

ESTUDO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE UMA BACTÉRIA ISOLADA DO REJEITO DE PETRÓLEO*

Márcio de Moraes Tavares¹
Marcela dos Passos Galluzzi Baltazar²
Lidiane Maria de Andrade³
Denise Crocce Romano Espinosa³
Bruno Karolski⁴
Jorge Alberto Soares Tenório⁵

Resumo

A contaminação de solos e do ambiente hídrico por hidrocarbonetos de cadeias longas, geralmente por rompimentos de dutos ou por acidentes ocorridos no seu transporte afetam o meio ambiente de forma deletéria. Visando aplicabilidades futuras na remediação de solos e águas, existe a necessidade de estudos de biodegradação específicos, como por exemplo, bactérias que utilizam óleos de cadeias longas como fonte de carbono, visando melhorar o entendimento do mecanismo de interação do óleo com as bactérias. Baseado neste raciocínio, para desenvolvimento deste trabalho que visou encontrar, estudar e entender o metabolismo de uma microbiota capaz de utilizar hidrocarbonetos de cadeias longas como fonte de carbono, foram isoladas linhagens de bactérias provenientes de uma comunidade encontrada em borra de petróleo. Esta comunidade bacteriana teve avaliado seu poder de biodegradação de várias moléculas, constituintes do petróleo, assim como a sua preferência metabólica por cadeias específicas, resultando em um melhor entendimento do processamento dos componentes do óleo derivado de petróleo por micro-organismos. Os resultados de cromatografia comprovaram a biodegradação através da redução dos picos, e através do estudo dos cromatogramas foi possível identificar as substâncias biodegradadas.

Palavras-chave: Biodegradação; Bactéria, Petróleo; Cromatografia.

STUDY OF THE BIODEGRADATION POTENTIAL OF AN ISOLATED BACTERIUM OF PETROLEUM REJECTION

Abstract

Contamination of soils and the hydrological environment by hydrocarbons of long chains, generally due to ruptures of ducts or by accidents occurred in their transport, affect the environment in a deleterious way. Aiming for future applications in soil and water remediation, there is a need for specific biodegradation studies, such as bacteria that use long chain oils as a source of carbon, in order to improve understanding of the interaction mechanism of oil and bacteria. Based on this reasoning, for the development of this work aimed at finding, studying and understanding the metabolism of a microbiota capable of using long chain hydrocarbons as a carbon source, bacteria lineages were isolated from a community found in oil sludge. This bacterial community has evaluated its biodegradation power of several molecules, constituents of petroleum, as well as its metabolic preference for specific chains, resulting in a better understanding of the processing of petroleum derived components by microorganisms. The results of chromatography proved biodegradation by reducing the peaks, and by studying the chromatograms it was possible to identify the biodegradable substances.

Keywords: Biodegradation; Bacterium; Petroleum; Chromatography.

- ¹ Engenheiro Químico, Mestre em Engenharia Mecânica, Doutorando em Engenharia Química, Coord. do Curso de Eng. Civil e de pós graduação em Eng. de Segurança do Trabalho da UNAERP, Guarujá, SP, Brasil (mtavares@unaerp.br).
- ² Engenheira Química e Doutora em Engenharia Química pela Universidade de São Paulo, SP, Brasil (mgalluzzi@usp.br).
- ³ Engenheira Química, Mestre e Doutora em Engenharia Química, Pós-doutorado pela Escola Politécnica, São Paulo, SP, Brasil (lidiane.andrade@gmail.com).
- ⁴ Engenheiro Químico, Mestre e Doutor em Engenharia Química, Pós-doutorado pela Escola Politécnica, São Paulo, SP, Brasil (brukarolski@gmail.com).
- ⁵ Engenheiro Metalurgista, Mestre e Doutor em Engenharia Metalúrgica, Professor Livre-Docente pela Escola Politécnica, SP, Brasil (jtenorio@usp.br).

1 INTRODUÇÃO

A eficiência da biorremediação está associada a uma população microbiana adaptada ao consumo dos contaminantes e como esta pode ser enriquecida e mantida no ambiente. De acordo com vários trabalhos [1, 2, 3, 4], a inoculação de bactérias com habilidade em biodegradar hidrocarbonetos pode reduzir o tempo de tratamento, no entanto muitos estudos mostram que esta técnica ainda não é muito eficiente, pois necessita de mais estudos e desenvolvimento [5, 6, 7].

Visando aplicabilidades futuras na remediação de solos e águas, existe a necessidade de estudos de biodegradação específicos, como por exemplo, como que bactérias utilizam óleos de cadeias longas como fonte de carbono, visando melhorar o entendimento do mecanismo de interação do óleo (fonte de carbono) com as bactérias (agentes metabólicos de degradação).

