). **Endospore-forming soil bacteria**. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2011. p. 31–59.

MARTINS, L. F.; PEIXOTO, R. S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 865–872, 2012.

MNIF, S. et al. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 525–536, 2011.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure & function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 211–218, 2000.

MOSTAVI, E.; ASADI, S.; UGOCHUKWU, E. Feasibility Study of the Potential Use of Drill Cuttings in Concrete. **Procedia Engineering**, v. 118, n. 2, p. 1015–1023, 2015.

NIE, Y. et al. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. **Scientific reports**, v. 4, p. 4968, 2014.

NITSCHKE, M.; PASTORE, M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química nova**. v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

OLGA, P. et al. Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 74, n. 2-3, p. 110–113, 2008.

OLIVEIRA, J. S. et al. BioSurfDB: Knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. **Database**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

PACCHIONI, R. G., et al. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. **Microbiology Open**, v. 3, n. 3, p. 299–315, 2014.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633–654, 2011.

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 715–721, 2010.

- PATHAK, K. V.; KEHARIA, H. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis K1* isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). **3 Biotech**, v. 4, n. 1, p. 41–48, 2014.
- PAWAR, R. M. The Effect of Soil pH on Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS). **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 06, n. 03, 2015.
- PETER, J.; RAO, A.; KUMARI, R. Consortium based Biosurfactant development for degradation and emulsification of oils and Petroleum Hydrocarbons. **International Journal of Engineering and Computer Science**. v. 3, n. 6, p. 6476–6490, 2014.
- PUSHPANATHAN, M. et al. Microbial Bioremediation: A Metagenomic Approach. In: DAS, S. (Ed). **Microbial Biodegradation and Bioremediation**, p. 407-419, 2014.
- PRINCE, et al. Prokaryotic hydrocarbon degraders, In: Timmis, K. N. et al. (Eds.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. p. 1669–1692, 2010.
- RAHMAN, K. S. M. et al. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 2, p. 159–168, 2003.
- REDDY, M. S. et al. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus sp.* **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7980–7983, 2010.
- RIPA, M. et al. The relevance of site-specific data in Life Cycle Assessment (LCA). The case of the municipal solid waste management in the metropolitan city of Naples (Italy). **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 445–460, 2017.
- ROCHA, S. D. F., et al. Aspectos do coprocessamento de resíduos em fornos de clínquer. **Eng Saint Ambient**, v. 16, n. 31, p. 1–10, 2011.
- ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria: Minireview. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2477–2490, 2009.
- ROJO, F.. Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes, In: Timmis, K. N. et al. (Eds.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. p. 792-793, 2010.
- RÖLING, W. F. M.; HEAD, I. M.; LARTER, S. R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: Perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 321–328, 2003.
- SAFDARI, M. S. et al. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 342, p. 270–278, 2018.
- SATPUTE, S. K., et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010.
- SANTHINI, K. et al. Screening of Micrococcus Sp from Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation. **Botany Research International**, v. 2, n. 4, p. 248–252,

2009.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.

SEO, J. S.; KEUM, Y. S.; LI, Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.6, p.278-309, 2009.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: Past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153–1161, 2011.

SOREK, R.; COSSART, P. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 9–16, 2010.

STEFANI, F. O. P. et al. Culture-dependent and -independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.

STEWART, E. J. Growing unculturable bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4151–4160, 2012.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics - The key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492–498, 2004.

SU, C. et al. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 993–1003, 2012.

SUNDARAM, S., THAKUR, I.S. Biosurfactant production by a CO₂ sequestering Bacillus sp. strain SS105. **Bioresource Technology**. 188, 247-250, 2015.

SUTTON, N. B. et al. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 619–630, 2013.

TECHTMANN, S. M.; HAZEN, T. C. Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 10, p. 1345–1354, 2016.

THIES, S. et al. Metagenomic discovery of novel enzymes and biosurfactants in a slaughterhouse biofilm microbial community. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–12, 2016.

TONGARUN, R.; LUEPROMCHAI, E.; VANGNAI, A. S. Natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation in 4-chloroaniline-contaminated soil. **Current Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 182–188, 2008.

THOMAS, J.E. **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**. Rio de Janeiro. Interciência. p. 55-119, 2001.

TUNCAN, A. Use of petroleum-contaminated drilling wastes as sub-base material for road construction. **Waste Management and Research**. v.18, p. 489–505, 2000.

UENO, A. et al. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 23, 1739–1745, 2007.

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–6, 2015.

VAN HAMME, J.D, SINGH A, WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p.503–549, 2003.

VAN HAMME, J.D, ODUMERU, J.A, WARD, O.P. Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. **Canadian Journal of Microbiology**, 46:441–450, 2000.

