

**Imobilização de consórcio de bactérias extraídas da rizosfera de *echinochloa polystachya* (KUNTH) HITCHC., Poaceae, e seu potencial para a degradação de petróleo**

**Immobilization of bacteria consortium extracted from *echinochloa polystachya* (KUNTH) HITCHC., Poaceae, and its potential for petroleum degradation**

DOI:10.34117/bjdv6n7-623

Recebimento dos originais: 03/06/2020

Aceitação para publicação: 23/07/2020

**Letícia Malinoski**

Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Positivo  
Universidade Positivo (UP)

Endereço: R. Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300, Campo Comprido, Curitiba -  
PR, Brasil, CEP 81280-330

E-mail: leticia.malinoski1@gmail.com

**Leila Teresinha Maranhão**

Professora titular da Universidade Positivo. Doutora em Engenharia Florestal pela Universidade  
Federal do Paraná. Universidade Positivo (UP)

Endereço: R. Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300, Campo Comprido, Curitiba - PR,  
Brasil, CEP 81280-330

E-mail: maranhão@up.com.br

**RESUMO**

A biorremediação de ambientes contaminados por petróleo por meio de microrganismos degradadores vem sendo apontada como um dos métodos mais viáveis para tratamento, tanto pela vantagem econômica quanto ambiental. Porém, há necessidade de otimização desse processo, com o uso de diferentes espécies de microrganismos para degradar todos os componentes do petróleo, assim como maneiras de preservar a viabilidade desses microrganismos e com métodos que permitam o armazenamento e a formação de produtos que possam ser usados em larga escala. Isso posto, a presente pesquisa tem como objetivo principal analisar a eficiência na degradação de petróleo por consórcio bacteriano imobilizado constituído por três bactérias identificadas e previamente isoladas da rizosfera de *Echinochloa polystachya* (KUNTH) HITCHC. As bactérias, denominadas como “Amarela”, “Branca” e “Mostarda”, foram identificadas e formaram a composição de um consórcio biodegradador. Esse consórcio foi imobilizado por encapsulação em alginato, e revestido por uma solução de nanoquitosana, visando o intuito de aumentar a superfície de contato entre cápsula e poluente, otimizando a velocidade da cinética da reação de quebra do poluente pelo consórcio. Os testes de degradação e viabilidade comprovaram que o consórcio degrada o petróleo de forma efetiva e gradativa, e ainda com o potencial da formação de biossurfactantes. O uso de nanotecnologia foi destaque como uma inovação para a formulação desse novo revestimento para melhoria do processo e geração de um produto sustentável para a biorremediação de meios contaminados.

**Palavras-chave:** Biorremediação, Consórcio, Imobilização, Nanotecnologia.

**ABSTRACT**

The bioremediation of petroleum contaminated environments by microorganisms has been identified as one of the most viable methods for treatment, both for its economic and environmental advantage.

However, there is a demand to optimize such process, with the use of different species of microorganisms to degrade most components of petroleum, as well as methods to preserve the viability of these microorganisms and of the possibility of formation of products that can be used on a large scale. That said, the present research has as main objective the analysis of the efficiency in the degradation of petroleum by immobilized bacterial consortium constituted by three bacteria identified and previously isolated from the rhizosphere of *Echinochloa polystachya* (KUNTH) HITCHC. The species of bacteria, denominated “Yellow”, “White” and “Mustard”, were identified and formed the composition of the consortium. This consortium was immobilized by encapsulation in alginate, and coated with a nanoquitosan solution, that aids in increasing the contact surface between the consortium capsule and pollutant, optimizing the kinetics speed of the pollutant breaking reaction by the bacteria. The degradation and viability tests proved that the consortium degrades oil effectively and gradually and has the potential for the production of biosurfactants. The use of nanotechnology was highlighted as an innovation for the formulation of this new coating to improve the process and generate a sustainable product for the bioremediation of contaminated media.

**KeyWords:** Bioremediation, Consortium, Immobilization, Nanotechnology.

## 1 INTRODUÇÃO

O petróleo é uma matéria prima não-renovável, porém essencial para a sociedade. Ele e seus petroderivados estão presentes em combustíveis, na formulação de plásticos, cosméticos, borrachas, fibras, asfalto e até de alguns medicamentos. Isso destaca a alta demanda de extração e refinamento do composto, que acabam causando derramamentos em solos e oceanos (GERALDO et al., 2020). Essa contaminação por petróleo causa problemas maiores quando se procura tratar esses ambientes, já que métodos não biológicos podem torná-los inviáveis para a geração de vida (GALLOTTA et al., 2012).

Métodos biológicos utilizados como remediação de ambientes contaminados, como a Biorremediação, são alternativas viáveis para degradar esses poluentes, pois propõem uma maior preservação do ambiente, principalmente se forem utilizados microrganismos naturais (MARTINS et al., 2014). Microrganismos isolados da rizosfera de plantas identificadas como fito-remediadoras, ou seja, plantas utilizadas no método de biorremediação, são os verdadeiros responsáveis por degradar esse petróleo e propiciar um ambiente ainda viável (SANTOS et al., 2018).

Bactérias compreendem um dos tipos de microrganismos degradadores de petróleo (KARLAPUDI et al., 2018; WETLER-TONINI et al., 2010; MORAIS et al., 2012), no entanto o estudo propõe, identificar as espécies de cada bactéria trabalhada, analisar seus parâmetros de crescimento e simular sua interação, viabilizando a criação de consórcios bacterianos, que potencializem e otimizem a degradação. Também será estudada a imobilização e preservação desse consórcio por encapsulamento, conforme formulado em estudo anterior, para formar produtos aplicáveis para situações de biorremediação de solo contaminados, trazendo, assim, uma melhoria inovadora ao tratamento feito por empresas petrolíferas.

Com isso, foi definido como objetivo principal do seguinte estudo analisar a eficiência na degradação de petróleo por consórcio bacteriano imobilizado constituído por três bactérias identificadas e previamente isoladas da rizosfera de *E. polystachya*, assim como extrair, identificar e converter em produto biorremediador as espécies de três bactérias comprovadamente degradadoras de petróleo previamente isoladas de modo que a biorremediação seja melhorada.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 PETRÓLEO E MÉTODOS DE REMEDIAÇÃO**

O petróleo é a maior fonte de energia fóssil utilizada mundialmente. Em sua extração e manipulação, derramamentos e contaminações tanto em solo quanto em ambientes aquáticos tornam-se riscos presumidos para empresas petrolíferas, afetando o meio ambiente da região (ANDRADE *et al*, 2010). Devido à complexidade da composição química do petróleo e as suas propriedades físicas, o tratamento de ambientes contaminados por petróleo torna-se um desafio a ser estudado, não somente para a retirada do componente tóxico, mas também para a recuperação das áreas afetadas (HEIDERSCHEIDT *et al*, 2016).

O tratamento da poluição causada pelo petróleo em ambientes terrestres pode ser feito de forma física, química ou biológica. Os métodos físicos envolvem a queima de componentes voláteis presentes no poluente, que diminui consideravelmente os níveis tóxicos da contaminação, mas, além de se mostrar um processo caro, acaba por deixar aquele solo infértil (LEAL *et al*, 2012; LIMA *et al*, 2014). Os métodos químicos, mais utilizados em indústrias, fazem uso da reação química de oxidação para clivar as estruturas mais complexas e mais nocivas do petróleo. Apesar de agredirem menos o solo que os métodos físicos, ainda existe uma alteração considerável no pH do meio e resíduos dos reagentes químicos (GRACIANO *et al*, 2012).

