

Isabela Vieira Montenegro Delmas

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES E
DEGRADADORAS DE PETRÓLEO DE SOLOS SALINOS**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2022**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Lucy Seldin e coorientação do Dr. Luciano Procópio.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

D359i Delmas, Isabela Vieira Montenegro
ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
BIOSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES E DEGRADADORAS
DE PETRÓLEO DE SOLOS SALINOS / Isabela Vieira
Montenegro Delmas. -- Rio de Janeiro, 2022.
36 f.

Orientadora: Lucy Seldin.
Coorientador: Luciano Procópio.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Biossurfactante. 2. Bioemulsificante. 3.
Bactérias halófilas ou halotolerantes. 4. Solos
salinos. 5. Biotecnologia. I. Seldin, Lucy, orient.
II. Procópio, Luciano, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Isabela Vieira Montenegro Delmas**

DRE: 119050534

BANCA EXAMINADORA: Prof. Diogo Jurelevicius (Presidente)

Dra. Carolina Reis Guimarães

M.Sc. Karen Caroline Ferreira Santaren

Prof. Mateus Gomes de Godoy (Suplente)

Título da Monografia: **“Isolamento de bactérias produtoras de biosurfactantes/bioemulsificantes e degradadoras de petróleo de solos salinos”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/wxf-heut-ren>

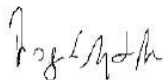
Data e hora de início: **21 de dezembro de 2022 às 13:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **7,5** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 21.... de .dezembro..... de 2022.

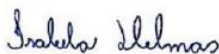
NOTA	Banca Examinadora:
<u>7,5</u>	Prof. Diogo Jurelevicius
<u>7,5</u>	Dra. Carolina Reis Guimarães
<u>7,5</u>	M.Sc. Karen Caroline Ferreira Santaren
_____	Prof. Mateus Gomes de Godoy

Presidente da banca



Prof. Diogo Jurelevicius

Aluno:



Isabela Vieira Montenegro Delmas

Orientador:



Prof. Lucy Seldin / Coorientador: Dr. Luciano Procópio

Coordenador
de TCC



Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

RESUMO

ISABELA VIEIRA MONTENEGRO DELMAS

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES E DEGRADADORAS DE PETRÓLEO DE SOLOS SALINOS

Orientadora: Lucy Seldin

Coorientador: Luciano Procópio

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O solo é um recurso natural essencial para a vida na Terra. Entretanto, a poluição resultante de derramamentos de petróleo é frequente e atinge solos de diferentes ecossistemas, trazendo diversas consequências negativas para inúmeras formas de vida. Na tentativa de minimizar esse problema, ao longo dos anos, foram desenvolvidas diversas técnicas de remediação de áreas contaminadas por petróleo a fim de diminuir os impactos ambientais desse poluente. O tratamento da poluição pelo petróleo no solo pode ser feito a partir de métodos químicos, físicos ou biológicos. Nos últimos anos, técnicas de biorremediação empregando microrganismos ou seus produtos, tais como biossurfactantes e/ou bioemulsificantes, mostram-se promissoras, inclusive na remediação de ambientes extremos, como os solos salinos. O atual projeto teve como objetivo principal isolar e identificar estirpes bacterianas halofílicas ou halotolerantes produtoras de biossurfactantes e/ou bioemulsificantes e degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo. Para tal finalidade, foram isoladas aproximadamente 500 colônias bacterianas de solo salino no município de Cabo Frio – Rio de Janeiro (RJ) em meio Tryptic Soy Broth (TSB) contendo 1,2% ágar e 5% de NaCl. Estas foram posteriormente crescidas em diferentes concentrações de NaCl (6, 8, 10, 12 e 15%) e 12 estirpes foram então selecionadas. Estas estirpes foram testadas quanto a sua capacidade de emulsificação utilizando-se n-hexadecano e

diesel na presença de concentrações crescentes de NaCl. Dessas 12 estirpes, oito apresentaram índice de emulsificação acima de 50% em pelo menos um dos hidrocarbonetos testados. Posteriormente, verificou-se que cinco destas bactérias apresentaram a capacidade de crescer na presença de hexadecano como única fonte de carbono. Essas estirpes foram selecionadas e identificadas como pertencentes aos gêneros *Halomonas*, *Planococcus* e *Oceanobacillus*. Portanto, estas cinco estirpes apresentam potencial para serem aplicadas em processos de biorremediação, especialmente de solos salinos contaminados por petróleo.

Palavras-chave: biossurfactantes; bioemulsificantes; bactérias halófilas ou halotolerantes; solos salinos; biotecnologia; petróleo

ABSTRACT

ISABELA VIEIRA MONTENEGRO DELMAS

ISOLATION OF BIOSURFACTANT/BIOEMULSIFIER-PRODUCING AND OIL DEGRADING BACTERIAL STRAINS FROM SALINE SOILS

Orientadora: Lucy Seldin

Coorientador: Luciano Procópio

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Soil is a natural resource that is essential for life on Earth. However, pollution resulting from oil spills is frequent and affects soils of different ecosystems, bringing several negative consequences for numerous forms of life. In an attempt to minimize this problem, over the years several techniques have been developed to remediate areas contaminated with oil in order to reduce the environmental impacts of this pollutant. The treatment of oil pollution in the soil can be done through chemical, physical or biological methods. In recent years, bioremediation techniques employing microorganisms or their products, such as biosurfactants and/or bioemulsifiers, have shown to be promising in the remediation of extreme environments, including saline soils. The main objective of the current project was to isolate and identify halophilic or halotolerant bacterial strains that produce biosurfactants and/or bioemulsifiers and degrade petroleum hydrocarbons. For this purpose, approximately 500 bacterial colonies were isolated from saline soil in the municipality of Cabo Frio - Rio de Janeiro (RJ) in Tryptic Soy Broth (TSB) medium containing 1.2% agar and 5% NaCl. They were further tested for growth in different concentrations of NaCl (6, 8, 10, 12 and 15%) and 12 strains were selected. These strains were tested for their emulsification ability using n-hexadecane and diesel in the presence of increasing concentrations of NaCl. Of these 12 strains, eight showed an emulsification index

above 50% in at least one of the hydrocarbons tested. Five of these bacteria showed the ability to grow in the presence of hexadecane as the sole carbon source. These strains were identified as belonging to the genera *Halomonas*, *Planococcus*, and *Oceanobacillus*. Therefore, these five strains present potential to be applied in bioremediation processes, especially of saline soils contaminated by oil.

Keywords: biosurfactants; bioemulsifiers; halophilic and halotolerant bacteria; saline soils; biotechnology; oil

RESUMO PARA LEIGOS

ISABELA VIEIRA MONTENEGRO DELMAS

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES E DEGRADADORAS DE PETRÓLEO DE SOLOS SALINOS

Orientadora: Lucy Seldin

Coorientador: Luciano Procópio

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O solo é muito importante para a vida no planeta Terra. Entretanto, a poluição causada pelo derramamento de petróleo é muito comum e afeta solos de diferentes ambientes, trazendo danos para vários seres vivos. Na tentativa de diminuir esse problema, foram criadas várias maneiras de remediação de áreas contaminadas por petróleo para reduzir os impactos ambientais desse poluente. O tratamento da poluição pelo petróleo no solo pode ser feito a partir de métodos químicos, físicos ou biológicos. Nos últimos anos, técnicas biológicas de remediação, que empregam microrganismos ou seus produtos, como biossurfactantes e bioemulsificantes (moléculas capazes de formar emulsões que ajudam no processo de remediação), mostram-se mais promissoras, inclusive na remediação de ambientes extremos, como os solos salinos. Esse projeto teve como objetivo principal isolar e identificar espécies bacterianas adaptadas a altas concentração de sal, as quais produzem moléculas de biossurfactantes e/ou bioemulsificantes e ainda são degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo. Para isso, foram isoladas inicialmente 500 colônias bacterianas de solo salino no município de Cabo Frio – Rio de Janeiro (RJ). Após diversos testes e avaliações, este estudo levou à seleção de cinco bactérias adaptadas a altas

concentrações de sal que apresentam potencial para serem aplicadas em processos de biorremediação, especialmente de solos salinos contaminados por petróleo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial a graduação do curso Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia pela oportunidade de realizar esse curso e pela formação excepcional oferecida aos alunos.