VIRAMONTES-RAMOS, S., et al. Selection of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. **Brazilian Journal Microbiology**, 41, 668–675, 2010.

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

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 389–397, 2017b.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 1, p. 1–7, 2010.

VASCONCELLOS, S. P. et al. Reprint of: Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. **Organic Geochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1067–1073, 2010.

VAZ-MOREIRA, I. et al. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: A case study in a freshwater sample. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 245–257, 2011.

VESTER, J. K.; GLARING, M. A.; STOUGAARD, P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 17–29, 2015.

VIDALI, M. Bioremediation . An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.

VIÑAS, M. et al. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 252–260, 2002.

WANG, W.; SHAO, Z. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013.

WANG, X. et al. Archaeal community structure along a gradient of petroleum contamination in saline-alkali soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 11, p. 1858–1864, 2011.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 237–241, 2001.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415–423, 1997.

WILES, C.C. A review of solidification/stabilization technology. **Journal Hazardous Materials**, 14: 5– 21, 1987.

WU, M. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 152–158, 2013.

YADAV, T. C. et al. Comparative metagenomics demonstrating different degradative capacity of activated biomass treating hydrocarbon contaminated wastewater. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 24–32, 2015.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Obligate oil-degrading marine bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 257–266, 2007.

YU, K.S.H, et al. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v.51, p. 1071–1077, 2005.

8 Anexos

Environ Pollut. 2018 Jan 16;235:869-880. doi: 10.1016/j.envpol.2018.01.014. [Epub ahead of print]

Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation.

Guerra AB¹, Oliveira JS², Silva-Portela RCB¹, Araújo W¹, Carlos AC¹, Vasconcelos ATR³, Freitas AT⁴, Domingos YS⁵, de Farias ME⁵, Fernandes GJT⁶, Agnez-Lima LF⁷.

Author information

Abstract

Drill cuttings leave behind thousands of tons of residues without adequate treatment, generating a large environmental liability. Therefore knowledge about the microbial community of drilling residue may be useful for developing bioremediation strategies. In this work, samples of drilling residue were enriched in different culture media in the presence of petroleum, aiming to select potentially oil-degrading bacteria and biosurfactant producers. Total DNA was extracted directly from the drill cutting samples and from two enriched consortia and sequenced using the Ion Torrent platform. Taxonomic analysis revealed the predominance of Proteobacteria in the metagenome from the drill cuttings, while Firmicutes was enriched in consortia samples. Functional analysis using the Biosurfactants and Biodegradation Database (BioSurfDB) revealed a similar pattern among the three samples regarding hydrocarbon degradation and biosurfactants production pathways. However, some statistical differences were observed between samples. Namely, the pathways related to the degradation of fatty acids, chloroalkanes, and chloroalkanes were enriched in consortia samples. The degradation colorimetric assay using dichlorophenolindophenol as an indicator was positive for several hydrocarbon substrates. The consortia were also able to produce biosurfactants, with biosynthesis of iturin, lichenysin, and surfactin among the more abundant pathways. A microcosms assay followed by gas chromatography analysis showed the efficacy of the consortia in degrading alkanes, as we observed a reduction of around 66% and 30% for each consortium in total alkanes. These data suggest the potential use of these consortia in the bioremediation of drilling residue based on autochthonous bioaugmentation.

KEYWORDS: Biodegradation; Biosurfactants; Drill cuttings; Metagenome; Microbial consortium

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Biogeographical distribution analysis of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing genes suggests that near-equatorial biomes have higher abundance of genes with potential for bioremediation

Jorge S. Oliveira^{1,2,3*†}, Wydemberg J. Araújo^{1,3†}, Ricardo M. Figueiredo², Rita C. B. Silva-Portela¹,
Alaine de Brito Guerra¹, Sinara Carla da Silva Araújo¹, Carolina Minnicelli¹, Aline Cardoso Carlos¹,
Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos³, Ana Teresa Freitas² and Lucymara F. Agnez-Lima¹

Abstract

Background: Bacterial and Archaeal communities have a complex, symbiotic role in crude oil bioremediation. Their biosurfactants and degradation enzymes have been in the spotlight, mainly due to the awareness of ecosystem pollution caused by crude oil accidents and their use. Initially, the scientific community studied the role of individual microbial species by characterizing and optimizing their biosurfactant and oil degradation genes, studying their individual distribution. However, with the advances in genomics, in particular with the use of New-Generation-Sequencing and Metagenomics, it is now possible to have a macro view of the complex pathways related to the symbiotic degradation of hydrocarbons and surfactant production. It is now possible, although more challenging, to obtain the DNA information of an entire microbial community before automatically characterizing it. By characterizing and understanding the interconnected role of microorganisms and the role of degradation and biosurfactant genes in an ecosystem, it becomes possible to develop new biotechnological approaches for bioremediation use. This paper analyzes 46 different metagenome samples, spanning 20 biomes from different geographies obtained from different research projects.