Dos métodos biológicos para o tratamento de áreas contaminadas por petróleo, se destaca a Biorremediação, por ser analisada como uma possibilidade mais acessível, rápida e barata de se retirar tais contaminantes do meio em que se encontram, ou deixá-los em uma condição não prejudicial para o meio que estava contaminado (ARAÚJO *et al*, 2014).

### **2.2 BIORREMEDIAÇÃO E MICRORGANISMOS DEGRADADORES**

A Biorremediação pode ser definida como o uso de organismos vivos na degradação de compostos tóxicos ou na sua conversão em substâncias menos nocivas (e, em determinados casos, com características benéficas ao meio que se encontram), e na aplicação desse tipo de metabolismo para a remediação ambiental (MARTINS *et al*, 2014).

O petróleo, apesar de ser um componente tóxico para muitos seres vivos, pode ser utilizado por determinados microrganismos como fonte de carbono e energia, contribuindo para um aumento no desenvolvimento natural desses organismos em ambientes contaminados. Já foram identificadas diversas espécies de fungos, leveduras e bactérias com potencial para degradação de petróleo, que efetuam essa ação remediadora tanto ambientes aquáticos quanto terrestres (TONINI *et al*, 2011).

As bactérias, além de serem maioria nos organismos identificados, ficam em destaque pela elevada produção de biossurfactantes, moléculas com propriedades tensoativas, de origem biológica, que possuem grande potencial industrial pelos seus benefícios no crescimento bacteriano, e pela fácil manipulação de parâmetros de crescimento em experimentos laboratoriais (TONINI *et al*, 2010; MORAIS *et al*, 2012). Gêneros de bactérias que já possuem comprovação de biodegradação de petróleo no solo incluem: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas*. As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são destacadas por estarem entre as mais utilizadas e identificadas dentro do ramo de biorremediação (WEBER *et al*, 2013; PEREIRA *et al*, 2012).

Por serem várias as espécies de bactérias com potencial degradador, é ideal encontrar uma forma em que se possa uni-las em um único meio, com o intuito de melhorar a degradação do composto tóxico. Uma forma seria a de formação de consórcios de microrganismos (MNIF *et al*, 2017).

### 2.3 CONSÓRCIOS DE MICRORGANISMOS

Um consórcio de microrganismos pode ser definido como um conjunto de microrganismos num mesmo meio de crescimento, utilizados para a produção otimizada de determinada substância ou degradação acelerada de determinado composto (SILVA *et al*, 2011, MNIF *et al*, 2017).

No caso de consórcios bacterianos para a degradação de petróleo e derivados, torna-se necessária a construção de um consórcio viável, pois, não é possível com somente uma espécie de bactéria, degradar todos os tipos de hidrocarbonetos presentes na composição do poluente (TONINI *et al*, 2010). Uma outra vantagem de se utilizar um consórcio é pela substância químicas que algumas bactérias produzem naturalmente em seu metabolismo, os biossurfactantes. Essas substâncias podem aumentar a biodisponibilidade de substratos insolúveis em água (como os hidrocarbonetos do petróleo), assim como facilitar o crescimento de bactérias próximas (PINHATI *et al*, 2014).

Formado, então, um consórcio com microrganismos de interesse, é interessante buscar maneiras de conservar e proteger esse material do meio externo, que pode conter uma alta toxicidade dos contaminantes assim como outros microrganismos que crescem neste mesmo meio. Imobilizar o

consórcio a partir do método de encapsulamento com polímeros é uma das saídas mais viáveis e baratas de conservação e imobilização (HOLKEM *et al.*, 2015; PAULO *et al.*, 2009)

## 2.4 MICROENCAPSULAMENTO E IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A microencapsulação é uma técnica que recobre gotas de materiais com outro material que atue como uma proteção, denominado de agente encapsulante, que permite que a liberação do conteúdo interno das cápsulas numa taxa mais lenta e contínua, e que o mesmo fique sobre ação de condições específicas (MENEZES *et al.*, 2012).

Uma das formas mais práticas de se produzir essas cápsulas é pelo método de gelificação iônica. Esse método se baseia no gotejamento de uma mistura de um polímero (o agente encapsulante) com carga conhecida e o material de interesse em uma solução de carga oposta ao do polímero, causando uma interação física de repulsão que forma a cápsula (PATIL *et al.*, 2012).

Os agentes encapsulantes que envolvem as microcápsulas formadas podem variar dependendo do tipo de material que deseja ser encapsulado, as condições que ele será submetido, e também todas as propriedades químicas do agente, como solubilidade, viscosidade e porosidade. Um agente principal estudado para a formação de cápsulas é o polissacarídeo alginato, devido a facilidade do mesmo se misturar ao material a ser imobilizado (NOGUEIRA, 2013). Porém, o alginato pode-se tornar quimicamente instável em determinadas situações, causando a ruptura ou a dissolução da cápsula no meio. Utilizar um segundo polímero como um revestimento das cápsulas as deixa mais resistentes, mais conservadas e lhes proporciona uma maior estabilidade (MENEZES *et al.*, 2012). Uma solução viável para esse problema é tratar as esferas de alginato com uma solução contendo o polissacarídeo de Quitosana.

A quitosana é proveniente da quitina, um dos polímeros mais abundantes na natureza. Seu uso na imobilização de microrganismos possui várias vantagens por ser facilmente diluída em ácidos fracos, facilitando seu manuseamento, e por não ser tóxica. Porém, apresenta poros no revestimento da esfera que diminuem a superfície de contato entre os microrganismos e o composto a ser degradado, fazendo com que o tempo de reação seja menor. A conversão de quitosana para nanoquitosana otimiza essa situação, pois na nanoquitosana, além do tamanho dos poros presentes na cápsula se tornam menores, ainda há um aumento no número de grupos hidroxila e amina na superfície do polissacarídeo, que melhoram a ligação entre produto e suporte. Esses dois fatores são vantajosos para melhorar a cinética da reação e do tempo para degradar o poluente (DAMBIES *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2009)

Mesmo com a proteção de um encapsulamento, não se torna viável manter as cápsulas de forma “fresca” (como esferas gelatinosas), pois à necessidade de transporte e armazenamento por

longos períodos podem danificar ou inviabilizar o material para uso (PAULO *et al.*, 2009). A liofilização é um método que retira a água presente em uma amostra em estado de congelamento, fazendo a mesma passar por um processo de sublimação (do estado sólido para o gasoso). Esse processo faz com que uma amostra líquida se torne sólida, aumentando seu tempo de vida útil (para até mais de 2 anos) e facilitando o transporte e o potencial comércio do produto elaborado (SOLA, 2011).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA DAS AMOSTRAS

A extração de DNA bacteriano foi realizada de acordo com o método Fenol/Clorofórmio. Assim, como material para a extração de DNA, foram diluídas as colônias bacterianas crescidas em Ágar Nutriente em Placas de Petri com 10 mL de tampão PBS (Solução Salina Tamponada) e esses conteúdos foram colocados em um tubo Falcon de 10 mL estéril. Os tubos foram centrifugados a 9000 rpm por 15 minutos. Com essa etapa, formou-se um sobrenadante, que precisou ser descartado, e um precipitado que foi lavado com 2 mL de tampão TE (0,01 M Tris-HCl, pH 8,00; 0,01 M EDTA). Os tubos foram homogeneizados com uso de um vórtex, repetiu-se a centrifugação (com os mesmos parâmetros) e mais uma vez o sobrenadante formado foi descartado.