Assim, um dos objetivos desse trabalho foi isolar e identificar uma bactéria proveniente da borra de petróleo e estudar sua atividade de biodegradação de cadeias constituintes do petróleo como fonte de carbono.

A avaliação preliminar da capacidade dos microrganismos em degradar os poluentes é o primeiro passo a ser tomado no desenvolvimento de um projeto de biorremediação, como os que utilizam técnicas de bioaumentação.

1.1 Processo de biodegradação do petróleo por bactérias.

A eficiência de biorremediação do sistema scaffold-bactéria foi analisado por Roberto et al. [8], sobre petróleo bruto e n-alcenos usando duas cepas bacterianas altamente degradantes de hidrocarbonetos: a estirpe do modelo de hidrocarbonoclasta marinha *Alcanivorax borkumensis SK2* e a linhagem do solo de cadeia longa N-alceno degradador *Nocardia*.

Esses autores realizaram uma análise morfológica que destacou uma alta capacidade de adesão e proliferação de células das bactérias dentro de toda a estrutura tridimensional interligada. Taxas de degradação de HC, avaliada pela análise GC-FID, demonstrou o maior desempenho degradante das células imobilizadas se comparado com a cultura líquida submersa convencional.

1.2 Microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos

A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é formada por diversos gêneros microbianos, mas os principais são as bactérias e os fungos. Eles são encontrados em ambientes marinhos, de água doce e no solo. Os organismos podem metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente, de forma que é requerida uma mistura de populações com capacidade enzimática para degradar todos os hidrocarbonetos encontrados no petróleo.

São conhecidos 25 gêneros de bactérias e 27 de fungos, que fazem a degradação dos hidrocarbonetos no ambiente marinho [9], enquanto que nos solos são registrados 22 gêneros de bactérias e 31 de fungos [10, 11].

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Métodos

Foi realizado um desenho experimental para que se fosse possível atingir os objetivos deste trabalho (Figura 1).

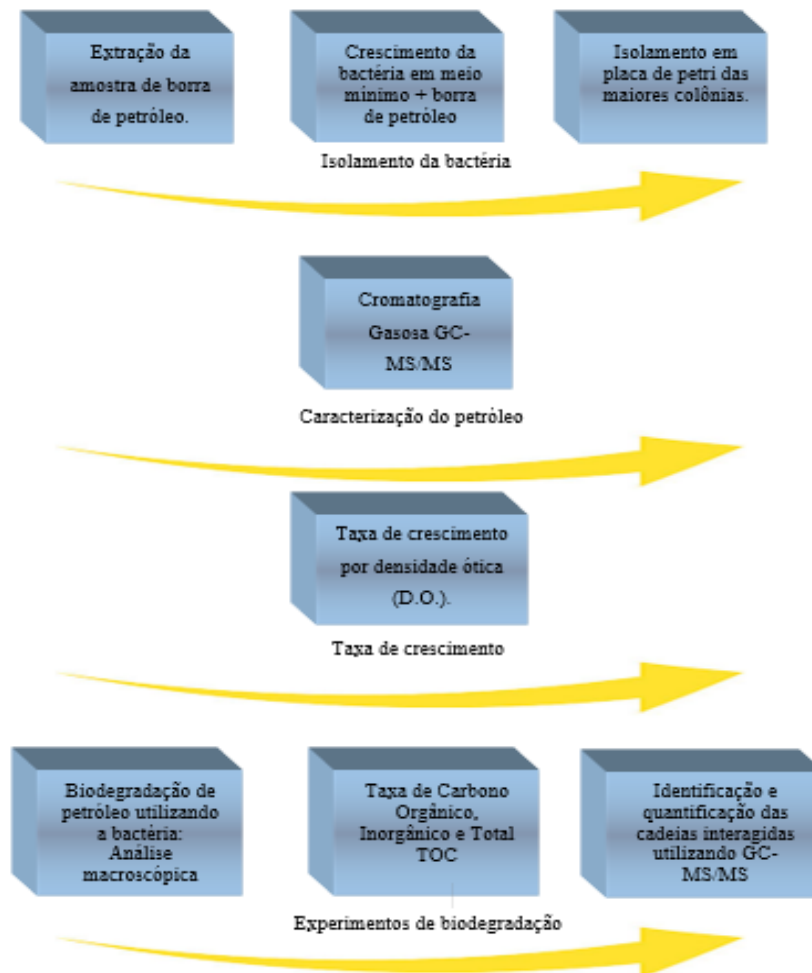


Figura 1. Fluxograma das atividades gerais desenvolvidas em laboratório.

Este trabalho seguiu 3 subseções, descritas a seguir:

- 1º Isolamento da bactéria com capacidade de biodegradação de petróleo;
- 2º Caracterização do petróleo;
- 3º Taxa de crescimento da cepa isolada;
- 4º Experimentos de potencial de biodegradação.