É com muita admiração e carinho que venho declarar toda a minha gratidão à minha orientadora, professora Lucy Seldin, por ter me recebido em seu laboratório e me dado a oportunidade de aprender e crescer ao longo do curso. Obrigada pelo apoio e confiança e por todo o suporte, correções e incentivos que recebi durante esse tempo. É uma honra ser sua aluna!

Aos meus pais, Carla e Fábio Delmas, por tanto amor, apoio e incentivo que me deram durante toda a minha trajetória. Obrigada por terem me ensinado seus valores e por terem me oferecido a melhor educação para que pudesse chegar até aqui. Obrigada por sempre apoiarem todas as minhas decisões e me incentivarem a alcançar meus objetivos. Amo vocês mais que tudo!

À minha irmã Gabriela por ter feito um pouco menos de barulho enquanto eu estudava e escrevia este TCC e por ter lido o resumo para leigos e opinado. Te amo infinito!

À minha cachorrinha Minie por ser minha companheira de vida e estar do meu lado na escrita de cada palavra do meu TCC. Te amo muito!

À minha família por me amar e me apoiar em todos os momentos. Amo vocês demais!

Agradeço também todos os professores que me deram aula e me acompanharam ao longo do curso e que se dedicam à arte de ensinar com todo empenho.

À toda equipe do LGM (laboratório o qual faço parte) pela parceria e especialmente ao Dr. Luciano Procópio por ser meu coorientador e me acompanhar no desenvolvimento do projeto. É muito bom trabalhar com vocês!

Aos membros da banca examinadora, Prof. Diogo Jurelevicius, Prof. Mateus Godoy, Carolina Guimarães e Karen Santaren, por aceitarem fazer parte da banca.

À CNPq por fornecer a bolsa de estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação, o meu muito obrigada.

Índice

1 – Introdução	1
1.1 – Poluição de solos salinos.....	1
1.2 – O petróleo e a indústria petrolífera	2
1.3 – Biorremediação	4
1.4 – Biossurfactantes e bioemulsificantes.....	4
1.5 – Bactérias halofílicas e halotolerantes.....	7
2 – Justificativa.....	9
3 – Objetivos.....	9
3.1 – Gerais.....	9
3.2 – Específicos	9
4 – Metodologia.....	10
4.1 – Coleta de amostras de solo salino.....	10
4.2 – Isolamento de estirpes bacterianas.....	10
4.3 – Teste de emulsificação.....	11
4.4 – Teste de deslocamento de óleo.....	11
4.5 – Teste de degradação do hexadecano.....	11
4.6 – Identificação das estirpes produtoras de biossurfactante/bioemulsificante.....	12
5 – Resultados.....	13
6 – Discussão	18
7 – Conclusão.....	19
8 – Referências.....	24

1 – Introdução

1.1 – Poluição de solos salinos

O solo é a camada superior da crosta terrestre, o qual é constituído por três fases: sólida, líquida e gasosa. Sua composição é apresentada na Figura 1, podendo variar entre os diferentes tipos de solo. É um recurso natural complexo e não renovável, sendo sua formação uma consequência da ocorrência de inúmeros processos químicos, físicos e biológicos sobre materiais rochosos ao longo de milhões de anos (Swartjes, 2011). O solo é uma parte vital do meio ambiente, fazendo-se fundamental para a vida sob diversos aspectos e promovendo interações entre os sistemas bióticos e abióticos (Mishra, Mohammad e Roychoudhury, 2016).

O solo é habitat para uma grande variedade de organismos, além de ser essencial para a existência da maioria das plantas e, conseqüentemente, dos animais terrestres. Assim sendo, este é fundamental para a vida na Terra (Abrunhosa, 2019). Desta forma, a manutenção de suas características físico-químicas, além da diversidade biológica presente no solo, é de fundamental importância para a sua preservação.

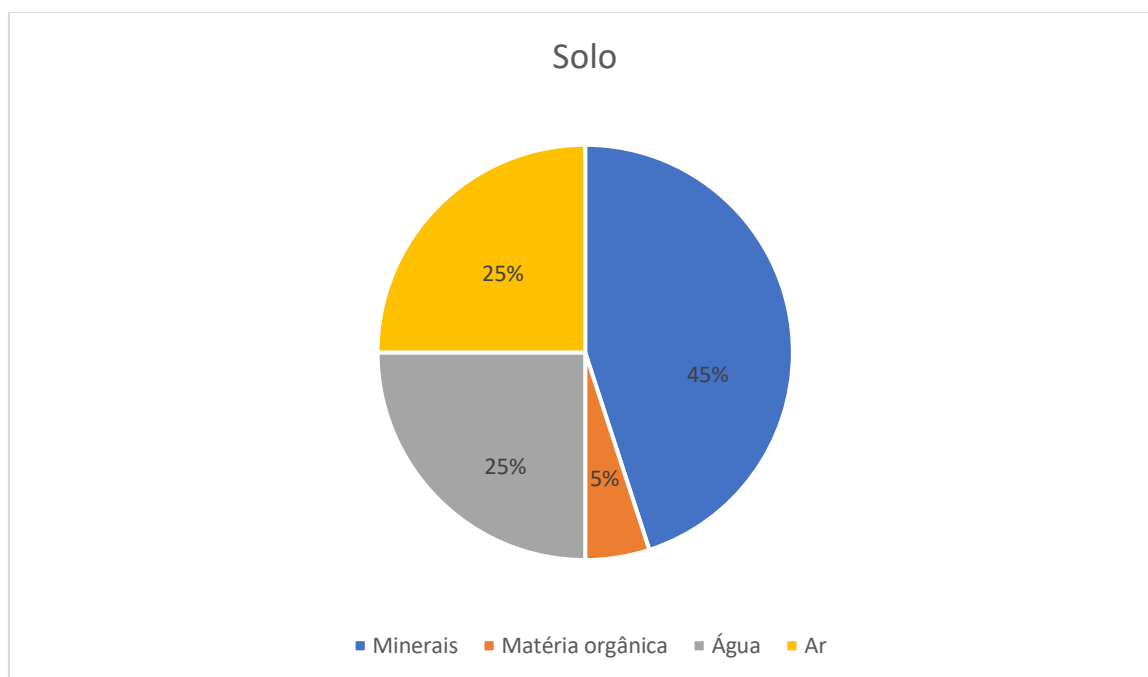


Figura 1: Composição do solo. Adaptado de Toor e Shober, 2009

Os solos salinos são caracterizados pela presença de altas concentrações de sais solúveis. Esse tipo de solo ocupa aproximadamente 7% do terreno mundial, e apesar de não apresentar grande relevância para a agricultura, é muito importante, já que abriga ecossistemas únicos. Os

solos salinos servem como habitat para diversos organismos extremófilos com estratégias de adaptação a altas concentrações de sal (Zeremski *et al.*, 2021).

Devido à complexidade da estrutura do solo, alterações em suas características, especialmente pela entrada de poluentes antropogênicos, podem alterar significativamente sua qualidade. A poluição do solo pode ser definida como a adição de qualquer composto (poluente), de origem natural (erupção de vulcões, erosão, deslizamento de solo) ou antropogênica (resíduos industriais, agroquímicos) que gere efeitos adversos em suas propriedades físicas, químicas ou biológicas (Singh, 1997). Devido a industrialização, guerras, mineração e particularmente a intensificação da agricultura, a contaminação dos solos, inclusive dos solos salinos, vem aumentando drasticamente nas últimas décadas, gerando graves consequências, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (Rodríguez, McLaughlin e Pennock, 2018).

Os poluentes são substâncias com potencial toxicidade que se acumulam ao longo de anos e podem causar mudanças no equilíbrio do solo, podendo gerar danos a curto ou a longo prazo. A presença de poluentes provoca prejuízos a inúmeras espécies de organismos vivos, especialmente os microrganismos presentes nos solos. Essas alterações afetam os ecossistemas, além de resultar na perda de funções do solo e estarem relacionadas com a poluição de águas subterrâneas. Dentre as diversas fontes de poluição no solo, destacam-se os hidrocarbonetos, os metais pesados, os pesticidas e herbicidas (Havugimana *et al.*, 2017).

