



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Carlos Jorge Batista Freitas

**Utilização de grânulos de cortiça para  
estimular a biorremediação aeróbia de  
hidrocarbonetos**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Ramo de Tecnologia Ambiental

Trabalho efetuado sob a orientação de:

**Doutora Ana Júlia Viana Cavaleiro**

**Doutora Ana Rita Castro Carvalho**

# DECLARAÇÃO

**Autor:** Carlos Jorge Batista Freitas

**Título:** Utilização de grânulos de cortiça para estimular a biorremediação aeróbia de hidrocarbonetos

**Orientadores:**

Doutora Ana Júlia Viana Cavaleiro

Doutora Ana Rita Castro Carvalho

**Ano de conclusão:** 2017

**Designação do Mestrado:** Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, Ramo Tecnologia Ambiental

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

Assinatura:

## Agradecimentos

Após o término desta dissertação, apesar de ser realizada individualmente, não seria possível sem a ajuda essencial, incentivo, orientação e motivação de algumas pessoas às quais deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

À orientadora, Doutora Ana Júlia Viana Cavaleiro, pela orientação indispensável e excepcional na realização desta dissertação. Obrigado pela disponibilidade mesmo nas fases mais difíceis e apertadas, pela ajuda e pelos ensinamentos. À co-orientadora, Doutora Ana Rita Castro Carvalho, pela ajuda, pelos conselhos e ensinamentos e por todo o tempo prestado para que esta dissertação fosse possível. À Professora Doutora Madalena Alves, pela oportunidade de realizar este trabalho no grupo de investigação BRIDGE.

Ao investigador, Valdo Ricardo Martins, por me ter acompanhado no dia-a-dia do trabalho, deste nosso trabalho, por todos os conhecimentos e paciência, por ser companheiro de trabalho e amigo.

À Corticeira Amorim, pela cedência das partículas regranuladas de cortiça, essenciais no trabalho que se apresenta.

Aos colegas do LBA, pela ajuda na integração do funcionamento do laboratório, pelo ótimo ambiente, companheirismo, pelo apoio, acolhimento e boa disposição dia após dia.

À Maria João Sousa, por ser mais que companheira e amiga. Por me encorajar a continuar com a realização deste trabalho, pela motivação, preocupação constante e força que me transmitiu. Aos meus pais, Daniel Jorge Freitas e Maria Fernanda Freitas, e à minha irmã, Ana Catarina Freitas, por me darem a força e a confiança que uma família deve dar. Pela preocupação constante e pela confiança depositada em mim. A vós, dedico esta dissertação.

Aos meus amigos.

A todos que fizeram parte desta fase importante da minha vida e marcaram a minha experiência académica.

A todos, um muito obrigado.

**FCT** Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

**NORTE2020**  
PROGRAMA OPERACIONAL REGIONAL NORTE



Cofinanciado por:

**COMPETE**  
2020

**PORTUGAL**  
2020



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), no âmbito dos projetos PTDC/AAG-TEC/3500/2014 (POCI-01-0145-FEDER-016575), UID/BIO/04469/2013 (POCI-01-0145-FEDER-006684), RECI/BBB-EBI/0179/2012 (FCOMP-01-0124-FEDER-027462) e BioTecNorte operation (NORTE-01- 0145-FEDER-000004). Ana Cavaleiro agradece o apoio financeiro do European Research Council (ERC) no âmbito do projeto Novel Anaerobes (323009).

## Resumo

Os derrames de petróleo constituem um dos desastres ambientais mais graves provocados pelo Homem. Uma das estratégias mais utilizadas para remediação de locais contaminados com petróleo é a contenção e remoção dos hidrocarbonetos por materiais sorventes. Entre estes, a cortiça tem sido aplicada com sucesso na remediação de derrames de óleos. Pelas suas características físico-químicas, a cortiça pode constituir um bom suporte para o crescimento de bactérias hidrocarbonoclásticas, ou conter substâncias que estimulem o seu crescimento, facilitando assim a ocorrência de biorremediação *in situ*.

Este trabalho pretende avaliar a degradação aeróbia de hidrocarbonetos sorvidos em partículas regrânuladas de cortiça por bactérias hidrocarbonoclásticas, bem como estudar o efeito da presença da cortiça no crescimento deste tipo de bactérias. Foram realizados ensaios com duas culturas bacterianas (*Alcanivorax borkumensis* SK2 e *Rhodococcus opacus* B4) e partículas de cortiça contaminados com uma mistura de alcanos (C14, C16, C20 e C24). Foram também efetuados ensaios controlo, em que as culturas bacterianas foram crescidas (i) com alcanos mas sem partículas de cortiça, e (ii) com cortiça mas sem adição da mistura de alcanos. O crescimento bacteriano foi avaliado ao longo do tempo, através da medição do azoto orgânico no material biológico em suspensão, e a degradação dos hidrocarbonetos foi monitorizada por cromatografia gasosa, após extração líquido-líquido.

As partículas de cortiça tiveram um efeito estimulador direto sobre o crescimento de *Alcanivorax borkumensis* SK2 em alcanos, tendo-se obtido valores de azoto orgânico 1,4 vezes superiores na presença de cortiça, relativamente aos ensaios realizados sem cortiça, após 452 horas de incubação. Relativamente à degradação da mistura de alcanos, esta foi superior nos ensaios desenvolvidos na presença do que na ausência de cortiça, isto é,  $72\pm 2\%$  e  $47\pm 2\%$ , respetivamente. Estes resultados mostram o potencial desta estratégia para estimular a biorremediação *in situ*. Quanto às culturas de *Rhodococcus opacus* B4, a cortiça não teve um efeito estimulador sobre o crescimento. Relativamente à degradação da mistura de alcanos, após 283 horas de incubação esta atingiu  $96\pm 1\%$  e  $89\pm 3\%$  na presença e na ausência de cortiça, respetivamente.