2.1.1 Coleta da amostra da borra de petróleo

O rejeito de petróleo foi fornecido pela Universidade de São Paulo, proveniente do descarte de várias unidades da refinaria Presidente Bernardes, localizada em Cubatão - SP. As amostras foram coletadas com auxílio de uma espátula, onde tomou-se o cuidado de se retirar a camada mais superficial dos locais (sobrenadante).

2.1.2 Isolamento da bactéria

A seleção de bactérias com potencial para biodegradação do petróleo foi realizada através da inoculação da amostra de borra de petróleo (1 g) em 100 mL de meio mínimo, por uma semana, a 28 °C e 180 RPM, utilizando erlenmeyer de 250 mL (Figura 2).

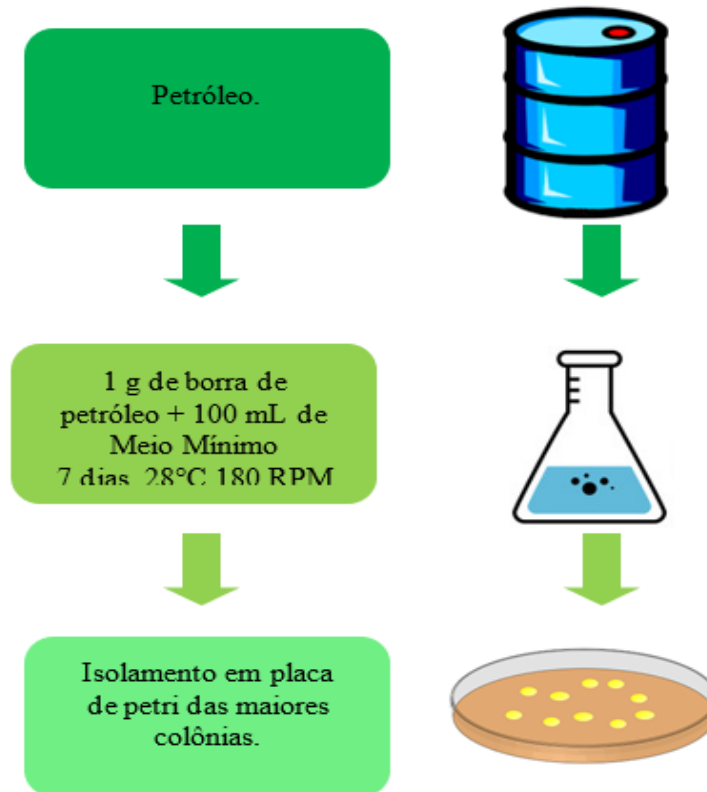


Figura 2. Fluxograma das atividades gerais desenvolvidas em laboratório.

As maiores concentrações que obtiveram crescimento, foram crescidas em placa de Petri e seus isolados identificados.

As amostras foram coletadas com auxílio de uma espátula, onde se tomou o cuidado de retirar a camada mais superficial dos locais (sobrenadante). Com o auxílio de um tubo de vidro, as amostras foram transferidas do tambor de armazenamento para tubos de polipropileno de 50 ml sendo preenchidos quase que toda sua totalidade. Pelo menos um tubo foi designado para análise físico-química e um para análise microbiológica.

No seu estado líquido, as amostras foram transferidas evitando-se o contato do óleo recolhido com as mãos ou outros interferentes que pudessem promover quaisquer tipos de contaminação, e conseqüentemente, modificar os resultados das análises posteriores.

As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente (25 °C), e transportadas até o Laboratório do Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA-POLI-USP), onde foi feito o isolamento e identificação de bactérias que interagem com o óleo e posterior realização de testes de biodegradação.

2.1.3 Crescimento da bactéria

A seleção da bactéria com potencial para degradação de óleos de cadeias longas foi realizada através da inoculação de uma amostra de borra de petróleo (1 g)

em um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mínimo. Logo após submeteu-se a amostra em *shaker* (180 RPM) a 28°C por sete dias.

Após esta primeira etapa, utilizou-se uma placa de Petri contendo 20-25 mL de meio mínimo (MM) sólido. Adicionaram-se 50 µL de petróleo na placa e espalhou-se com ajuda de uma alça de *Drigalski*. Adicionaram-se 50 µL do meio de cultura no centro da placa e espalhou-se com a alça. Levou-se à estufa à temperatura de 28°C por sete dias.

2.1.4 Isolamento em placa de Petri das maiores colônias

As linhagens isoladas foram identificadas e utilizadas nos ensaios de biodegradação de óleos em meio líquido.

Para repique em meio sólido, em uma placa de Petri foram adicionados 20 mL de meio mínimo com ágar contendo 300 ppm de fenantreno-antraceno. Após a solidificação da mistura, a bactéria foi espalhada na placa, com o auxílio de uma alça de *Drigalski* e em seguida armazenada em estufa à temperatura de 28°C por sete dias.