O precipitado obtido foi ressuspenso em 500 µL de tampão TNE (0,01 M Tris-HCl, pH 8,00; 0,01 M NaCl; 0,01 M EDTA) e transferido para um microtubo estéril de 2 mL. Adicionou-se 20 µL de SDS 5% e os microtubos foram mantidos em Banho Maria a 37°C por 10 minutos. Depois, adicionaram-se 5 µL de proteinase K (20 mg/mL) e as amostras foram incubadas a 50 °C por duas horas. Depois de retirado da incubação, adicionou-se 5 µL de RNase (20 mg/mL) e 5 µL de Lisozima, seguido de mais uma nova incubação a 37°C por 30 minutos. Depois, o material foi mantido em Banho Maria a 95°C por mais 10 minutos.

Em seguida, uma centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos foi feita nos tubos, onde os sobrenadantes foram coletados em novos microtubos, onde adicionaram-se 500 µL da solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A mistura foi previamente homogeneizada para ser centrifugada a 12000 rpm durante 10 minutos. Com esse processo formaram-se fases aquosas na parte superior dos tubos, que foram retiradas e transferidas para novos microtubos de 2 mL. Nessa fase aquosa, adicionou-se 500 µL da solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), e outra centrifugação (usando os mesmos parâmetros anteriores) foi feita. Uma nova fase aquosa formou-se e esta foi transferida para outro microtubo, onde adicionou-se 500 µL da solução de Clorofórmio Puro e repetiu-se outra centrifugação de 12000 rpm por 15 minutos. Novamente formou-se uma fase aquosa na mistura, transferida para outro microtubo onde se adicionou aproximadamente 30 µL de acetato de

sódio (3M) e 600  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto gelado. A amostra foi, então, incubada em *freezer* a  $-20^\circ\text{C}$  em período *overnight*.

Depois de retirada do *freezer*, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 30 minutos, tendo seus sobrenadantes descartados e seus precipitados formados lavados com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Esse precipitado foi centrifugado uma segunda vez (nos mesmos parâmetros) para a retirada de um novo sobrenadante. Os microtubos passaram por um processo de secagem (para retirada de excesso de etanol) em estufa a  $37^\circ\text{C}$ . O DNA presente no microtubo foi ressuspenso com 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, agitado no vórtex e colocado em banho-maria por, aproximadamente, 15 minutos.

Para determinar a pureza e a concentração de DNA total obtida na extração, utilizou-se o método de espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific). Após determinados os valores de concentração e pureza, as amostras foram diluídas para concentração final de  $25 \times 10^{-9}$  (nano)  $\text{g}/\mu\text{L}$ .

Para sequenciar as bactérias selecionadas, foi necessário realizar uma reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificar a amostra de DNA extraída. Os reagentes utilizados para compor o mix utilizado na reação (para cada microtubo com amostra) foram: 13,4  $\mu\text{L}$  de Água Ultrapura Estéril; 2  $\mu\text{L}$  de Tampão 10x; 0,8  $\mu\text{L}$  dNTP's (100 mM); 0,5  $\mu\text{L}$  de cada *Primer* (10 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ); 0,6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mmol); 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq *Platinum* 1,5 unidades (Invitrogen®); e 2  $\mu\text{L}$  de DNA diluído da amostra (25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ); Constituindo um total de 20  $\mu\text{L}$  de mix de reagentes por microtubo. A reação foi realizada em Termociclador StepOnePlus (Life Technologies), programada para efetuar um ciclo de desnaturação inicial a  $95^\circ\text{C}$  por 5 minutos, seguido por trinta ciclos onde essa desnaturação seria repetida em um tempo mais curto, 60 segundos, para ser efetuada uma etapa de anelamento, feita em  $60^\circ\text{C}$  por 60 segundos, seguida por uma etapa de extensão feita em  $72^\circ\text{C}$  por 60 segundos e finalizando na temperatura de  $72^\circ\text{C}$  por 5 minutos para uma etapa de extensão final.

Uma eletroforese foi feita após a reação de PCR para a verificação da ampliação do gene. Os produtos de PCR foram pipetados em poços de gel de agarose 1,5% e o mesmo foi submetido a uma voltagem de 90 volts, para carrear o DNA pelos poros do gel. Passados 60 minutos de corrida, corou-se o gel com Brometo de Etídio por 15 minutos, para que, ao ser exposto a luz ultravioleta, as bandas do DNA amplificado ficassem visíveis no gel.

Com a amplificação verificada, foi necessário purificar as amostras para retirar qualquer resíduo proveniente da reação de PCR. Sendo assim, 10  $\mu\text{L}$  de cada um dos produtos de PCR foram tratados com 6,7  $\mu\text{L}$  de Acetato de Amônio (7,5 M) e 20  $\mu\text{L}$  de Etanol Ultrapuro. Essas soluções foram centrifugadas a 18000 rpm por 25 minutos, com o posterior sobrenadante formado descartado. As soluções precipitadas foram lavadas com 80  $\mu\text{L}$  de Etanol 70% e centrifugadas novamente em

18000 rpm por 17 minutos, com o sobrenadante novamente sendo descartado. Os microtubos, com os produtos de PCR aderidos a suas paredes, ficaram *overnight* em temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual. Após, as amostras foram ressuspensas em 20 µL de Água Ultrapura Estéril para serem enviadas para o sequenciamento.

Os resultados do sequenciamento de DNA foram avaliados pelo programa Geneious, para que os resultados apresentados pudessem ser analisados pela plataforma de bioinformática on-line BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Nucleotide, indicando as espécies com maior similaridade com a amostra.

### 3.2 COLORAÇÃO PARA CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO CRISTALINA

Para identificar a presença de corpúsculos de inclusão cristalina, produtos da esporulação da espécie *Bacillus thuringiensis*, as culturas a serem avaliadas foram repicadas em ágar nutriente inclinado, e incubadas por 24h a 30°C, e posteriormente por 48 a 72h em temperatura ambiente.

Foram preparados esfregaços de lâmina, fixados com uso de Bico de Bunsen, para ser feita a coloração por Azul de Coomassie por 3 minutos. Passado o tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas, para se observar em microscópio com objetiva de imersão os corpúsculos de inclusão cristalina do *Bacillus thuringiensis*, que se apresentam como estruturas tetragonais de cor azul intensa.

### 3.3 AUMENTO DE BIOMASSA

Para realizar o aumento da biomassa bacteriana de cada micro-organismo individualmente, iniciou-se um aumento de inóculo em um tubo de ensaio com 10 mL de Meio Mineral (em g L<sup>-1</sup>) (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,5 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 0,5 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 0,5 g; FeCl<sub>3</sub> - 0,01 g; MnCl<sub>2</sub> - 0,001 g; ZNSO<sub>4</sub> - 0,0001 g; CaCl<sub>2</sub> - 0,01 g) enriquecido com 0,4% de Extrato de Levedura e 2% de Glicerol com aproximadamente uma colônia coletada com Alça de Drigalski, que permaneceu em um *Shaker*, a 130 rpm e 36 °C, por 24h. Passado esse período, esse volume foi transferido para um frasco de erlenmeyer de 250 mL, que continha um volume do mesmo Meio de 100 mL, passando pelas mesmas condições. O conteúdo do frasco de erlenmeyer de 250 mL foi também transferido para outro de 500 mL, com o mesmo volume de Meio, onde o experimento em agitação constante foi repetido.