**Palavras-Chave:** Cortiça, Biorremediação, *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Rhodococcus opacus* B4, Alcanos



## Abstract

Oil spills are one of the worst environmental disasters caused by anthropogenic activities. Containment of the oil spills and removal of hydrocarbons using sorbent materials is one of the most used strategies for remediation of the contaminated sites. Cork has been applied with success as biosorbent in the remediation of oil spills. Due to its physical-chemical characteristics, cork may be a good support for the growth of hydrocarbonoclastic bacteria, or may have substances which stimulate their growth, promoting *in situ* bioremediation.

This work intends to evaluate the aerobic degradation of hydrocarbons sorbed in regranulated cork particles by hydrocarbonoclastic bacteria, as well as to study the effect of cork in the growth of these bacteria. Assays were made with two bacterial cultures (*Alcanivorax borkumensis* SK2 and *Rhodococcus opacus* B4) and cork particles contaminated with a mixture of alkanes (C14, C16, C20 e C24). Control assays were also prepared, in which the bacterial cultures were grown (i) with alkanes but not with cork, and (ii) with cork without addition of the mixture of alkanes. The bacterial growth was evaluated along the time by measuring the organic nitrogen content in the biological suspended material, and the degradation of the hydrocarbons was monitored by gas chromatography after liquid-liquid extraction.

Cork particles had a direct stimulator effect on the growth of *Alcanivorax borkumensis* SK2 on alkanes, as shown by the 1,4 times higher values of organic nitrogen measured in the assays with cork, relatively to the assays without cork, after 452 hours of incubation. Alkanes degradation was higher in the presence than in the absence of cork, *i.e.*  $72\pm 2\%$  and  $47\pm 2\%$ , respectively. These results show the potential of this strategy for stimulating *in situ* bioremediation. Concerning *Rhodococcus opacus* B4, cork did not stimulate the growth of this bacterium. Degradation of the mixture of alkanes by these cultures, after 283 hours of incubation, reached  $96\pm 1\%$  and  $89\pm 3\%$  in the presence and in the absence of cork, respectively.

**Keywords:** Cork, Bioremediation, *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Rhodococcus opacus* B4, Alkanes





# Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Símbolos e Abreviaturas .....	ix
Índice de Tabelas .....	xi
Índice de Figuras.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Contextualização e Motivação .....	1
2. Estado da Arte.....	5
2.1. Estratégias utilizadas para a remediação de derrames de petróleo.....	6
2.1.1. Métodos mecânicos, químicos e térmicos .....	7
2.1.2. Métodos físicos.....	9
2.1.3. Métodos biológicos .....	10
2.2. Biossorbentes e a cortiça .....	12
2.2.1 Utilização da cortiça no controlo de derrames de óleos.....	14
2.3. Bactérias hidrocarbonoclásticas.....	15
2.3.1. <i>Alcanivorax borkumensis</i> .....	16
2.3.2. <i>Rhodococcus opacus</i> .....	17
3. Objetivos .....	19
4. Materiais e métodos .....	21
4.1. Testes preliminares .....	21
4.2. Culturas puras.....	21
4.3. Ensaio de crescimento de <i>A. borkumensis</i> SK2 e <i>R. opacus</i> B4 na presença de alcanos .....	22

4.4. Degradação de alcanos sorvidos em partículas regranuladas de cortiça por <i>A. borkumensis</i> SK2 e <i>R. opacus</i> B4 .....	22
4.5. Métodos analíticos .....	23
4.5.1. Quantificação de Azoto Orgânico .....	23
4.5.2. Análise de alcanos .....	23
5. Resultados e discussão .....	25
5.1. Testes preliminares .....	25
5.2. Ensaio de crescimento e degradação de alcanos sorvidos na cortiça por <i>A. borkumensis</i> SK2 .....	26
5.3. Ensaio de crescimento e degradação de alcanos sorvidos na cortiça por <i>R. opacus</i> B4 .....	30
6. Conclusões e perspectivas de trabalho .....	35
Bibliografia .....	37
ANEXOS .....	49
ANEXO I: Retas de calibração para cada alcano .....	49
ANEXO II: Curvas de crescimento de <i>A. borkumensis</i> SK2 e <i>R. opacus</i> PD630 .....	52

## Símbolos e Abreviaturas

BP – British Petroleum

PML – Plano Mar Limpo

FBR – Reator *fed-batch*

SBR – Reator *batch* sequencial

UASB - Reator de manto de lamas de fluxo ascendente

MB – Reator de membrana

RBC – Reator de biodiscos

BAF – Filtro biológico arejado

rRNA – RNA ribossômico

Cort – Cortiça

Alc – Mistura de alcanos

Ab – *Alcanivorax borkumensis* SK2

Ro – *Rhodococcus opacus* B4

C6 – Hexano

C11 - Undecano

C14 - Tetradecano

C16 - Hexadecano

C17 - Heptadecano

C20 - Eicosano

C24 – Tetracosano

DO – Densidade Ótica

PBS – Tampão fosfato salino

GC-FID – Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama

N<sub>org</sub> – Azoto orgânico

HCl – Ácido clorídrico

PI – Padrão Interno

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Percentagem de remoção de cada alceno por *A. borkumensis* SK2 no tempo final. . 29