A seleção da bactéria com potencial para biodegradação de óleos foi realizada através da inoculação da amostra de borra de rejeito de petróleo (1 g) em 100 mL de meio mínimo, por sete dias, a 28 °C e 180 rpm, utilizando erlenmeyer de 250 mL.

As colônias que obtiveram crescimento, foram crescidas em placa e seu isolado foi posteriormente identificado.

2.1.5 Caracterização: Composição Química por Cromatografia gasosa – GCMS/MS

Para se determinar a composição da amostra de petróleo, utilizou-se um erlenmeyer de 250 mL, ao qual foram adicionados 50 mL de meio mínimo e 100 µL da amostra, deixando a mistura em *shaker* a 28°C a 180 RPM. A amostra foi submetida a extração por solvente após cinco dias (controle cinco dias) e outra após dez dias (controle dez dias). A extração por solvente da amostra foi realizada adicionando 50 mL de n-hexano (P.A.), com agitação lenta durante 20 minutos, repetindo-se este passo para diluição do petróleo no solvente e para a separação das fases. Após a extração, foram transferidas alíquotas da fase solvente contendo petróleo para vials de 2,0 mL, filtrando-as em membrana de fibra de vidro com poros de 0,45 µm e em seguida procedeu-se a análise em duplicata por GCMS-MS.

O equipamento utilizado na caracterização química da amostra de petróleo foi um cromatógrafo gasoso modelo 450-GC da VARIAN, equipado com um espectrômetro de massa VARIAN 240-MS com ionização por impacto eletrônico (energia de 70 eV), utilizando hélio como gás de arraste com um fluxo de 0,9 mL/min e uma coluna capilar DB-1 da J&W com 30 metros de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

Foi utilizado o seguinte programa de temperaturas: temperatura inicial do forno de 50°C (2 min), rampa 5°C/min até aos 310°C, corte em 10 minutos. A temperatura do injetor e do detector foi mantida a 300°C. A injeção foi de 1 µL efetuada em modo Split e Splitless; com uma razão de split de 1:20, e em modo de varrimento contínuo (modo SCAN) num intervalo m/z de 33 a 808 u.m.a.

Os componentes químicos das amostras foram identificados pela análise de cada um dos espectros de massa e foram quantificados utilizando o método do padrão interno que é o banco de dados do próprio equipamento – NIST, em percentagem de área.

O programa de temperatura é detalhado na Tabela 1:

Tabela 1. Condições utilizadas na cromatografia gasosa:

Parâmetro	Split 10	Splitless 10
Coluna	DB-5 (0,30 m x 0,32 mm x 0,5 μ m)	DB-5 (0,30 m x 0,32 mm x 0,5 μ m)
Injetor	Split/Splitless	Split/Splitless
Temperatura do injetor	300°C	300°C
Volume injetado	1 μ L	1 μ L
Modo de injeção	Split	Splitless
Fase móvel	Hélio	Hélio
Vazão da fase móvel	1 mL/min	1 mL/min
Rampa do forno	50 °C (2 min) – 5 °C/min – 310 °C – hold 10 min	50 °C (2 min) – 5 °C/min – 310 °C – hold 10 min
Temperatura da interface/detector	300 °C	300 °C

2.1.6 Taxa de crescimento celular

Para a determinação da taxa de crescimento da bactéria por densidade ótica, foi utilizado um erlenmeyer de 500 mL autoclavado, ao qual foram adicionados 20 mL de meio mínimo, 400 μ L da amostra de petróleo e 800 μ L do inóculo, em ambiente devidamente esterilizado, com fluxo laminar. Após este procedimento, transferiu-se 1,0 mL da mistura para uma cubeta de quartzo de 10 mm para leitura em espectrofotômetro modelo D30 da Eppendorf.

2.1.7 Experimentos de Biodegradação

Em uma placa de Petri contendo 20 mL de meio mínimo sólido, foram adicionados 50 μ L de petróleo (Cru) na placa e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski e logo após adicionado 50 μ L do inóculo colocado no centro da placa e espalhado com a alça.

Na placa preparada para controle, utilizou-se o mesmo procedimento, no entanto não foi adicionado o inóculo. As placas de Petri contendo as amostras foram mantidas por cinco dias em estufa a 25°C.

Este experimento foi realizado com o objetivo de se observar a nível macroscópico a interação da bactéria com o óleo, comparando com a placa de controle (sem bactéria).

Em paralelo, foram preparados ensaios de biodegradação da amostra de petróleo para análise em cinco dias e dez dias em meio líquido, aos quais foram adicionados 50 mL de meio mínimo em um erlenmeyer de 250 mL, 100 μ L de petróleo e 200 μ L do inóculo.

Nos erlenmeyers utilizados como controle, utilizou-se o mesmo procedimento, no entanto não foram adicionados inóculo. Foram preparados dois controles, um para cinco dias e outro para dez dias.