1.2 – O petróleo e a indústria petrolífera

O petróleo é uma mistura de composição variável, formada predominantemente por hidrocarbonetos (principalmente alifáticos e aromáticos), além de compostos de enxofre, oxigênio, nitrogênio e constituintes organometálicos complexados com níquel e vanádio (Maranho *et al.*, 2006; Cruz e Marsaioli, 2012). O óleo cru é um líquido viscoso, inflamável de coloração escura, cuja origem está relacionada com a transformação de grandes deposições fósseis. As propriedades do petróleo e a quantidade de cada composto variam em diferentes óleos de diferentes locais, sendo que os hidrocarbonetos representam a maior parte da massa do petróleo. Centenas de hidrocarbonetos compõem o petróleo e esses apresentam diferenças tanto no número de carbonos, que varia de um carbono (metano) até mais de 300 carbonos, quanto em sua estrutura (Wetler-Tonini, de Rezende e Grativol, 2011; Gauto *et al.*, 2016).

Atualmente, o petróleo é uma das maiores fontes primárias de combustível de todo o mundo. Além disso, está presente na formulação de plásticos, cosméticos, borrachas, fibras, asfalto e até de alguns medicamentos (Malinoski e Maranhão, 2020). Dessa forma, são necessárias grandes quantidades de petróleo para suprir as demandas das indústrias, principalmente de energia e de automóveis.

As atividades de extração, armazenamento e transporte do petróleo podem resultar em vazamentos acidentais desse composto. De fato, a contaminação de petróleo no solo geralmente é originada de rompimentos de dutos ou problemas na manutenção de poços, além dos que ocorrem nas refinarias de petróleo, nos locais de produção de gás manufacturado, nas oficinas mecânicas e nas estações de serviço de abastecimento, o que gera risco de contaminação dos ecossistemas terrestres. Além disso, o descarte incorreto de produtos derivados do petróleo também compromete o meio ambiente.

O petróleo e seus produtos podem ser retidos pelas partículas de solo e seu grau de penetração e adsorção varia de acordo com as propriedades químicas e físicas da parte sólida do solo (Singh e Lin, 2009; Lima, 2010; Weber e Santos, 2013; Alves, 2018). Dessa forma, uma série de atividades antropogênicas que envolvem o uso de petróleo resultam na poluição por hidrocarbonetos, gerando efeitos diretos ou indiretos em diversas formas de vida.

Os casos de contaminação do solo e da água por hidrocarbonetos do petróleo são uma grande preocupação, já que, mesmo em pequenas concentrações, esses apresentam uma grande ameaça ao meio ambiente e à saúde humana (Souza *et al.*, 2010). Na tentativa de minimizar esse problema, foram desenvolvidas diversas técnicas de remediação de áreas contaminadas por petróleo a fim de minimizar os impactos ambientais desse poluente. O tratamento da poluição pelo petróleo no solo pode ser feito a partir de métodos químicos, físicos ou biológicos. Apesar de eficientes, os processos físicos e químicos apresentam muitas desvantagens. Por exemplo, nos métodos físicos, é realizada a queima do petróleo, diminuindo a toxicidade do poluente; entretanto, além de possuir custos elevados, essa técnica deixa o solo infértil. Da mesma forma, nos métodos químicos, são realizadas reações de oxidação, que clivam as estruturas do petróleo. Todavia, isso altera o pH do solo, o que afeta diretamente as comunidades microbianas locais (Malinoski e Maranhão, 2020).

Nas últimas décadas, os processos biológicos vêm se destacando dentre os diversos tipos de tratamento do solo pois são baseados em métodos naturais, sendo assim menos agressivos ao meio ambiente e mais adequados para a manutenção do equilíbrio ecológico, além de serem

mais baratos que os processos físicos e químicos de remediação (Brito *et al.*, 2010; Varjani e Upasani, 2016).

1.3 – Biorremediação

A biorremediação é um importante processo de remoção de compostos químicos em ambientes naturais. Nesse mecanismo, os organismos, a partir de sua atividade metabólica, transformam os poluentes em biomassa e subprodutos (Chagas-Spinelli, 2007; Costa Filho, 2011). Apesar de diversos organismos serem capazes de utilizar o petróleo como fonte de carbono e energia, os microrganismos destacam-se como os principais degradadores de hidrocarbonetos em sítios contaminados (Wetler-Tonini, de Rezende e Grativol, 2011; Jesus, Peixoto e Rosado, 2015). Vários grupos de bactérias, fungos, cianobactérias e algas estão relacionados à degradação de hidrocarbonetos. Esses microrganismos estão distribuídos em diferentes grupos taxonômicos e em diversos habitats, incluindo solos e águas doces e salgadas (Varjani e Upasani, 2016).

Existem três principais estratégias de biorremediação, que envolvem a utilização de microrganismos autóctones (do próprio local contaminado) ou alóctones (de outros locais): (i) a técnica de bioaumento consiste na adição de consórcios microbianos (organismos alóctones) capazes de degradar os hidrocarbonetos do solo; (ii) na bioestimulação, é realizada a adição de agentes estimulantes, como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes, levando a otimização das condições ambientais e, conseqüentemente, o aumento da taxa de crescimento e atividade metabólica dos microrganismos, resultando no aumento da biodegradação por organismos autóctones; (iii) já na atenuação natural, a descontaminação de hidrocarbonetos é feita por microrganismos autóctones através de processos naturais (Lima, 2010; Santos, 2020).

1.4 – Biossurfactantes e bioemulsificantes

Surfactantes (abreviação para agentes ativos de superfície, do inglês SURFace ACTive AgeNTS) são compostos químicos orgânicos anfipáticos cujas moléculas consistem em uma porção polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica) (Figura 2). Por serem formados por grupos polar e apolar, esses compostos se distribuem na interface entre fluidos com diferentes polaridades (ex: água/óleo) (Silva *et al.*, 2018; Dantas *et al.*, 2019), aumentando a superfície de

contato com compostos insolúveis e a solubilidade e mobilidade de moléculas hidrofóbicas (Seghal *et al.*, 2010; Felipe e Dias, 2016).

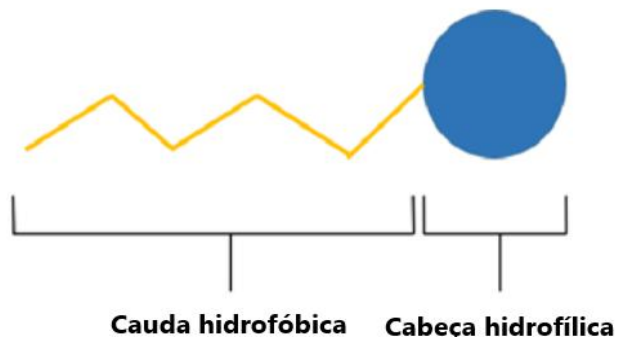


Figura 2: Molécula surfactante: porções polar (hidrofílica) e apolar (hidrofóbica). Adaptado de Dantas *et al.* (2019)

Os biossurfactantes exercem diversas funções fisiológicas nos microrganismos produtores e são utilizados pelos mesmos para a obtenção de nutrientes em substratos insolúveis ou hidrofóbicos (Mulligan, Sharma e Mudhoo, 2014; Felipe e Dias, 2016). Quando comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam diversas vantagens: (i) são biodegradáveis; (ii) geralmente apresentam baixa toxicidade; (iii) são biocompatíveis e digestíveis, o que pode ser útil para sua utilização em cosméticos, farmacêuticos e alimentos; (iv) apresentam diversidade em sua estrutura e ação específica; (v) tem como matéria-prima recursos naturais renováveis e de fácil disponibilidade, como hidrocarbonetos, carboidratos e lipídeos, e podem ser produzidos a partir de resíduos agroindustriais, como por exemplo soro de leite e água de maceração de milho, encorajando ações de gerenciamento ambiental; (vi) estabilidade em condições extremas (alguns biossurfactantes apresentam atividade em ambientes com condições extremas de temperatura, salinidade ou variações de pH) (Mulligan, Sharma e Mudhoo, 2014; Silva *et al.*, 2018).

Devido às suas diversas funções, como emulsificação, solubilização e redução de tensão superficial de compostos apolares, os biossurfactantes apresentam um amplo espectro de aplicações (Tabela 1). Esses compostos podem ser utilizados na biorremediação do petróleo uma vez que reduzem a tensão superficial dos compostos hidrofóbicos e aumentam sua solubilidade. Além disso, a ação dessas moléculas gera um aumento da superfície de contato com o óleo aumentando sua biodisponibilidade (Santos *et al.*, 2016). Dessa forma, os biossurfactantes podem aumentar a disponibilização de óleo, permitindo o acesso de um

número maior de microrganismos ao petróleo e, conseqüentemente, uma melhor biodegradação desse composto (Figura 3).