## Índice de Figuras

Figura 1 – Exemplos de estruturas químicas dos principais constituintes do petróleo. ....	5
Figura 2 - Cromatograma da solução stock de alcanos na concentração de 100 mg L <sup>-1</sup> . ....	25
Figura 3 - Cromatograma resultante da extração de compostos apolares a partir das partículas de cortiça. ....	26
Figura 4 - Concentração de biomassa ( <i>C<sub>b</sub></i> ), em mg de azoto orgânico por L, de <i>A. borkumensis</i> SK2 na presença de alcanos ao longo do tempo. ....	27
Figura 5 - Concentração de biomassa ( <i>C<sub>b</sub></i> ), em mg de azoto orgânico po L, de <i>A. borkumensis</i> SK2 na presença de alcanos, sorvidos na cortiça (Ab+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ab+Alc); concentração de biomassa de <i>A. borkumensis</i> SK2 na ausência de alcanos e na presença de cortiça (Ab+Cort). ....	28
Figura 6 – Concentração ( <i>C<sub>a</sub></i> ) de C14 (a), C16 (b), C20 (c) e C24 (d) ao longo do tempo, nas culturas de <i>A. borkumensis</i> SK2 crescidas em alcanos sorvidos na cortiça (Ab+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ab+Alc). ....	28
Figura 7 - Concentração total de alcanos ( <i>C<sub>t</sub></i> ) e de biomassa ( <i>C<sub>b</sub></i> ) ao longo do tempo, nas culturas de <i>A. borkumensis</i> SK2 crescidas em alcanos sorvidos na cortiça, Ab+Alc+Cort (a) e na ausência de cortiça, Ab+Alc (b). ....	30
Figura 8 - Concentração de biomassa ( <i>C<sub>b</sub></i> ), em mg de azoto orgânico por L, de <i>R. opacus</i> B4 na presença de alcanos ao longo do tempo. ....	31
Figura 9 - Concentração de biomassa ( <i>C<sub>b</sub></i> ), em mg de azoto orgânico po L, de <i>R. opacus</i> B4 na presença de alcanos, sorvidos na cortiça (Ro+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ro+Alc); concentração de biomassa de <i>R. opacus</i> B4 na ausência de alcanos e na presença de cortiça (Ri+Cort). ....	31
Figura 10 - Concentração de C24 ( <i>C<sub>a</sub></i> ) ao longo do tempo, nas culturas de <i>R. opacus</i> B4 crescidas em alcanos sorvidos na cortiça (Ro+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ro+Alc). ....	32
Figura 11 - Concentração total de alcanos ( <i>C<sub>t</sub></i> ) e de biomassa ( <i>C<sub>b</sub></i> ) ao longo do tempo, nas culturas de <i>R. opacus</i> B4 crescidas em alcanos sorvidos na cortiça, Ro+Alc+Cort (a) e na ausência de cortiça, Ro+Alc (b). ....	33





# 1. Introdução

## 1.1. Contextualização e Motivação

O avanço tecnológico e o crescimento populacional têm sido acompanhados por um aumento da contaminação ambiental (Alloway & Ayres, 1997). As sociedades atuais são ainda muito dependentes do petróleo como fonte de energia, e nas últimas décadas, a procura de produtos derivados de petróleo tem vindo a aumentar, levando a uma exploração intensiva dos recursos do planeta. A procura mundial de petróleo atingiu cerca de 96 milhões de barris por dia em 2016 (International Energy Agency, 2017), o que se traduz num risco acrescido de derrames de petróleo, bem como no aumento da produção de resíduos contaminados com hidrocarbonetos, nomeadamente lamas oleosas e águas residuais. Estes resíduos são gerados tanto em terra como em ambientes marinhos, durante as etapas de extração, transporte, refinação e armazenamento (Atlas, 1995). A contaminação ambiental com hidrocarbonetos tem efeitos nefastos sobre os ecossistemas e sobre a saúde humana (Alvarez & Vogel, 1991; Lefebvre & Moletta, 2006).

O petróleo é a maior fonte de energia da atualidade, não renovável, e resulta da decomposição, ao longo do tempo, de matéria orgânica. Esta matéria orgânica vai-se transformando à medida que é exposta a diferentes pressões e temperaturas, dependendo da profundidade a que se encontra (Galp Energia, 2014). Apesar da produção de alguns tipos de energia renovável, nomeadamente eólica e hidroelétrica, estar a aumentar, os combustíveis fósseis ainda representam a maior e mais rentável fonte de energia a nível global.

Em 2015, a produção de petróleo Mundial era perto de 96 milhões de barris por dia, enquanto que o consumo Mundial era de 93,62 milhões de barris por dia, o que indica que no futuro próximo o consumo de petróleo vai ultrapassar os níveis de produção (USEPA, 2015a).

A distribuição de petróleo é feita através de uma vasta rede de transportes numa escala global, maioritariamente por via marítima, levando a um aumento substancial do risco de derrames. Estes derrames podem ocorrer em navios petroleiros, nas plataformas de extração e nos oleodutos de distribuição, causando danos ambientais severos, nomeadamente a formação de uma camada densa de petróleo no topo da coluna de água, o que impossibilita a penetração

dos raios solares e dificulta a fotossíntese, e a contaminação dos ecossistemas, que provoca a morte de diferentes espécies animais e vegetais. As aves marinhas, especialmente as aves de mergulho, são as mais afetadas por estes derrames (Al-Majed, Adebayo, & Hossain, 2014). Neste tipo de desastres ambientais, são inadvertidamente derramadas elevadas quantidades de petróleo, tornando-se difícil a sua contenção.