Results: A metagenomics bioinformatics pipeline, focused on the biodegradation and biosurfactant-production pathways, genes and organisms, was applied. Our main results show that: (1) surfactation and degradation are correlated events, and therefore should be studied together; (2) terrestrial biomes present more degradation genes, especially cyclic compounds, and less surfactation genes, when compared to water biomes; and (3) latitude has a significant influence on the diversity of genes involved in biodegradation and biosurfactant production. This suggests that microbiomes found near the equator are richer in genes that have a role in these processes and thus have a higher biotechnological potential.

(Continued on next page)

* Correspondence: oliveira.jorge.88@gmail.com

†Equal contributors

¹Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

²INESC-ID/IST Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores/Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Rua Alves Redol, 9, 1000-029 Lisbon, Portugal

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Original article

BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies

Jorge S. Oliveira¹, Wydemberg Araújo², Ana Isabela Lopes Sales²,
Alaine de Brito Guerra², Sinara Carla da Silva Araújo²,
Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos³, Lucymara F. Agnez-Lima² and
Ana Teresa Freitas^{1,*}

¹INESC-ID/IST-Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores/Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Rua Alves Redol 9, 1000-029 Lisboa, Portugal, ²Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil and ³Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, RJ, Brazil

*Corresponding author: Tel: +351 21 3100384; Fax: +351 21 3145843; Email: ana.freitas@tecnico.ulisboa.pt

Citation details: Oliveira,J.S., Araújo,W., Lopes Sales,A.I., *et al.* BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. *Database* (2015) Vol. 2015: article ID bav033; doi:10.1093/database/bav033

Received 24 November 2014; Revised 22 February 2015; Accepted 13 March 2015

Abstract

Crude oil extraction, transportation and use provoke the contamination of countless ecosystems. Therefore, bioremediation through surfactants mobilization or biodegradation is an important subject, both economically and environmentally. Bioremediation research had a great boost with the recent advances in Metagenomics, as it enabled the sequencing of uncultured microorganisms providing new insights on surfactant-producing and/or oil-degrading bacteria. Many research studies are making available genomic data from unknown organisms obtained from metagenomics analysis of oil-contaminated environmental samples. These new datasets are presently demanding the development of new tools and data repositories tailored for the biological analysis in a context of bioremediation data analysis. This work presents BioSurfDB, www.biosurfdb.org, a curated relational information system integrating data from: (i) metagenomes; (ii) organisms; (iii) biodegradation relevant genes; proteins and their metabolic pathways; (iv) bioremediation experiments results, with specific pollutants treatment efficiencies by surfactant producing organisms; and (v) a biosurfactant-curated list, grouped by producing organism, surfactant name, class and reference. The main goal of this repository is to gather information on the characterization of biological compounds and mechanisms involved in biosurfactant production and/or biodegradation and make it available in a



ENCONTRO DE BIOTECNOLOGIA DO NORDESTE

CERTIFICADO

A Rede Nordeste de Biotecnologia certifica que

Alaine de Brito Guerra

recebeu o prêmio de melhor trabalho na categoria "Apresentação Oral" da pós-graduação na área indústria no Encontro de Biotecnologia do Nordeste - RENORBIO 2017, realizado em Natal-RN, de 08 a 11 de agosto de 2017. Com o trabalho: "Obtenção de consórcios microbianos relacionados a degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes".


LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ LIMA
Coordenadora Geral do Programa RENORBIO


MITERMAYER GALVÃO DOS REIS
Coordenador Executivo da Rede RENORBIO

Para validar este certificado acesse o link <http://www.renorbio.org/congressorenorbio2017/index.php?class=validarcertificado> e informe o código 116263



Certificado

Certificamos o trabalho intitulado:


BioSurfDB : Knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies

Jorge Oliveira, Wydemberg Araújo, Sinara Araújo, Ana Sales, Alaine Guerra, Ana Vasconcelos, Lucymara Agnez-Lima, Ana Freitas.

Concorreu no prêmio de melhores cartazes científicos, realizado durante a **XII Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq** e **5th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology**, realizada em Natal, Rio Grande do Norte, no período de 1 a 3 de dezembro de 2014, e recebeu **menção honrosa** pela apresentação.

Natal, 3 de dezembro de 2014


Hugo Alexandre Oliveira Rocha
Presidente da Comissão Organizadora


Prof. Dr. Jerson Lima da Silva
Presidente da SBBq



Sociedade Brasileira de Bioquímica
Biologia Molecular – SBBq