Após a preparação das amostras, mantiveram-se as mesmas sob agitação constante em *shaker* a 28°C e 180 RPM e retirados em cinco dias e em dez dias (com bactéria e controle) para posterior análise macroscópica. Posteriormente as mesmas foram submetidas à preparação para análise de composição química por cromatografia gasosa.

2.2 Resultados

2.2.1 – Taxa de crescimento celular

Faz-se necessário o conhecimento do perfil de crescimento da bactéria isolada. Neste sentido, foi desenvolvido o experimento de crescimento da bactéria e degradação do petróleo. Para isso, foi construída a curva de crescimento para a bactéria isolada, sendo que o crescimento celular da cepa isolada em Meio mínimo agora denominada o1 está apresentado na Figura 3.

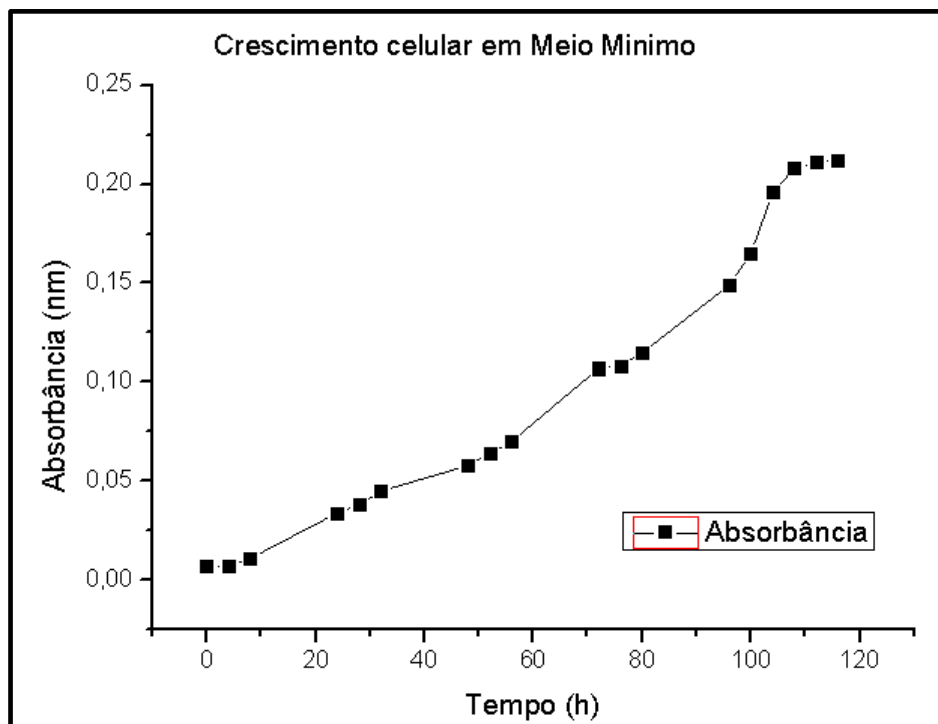


Figura 3. Curva de Crescimento da bactéria o1, isolada em meio mínimo na presença de petróleo.

O gráfico mostra as diferentes fases de crescimento da bactéria utilizadas para a biodegradação de petróleo. A curva de crescimento envolvendo petróleo, apresentou aumento de DO (densidade ótica) em relação ao tempo, sendo que os dados foram obtidos em triplicata e apresentados no presente, a média com desvio padrão (S) de 0,060305.

2.2.2 - Análise macroscópica de biodegradação

Foi possível observar a nível macroscópico a interação da bactéria com o petróleo, comparando as placas contendo bactéria com a placa de controle (sem bactéria).

Neste sentido a biodegradação do petróleo foi observada nas placas de Petri contendo a amostra e controle, as quais foram mantidas por cinco dias em estufa a 25°C.

Na Figura 4 pode-se observar as placas com suas respectivas amostras e inóculo (com exceção da placa que contém o controle, indicadas pelas setas).

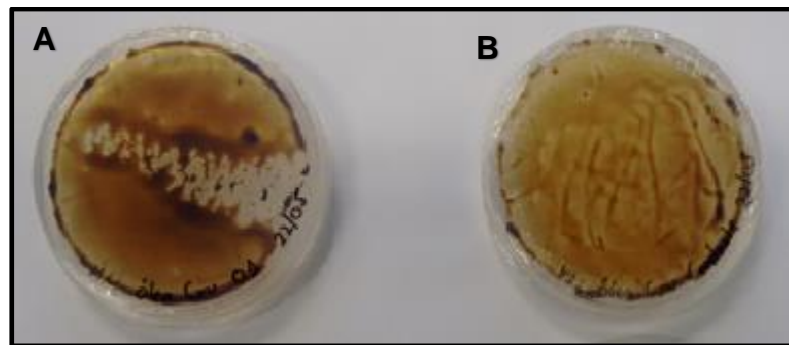


Figura 4. Registro de biodegradação de óleos com aplicação da bactéria o1.