Um dos maiores desastres já registado em ambiente marinho ocorreu em 2010, quando uma plataforma de extração de petróleo da BP (*Deepwater Horizon*) explodiu, na costa de Louisiana, Estados Unidos. Este desastre lançou cerca de 690 mil toneladas de petróleo no Golfo do México, ao longo de vários meses, causando problemas económicos, problemas de saúde e uma destruição ambiental incalculável (Kimes *et al.*, 2014). Apesar do desastre de *Deepwater Horizon* ser um dos desastres mais importantes da história, também existem outros acidentes anteriores a este. Em 1980, em Lake Perigneur, Los Angeles, uma estação da Texaco afundou no leito de um lago de águas puras e cristalinas. Uma broca tentava chegar a um lençol de petróleo quando atingiu uma caverna, que afinal seria uma mina de sal. A elevada pressão provocou o colapso da estação, alterando irreversivelmente as condições do lago (Galastri, 2010). Outros desastres semelhantes a estes têm ocorrido ao longo dos anos, tal como o naufrágio da Alexander Kielland em 1980, uma estação localizada nos mares do Norte e a falha que ocorreu em 1988 na estação de extração de petróleo chamada Alpha Piper que fez com que se desse a explosão desta (Galastri, 2010). Vários são os desastres que também afetaram Portugal, como por exemplo o do petroleiro Prestige, que encalhou ao largo da Galiza em 2002, derramando 68 mil toneladas de petróleo no Oceano Atlântico (Euronews, 2013). Outro foi o desastre de Jakob Maersk, que embateu numa rocha quando tentava entrar no Porto de Leixões, o que causou várias explosões e provocou o derrame de 88 mil toneladas de óleo na costa portuguesa (Fernandes, 2001). Os derrames e contaminações em portos são também muito frequentes e por vezes são mais difíceis de avaliar do que os derrames de larga escala (Daghio *et al.*, 2017; Miola, *et al.*, 2009).

Em 1993, o governo português estabeleceu a criação do plano PML (Plano Mar Limpo) para combater áreas contaminadas com hidrocarbonetos e outras substâncias perigosas em ambiente marinho. Este plano propõe-se a atuar atempadamente e de maneira eficaz, estabelecer planos de intervenção, aplicação de medidas de aquisição, conservação e manutenção de equipamentos, estudos de antecipação, projeção de resultados de combate,

formação dos responsáveis pelo combate à poluição, realização de exercícios periódicos e criação de centros de operação (Paulo, 2015).

Dada a enorme dimensão que estes acidentes atingem, têm sido desenvolvidas várias técnicas para controlar e minimizar as consequências destes desastres, nomeadamente métodos mecânicos, físicos, químicos e biológicos. Os métodos de remediação mecânica consistem principalmente no uso de barreiras flutuantes, que limitam a deriva superficial das manchas de óleo, e no uso de equipamentos designados por recuperadores que separam o óleo da água e o recolhem. Os métodos de remediação física baseiam-se na utilização de absorventes/adsorventes, que têm a vantagem de permitir a passagem dos hidrocarbonetos de uma matriz líquida para uma matriz sólida ou semi-sólida, facilitando assim o processo de remoção (Karakasi & Moutsatsou, 2010). O recurso a sorventes naturais (biossorventes) tem ainda a vantagem destes materiais apresentarem geralmente um baixo custo e estarem facilmente disponíveis como resíduos agrícolas ou industriais (Cojocar, Macoveanu, & Cretescu, 2011). Um exemplo destes biossorventes é a cortiça, que apresenta capacidade para sorver até 10 vezes o seu peso em óleo (Gil, 2015). Podem ainda ser aplicados processos térmicos, que utilizam temperaturas elevadas com o objetivo de destruir os contaminantes presentes no meio. Os métodos químicos dividem-se genericamente em duas categorias: os dispersantes, que contribuem para que a mancha de óleo se dissolva em partículas de menores dimensões, e os surfactantes, que reduzem a tensão interfacial e promovem a criação de emulsões entre o óleo e a água. Os métodos biológicos baseiam-se na utilização de bactérias hidrocarbonoclásticas, ou seja, bactérias que têm a capacidade de degradar hidrocarbonetos e assim transformar ou remover estes compostos do meio ambiente (Watanabe, 2001). Promove-se assim uma biorremediação do meio contaminado, sem recurso a materiais de origem sintética. Deste modo, o tratamento destas áreas é natural e não comporta riscos para os ecossistemas.

Dado o grande impacto ambiental que derrames de hidrocarbonetos apresentam atualmente, é necessário estudar, desenvolver e otimizar os métodos de remediação já existentes de maneira a torná-los mais eficazes e viáveis, tanto a nível económico como a nível ecológico.



## 2. Estado da Arte

O petróleo é composto por uma mistura diversa de hidrocarbonetos, tendo na composição química cerca de 14% de alcanos lineares, 30% de alcanos cíclicos, 10% de resinas e asfaltenos, 16% de alcanos ramificados e 30% de aromáticos (Galp Energia, 2014). Alguns exemplos das estruturas químicas destes compostos estão representados na Figura 1.