O aumento de biomassa foi realizado em um biorreator (Marca TecBio; Modelo de 7,5 L), onde foram colocados 5 L de Meio Mineral novamente enriquecido com 0,4% de extrato de levedura e 2% de glicerol, e 1% (v/v) do inóculo previamente preparado. Foi necessário também preparar, para que fosse possível controlar o pH da solução, uma solução de 200 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10% e uma solução de 200 mL de NaOH 3 M. A temperatura do biorreator foi ajustada para 36 °C, a quantidade de

oxigênio dissolvido (OD) para 2,5% e o pH para aproximadamente 6,5, sendo esses os parâmetros para todos os micro-organismos.

Depois de inoculada determinada bactéria no biorreator, amostras da solução foram retiradas periodicamente, sendo feitas análises de densidade óptica (DO) em cada amostra para avaliar o crescimento e o aumento de biomassa. Terminada a fermentação, de 24h para todos os microrganismos, o biorreator foi esvaziado em um frasco de erlenmeyer de 6 L.

Para a separação da biomassa bacteriana do meio, o frasco de erlenmeyer foi armazenado em geladeira até que fosse observado a decantação da maior parte da biomassa disponível, para então ser retirado o meio residual precipitado. A biomassa líquida foi armazenada em frascos de erlenmeyer de 1 L. Metade de cada uma das quantidades foi separada para liofilização em tubos Falcon de 50 mL, enquanto a outra metade foi separada para a utilização na formação do consórcio.

### 3.4 FORMAÇÃO DE CONSÓRCIO BACTERIANO

Para a formação dos consórcios, foi determinado que as concentrações celulares de cada bactéria deveriam ser iguais no consórcio, para avaliar como se comportariam os padrões de crescimento de cada organismo. Assim, depois de fermentadas em biorreator, alíquotas de cada amostra bacteriana foram retiradas para contagem celular em câmara de Neubauer, para a determinação da concentração celular de cada bactéria. Foi retirada a quantidade, em mL, necessária de cada amostra para que se tivesse a mesma concentração. Finalmente, foi obtido um consórcio com biomassa líquida equivalente a 50 mL.

### 3.5 IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA BACTERIANA POR LIOFILIZAÇÃO

Uma parte da biomassa líquida obtida para cada bactéria foi preparada para liofilização em *over-night* em um congelador a -20 °C, juntamente com 3 mL aproximadamente de glicerol como crioprotetor, para a adaptação do material.

Passado esse período, cada amostra de biomassa foi colocada em um Liofilizador (Marca ILSHIN; Modelo de 20 L), ajustado para atingir a temperatura de -80 °C automaticamente. O material permaneceu no equipamento até que fosse percebida a completa retirada de água da biomassa.

Depois de retirada do liofilizador, a biomassa agora liofilizada foi armazenada em um pequeno pote vedado, para evitar a entrada de umidade no material.

### 3.6 IMOBILIZAÇÃO DO CONSÓRCIO POR MICROENCAPSULAMENTO COM NANOQUITOSANA

O consórcio formado, de 50 mL, foi misturado com 1% de Alginato em pó até completa homogeneização com o auxílio de um Agitador Magnético. A solução contendo Alginato foi gotejada por uma seringa de 10 mL em uma solução de  $\text{CaCl}_2$  0,5%, com o auxílio de uma Bomba de Seringa Programável (Marca Syringepump ajustada para 0,5 mL/min., para a formação das microesferas iniciais de Alginato.

Assim que todo o material do consórcio foi convertido em microesferas, as mesmas foram lavadas com água destilada para retirada de qualquer resíduo de  $\text{CaCl}_2$ . As microesferas, então, ficaram por aproximadamente 40 minutos (sendo agitadas de 5 em 5 minutos) em uma solução previamente preparada de nanoquitosana.

### 3.7 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NANOQUITOSANA

Quitosana foi modificada para nanoquitosana pelo protocolo elaborado por Safari et al (2015).

Quitosana em pó (0,5% m/v) foi dissolvida em 1% de Ácido Acético sob agitação magnética constante em temperatura ambiente, e, de gota a gota, adicionou-se 50 mL de Molibdato de amônio (0,4% m/v), mantendo a agitação constante, para ser formada a solução contendo nanoquitosana líquida.

### 3.8 TESTES DE VIABILIDADE E DE POTENCIAL DEGRADADOR DO CONSÓRCIO

Depois de liofilizadas as esferas de nanoquitosana contendo os consórcios, sua viabilidade foi testada preparando-se 100 mL de Meio Mineral enriquecido com 0,4% de Extrato de Levedura e 2% de Glicerol erlenmeyers de 125 mL. Os frascos foram colocados em *shaker* a 130 rpm e 36 °C por 48h, sendo que foi retirada uma amostra referente ao tempo de 48h para avaliação de crescimento e de concentração celular do consórcio no meio.

Foi preparado, também, um teste pelo mesmo método para degradação do petróleo, com a única alteração na utilização do Meio Mineral enriquecido com 1% de petróleo bruto. Foram observados os tempos de degradação de 0h, 24h e 144h, e para cada foram feitas placas para observação de crescimento das colônias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TABELAS COMPARATIVAS DOS MICRO-ORGANISMOS IDENTIFICADOS

As três bactérias estudadas, denominadas, em estudos anteriores, como morfotipo Branca, Amarela e Mostarda (devido às conformações de suas colônias), que foram amplificadas após análises das sequências pelo BLAST, resultaram em correlações de 99% de similaridade com algumas espécies de bactérias.

Posteriormente, esses resultados foram também analisados pelo programa de bioinformática Geneious, que é capaz de verificar maiores correlações presentes em intersecções das sequências de DNA amplificadas, possibilitando ao BLAST uma leitura mais detalhada do código genético. Mesmo com o uso do programa, as mesmas correlações foram encontradas nos dois casos para os morfotipos “Amarela” e “Branca”.

O morfotipo “Amarela” apresentou correlação de 99% de similaridade com duas espécies de *Bacillus*: *B. thuringiensis* e *B. cereus* (Tab. 1).

**Tabela 1** – Identificação molecular do morfotipo de bactéria “Amarela” selecionada da rizosfera de *Echinochloa polystachya*, a partir do sequenciamento do DNA amplificado por reação de PCR, apresentando nível de similaridade, de acordo com o banco de dados BLAST®.

Espécie	Gram	Colônia	Faixa de temperatura de crescimento
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Positiva	Esbranquiçada, plana	10-45 °C
<i>Bacillus cereus</i>	Positiva	Esbranquiçada, plana	10-45 °C

Visualmente e em padrões de crescimento, as duas espécies são iguais (bastonetes com parede Gram Positiva com crescimento na mesma faixa de temperatura e mesma conformação de colônia), sendo consideradas variações de uma mesma espécie (CEUPPENS *et al*, 2013). A única diferença notável seria a presença de cristais proteicos intracelulares na *B. thuringiensis*, com característica patogênica para insetos. (ANGELO *et al*, 2010) O que torna essa diferença mais imperceptível, em muitos casos, é o fato dessa proteína ser codificada por uma sequência de genes presente no plasmídeo dessa bactéria, sendo que sem esse plasmídeo, *B. thuringiensis* e *B. cereus* não poderiam mais ser distinguidas (HELGASON *et al*, 2000).

O morfotipo “Branca” apresentou correlação de 99% de similaridade com quatro espécies de *Bacillus*: *Bacillus mycoides*, *Bacillus oryzarcorticis*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus* (Tab. 2).

**Tabela 2** – Identificação molecular do morfotipo de bactéria “Branca” selecionada da rizosfera de *Echinochloa polystachya*, a partir do sequenciamento do DNA amplificado por reação de PCR, apresentando nível de similaridade, de acordo com o banco de dados BLAST®.