Tabela 1: Funções e aplicações dos biossurfactantes. Adaptado de Nitschke e Pastore (2002).

FUNÇÕES	CAMPOS DE APLICAÇÃO
Emulsificadores e dispersantes	Cosméticos, plantas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Farmacêuticos, produtos de higiene
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos, flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas, alimentos
Sequestradores de metal	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos, Drogas
Fatores de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos de óleo
Diminuidores de emulsão	Tratamento de esgoto, recuperação de óleo
Redutores de viscosidade	Óleodutos, transporte em óleodutos
Dispersantes	Misturas (ex: mistura de água-carvão)
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes recuperadores de óleo	Recuperação microbiana avançada de petróleo (MEOR)

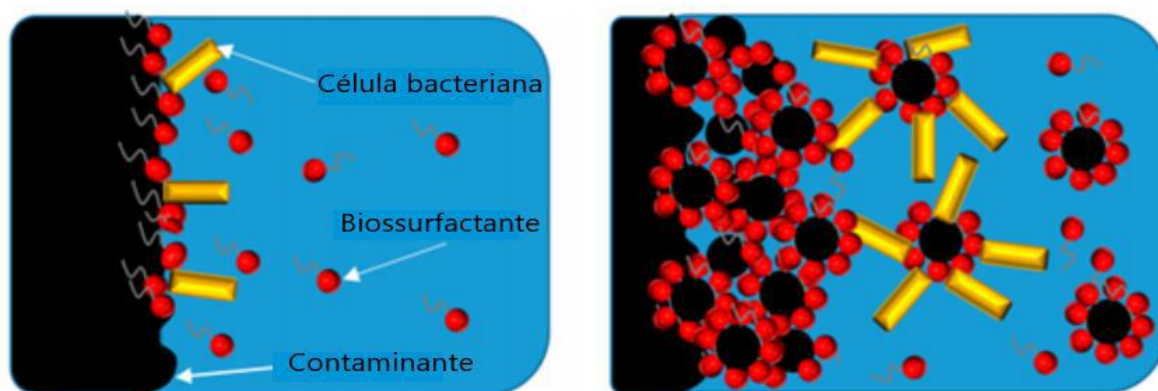


Figura 3: Ação de biossurfactantes aumenta a superfície de contato com o óleo, facilitando o acesso de uma maior quantidade de microrganismos e, conseqüentemente, uma degradação mais eficiente. Adaptado de Santos *et al.* (2016).

Assim como os surfactantes, os emulsificantes são moléculas anfipáticas que contêm uma porção polar e outra apolar (McClements e Jafari, 2018). Essas moléculas são capazes de formar emulsões estáveis (Miyasaki, 2013). Entretanto, ao contrário dos surfactantes, os emulsificantes não reduzem a tensão superficial entre compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (Souza *et al.*, 2019).

Os bioemulsificantes são compostos por heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas e possuem elevado peso molecular. Essas moléculas apresentam vantagens em relação aos emulsificantes sintéticos por serem menos tóxicos, biocompatíveis e estáveis em condições extremas. Essas moléculas despertam um grande interesse biotecnológico devido a sua propriedade de estabilizar emulsões e possuem aplicações como agentes espumantes, estabilizadores e detergentes nas indústrias petroquímica, alimentícia e agrícola, farmacêutica e de cosméticos (Uzoigwe *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2019). Os bioemulsificantes formam emulsões juntamente com os hidrocarbonetos, aumentando sua solubilidade em água e, conseqüentemente, aumentando o deslocamento das partículas de óleo, tornando-as mais disponíveis para os microrganismos (Calvo *et al.*, 2008).

1.5 – Organismos halófilos e halotolerantes

A vida microbiana pode ser encontrada em diversas condições, que incluem variações de salinidade, pH, temperatura, pressão, intensidade da luz e disponibilidade de oxigênio e nutrientes (Moreno *et al.*, 2013). Os microrganismos capazes de sobreviver e crescer sob condições ambientais consideradas hostis para a maioria dos organismos são denominados extremófilos. Esses microrganismos desenvolveram, ao longo dos anos, uma série de mecanismos para lidar com os fatores ambientais adversos de seus habitats, como alterações em sua estrutura celular e mudanças nas atividades bioquímicas (Dhakar e Pandey, 2016).

Organismos que vivem em ambientes hipersalinos são classificados como halófilos ou halotolerantes. Os organismos halófilos podem ser classificados de acordo com sua concentração ótima de sal necessária para seu crescimento: os levemente halófilos crescem em concentrações de NaCl ente 1 e 3%; os halófilos moderados, em concentrações de 3 a 15%; e os halófilos extremos, de 15 a 30%. Já os organismos halotolerantes, apesar de tolerarem altas concentrações de sal, não exigem essa condição para crescer (Corral, Amoozegar e Ventosa, 2019; Mainka *et al.*, 2021). Na grande maioria dos casos, à medida que a concentração de sal

aumenta, a atividade e a diversidade metabólicas diminuem. Entretanto, em microrganismos adaptados a ambientes salinos e hipersalinos, o seu metabolismo pode não ser afetado pelas altas concentrações de sal e a sua atividade metabólica pode até ser maior nessas condições (Le Borgne, Paniagua e Vazquez-Duhalt, 2008).

O interesse por microrganismos halófilos e halotolerantes vem crescendo nos últimos anos. Isso se deve a sua capacidade metabólica e produção de biomoléculas em altas concentrações de sal que tem um alto potencial em diferentes campos da biotecnologia. Dentre as diversas aplicações biotecnológicas de microrganismos adaptados a ambientes salinos já descritas na literatura, destacam-se a produção de enzimas (como por exemplo as amilases produzidas pelas bactérias *Halomonas meridiana* e *Halobacterium salinarum* e a galactosidase produzida pela *Haloferax alicantei*) e síntese de polímeros (como o exopolissacarídeo produzido pela *Halomonas eurialina* e o biossurfactante produzido pelo *Bacillus licheniformis* JF-2), além do uso desses extremófilos na degradação de resíduos e compostos tóxicos (Ventosa e Nieto, 1995; Margaresin e Schinner, 2001; Ramirez, Sandoval e Serrano, 2004).

2 – Justificativa

Na era da industrialização global, o mundo vem se tornando cada vez mais dependente do petróleo e seus derivados. Com o crescimento da população e das atividades industriais, houve o aumento da poluição do solo pelo petróleo. Dessa forma, nas últimas décadas, o interesse por pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novas técnicas de remediação vem crescendo de forma acentuada.

Diversos ecossistemas são atingidos pela poluição pelo petróleo, incluindo os solos salinos e hipersalinos (como em praias e zonas costeiras). Entretanto, a biorremediação desses ambientes muitas vezes só pode ser feita por microrganismos halófilos ou halotolerantes, presentes nesses ambientes contendo altas concentrações de 8sal. Os biossurfactantes e/ou os bioemulsificantes produzidos por estes microrganismos podem também facilitar a biorremediação desses ambientes contaminados com petróleo.

Pelo fato da maioria dos surfactantes e emulsificantes usados atualmente serem de origem sintética, esses compostos são muitas vezes danosos ao meio ambiente. Portanto, os biossurfactantes e/ou os bioemulsificantes apresentam vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, visto que são biodegradáveis, menos tóxicos e podem ser produzidos a partir de

substratos renováveis e de menor custo, além de serem menos sensíveis a ambientes extremos. Portanto, com o aumento da preocupação ambiental, alternativas sustentáveis como o uso de biossurfactantes e/ou os bioemulsificantes vêm se tornando cada vez mais atrativas.

3 – Objetivos

3.1 – Gerais

Isolar e identificar bactérias degradadoras de componentes de petróleo e produtoras de bioemulsificantes /biossurfactantes a partir de solo salino.

3.2 – Específicos

1. Isolar estirpes bacterianas produtoras de bioemulsificantes/biossurfactantes a partir de solo salino.
2. Avaliar a capacidade das estirpes isoladas em degradar componentes de petróleo.
3. Avaliar a ação emulsificante das moléculas de biossurfactantes/bioemulsificantes, em diferentes concentrações de sal.
4. Identificar as estirpes selecionadas por meio do sequenciamento do gene *rrs*, que codifica o 16S rRNA.