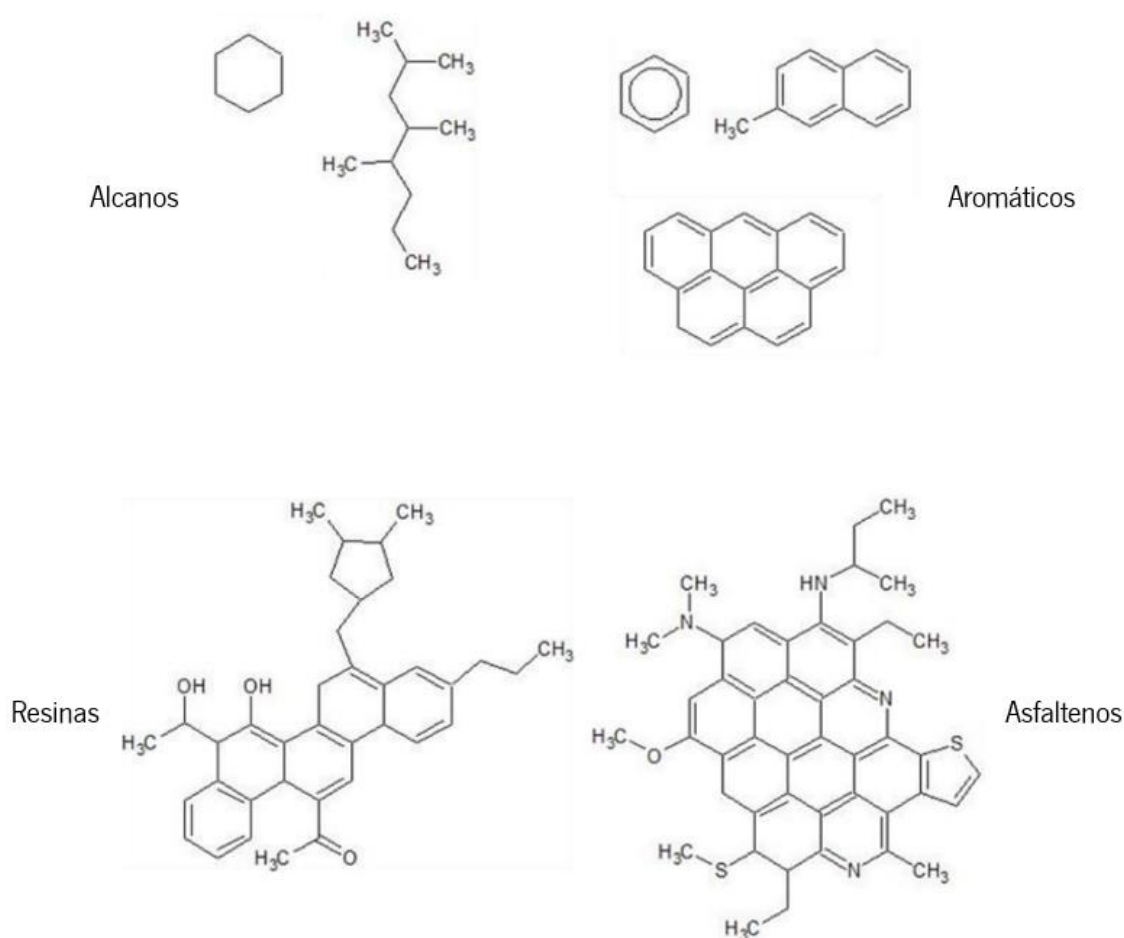


Figura 1 – Exemplos de estruturas químicas dos principais constituintes do petróleo.

O petróleo pode ser classificado como leve, médio ou pesado, dependendo da composição de cada um dos seus componentes. Um óleo leve apresenta uma grande percentagem de alcanos e aromáticos e uma baixa concentração de resinas e asfaltenos. Os

óleos pesados apresentam grandes quantidades de resinas e asfaltenos. (Hassanshahian & Cappello, 2013).

Este combustível fóssil é um líquido que apresenta cor castanha escura, é inflamável e é utilizado em várias indústrias, tais como a produção de combustíveis, solventes, lubrificantes e vários materiais para a indústria petroquímica, nomeadamente nafta, etano, propano, butano, etileno, entre outros (Britannica, 2013).

## 2.1. Estratégias utilizadas para a remediação de derrames de petróleo

Atualmente existem vários métodos que são utilizados para remediação dos derrames de petróleo, tanto em ambiente marinho como terrestre. Dependendo do tipo, quantidade e localização do óleo derramado, são aplicadas soluções específicas para conter, sorver ou dispersar os contaminantes de modo a minimizar os seus impactos ambientais, e podem inclusivamente ser adotadas várias estratégias ao mesmo tempo.

Em 1967 o navio petroleiro Torrey Canyon afundou na costa do Reino Unido, descarregando 120 mil toneladas de petróleo que afetaram 161 km de linhas de costa. O tratamento deste desastre foi efetuado através da aplicação de dispersantes, libertação de bombas na zona do acidente de maneira a que incêndios consumissem os óleos antes que eles dispersassem, e foram também utilizadas palhas e carqueja para absorver o óleo que atingiu as praias (Bourne, 1979; Boyes and Elliot, 2010; Enzler, 2006). Outro incidente, em 1978 provocado pelo navio petroleiro Amoco Cadiz que afundou na costa de França, libertou 230 mil toneladas de petróleo que afetaram 300 km de linha de costa. Na costa, o óleo foi removido das praias através de métodos mecânicos e posteriormente foram pulverizadas com fertilizantes e comunidades bacterianas. As zonas rochosas foram limpas através de mangueiras de alta pressão com água quente, e diferentes sorventes foram utilizados (Bourne, 1979; Boyes and Elliot, 2010; Enzler, 2006). Em 1989 o navio petroleiro Exxon Valdez encalhou na costa do Alasca e derramou cerca de 35 mil toneladas de petróleo ao longo de 1900 km de costa. A utilização de dispersantes (Corexit) não foi bem sucedida pois a maior parte do óleo transformou-se numa camada grossa gelatinosa (Cleveland *et al.*, 2010; Cutler *et al.*, 2010; Enzler, 2006; ITOPI, 2010). Outros métodos utilizados para tratar este derrame foram as barreiras