A placa que não foi aplicada a bactéria, nada alterou, Figura 4 B), no entanto se pode observar na Figura 4 A) que a bactéria interage com o petróleo.

O ataque da bactéria na amostra de petróleo em meio aquoso após cinco e dez dias é mostrado na Figura 5.

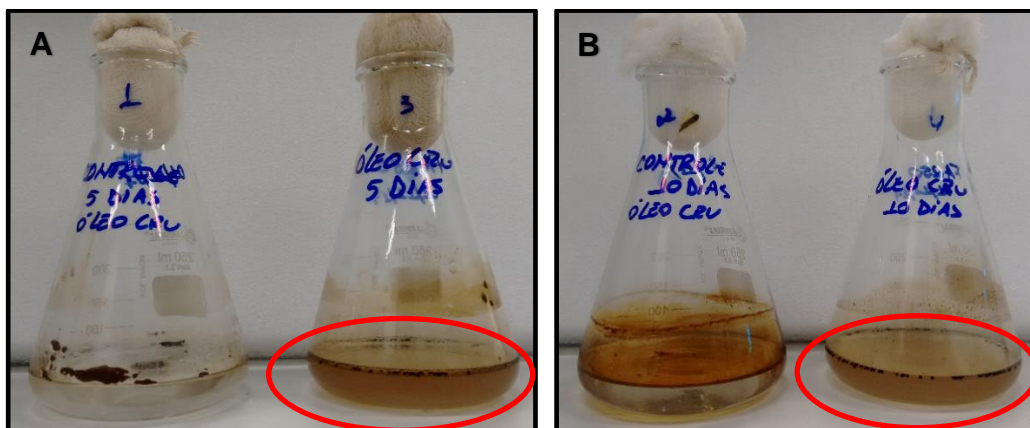


Figura 5. Registro da ação de biodegradação da bactéria o1 em petróleo:

A) Após 5 dias e B) após 10 dias.

Observa-se que nos erlemeyers contendo a bactéria (óleo cru 5 dias e óleo cru 10 dias), apesar de macroscopicamente ser impossível mensurar, há uma diminuição significativa da massa de óleo na superfície do líquido.

A massa de petróleo foi fracionada em micro gotas e a fase aquosa ficou turva, fenômeno causado pela formação de um produto de biodegradação, solúvel nesta fase.

2.2.3 Análise de biodegradação por cromatografia gasosa.

Análises dos componentes do petróleo com cromatografia gasosa (GC) destinaram-se a conhecer a alteração na composição química no próprio petróleo, através da atividade de biodegradação da bactéria o1.

A Figura 6 mostra as análises em GCMS, que através de recurso do software do equipamento, foi possível sobrepor os cromatogramas do controle (CTRL_cru_5dias), da amostra biodegradada pela o1 após 5 dias (BAC_cru_5 dias) e após 10 dias (Cru_bac_10 dias).

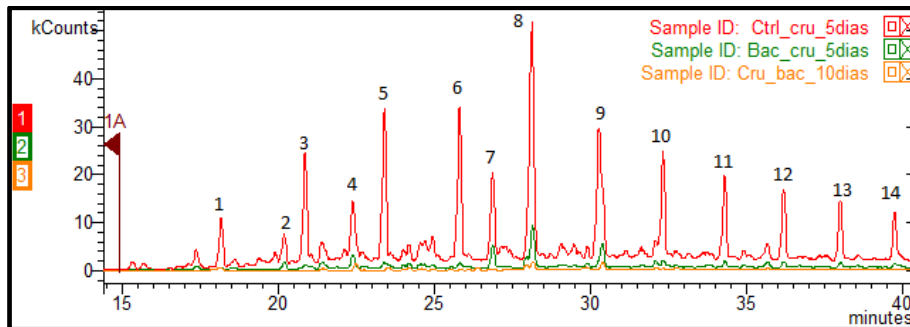


Figura 6. Cromatograma comparativo de biodegradação da o1 em petróleo entre 5 e 10 dias.

É possível observar os picos dos principais componentes da amostra de petróleo, representados no cromatograma pela cor vermelha, a redução dos mesmos em cinco dias e dez dias, representados pela cor verde e laranja, respectivamente.

Para um estudo mais detalhado, foi realizada uma comparação entre as concentrações das principais substâncias identificadas pelo espectrômetro de massas das amostras do controle (CTRL_CRU_5 dias) e da amostra biodegradada pela o1 após 5 dias (BAC_CRU_5 dias), ilustradas pela Figura 7, com os dois cromatogramas sobrepostos.