4 – Materiais e métodos

4.1 - Coleta de amostras de solo salino

Foi coletado com o auxílio de uma espátula previamente esterilizada aproximadamente 1 kg de solo de ambiente salino (5 a 10 cm da superfície) no município de Cabo Frio, no estado do Rio de Janeiro-RJ (22.8944° S, 42.0633° W). O solo foi transportado em saco plástico estéril. A amostra foi acondicionada em caixa térmica com gelo (temperatura aproximada de 0°C) e transportada imediatamente para o Laboratório de Genética Bacteriana, localizado no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde foi acondicionada a temperatura de -20°C.

4.2 - Isolamento de estirpes bacterianas

Um grama de solo foi adicionado a um tubo de polipropileno de 1,5 ml contendo 1 ml de Tampão Fosfato Salino (NaCl 0,82%, Na₂HPO₄ 1,04%, NaH₂PO₄ 0,3%), e misturados em

agitador mecânico por 3 minutos. A mistura foi centrifugada em centrífuga Eppendorf por 6 minutos a 6000 rpm e o sobrenadante foi usado para fazer diluições seriadas que foram semeadas com alça de Drigalski em meio de cultura Trypticase Soy Broth acrescido de ágar (TSA) (Tryptona 17,0 g/L, Farinha de Soja 3,0 g/L, Glicose 2,5 g/L, Cloreto de Sódio 5,0 g/L, Fosfato Dipotássico 2,5 g/L, Ágar 12,0 g/L, Água destilada q.s.p. para 1 litro) + 5% de NaCl. As placas semeadas foram incubadas na estufa a temperatura de 28°C por 48h. Após o crescimento visual das colônias sobre a superfície do meio, cerca de 500 delas foram isoladas e nomeadas com as letras SS seguidas de números em ordem crescente (SS01, SS02, SS03, e assim por diante). Posteriormente, 28 estirpes foram selecionadas através da comparação da morfologia das colônias e essas foram novamente cultivadas em TSB com concentrações crescentes de NaCl - 6%, 8%, 10%, 12%, 15% e 20% - seguindo as mesmas condições descritas acima. Após o crescimento visual das colônias sobre a superfície do meio, 12 estirpes foram selecionadas de acordo com seu crescimento nas diferentes concentrações de sal e pela sua morfologia celular observada após coloração de Gram.

4.3 - Teste de emulsificação

A seleção inicial das estirpes bacterianas produtoras de bioemulsificantes e/ou biosurfactantes foi realizada através da determinação do índice de emulsificação (E24) (Iqbal *et al.*, 1995) utilizando-se diesel e n-hexadecano. Para esta finalidade, as colônias previamente isoladas e selecionadas foram cultivadas em tubos de 15 ml, contendo 7 ml de meio TSB com diferentes concentrações de NaCl (6, 8, 10, 12, 15 e 20%), durante 48 horas, sob agitação de 100 rpm, à temperatura de 28°C. Posteriormente, cada cultura (onde foi observado o crescimento bacteriano por turvação) foi transferida para 6 tubos de 2 ml (o experimento foi realizado em triplicata, sendo 3 tubos de 2ml para diesel e 3 para hexadecano), e foi centrifugada por 6 minutos a 6000 rpm em centrífuga Eppendorf. O equivalente a 1ml de cada um dos sobrenadantes foi transferido para um novo tubo de 2 ml. Aos sobrenadantes foram adicionados 1 ml de diesel em 3 dos tubos e 1 ml de hexadecano em 3 outros tubos. As misturas foram homogeneizadas em agitador mecânico por 3 minutos e os tubos incubados a 28°C por 24 horas. O índice de emulsificação foi calculado empregando a fórmula: $E24 = (\text{altura da camada de emulsão/altura total}) \times 100$. O resultado foi expresso em porcentagem. As estirpes isoladas que apresentaram índice de E24 acima de 50% foram separadas e empregadas no teste de deslocamento de óleo e no teste de degradação de hexadecano.

4.4 - Teste de deslocamento de óleo

Inicialmente, as estirpes selecionadas no teste E24 foram crescidas em TSB com diferentes concentrações de NaCl (6, 8, 10, 12%, de acordo com o crescimento de cada estirpe) e o sobrenadante recuperado seguindo as condições descritas no item 4.3. Foram adicionados a uma placa de Petri 2,5 ml de água destilada e, em seguida, foi pipetada uma gota de óleo cru, com o objetivo de formar um filme de óleo na superfície da água. A seguir, foram adicionados 100 µl de sobrenadante sobre a camada de óleo. O teste foi considerado positivo quando houve a formação de um halo transparente na camada de óleo. Para os controles positivo e negativo, foram empregados 100 µl de SDS 10% e meio TSB estéril, respectivamente.

4.5 - Teste de degradação do hexadecano

A fim de realizar o teste de degradação do hexadecano, foi feito um pré-inóculo a partir de colônias bacterianas isoladas em TSB + 5% NaCl e que apresentaram índice de emulsificação maior ou igual a 50%. Após o crescimento bacteriano por 48 horas, as culturas foram centrifugadas a 6000 rpm por 6 minutos em microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 17R (Thermo Fisher), o sobrenadante descartado e o precipitado de células ressuscitado em meio Bushnell-Hass (Difco™) estéril. Este processo de centrifugação e ressuspensão do precipitado celular foi realizado mais duas vezes. Em seguida, 20 µl da suspensão das bactérias foi adicionado em 2 ml de meio Bushnell-Hass contendo NaCl nas concentrações de 6%, ou 8% ou 10%, e 200 µl de hexadecano. O controle negativo foi realizado nas mesmas condições, mas sem a adição de hexadecano ao meio. As culturas foram acondicionadas em temperatura de 28°C sem agitação e seu crescimento foi avaliado visualmente após 15 dias.

4.6 - Identificação das estirpes bacterianas produtoras de biossurfactante/bioemulsificante

A partir de 1 µl de cultura previamente crescida de cada estirpe isolada com resultado positivo nos testes de emulsificação e de degradação do hexadecano, foi realizada a amplificação do gene *rrs* (que codifica o 16S rRNA), utilizando a técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). As condições empregadas na reação de PCR são descritas na Tabela 2. Os iniciadores empregados foram: PA (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e PH (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3'). O programa de amplificação utilizado consistiu de uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos das etapas de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 58°C por 1 min, extensão a 72°C por 3 min, e finalmente uma etapa final de extensão a 72°C por 7 min. Após a reação, os produtos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8%, a fim de confirmar os tamanhos

esperados (aproximadamente 1500 pares de base). A quantificação dos produtos de PCR foi realizada empregando o equipamento Qubit (Thermo Fisher), seguindo as condições sugeridas pelo fabricante. Os produtos da reação de PCR foram purificados utilizando o kit comercial DNA Purification for PCR - PCR Clean Up & Gel Extraction (Promega), seguindo as condições do fabricante. Posteriormente, cerca de 35 ng de DNA de cada amostra foram enviados para sequenciamento no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na UFRJ. Os resultados do sequenciamento foram utilizados em análise computacional a fim de inferir as relações filogenéticas empregando o banco de dados Genbank/NCBI utilizando a ferramenta BLASTN (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Tabela 2. Condições empregadas na reação de PCR.

Componentes	Concentração final
H ₂ O livre de RNAses e DNAses	quantidade necessária para reação de 25µl
Tampão 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM
dNTP Mix 10 µM	0,5 µM
Primer 3' 10 µM	1 µM
Primer 5' 10 µM	1 µM
Enzima <i>Taq</i> Polimerase	0,2 U
DNA da estirpe crescida em meio TSB com 5% de NaCl	1 µl

5 – Resultados

A partir de 500 colônias isoladas de solo salino do município de Cabo Frio previamente crescidas em TSB + NaCl 5% foram selecionadas, através da comparação das morfologias coloniais (tamanho, cor e textura), 28 estirpes com capacidade de crescimento em meio TSB acrescido de NaCl 5%. Posteriormente, essas estirpes foram crescidas em diferentes concentrações de NaCl (6, 8, 10, 12, 15 e 20%) (Tabela 3). Após o período de incubação foi

selecionado um total de 12 estirpes, sendo cinco delas com capacidade de crescimento em até 12% (SS01, SS01G, SS02, SS03 e SS03G), duas estirpes com crescimento em até 10% (SS24P e SS24G) e cinco com crescimento em até 8% (SS109, SS150P, SS150G, SS163P e SS163G). Nenhuma das estirpes avaliadas neste experimento foi capaz de crescer em 15 ou 20% de NaCl. Após a comparação da morfologia das colônias, juntamente com a sua morfologia celular, através da coloração de Gram, as estirpes SS01 e SS03 foram consideradas idênticas às estirpes SS01G e SS03G, respectivamente. Sendo assim, as estirpes SS01G e SS03G não foram mais empregadas nos experimentos seguintes.