absorventes, incêndios para consumir os óleos, lavagem com mangueiras de pressão de água quente das praias e técnicas de biorremediação (Cleveland *et al.*, 2010; Cutler *et al.*, 2010;ENZLER, 2006; ITOPI, 2010). A utilização de Corexit foi a maior estratégia adotada para tentar controlar o derrame do Golfo do México, provocado pela plataforma da BP *Deepwater Horizon*, em 2010 (Daly, Passow, Chanton, & Hollander, 2016).

Os métodos atuais para remediação de derrames podem ser classificados de acordo com o tipo de processos aplicados (mecânicos, físicos, químicos, térmicos ou biológicos), ou com o local de tratamento, isto é, *in situ*, quando é realizado no mesmo local onde ocorreu o derrame, e *ex situ*, quando se procede à remoção dos solos e/ou das águas contaminadas, que são depois encaminhadas para tratamento noutro local. As tecnologias *in situ*, têm vindo a ser preferidas relativamente às *ex situ* pois apresentam muitas vezes custos inferiores (Nathanail & Bardos, 2004) e evitam os riscos associados à manipulação dos óleos ou dos resíduos contaminados com hidrocarbonetos resultantes das técnicas de remediação (por exemplo, os materiais sorventes). Por outro lado, as *técnicas in situ* são relativamente lentas, pelo que do ponto de vista ambiental pode ser mais vantajoso remover os óleos e tratar noutro local.

### 2.1.1. Métodos mecânicos, químicos e térmicos

A primeira linha de atuação em caso de derrames de petróleo consiste frequentemente no uso de barreiras flutuantes, que limitam a propagação do derrame e contém os contaminantes na área. Desta forma, os compostos ficam concentrados, facilitando o seu tratamento posterior *in situ*, nomeadamente através de técnicas químicas, ou a remoção destes óleos para tratamento *ex situ*. A remoção em ambiente marinho pode ser feita por métodos mecânicos, por exemplo com recurso a equipamentos que separam os óleos da água, sendo por isso designados por recuperadores (Al-Majed, Adebayo, & Hossain, 2012), ou por métodos físicos como a absorção/adsorção. O uso de recuperadores mecânicos é fortemente limitado pelos ventos, correntes e agitação marítima.

As técnicas químicas em ambiente marinho recorrem geralmente a dois tipos de compostos: dispersantes, promovendo a desintegração das manchas de petróleo em gotículas de menores dimensões (Al-Majed *et al.*, 2012), e surfactantes, para reduzir a tensão superficial

de modo a aumentar a criação de emulsões do óleo na água. A utilização de dispersantes foi considerada a técnica mais eficaz atuando num curto período de tempo (Lessard & DeMarco, 2000). Os dispersantes são facilmente pulverizados sobre a água contaminada, promovendo a dispersão do óleo mesmo quando utilizados em pequenas concentrações (Kleindienst, Paul, & Joye, 2015). Estes são compostos por surfactantes dissolvidos em solventes, apresentando afinidade química tanto com o petróleo como com a água. Quando aplicados, as moléculas alinham-se de maneira a que o lado lipofílico se possa ligar ao petróleo, e a parte hidrofílica se possa ligar às moléculas de água, o que diminui a tensão interfacial existente promovendo a formação de gotículas (Kujawinski et al., 2011). O uso de dispersantes torna o óleo mais disponível para as bactérias, o que promove a biorremediação *in situ* e a redução dos níveis de contaminação. A maior desvantagem desta técnica é o potencial tóxico dos dispersantes (Al-Majed *et al.*, 2014). Porém, nestas últimas décadas tem havido tentativas de diminuir a toxicidade destes compostos, de maneira a preservar o meio marinho circundante. Em 2010, após o incidente de *Deepwater Horizon*, milhares de litros de dispersantes (Corexit) foram lançados tanto na superfície da água, como injetados em profundidade nos oceanos contaminados (Barstow, Rohde, & Saul, 2010). Neste caso, um resultado inesperado surgiu da aplicação deste dispersante. A ocorrência de *marine snow*, que consiste na sedimentação de um conjunto de partículas orgânicas e inorgânicas, resultou no arraste de grandes quantidades de óleo para o fundo do oceano (Daly *et al.*, 2016).

Tanto em ambiente marinho como noutras matrizes, os processos químicos podem também ser realizados com agentes oxidantes fortes, podendo ser aplicados *in situ* ou *ex situ* (M. S. C. R. P. da Silva, 2008). Em geral, apesar da eficácia e rapidez de resposta dos métodos químicos contribuírem para a minimização das consequências nefastas de um derrame, estas técnicas são bastante agressivas para o ambiente (Al-Majed *et al.*, 2014) e para a saúde humana (Netto *et al.*, 2000).