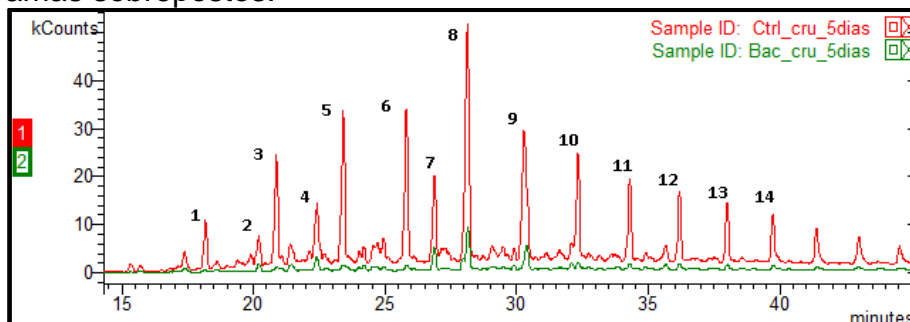


Figura 7. Cromatograma obtido para a análise do petróleo, Controle 5dias x bac 5 dias.

A redução de concentração dos principais componentes do petróleo é nítida, inclusive compostos após 5 dias de biodegradação pela o1, comparando os picos do cromatograma, sendo que o controle é representado pela cor vermelha e biodegradada é representada pela cor verde.

A Figura também mostra que a concentração de 14 substâncias (representadas pelos 14 picos no cromatograma) diminuíram significativamente quando comparadas ao controle.

Foi realizado um estudo comparativo entre as amostras biodegradadas em 5 e 10 dias, ao qual é representado pela Figura 8.

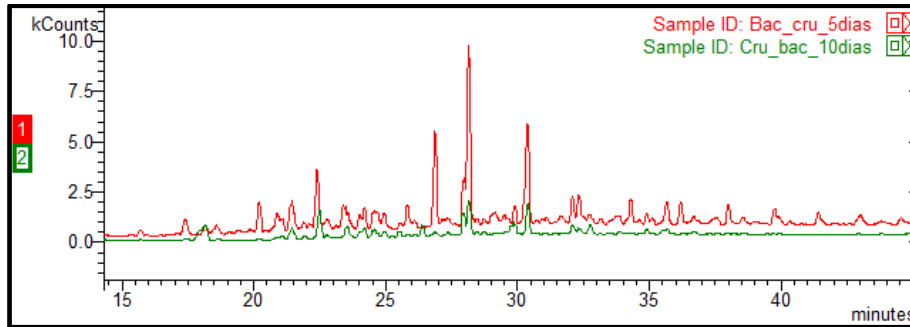


Figura 8. Cromatograma comparativo de biodegradação da o1 em petróleo entre 5 e 10 dias.

Neste sentido, pode se afirmar que a o1 pode degradar hidrocarbonetos de cadeia média e longa, significativamente.

De uma maneira geral, todos os hidrocarbonetos de cadeia média, iniciando de C-10 para C-17 obtiveram redução significativa. Os álcoois decanóicos são mais evidentes na biodegradação pela bactéria o1.

O perfil de biodegradação da o1 em petróleo, considerando o tempos de cinco e dez dias pode ser observado na Figura 9.

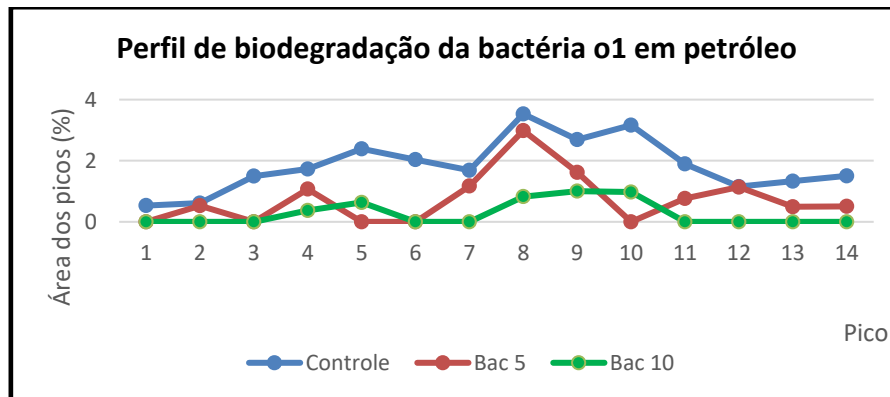


Figura 9. Comparação de biodegradação em cinco dias e em 10 dias da bactéria o1

De uma maneira geral, todos os hidrocarbonetos de cadeia média, iniciando de C-10 para C-17 obtiveram redução significativa. Os álcoois decanóicos são mais evidentes na biodegradação pela bactéria o1. Atlas (1981) explica que apenas poucas bactérias têm capacidade de degradar ramificados ou estrutura de anel de hidrocarboneto porque são mais difíceis de entrar na célula, enquanto Harayama (1999) explica que alto nível de peso molecular de hidrocarbonetos é difícil de degradar porque tem baixa solubilidade e por este motivo, dificultando a entrada na membrana celular.