Espécie	Gram	Colônia	Faixa de temperatura de crescimento
<i>Bacillus mycoides</i>	Positiva	Rizoidal	10-45°C
<i>Bacillus oryzaecorticis</i>	Positiva	Alaranjada, levemente elevada	15-45°C
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Positiva	Esbranquiçada, plana	10-45°C
<i>Bacillus cereus</i>	Positiva	Esbranquiçada, plana	10-45°C

Assim como a Amarela, houve similaridade com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus*. *B. mycoides*, comparada a *B. cereus*, só apresenta uma única diferença notável; a conformação de crescimento de suas colônias em formato rizoidal (como uma formação de raízes) (NAKAMURA *et al*, 1995), sendo essa espécie até por vezes referida como *B. cereus* var. *mycoides* (DROBNIIEWSKI, 1993). *B. oryzaecorticis* possui colônias alaranjadas, levemente elevadas, e não é citada como similar as outras espécies comparadas, apesar de semelhanças no gram e na faixa de crescimento, por ser vista como uma espécie nova, recentemente isolada (HONG *et al*, 2014).

A partir das características morfológicas, já se pôde dizer que o morfotipo “Branca” não poderia ser *B. oryzaecorticis* e nem *B. mycoides*, por não apresentar colônias alaranjadas e nem crescimento em formato rizoidal.

O protocolo de coloração dos corpúsculos de inclusão cristalina feito nos dois morfotipos “Branca” e “Amarela”, indicou por observação da microscopia a formação dos cristais em abundância somente no morfotipo “Amarela”. Pôde-se, assim, determinar que a “Amarela” é definida como *Bacillus thuringiensis* e a “Branca” é definida como *Bacillus cereus*.

O morfotipo “Mostarda” apresentou correlação de 99% de similaridade com quatro espécies de *Arthrobacter*: *Arthrobacter koreensis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter luteolus* e *Arthrobacter gandavencis* (Tab. 3).

**Tabela 3** – Identificação molecular do morfotipo de bactéria “mostarda” selecionada da rizosfera de *Echinochloa polystachya*, a partir do sequenciamento do DNA amplificado por reação de PCR, apresentando nível de similaridade, de acordo com o banco de dados BLAST®.

Espécies	Colônia	Faixa de temperatura de crescimento
<i>Arthrobacter koreensis</i>	Amarelas e planas (arredondadas)	~30°C
<i>Arthrobacter citreus</i>	Cor de “Amarelo-limão” que se intensifica com o crescimento, planas	25-32°C
<i>Arthrobacter luteolus</i>	Amarelas e planas	~37°C
<i>Arthrobacter gandavencis</i>	Amarelo forte	25-37°C

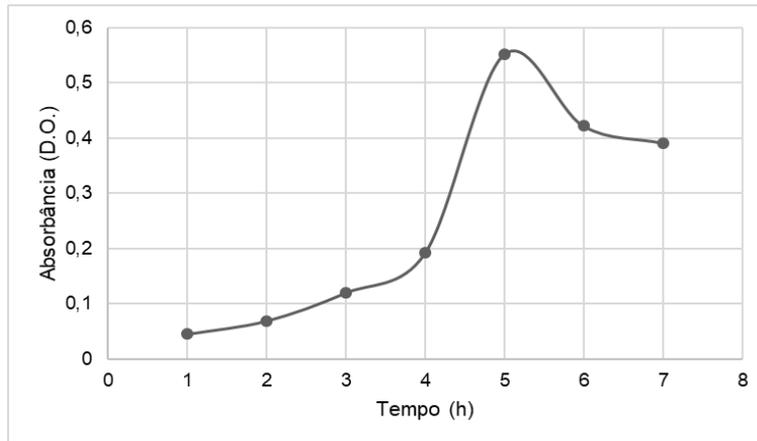
A bactéria Mostarda foi definida como pertencente ao gênero *Arthrobacter*, que se caracteriza como Bastonetes Gram Negativos em culturas ainda em fase de crescimento e Cocos Gram Positivos em culturas que já atingiram fase estacionária (STORMS *et al*, 2003). As principais diferenças das espécies correlacionas com a Mostarda (*Arthrobacter koreensis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter luteolus* e *Arthrobacter gandavencis*) são as faixas de temperatura de crescimento e as sutis diferenças de coloração em determinadas meios de crescimento (LEE *et al*, 2003; WAUTERS *et al*, 2000; STORMS *et al*, 2003; SACKS, 1953).

Como as características morfológicas de todas as correlações são muito similares, foi necessária uma pesquisa mais aprofundada sobre os parâmetros bioquímicos de cada espécie. Foi possível, também, a partir dos resultados obtidos da análise feita com o programa Geneious, que indicou uma correlação de 99% de similaridade somente com uma espécie de *Arthrobacter*, afirmar uma maior relação da “Mostarda” com a espécie *Arthrobacter luteolus*. Os parâmetros bioquímicos indicavam que somente essa espécie crescia na presença de Glicerol (WAUTERS, 2000), característica já avaliada, por ser esse um dos substratos utilizados em seu crescimento nesse estudo.

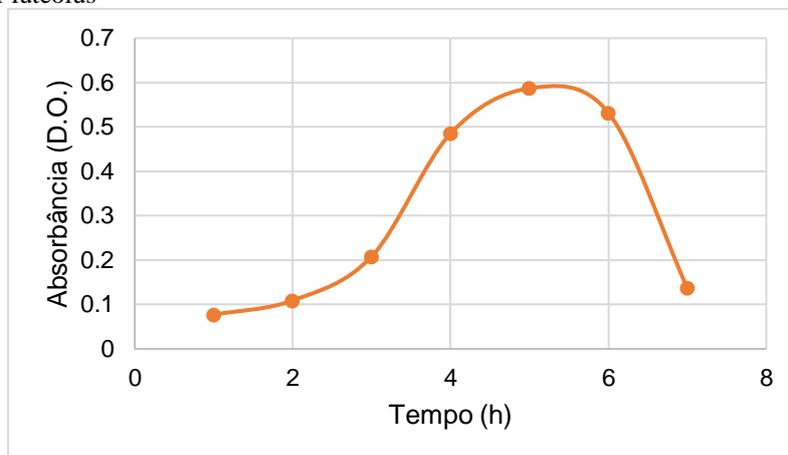
#### 4.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA

**Crescimento em Biorreator:** as três bactérias têm tempo de crescimento ótimo de 24h, sendo inoculadas em biorreator com os mesmos parâmetros padrão: pH de 6,5, 20% de Oxigênio Dissolvido, e com temperatura de 36°C. Os crescimentos foram todos mantidos por até 48h para que se pudesse acompanhar os principais pontos de crescimento (sendo, no total, para cada bactéria: “Branca”: 28h de crescimento; “Mostarda”: 42h de crescimento; e “Amarela”: 25h de crescimento). Os resultados de absorbância obtidos por Densidade Ótica para cada microrganismo estão representados nas figuras 1, 2 e 3.