Os processos térmicos utilizam temperaturas elevadas com o objetivo de destruir os contaminantes presentes no meio. Este método aplica-se apenas a compostos que volatilizam a temperaturas elevadas, mais especificamente, entre os 800 °C e os 3000 °C (WTIC, 1997). Um dos métodos mais utilizados é a desorção térmica, geralmente aplicada a solos contaminados. Estes são previamente retirados do local onde se encontram, e são depois submetidos a altas temperaturas de modo a remover os compostos orgânicos do meio por volatilização. Os



hidrocarbonetos volatilizados são tratados antes de serem lançados para a atmosfera, sendo o solo arrefecido e humedecido para ser posteriormente depositado em aterro ou reutilizado (FWECBC, 1998; Castelo-Grande *et al.*, 2007). Este processo apresenta algumas vantagens, nomeadamente a eficácia na libertação do contaminante absorvido, rápido tratamento do meio e adequado para aplicação em zonas com concentrações elevadas de contaminantes (Khan, Husain, & Hejazi, 2004; EPA, 2004). Porém, esta técnica também apresenta limitações pois estes processos são aplicados *ex situ*, originando elevados custos da operação das instalações, de escavação, transporte e gestão do solo tratado. Adicionalmente, a presença de humidade pode reduzir a eficiência do processo (Khan, Husain, & Hejazi, 2004; Deuren et al., 2002).

### 2.1.2. Métodos físicos

Os métodos físicos baseiam-se geralmente na aplicação de materiais absorventes/adsorventes. A utilização de sorventes para a remoção de hidrocarbonetos tem a vantagem de permitir a passagem destes contaminantes de uma matriz líquida para uma matriz sólida ou semi-sólida, facilitando assim o processo de remoção (Karakasi & Moutsatsou, 2010). Adicionalmente, podem também ser aplicados para remover hidrocarbonetos de vários tipos de matrizes sólidas, tais como pavimentos de indústrias de refinaria, estradas, ou até zonas de armazenamento de óleos. A eficácia dos materiais sorventes depende, entre outras, das suas propriedades hidrofóbicas e lipofílicas e da sua capacidade de retenção. A sua resistência ao longo do tempo e possível reutilização, bem como a possibilidade de recuperação do agente contaminante são aspetos importantes a ponderar na escolha do material sorvente a utilizar (Karakasi & Moutsatsou, 2010). Assim, o tipo de sorvente a utilizar deve ser escolhido tendo em conta o lugar onde vai ser aplicado e as condições ambientais do meio. Numa situação de derrame de óleos em ambientes aquáticos, é necessário utilizar um sorvente que tenha a capacidade de reter o contaminante e não a água (Banerjee, Joshi, & Jayaram, 2006). Os materiais sorventes podem ser inorgânicos (minerais) ou orgânicos (sintéticos ou naturais) (Cojocarú et al., 2011). Considerando que os minerais inorgânicos, tais como a perlite ou cinzas voláteis, apresentam menor capacidade de sorção e fluabilidade do que os materiais orgânicos, estes últimos apresentam maiores vantagens ao nível da remediação. Biossorventes orgânicos de origem natural apresentam custos menores, encontram-se disponíveis muitas vezes

na forma de resíduos agrícolas ou industriais, são renováveis e podem ser biodegradáveis após a sua utilização (Cojocar, *et al.*, 2011). Após aplicação, os sorventes contaminados são considerados resíduos perigosos, pelo que o armazenamento e tratamento/descarte destes deverão ser alvo de planeamento, de forma a proceder ao tratamento da maneira mais segura possível para o meio ambiente e para a saúde humana (Guidi, Sliskovic, Violante, & Vukic, 2016).

### 2.1.3. Métodos biológicos

Os processos de tratamento biológico (biorremediação) baseiam-se principalmente na utilização de microrganismos com capacidade para utilizar os hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, contribuindo para a sua transformação em compostos menos perigosos ou para a sua degradação completa (Pala, *et al.*, 2006; Watanabe, 2001; Atlas & Cerniglia, 1995). Atualmente conhecem-se diversas bactérias, fungos e algas capazes de degradar ou transformar hidrocarbonetos (Head, Jones, & Röling, 2006). No caso da degradação por bactérias, estes processos podem decorrer tanto em condições aeróbias como anaeróbias. A biorremediação tem sido aplicada com sucesso tanto *in situ* como *ex situ*, apresentando melhores resultados neste último. Relativamente às técnicas de remediação já referidas nas secções anteriores, os processos de biorremediação são os que apresentam maior potencial a nível ecológico e económico, uma vez que apresentam custos menores de aplicação e são considerados não invasivos, isto é, não perturbam o meio ambiente onde são introduzidos (Das & Chandran, 2011). Contudo, não existe um microrganismo que seja capaz de degradar completamente uma mistura complexa de hidrocarbonetos, pelo que é necessária uma combinação de diferentes organismos para aumentar a biorremediação e obter melhores resultados a nível de eficácia de degradação (Olajire, 2014).

Durante a biodegradação de hidrocarbonetos, os compostos com menor peso molecular (alcanos lineares) e de estrutura mais simples são degradados mais rapidamente do que os compostos com maior peso molecular (alcanos cíclicos ou hidrocarbonetos aromáticos) e estruturas mais complexas (Head, *et al.*, 2006). Assim, a diminuição da percentagem de hidrocarbonetos saturados e aromáticos, juntamente com um aumento da abundância relativa dos compostos polares, assinala de forma característica a ocorrência de biodegradação de

petróleo. Os hidrocarbonetos saturados constituem a maior fração em massa do petróleo bruto, pelo que a sua biodegradação constitui o processo mais importante, em termos quantitativos, na remoção de petróleo do meio ambiente. No entanto, os hidrocarbonetos aromáticos, que são mais tóxicos e persistentes, podem ter efeitos sobre o ambiente que são relevantes a longo prazo (Head, *et al.*, 2006).