Tabela 3. Estirpes cultivadas em TSB com a adição de NaCl em níveis crescentes.

Estirpe	NaCl 6%	NaCl 8%	NaCl 10%	NaCl 12%
SS01	+	+	+	+
SS01G	+	+	+	+
SS02	+	+	+	+
SS03	+	+	+	+
SS03G	+	+	+	+
SS24P	+	+	+	-
SS24G	+	+	+	-
SS109	+	+	-	-
SS150P	+	+	-	-
SS150G	+	+	-	-
SS163P	+	+	-	-
SS163G	+	+	-	-

A capacidade de emulsificação das estirpes selecionadas foi avaliada na presença de hexadecano e diesel (Tabela 4). Todas as estirpes bacterianas que apresentaram índices de emulsificação abaixo de 50% foram desconsideradas. A estirpe SS01 mostrou-se capaz de emulsificar hexadecano e diesel em todas as concentrações de NaCl avaliadas. A estirpe SS02 apresentou índice de emulsificação acima de 50% apenas em diesel com 6 e 8% de NaCl, enquanto a estirpe SS03 apresentou capacidade de emulsão de diesel a 8% e 10% de NaCl. As estirpes SS24P e SS24G apresentaram índices de emulsificação acima de 50% para diesel nas concentrações de 6% e 8% de NaCl, e SS24G para hexadecano na presença de 6% de NaCl. A estirpe SS109 apresentou índice de emulsificação acima de 60% em hexadecano e diesel na presença de 8% de NaCl. A estirpe SS150G apresentou índice de emulsificação acima de 50%

em diesel na concentração de NaCl 6%, enquanto SS163G apresentou índice acima de 50% em 6% e 8% na presença de diesel. As estirpes SS150P e SS163P não apresentaram índice de emulsificação acima de 50% em nenhuma das condições.

Tabela 4. Avaliação do E24 em diferentes concentrações de NaCl na presença de hexadecano (C16) ou diesel.

<i>Estirpes</i>	<i>Hexadecano</i>										
	SS01	SS02	SS03	SS24P	SS24G	SS109	SS150P	SS150G	SS163P	SS163G	
<i>Diesel</i>	6%	60%	53%	-	56%	56%	-	-	53%	-	56%
	8%	56%	50%	50%	50%	56%	-	-	-	-	50%
	10%	53%	-	56%	-	-	-	-	-	-	-
	12%	50%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hexadecano</i>	6%	70%	-	-	-	66%	-	-	-	-	-
	8%	70%	-	-	-	63%	-	-	-	-	-
	10%	70%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12%	66%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Foi realizado o teste de deslocamento de óleo com as estirpes que apresentaram resultados de emulsificação acima de 50% nas condições avaliadas (SS01, SS02, SS03, SS24P, SS24G, SS150G, SS163G e SS109) (Figura 4). O resultado foi considerado positivo quando o espalhamento da gota de óleo se manteve por mais de um minuto. Os sobrenadantes das estirpes SS01, SS24P, SS24G, SS150G e SS163G apresentaram resultado positivo para o espalhamento do óleo, enquanto os das estirpes SS02, SS03 e SS109 foram negativos para o teste.

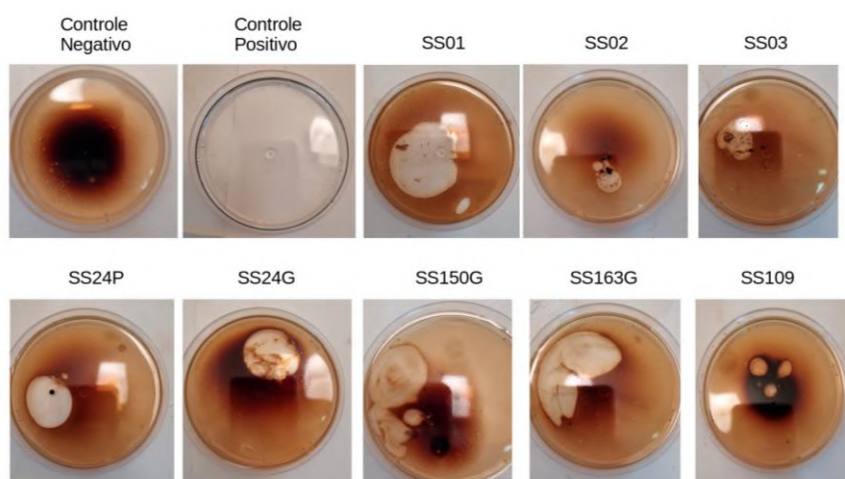


Figura 4. Teste de deslocamento de óleo usando os sobrenadantes das estirpes. O controle negativo foi realizado com meio TSB estéril, e o controle positivo com SDS 10%.

As estirpes selecionadas também foram avaliadas em relação ao seu crescimento na presença de hexadecano como única fonte de carbono disponível. Os resultados foram considerados positivos após análise visual do crescimento após 15 dias de incubação a 28°C (Figura 5). As estirpes SS01 e SS163G apresentaram crescimento em todas as concentrações de NaCl testadas, enquanto SS02, SS150G e SS109 cresceram apenas na concentração de NaCl 6%. As demais estirpes não cresceram na presença de hexadecano como única fonte de carbono disponível em nenhuma das concentrações de sal testadas.

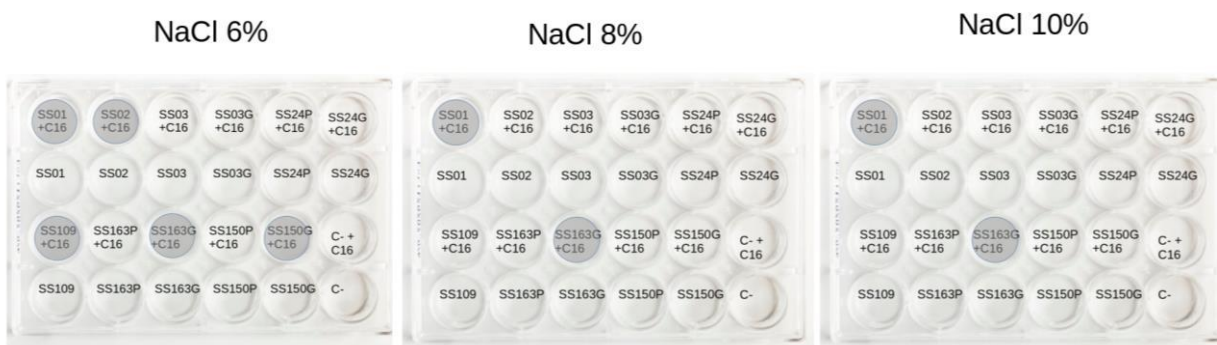


Figura 5. Estirpes na presença ou não de C16 como única fonte de carbono em NaCl 6%, 8% e 10%. O círculo cinza indica o crescimento positivo após 15 dias.

As estirpes que apresentaram resultados de emulsificação acima de 50% em diferentes concentrações de NaCl e crescimento em hexadecano como única fonte de carbono foram selecionadas e identificadas por meio do sequenciamento do gene que codifica o 16S rRNA. Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8%, e houve a confirmação dos tamanhos de bandas esperados (Figura 6). As sequências (em anexo) foram utilizadas para busca na plataforma BLASTN e os resultados estão apresentados na Tabela 5. Todos os resultados dos alinhamentos mostraram identidades acima de 95% e cobertura igual a 100%, enquanto os valores de e-value foram iguais a 0.0 em todas as análises.



Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos de PCR (iniciadores PA e PH) das estirpes selecionadas.