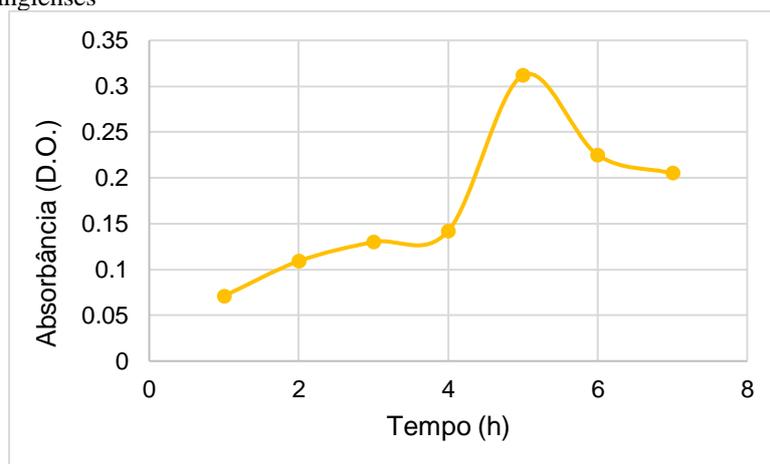
**Figura 1:** Crescimento bacteriano em biorreator representado pelos valores de absorbância obtidos por Densidade Ótica (D.O.) de *Bacillus cereus*



**Figura 2:** Crescimento bacteriano em biorreator representado pelos valores de absorbância obtidos por Densidade Ótica (D.O.) de *Arthrobacter luteolus*



**Figura 3:** Crescimento bacteriano em biorreator representado pelos valores de absorbância obtidos por Densidade Ótica (D.O.) de *Bacillus thuringiensis*



**Separação da biomassa líquida:** depois de separado o meio residual da biomassa líquida, foi possível obter aproximadamente 600 mL de biomassa líquida para a “Branca”, 400 mL para a “Mostarda” e 300 mL para a “Amarela”.

**Liofilização da Biomassa Bacteriana:** As biomassas líquidas permaneceram por duas semanas no liofilizador, para que toda a água fosse retirada. No final do processo percebeu-se que as amostras ainda estavam pastosas, não em formato sólido (em pó) como era esperado e foi percebido em estudos anteriores. Esse aspecto deve-se a quantidade elevada de glicerol acrescentado como crioprotetor, que, por ser viscoso, impediu a total conversão do material para a aparência esperada.

### 4.3 CONSÓRCIO BACTERIANO

A partir da contagem em câmara de Neubauer de cada microrganismo, foi possível determinar a concentração celular de cada um após o aumento de biomassa feito por biorreator, apontadas na tabela 4. A concentração de *Bacillus cereus* foi definida como padrão para a formação do consórcio.

**Tabela 4:** Concentrações celulares de cada microrganismo estudado.

Bactéria	Concentração Celular (células/mL)
<i>Bacillus cereus</i>	$2,73 \times 10^8$
<i>Bacillus thuringiensis</i>	$3,81 \times 10^9$
<i>Arthrobacter luteolus</i>	$2,79 \times 10^{10}$

### 4.4 IMOBILIZAÇÃO POR MICROENCAPSULAMENTO EM NANOQUITOSANA

**Liofilização das microcápsulas:** as microcápsulas do consórcio bacteriano formadas a partir de alginato e revestidas com a solução de nanoquitosana, depois da liofilização, diminuíram de tamanho considerando a perda de água causada pela secagem no liofilizador e pela conformação de tamanho nano dos poros na superfície das esferas devido à nanoquitosana. Homan (2016) ao fazer as cápsulas pelo método, sem uso da nanoquitosana, e liofilizá-las, constatou também uma alteração no tamanho, mas que ainda se assimilava muito ao tamanho das cápsulas originalmente. Isso se demonstra uma vantagem alcançada pelo método com nanotecnologia quanto a facilidade de transporte e armazenamento do produto, que facilita sua comercialização.

Não foram encontrados artigos que utilizassem do revestimento de nanoquitosana para a preparação de cápsulas com microrganismos degradadores de petróleo.

A conformação das microcápsulas pós liofilização está presente na Figura 4

**Figura 4:** Aspecto das microcápsulas pós liofilização

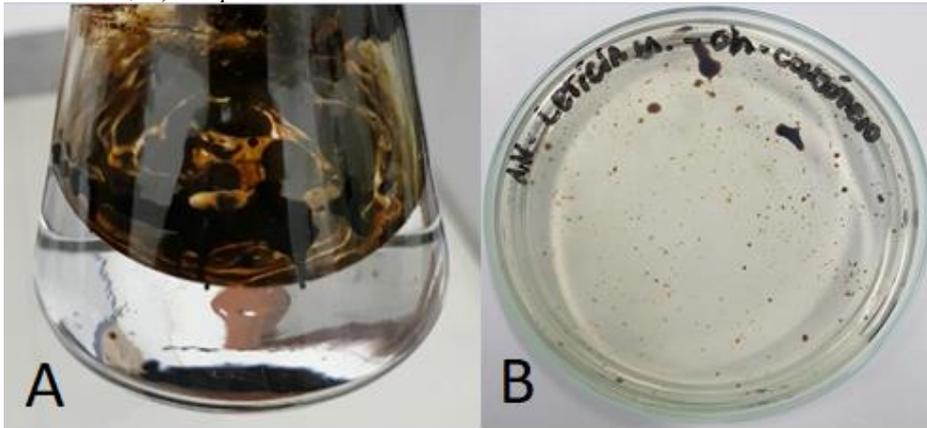
**Teste de Viabilidade Celular e de Degradação de Petróleo:** Foi avaliada a concentração de células por mL e o aspecto morfológico por microscopia depois de 48h em que 50 microcápsulas foram incubadas em Meio Mineral Enriquecido. A concentração presente era de  $3,01 \times 10^8$  células/mL, o que indica que a viabilidade do consórcio pós encapsulamento e liofilização. As microcápsulas ainda estavam presentes em grande quantidade do meio, indicativo da liberação do inóculo de forma controlada no meio. O aspecto de turbidez e o meio com as microcápsulas estão mostrados na Figura 5.

**Figura 5:** Aspecto de turbidez no meio depois de 48h de incubação das microcápsulas

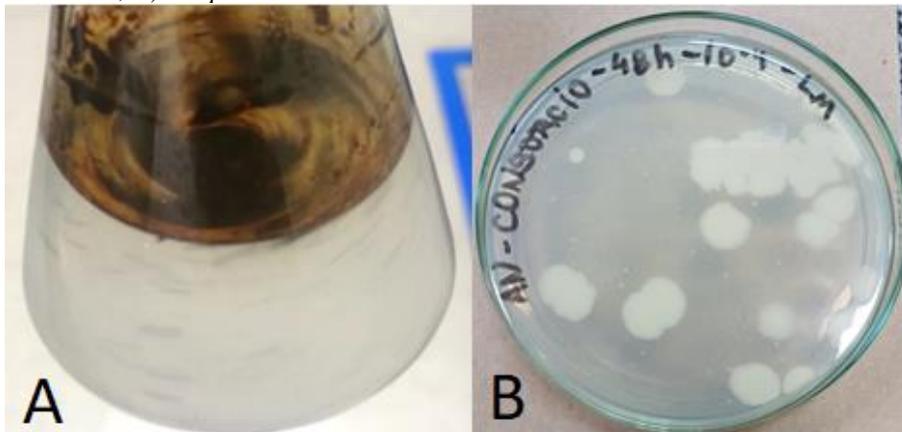
**Teste de Degradação de Petróleo:** Foi observada a degradação do petróleo nos tempos de 0h (sem ação do produto), 24h e 144h. Para observar efetivamente, era necessário agitar o frasco. Ao colocar o produto, o petróleo não se dissolvia no meio mineral e não se desprendia da parede do frasco (Figura 6 - A). Em seu plaqueamento, como esperado não houve crescimento (Figura 6 - B). Depois de 24h,

o meio já estava turvo, e o petróleo já começasse a se desprender das paredes do frasco (Figura 7 – A). A placa deste tempo apresentava algumas colônias (Figura 7 – B). Depois de 6 dias de experimento, o petróleo facilmente era limpo das paredes do frasco, e apresentava um aspecto particulado, mais diluído no meio mineral (Figura 8 – A). As cápsulas ainda estavam presentes sem aparentar ruptura. A placa referente a essa amostra apresentou várias colônias, averiguando o crescimento (Figura 8 – B).