A Figura 10 mostra o resultado da análise de GC, composta por hidrocarbonetos e álcoois do petróleo após 5 e 10 dias de biodegradação por o1.

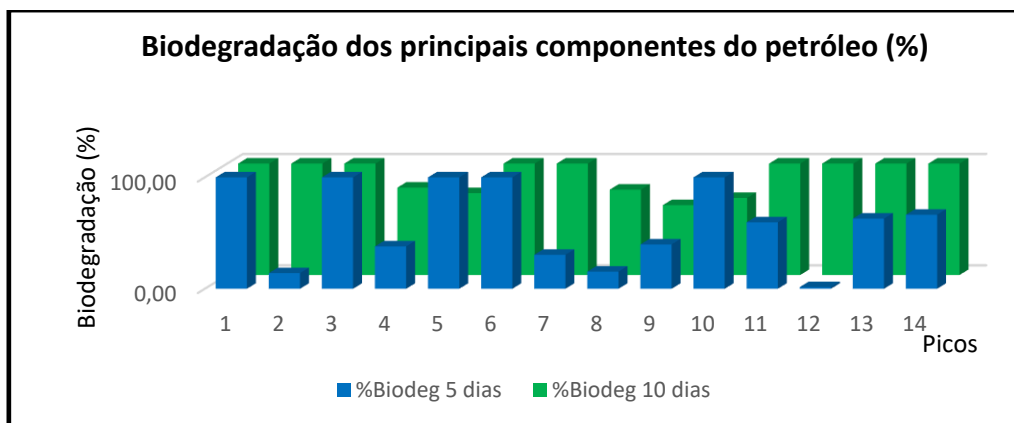


Figura 10. Biodegradação dos principais componentes do petróleo pela bactéria o1

É possível observar na Figura que as substâncias representadas pelos picos 2 e 8, que são Terthexadacanol e 3,7,11-trimetil-dodecanol, respectivamente, foram menos biodegradadas com 14,03% e 15,38% e após dez dias de biodegradação, estas substâncias obtiveram biodegradação de 100% e 76,6%.

Cadeias longas como o 1,54-dibromo-tetrapentacontano (54 átomos de Carbono) e o heptatriocotanol (37 átomos de carbono) também foram 63,0 e 66,4% biodegradadas em 5 dias. Em 10 dias estas substâncias foram 100% biodegradadas.

4. CONCLUSÃO

Esse trabalho visou o estudo da microbiota existente em borra de petróleo, o isolamento de uma cepa extraída deste meio, a taxa de crescimento celular e o estudo de biodegradação no próprio petróleo.

Estes dados poderão viabilizar estudos posteriores de remediação de locais contaminados por petróleo ou efluentes industriais contendo cadeias carbônicas apontadas no presente estudo.

Foi observado e constatado também nesse estudo que a bactéria o1, isolada e estudada possui potencial para a uso em processos de biorremediação devido à sua alta interação e consumo de material orgânico presente no petróleo, quando comparadas a bactérias reportadas na literatura disponível. A hipótese de interagir compostos saturados na primeira fração foi concretizada, conforme mostraram os cromatogramas obtidos por GC/MS, indicando que o procedimento foi realizado de maneira satisfatória.

REFERÊNCIAS

- [1] KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de "landfarming"**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.
- [2] MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R. N.; GIBBS, B. F. **Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review**. Eng. Geol., v. 60, p. 371-380, 2001.
- [3] BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. **Bioremediation of soil contaminated by diesel oil**, Brazilian Journal of Microbiology, v.34 (Supl.1), p. 65-68, 2003.

- [4] RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. **Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients.** Bioresource Technol., v.90, p.159-168, 2003.
- [5] D. HOU, X. SHEN, Q. LUO, Y. HE, Q. WANG, Q. LIU, Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material, Mar. Pollut. Bull. 67 (2013) 146–151,
- [6] TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; LEMOS, J. L. S. **Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil.** In: 9th International Petroleum Environmental Conference, New Mexico, USA, 2002.
- [7] PENG, R. H.; XIONG, A. S.; XUE, Y.; FU, X. Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y. S.; YAO, Q. H.; Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons; FEMS Microbiol Rev, 32(6), p -927-55, 2008.
- [8] SILVESTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C., **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- [9] FOSTER, J. A. COMPUTATIONAL GENETICS: EVOLUTIONARY COMPUTATION. Nature Reviews Genetics, v. 2, n. 6, p. 428–436, jun. 2001.
- [10] **BARTHA R.** 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. Microb. Ecol. **12**:155–172.
- [11] RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. **Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients.** Bioresource Technol., v.90, p.159-168, 2003.