Tabela 5. Identificação das estirpes selecionadas a partir do primeiro hit no BLASTN

Estirpe	Organismo (primeiro hit no BLAST-N)	Cobertura	E-value	Identidade
SS01	<i>Halomonas olivaria</i> strain MT1-2	100%	0.0	97,5%
SS02	<i>Planococcus rifietoensis</i> strain CCMM B654	100%	0.0	97,5%
SS109	<i>Oceanobacillus picturae</i> XJSL9-9	100%	0.0	97,9%
SS150G	<i>Halomonas piezotolerans</i> NBT06E8	100%	0.0	98,7%
SS163G	<i>Planococcus sp.</i> clone ONGS102	100%	0.0	96,8%

6 – Discussão

No presente projeto, a fim de obter bactérias com potencial para aplicação na biorremediação de solos salinos contaminados por petróleo, foi coletado solo salino do município de Cabo Frio – Rio de Janeiro com o objetivo de isolar e identificar estirpes bacterianas ali presentes capazes de crescer na presença de sal, além de produzir biossurfactantes ou bioemulsificantes e de degradar hidrocarbonetos do petróleo nessa condição. As estirpes selecionadas foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Halomonas*, *Planococcus* e *Oceanobacillus*. Estudos anteriores já haviam demonstrado que uma grande variedade de bactérias pode ser encontrada em solos salinos. Vários gêneros bacterianos, como *Bacillus*, *Halobacillus*, *Staphylococcus*, *Exiguobacterium*, *Lysinibacillus*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Amphritea*, *Rhodobacter*, *Cyclobacterium*, *Gramella*, *Leifsonia*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum* e *Microbacterium* foram descritos na literatura (Irshad, Ahmad e Kim, 2014; Kalami e Pourbabae, 2021; Pourfadakari *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021).

As estirpes isoladas no presente trabalho se mostraram capazes de produzir biossurfactantes e bioemulsificantes com atividade de emulsificação em diesel e/ou hexadecano mesmo com crescimento bacteriano em elevadas concentrações de NaCl (6, 8, 10 e 12%), além

de crescer em hexadecano em condições de elevada salinidade. Esses resultados sugerem que essas estirpes apresentam potencial aplicação para a biorremediação de ambientes salinos.

A relação entre a concentração de sal do meio e a produção de biossurfactantes/bioemulsificantes e a degradação de petróleo é muito variável e pode ser muito distinta entre as diferentes bactérias. Alguns estudos apontam que o aumento da salinidade leva ao aumento da degradação de hidrocarbonetos (Le Borgne, Paniagua e Vazquez-Duhalt, 2008). Ao contrário, Ward e Brock (1978) indicam que o aumento da salinidade resulta no decréscimo do metabolismo de hexadecano. No presente projeto, a maior parte das bactérias apresentou maior produção de biossurfactantes/bioemulsificantes e crescimento na presença de hexadecano em concentrações de sal mais baixas (6 e 8%), coincidindo com os resultados obtidos por Ward e Brock (1978).

O sucesso da biorremediação está altamente relacionado à solubilidade dos hidrocarbonetos. Dessa forma, o papel dos surfactantes e emulsificantes apresenta grande relevância (Pourfadakari *et al.*, 2021). Os biossurfactantes e bioemulsificantes são biodegradáveis, geralmente apresentam baixa toxicidade e podem ser produzidos a partir de recursos renováveis, além de alguns deles serem estáveis em condições extremas, incluindo altas concentrações de sal e, por isso, apresentam vantagens em relação aos surfactantes e emulsificantes sintéticos (Silva *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2019).

Os biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão interfacial enquanto os bioemulsificantes não. Por isso, os primeiros costumam obter resultado positivo no teste de deslocamento de óleo enquanto os últimos tendem a obter resultado negativo. Os resultados desse projeto indicam que as estirpes SS01 (*Halomonas alkaliantarctica*), SS150G (*Halomonas piezotolerans*) e SS163G (*Planococcus maritimus*) são produtoras de biossurfactantes enquanto as estirpes SS02 (*Planococcus rifietoensis*) e SS109 (*Oceanobacillus picturae*) são produtoras de bioemulsificantes.

Dessa forma, diante os resultados obtidos nessa pesquisa e as evidências previamente descritas na literatura, considerou-se que as estirpes isoladas no presente trabalho possuem potencial biotecnológico para processos de biorremediação de solos salinos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo.

7 – Conclusão

Esta pesquisa possibilitou a seleção e identificação de cinco estirpes bacterianas pertencentes aos gêneros *Halomonas*, *Planococcus* e *Oceanobacillus* com capacidade de produzir biossurfactantes ou bioemulsificantes e crescer na presença de hexadecano como única fonte de carbono em diferentes concentrações de NaCl.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os biossurfactantes e bioemulsificantes produzidos por algumas das estirpes isoladas apresentam atividade de emulsificação mesmo com o crescimento bacteriano em elevadas concentrações de NaCl (6, 8, 10 e 12%). Com os resultados do teste de deslocamento de óleo, sugere-se que as estirpes SS01 (*Halomonas alkaliantarctica*), SS150G (*Halomonas piezotolerans*) e SS163G (*Planococcus maritimus*) sejam produtoras de biossurfactantes e as estirpes SS02 (*Planococcus rifietoensis*) e SS109 (*Oceanobacillus picturae*) sejam produtoras de bioemulsificantes. É bastante comum a observação de testes positivos no abaixamento da tensão superficial em estirpes bacterianas que apresentam a capacidade de deslocar o óleo no teste de deslocamento de óleo aqui utilizado.

Os resultados deste estudo indicam que as cinco estirpes selecionadas apresentam potencial para serem empregadas em processos de biorremediação de ambientes salinos contaminados por petróleo.

Anexo: Sequências de nucleotídeos das estirpes selecionadas.

SS01

TGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACCTGG
GGAAACCCAGGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGGGGGCTTTGGCTCCCGCTATTGGAT
GAGCCTATGTTCGGATTAGCTGGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTC
TGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCCGAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGG
TTGTAAAGCACTTTTCAGCGAGGAAGAACGCCTAGTGGTTAATACCCATTAGGAAAGACATCACTCG
CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCA
ACCTGGGAACGGCATCCGGAAGTGTGAGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGATTCCCGGTGTAG
CGGTGAATGCGTAGAGATCGGAGATACAGTGCAGGCGCTCTGACTGACACTGACACTGAGTGCGA
AGGCGTGGTAGCAAACAGGAT

SS02

GCTGGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAGATGTTGGAGCTTGCTCCAACAYRTSTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGCAGATCGGGATAACTCCGGGAAACCG
GTGCTAATACCGAATAGTTTTCGGCCTCTCATGAGGCCACACGGAAAGACGGTTTTTCGGCTGTCACT
GCAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGARCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG
TTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTACCAAKTAACTACTGGTACCTTGACG
GTACCTCACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCAC
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGGACTTGAGTGCAGAGAGGAAGTGAATTCCACG
TGTAGCGTGAATGCGTAAGATGTGAGACACAGTGCAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCT

SS0109

GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCAAGCTGATCCCCCTTCAGGGGTGACGC
TTGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACC
CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATACTTTCTTTTGCATAAAGGAAAGTTGAAAGGCGGCTT
CGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTTGGGTAGTAACTGACC
CAACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATG

TGAAATCTCGCGGCTCAACCGCGAACGGTCATTGGAACTGGAGGACTTGAGTACAGAGAGAGAG
TGATTCCACGTGTAGCGTGAATGCGTAAGATGTGAAGACACATGCGAGCGACTCTCTG

SS0150

GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCAAGCTGATCCCCTTCAGGGGTGACGC
TTGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACC
CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATACTTTCTTTTGCATAAAGGAAAGTTGAAAGGCGGCTT
CGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTTGGGTAGTAACTGACC
CAACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATG
TGAAATCTCGCGGCTCAACCGCGAACGGTCATTGGAACTGGAGGACTTGAGTACAGAGAGAGAG
TGATTCCACGTGTAGCGTGAATGCGTAAGATGTGAAGACACATGCGAGCGACTCTCTG

SS0163

ACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGAGGCTGGCTCCCGTAAGGGTTACCCACCGACT
TCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGC
GGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGA
ACTGAGAACGGTTTTCTGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGTTTTGCAGCCCTTTGTACCGTCCATTGTA
GCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTG
TCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCGCTGT
CCCCGAAGGGAAAGCCTAGTCTCCTAGGCGGTCAGCGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC
GTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTCAGC
CTTGCGGCCGTACTCCAGCGAGTGCTATGCGTAGCTGCAGCACTAACGGCGAACCCCTACACTAGC
ACTCATCATAACGGCCTGACTACAGGTATTCTATCCTGTTT