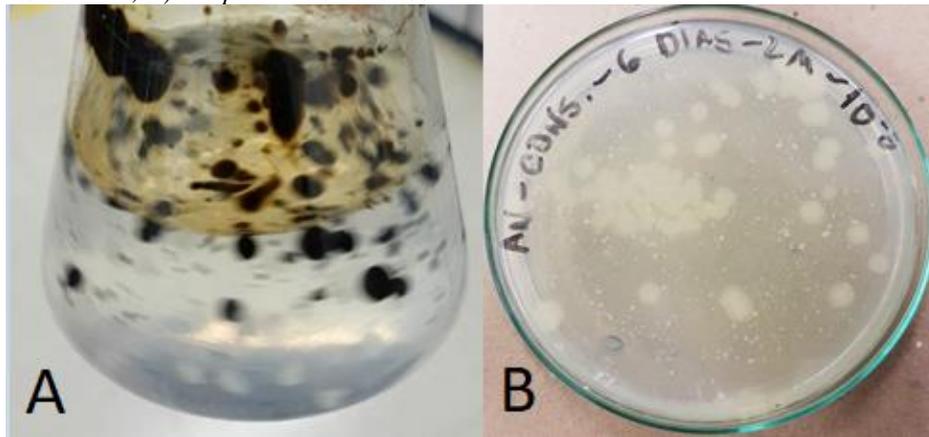
**Figura 6:** 0h de aplicação do produto para degradação de Petróleo, sendo que: A) Aspecto da degradação no frasco com esferas + Meio Mineral; B) Plaqueamento da amostra.



**Figura 7:** 24h de aplicação do produto para degradação de Petróleo, sendo que: A) Aspecto da degradação no frasco com esferas + Meio Mineral; B) Plaqueamento da amostra.



**Figura 8:** 144h de aplicação do produto para degradação de Petróleo, sendo que: A) Aspecto da degradação no frasco com esferas + Meio Mineral; B) Plaqueamento da amostra.



## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, neste estudo, indicam que a utilização de um consórcio composto por bactérias identificadas e comprovadamente degradadoras de petróleo, encapsuladas e liofilizadas tornaram-se um produto eficiente nas variantes de preservação, armazenamento e para na aplicação como biorremediação em ambientes contaminados. Destaca-se a relevância da formulação de um protocolo para um produto com essas características, devido a demanda de tratamentos alternativos para remediação da contaminação por petróleo e seus derivados. Corroborando para a confirmação da relevância da pesquisa para a sociedade atual.

A pesquisa apresentou o estudo e a identificação de uma espécie do gênero *Anthrobacter sp.*, que não havia sido identificada dentro no núcleo de pesquisa em degradação de petróleo e petroderivados da Universidade. Possibilitando novas investigações e aprimoramentos de pesquisas com a espécie em pesquisas futuras.

Os testes de degradação e viabilidade comprovaram que o consórcio degrada o petróleo de forma efetiva e gradativa, como esperado do método com encapsulamento. Um ponto interessante a se destacar foi a observação do desprendimento do poluente das paredes do frasco, como visto na Figura 8, que pode ser indicativo da produção de biossurfactantes pelas bactérias.

O estudo trouxe o uso da técnica de nanotecnologia para a formação do revestimento de produtos para a biorremediação de petróleo, apesar de não ter sido encontrado bibliografia que trate do tema em outros estudos, que avaliam outros microrganismos biorremediadores. Desta forma, a pesquisa contribui com um método com potencial para o melhoramento da reação de remediação, com a nanotecnologia na formação das microcápsulas de quitosana.

Como perspectivas futuras, é preciso analisar com maior detalhe como é o comportamento do consórcio em um crescimento mais prolongado, como é o crescimento das bactérias que o compõem, e quais são os biossurfactantes produzidos. Também se torna necessário o uso de análises

físicas para avaliar a conversão de quitosana para nanoquitosana e assim, analisar a conformação dos poros do polissacarídeo, e determinar a viabilidade e eficácia do protocolo pesquisado e sua aplicação para a formulação desse novo revestimento para melhoria do processo e geração de um produto sustentável para a biorremediação de meios contaminados.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. A.; *et al* Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**. v. 35, n.3, p. 17-43 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-46702010000300002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000300002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 17 Mar 2017.
- ANGELO, E. A. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 31, n 4, p. 945-958, 2010. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/7599/6690>>. Acesso em 13 Mar. 2017.
- ARAÚJO, A. M. *et al* Protocolo para Biorremediação de Águas Contaminadas por Petróleo e Derivados. **e-xacta**. v. 7, n. 1, p. 55-63, 2014. Disponível em: <<http://revistas2.unibh.br/index.php/dcet/article/view/973/669>>. Acesso em 19 Mar 2017.
- BOBROWSKI, V.L. *et al* Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Cienc. Rural**, v. 33, n. 5, p. 843-850, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782003000500008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782003000500008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 13 Mar. 2017.
- CEUPPENS, S. *et al* Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. **FEMS Microbiol Ecol**; v. 84, n 3, p. 433-450, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article/84/3/433/577935/Diversity-of-Bacillus-cereus-group-strains-is>>. Acesso em 13 Mar. 2017.
- DAMBIES, L. *et al* Preparation of Chitosan Gel Beads by Iontropic Molybdate Gelation. **Biomacromolecules**. v. 2, p. 1198-1205, 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm010083r>> Acesso em 16 Jun. 2017
- DROBNIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and Related Species. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**. v. 6, n 4, p. 324-338, 1993. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/6/4/324.short>>. Acesso em 13 Mar. 2017.
- GALLOTTA, F. D. C. *et al*. Source identification of petroleum hydrocarbons in soil and sediments from Iguac, u River Watershed, Paraná, Brazil using the CHEMSIC method (CHEMometric analysis of Selected Ion Chromatograms). *Journal of Chromatography A*. v. 1235, p. 149– 158, 2012. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967312003160>> Acesso em 16 Jul. 2020.
- GERALDO, M. R. *et al*. Imobilização de consórcio de bactérias degradadoras de petróleo obtidas da rizosfera de *panicum aquaticum* poir., poaceae. **Braz. J. of Develop.** v. 6, n. 7, p.45816 – 45830,

2020. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/13066/10984>> Acesso em 16 Jul. 2020.

GRACIANO, V. A. et al. Remediação de um solo contaminado com petróleo por Oxidação Química. **Brasil Ciência Solo**, v. 36, n. 5, p. 1656-1660, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-06832012000500030&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832012000500030&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 16 Mar. 2017.

HEIDERSCHIEDT, D. Conceitos Aplicados à Poluição do Solo decorrente do Derrame de Petróleo e seus Derivados. **Revista Maiêutica**. v. 4, n. 1, p. 7-14, 2016. Disponível em: <[https://publicacao.uniasselvi.com.br/index.php/GAM\\_EaD/article/view/1533](https://publicacao.uniasselvi.com.br/index.php/GAM_EaD/article/view/1533)>. Acesso em 17 Mar 2017.

HELGASON, E. et al *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**; v. 66, n 6, p. 2627–2630, 2000. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/66/6/2627.short>>. Acesso em 13 Mar. 2017.

HOLKEM, A. T. et al Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica interna. **Ciência e Natura**. v. 37, p. 125-131. 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/19741>> Acesso em 16 Jun. 2017.

HOMAN, S. **IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO EXTRAÍDAS DA RIZOSFERA DE PLANTAS FITORREMEIADORAS**. 2016.

HONG, S. W. et al *Bacillus oryzaecorticis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from rice husks. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**; v. 64, p. 2786–2791, 2014. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.058768-0>>. Acesso em 13 Mar. 2017.

HUANG, K. et al Preparation and Properties of Nanochitosan. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 48, p. 1–5, 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03602550903159069?journalCode=lppt20>> Acesso em 16 Jun. 2017

KARLAPUDI, A. P. et al. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution - a review. **Petroleum**. 2018; Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405656117301530>> Acesso em 16 Jul. 2020.

LEAL, M. G.; MOURA, M. C. P.; SILVA, A. V. Cogeração de Energia Através do Tratamento de Solos Contaminados com Hidrocarbonetos. **E-xacta**. v. 5, n. 1, p. 133-158, 2012. Disponível em: <<http://revistas.unibh.br/index.php/dcet/article/view/769>>. Acesso em 16 Mar. 2017.

LEE, J. S. et al *Arthrobacter koreensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from soil. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**; v. 53, p. 1277–1280, 2003. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.02492-0>>. Acesso em 13 Mar. 2017.

LIMA, C. F.; ARAÚJO, R. S. Remoção de compostos BTEX em solo areno-argiloso usando processo de termodessorção. **Conexões Ciência e Tecnologia**. v. 8, n. 3, p. 19-28, 2014. Disponível em: <<http://conexoes.ifce.edu.br/index.php/conexoes/article/view/707>>. Acesso em 16 Mar. 2017

MALIK, Z. A. *et al* Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n. 3, p. 650-688. 2012. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/99450/88738>> Acesso em 16 Jun. 2017.

MARTINS, A. S., *et al* Bioprospecção de bactérias com potencial tecnológico para biorremediação de ecossistemas impactados por mercúrio e cromo. **Geochimica Brasiliensis**. v. 28, n. 1, p. 36-42, 2014. Disponível em: <<http://geobrasiliensis.org.br/ojs/index.php/geobrasiliensis/article/view/363/>>. Acesso em 21 Fev. 2017.

MENEZES, C. R. *et al*. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2013nahead/a18613cr2012-0763.pdf>>. Acesso em 16 Jun. 2017.

MNIF, I. *et al* Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**. v.109, p. 72-81. 2017. Disponível em: <[http://www.psep.ichemejournals.com/article/S0957-5820\(17\)30034-4/fulltext](http://www.psep.ichemejournals.com/article/S0957-5820(17)30034-4/fulltext)> Acesso em 16 Jun. 2017.

MORAIS, R. K. S., *et al* Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **SCIENTIA PLENA**. v. 8, n. 10, 2012. Disponível em: <<https://scientiaplenua.emnuvens.com.br/sp/article/view/1051/>>. Acesso em 21 Fev. 2017.

NAKAMURA, L. K. *et al* Clarification of the Taxonomy of *Bacillus mycoides*. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**; v. 45, n 1, p. 46-49, 1995. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-45-1-46>>. Acesso em 13 Mar. 2017.

NOGUEIRA, M. B. **Atividade Antagonista de *Lactobacillus brevis* e *Bifidobacterium lactis* contra *Streptococcus mutans* e sua viabilidade na Forma Livre e Microencapsulada em Goma de Mascar**. 2013. Disponível em: <<http://www.escavador.com/sobre/7671936/michele-barbosa-nogueira>>. Acesso em 16 Jun. 2017.

PATIL, P. *et al* A Review on Ionotropic Gelation Method: Novel Approach for Controlled Gastroretentive Gelspheres. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, 2012. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/279710571\\_A\\_review\\_on\\_ionotropic\\_gelation\\_method\\_Novel\\_approach\\_for\\_controlled\\_gastroretentive\\_gelspheres](https://www.researchgate.net/publication/279710571_A_review_on_ionotropic_gelation_method_Novel_approach_for_controlled_gastroretentive_gelspheres)> Acesso em 16 Jun. 2017

PAULO, E. M. *et al* Polímeros constituídos por carboidratos utilizados no processo de microencapsulação de bactérias: uma revisão. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**. v. 1, n. 4, p. 185-191 2009. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufba.br:8080/ri/handle/ri/7221>>. Acesso em 16 Jun. 2017.

PEREIRA, A. R. B., *et al* Uso de Microorganismos para a Biorremediação de Ambientes Impactados. **Pereira & Freitas**. v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/4818/2993/>>. Acesso em 21 Fev. 2017.

PINHATI, F. R. *et al* Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Quim. Nova.** v. 37, n. 8, p. 1269-1274, 2014. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=249](http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=249)> Acesso em 16 Jun. 2017.

SANTOS, J. J., *et al*. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. **Journal of Environmental Management.** v. 210, p. 104 – 113, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030147971830015X>> Acesso em 16 Jul. 2020.

SACKS, L. E. Observations on the Morphogenesis of *Arthrobacter Citreus*, Spec Nov. **Journal of Bacteriology.** v. 67, n. 3, p. 342–345, 1954. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC357230/>>. Acesso em 13 Mar. 2017.

SAFARI, J. *et al* Chitosan nanoparticles as a green and renewable catalyst in synthesis of 1,4-dihydropyridine under solvent-free conditions. **New Journal of Chemistry.** v. 1, p. 1-3. 2013. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/-/content/articlelanding/2015/nj/c4nj01730g#!divAbstract>> Acesso em 16 Jun. 2017

SILVA, A.R. *et al* Seleção de Consórcio de Microrganismos para Estudo da Biorremediação de Solo Contaminado. **II CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEIO AMBIENTE SUBTERRÂNEO.** 2011. Disponível em: <<https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/28149>> Acesso em 16 Jun. 2017.

SOLA, M. C. **Manutenção de Microrganismos: Conservação E Viabilidade.** 2011. Disponível em: <[http://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011\\_Marilia\\_Cristina\\_2.pdf](http://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011_Marilia_Cristina_2.pdf)>. Acesso em 16 Fev. 2016.

STORMS, V. *et al* *Arthrobacter gandavensis* sp. nov., for strains of veterinary origin. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 53, p. 1881–1884, 2003. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.02353-0>>. Acesso em 13 Mar. 2017.

WAUTERS, G. *et al* Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens, Spec Nov. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.** v. 38, n. 6, p. 2412–2415, 2000. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/38/6/2412.short>>. Acesso em 13 Mar. 2017.

WEBER, B. D., *et al* Utilização da Biorremediação como ferramenta para o controle da Degradação Ambiental causada pelo Petróleo e seus Derivados. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal.** v. 10, n. 1, p. 114-133, 2013. Disponível em: <<https://unipinhal.edu.br/>>. Acesso em 21 Fev. 2017.

WETLER-TONINI, R. M. C., *et al* Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. **Revista Virtual de Química.** v. 3, n. 2, p. 78-87, 2011. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/173/>>. Acesso em 21 Fev. 2017.

WETLER-TONINI, R. M. C., *et al* Degradação e Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: Revisão. **Oecologia Australis.** v. 14, n. 4, p. 1010-1020, 2010. Disponível em: <<https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/view/7128/>>. Acesso em 21 Fev. 2017.

ZWICK, M. E. *et al* Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: Backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. **Genome Research**, n. 22, p.1512–1524, 2012. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/22/8/1512.short>>. Acesso em 13 Mar. 2017.