8 – Referências

- Abrunhosa, M.L.L.A. (2019). Percepção da poluição dos solos e impacto na biodiversidade: uma abordagem segundo a Aprendizagem Baseada na Resolução de Problemas. Relatório de estágio - Unidade de Ensino das Ciências da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Universidade do Porto, Porto.
- Alves, B.G.T. (2018). Avaliação da biodegradação de hexadecano por um consórcio de actinobactérias imobilizado em quitosana em microcosmos de sedimentos de manguezal por medida de atividade desidrogenásica. Dissertação (mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Brito, G.C.B., de Souza, D.B., Vasconcelos, F.C.W., Braga, L.C. (2010). A Importância da Bioprospecção de Microrganismos em Áreas Contaminadas com Produtos Derivados do Petróleo. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, 3, 3, 291-310.
- Calvo, C., Silva-Castro G.A., Uad, I, Fandiño, C.G., Laguna, J., González-López, J. (2008). Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35, 11, 1493-1501.
- Chagas-Spinelli, A.C.O. (2007). Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrames de óleo diesel. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Corral, P., Amoozegar, M.A., Ventosa, A. (2019). Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. Marine Drugs, 18, 1, 33.
- Costa Filho, G.F. (2011). Biodegradação de Óleos Derivados do Petróleo e de Origem Vegetal Estimulada por Biossurfactantes em Meio Aquoso e Monitoramento de sua Toxicidade. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Cruz, G.F. Marsaioli, A. J. (2012). Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. Química Nova [online], 35, 8, 1628-1634.
- Dantas, T., Santanna, V., Souza T., Lucas, C., Dantas N., Aum, P. (2019). Microemulsions and nanoemulsions applied to well stimulation and enhanced oil recovery (EOR). Brazilian Journal of Petroleum and Gas, 12, 4, 251-265.
- de Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M.T., Mellado, E. (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. Life (Basel, Switzerland), 3, 1, 38-51.
- Dhakar, K., Pandey, A. (2016). Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology, 100, 6, 2499-2510.
- Felipe, L.O., Dias, S.C. (2016). Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. Química Nova Escola, 39, 3, 250-260.
- Gauto, M.A., de Melo Apoluceno, D., Amaral, M.C., Auríquio, P.C. (2016). Petróleo e Gás: princípios de exploração, produção e refino. Bookman Editora.
- Havugimana, E., Bhople, B.S., Kumar, A., Byiringiro, E., Pierremugabo, J., Kumar, A. (2017). Soil pollution—major sources and types of soil pollutants. Environmental science and engineering 11, 53-86.
- Iqbal, S., Khalid, Z.M., Malik, K.A. (1995). Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. Letters in Applied Microbiology, 21, 3, 176-179.
- Irshad, A., Ahmad, I., Kim, SB. (2014). Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. Brazilian Journal of Microbiology, 29, 45(2), 563-71.
- Jesus H.E., Peixoto R.S., Rosado A.S. (2015). Bioremediation in Antarctic Soils. Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, 06, 06, 248.
- Kalami, R., Pourbabaee, AA. (2021). Investigating the potential of bioremediation in aged oil-polluted hypersaline soils in the south oilfields of Iran. Environmental Monitoring and Assessment, 193, 8, 517.
- Le Borgne, S., Paniagua, D., Vazquez-Duhalt, R. (2008). Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology; 15, 2-3, 74-92.

- Lima, D.C.R. (2010). Microorganismos degradadores de petróleo isolados de solos rizosféricos da província petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas. Dissertação (mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.
- Mainka, T., Weirathmüller, E., Herwig, C., Pflügl, S. (2021). Potential applications of halophilic microorganisms for biological treatment of industrial process brines contaminated with aromatics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 48, 1-2.
- Malinoski, L., Maranhão, L. (2020). Imobilização de consórcio de bactérias extraídas da rizosfera de *Echinochloa polystachya* (KUNTH) HITCHC., Poaceae, e seu potencial para a degradação de petróleo. *Brazilian Journal of Development*. 6, 7, 50373-50395.
- Maranhão, L.T., Galvão F., Preussler K.H., Muñoz G.I.B., Kuniyoshi Y.S. (2006). Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. *Acta Botanica Brasilica* [online]. 20, 3, 615-624.
- Margesin, R., Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 2, 73-83.
- McClements, D.J., Jafari, S.M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, 0001-8686, 55-79.
- Mishra, R.K., Mohammad, N., Roychoudhury, N. (2016). Soil pollution: Causes, effects and control. *Van Sangyan*. 3, 1-14.
- Miyasaki, E.K. (2013). Avaliação a Adição de Emulsificantes do Tipo Lecitinas Modificadas na Cristalização de Manteiga de Cacau e de Chocolate Amargo. Tese - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Moreno, M.de L., Pérez, D., García, M. T., Mellado, E. (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life (Basel, Switzerland)*, 3, 1, 38-51.
- Mulligan, C.N., Sharma, S.K., Mudhoo, A. (2014). *Biosurfactants: Research trends and applications*, CRC Press. New York. 1-30.
- Nitschke, M., Pastore, G. (2002). Biosurfactants: properties and applications. *Química Nova* [online]. 25, 5, 772-776.
- Pourfadakari, S., Ghafari, S., Takdastan, A., Jorfi, S. (2021). A salt resistant biosurfactant produced by moderately halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* (AHV-KH10) and its application for bioremediation of diesel-contaminated sediment in saline environment. *Biodegradation*, 32, 3, 327-341.
- Ramirez, N., Sandoval, A.H., Serrano, J.A. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*., Caracas, 24(1-2), 12-23
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., Pennock, D. (2018). *Soil Pollution: a hidden reality*. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 142 pp.
- Santos, D.K.F., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 3, 401.
- Santos, R.S. (2020). Bioprospeção de bactérias degradadoras de petróleo. Tese - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- Seghal, K.G., Anto, T.T., Selvin, J., Sabarathnam, B., Lipton, A. P. (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresource Technology*, 101, 7, 2389-2396.
- Silva, A.C.S., dos Santos, P.N., Silva, T.A.L., Andrade, R.S.F., Campos-Takaki, G.M. (2018). Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Arquivos do Instituto Biológico*, 85, 1808-1657, 1-12.
- Singh, A., Lin, J. (2009). Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. *African Journal of Biotechnology*, 8, 21, 5847-5854.
- Singh, B.R. (1997) Soil pollution and contamination. *Advances in soil science: Methods for assessment of soil degradation*. Lal *et al.* (eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 279-299.

- Souza M. R., Alves, M.F., Souza, A.F., Rodríguez, D.M., de Campos Takaki, G.M. (2019). Bioemulsificante produzido por um fungo promissor *Absidia* sp. UCP 1144 isolado de solo da Caatinga no Nordeste do Brasil. *Brazilian Journal of Development*, 5, 11, 25402-25414.
- Souza, D.B., Brito, G.C.B., Vasconcelos, F.C.W., da Conceição Braga, L. (2010). Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de estudos ambientais*, 12, 2, 38-46.
- Swartjes, F.A. (2011). Introduction to contaminated site management. In *Dealing with contaminated sites*. Springer, Dordrecht. 3-89.
- Toor, G.S., Shober, A.L. (2009). *Soils & Fertilizers for Master Gardeners: Soil Organic Matter and Organic Amendments. (SL273)*. University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences EDIS.
- Uzoigwe, C., Burgess, J.G., Ennis, C.J., Rahman, P.K. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, 7, 6, 245.
- Varjani S.J., Upasani V.N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*. Dec; 222,195-201.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 1, 85-94.
- Ward, D. M., Brock, T. D. (1978). Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 2, 353-359.
- Weber, B.D., Santos, A.A. (2013). Utilização da biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. *Engenharia Ambiental (Online)-Espírito Santo do Pinhal*, 10, 1, 114-133.
- Wetler-Tonini, R.M.C., de Rezende, C.E., Grativol, A. D. (2011). Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. *Revista Virtual de Química*, 3, 2, 78-87.
- Zeremski, T., Tomić, N., Milić, S., Vasin, J., Schaeztl, R.J., Milić, D., Gavrilov, M.B., Živanov, M., Ninkov, J., Marković, S.B. (2021). Saline Soils: A Potentially Significant Geoheritage of the Vojvodina Region, Northern Serbia. *Sustainability*, 13, 14, 7891.
- Zhu, WY., Yang, L., Zhang, ZTL., Mu, CG., Wang, Y., Kou, YR., Jiang, GQ., Yin, M., Tang, SK. (2021). *Oceanobacillus salinisoli* sp. nov., a bacterium isolated from saline soil of Turpan city in Xinjiang province, north-west China. *Archives of Microbiology*, 203, 6, 2919-2924.