A biorremediação pode-se realizar procedendo à adição de microrganismos ao local que se pretende tratar, para que eles possam utilizar o petróleo como fonte de carbono e energia para o seu crescimento, num processo designado por bioaugmentação. Contudo, esta abordagem nem sempre é bem sucedida, uma vez que muitas vezes os organismos adicionados não conseguem competir com os organismos autóctones (Cruz, Cavaleiro *et al.*, 2016). Para além deste método, pode-se também estimular o crescimento de populações já existentes na comunidade, através da adição de nutrientes ou substâncias que promovam o seu crescimento. Este último, designa-se bioestimulação e, tanto este como a bioaugmentação, são realizados *in situ*.

Para além de bioestimulação/bioaugmentação, também existem métodos de tratamento *ex situ* como *landfarming/landfilling* e compostagem. O tratamento *landfarming/landfilling* consiste na aplicação de um resíduo oleoso na superfície do solo num local de tratamento confinado, de modo a reduzir as concentrações dos constituintes de petróleo por meio da biorremediação. A biodegradação microbiana é o mecanismo primário de eliminação dos poluentes e é de grande importância a manutenção das condições adequadas ao crescimento e atividade destas comunidades, por exemplo através da adição de água, oxigenação e controlo de pH (Castro, 2015). No caso da compostagem, o resíduo oleoso é misturado com diferentes substratos orgânicos, em pilhas/leiras estáticas ou arejadas, e é degradado pela comunidade microbiana. Para aumentar a eficiência de compostagem pode-se adicionar oxigénio, água, nutrientes e controlar o pH e temperatura (Ball *et al.*, 2012; Gibb *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2013). As principais vantagens deste método são a pequena área necessária e a redução de produtos secundários gerados.

Por último, outro método alternativo é a utilização de biorreatores. Estes processos consistem na adição de resíduos ou águas residuais contaminadas com hidrocarbonetos a um reservatório (reator) que contém microrganismos especializados na degradação dos hidrocarbonetos. O contacto entre os contaminantes e os microrganismos é essencial, devendo-

se então promover a homogeneização do conteúdo do biorreator para aumentar a eficácia do tratamento biológico, bem como a adição de nutrientes e oxigênio (Walter J. Weber & Kim, 2005). Diferentes tipos de reatores têm sido testados para o tratamento de resíduos/águas residuais contaminados com hidrocarbonetos, nomeadamente reatores *fed-batch* (FBR), reatores *batch* sequenciais (SBR), reatores de membrana (MB), reator de biodiscos (RBC), filtros biológicos arejados (BAF) e reatores de manto de lamas de fluxo ascendente (UASB) combinados com BAF (Alberti *et al.*, 2007; Chavan & Mukherji, 2008; Liu, *et al.*, 2013; Zhao, *et al.*, 2006; Shabir *et al.*, 2013).

## 2.2. Biossorventes e a cortiça

Apesar de os polímeros sintéticos serem classificados como materiais ideais para a recuperação marinha em zonas de derrames, devido à sua baixa densidade e retenção de água, e excelente resistência química e física, estes sorventes não são renováveis e biodegradáveis. Os biossorventes naturais, por outro lado, apresentam uma grande variedade de vantagens tais como um menor custo de aplicabilidade, encontram-se disponíveis na natureza, são renováveis e apresentam a possibilidade de serem biodegradáveis depois do seu uso (Cojocarú *et al.*, 2011). Assim, a utilização de materiais sorventes naturais para remoção dos hidrocarbonetos do petróleo de locais contaminados permite o seu posterior tratamento por processos biológicos, favorecendo assim potenciais soluções económicas e ambientalmente sustentáveis para o problema dos derrames de petróleo, utilizando uma combinação de métodos físicos (sorventes) e métodos biológicos (biorremediação). Por outro lado, alguns produtos comerciais referem a possibilidade do biossorvente melhorar a biodegradação de certos hidrocarbonetos – por exemplo, o produto NatureSorb (Ambicare, 2013) – podendo facilitar a ocorrência de biorremediação *in situ*.

Os materiais biossorventes a aplicar no caso de derrames de petróleo deverão ser produtos oleofílicos e hidrofóbicos. Certos biossorventes já contém algumas ceras ou óleos, o que lhes dá uma maior afinidade com o óleo do que com a água. Quando secos, geralmente flutuam na água e são baratos, abundantes e ecológicos. Estes sorventes já provaram ser um dos métodos mais eficazes no tratamento de derrames de petróleo em áreas de litoral, onde as

contaminações por derrames de petróleo causam um enorme impacto ambiental e económico (Carmody, Frost, Xi, & Kokot, 2007).

Alguns exemplos de biossorventes são as palhas, madeira de Mafumeira, casca de arroz, cortiça, cana de açúcar, resíduos de algodão e de espigas de milho, serradura, turfa, fios de seda, casca de pinheiro, lã, casca de coco, entre outros (Al-Majed et al., 2012). A palha é oca e consegue flutuar durante muito tempo, é abundante no meio ambiente, barata e estudos mostram que esta pode absorver até 24 vezes o seu peso em óleo (Adebajo, *et al.*, 2003). Abdullah *et al.* (2010) e Lim & Huang, (2007) também fizeram experiências com madeira de Mafumeira e concluíram que esta conseguia absorver até 50 vezes o seu peso em óleo, apresentava capacidade de reutilização, fluabilidade e hidrofobia. Estudos com fios de seda mostram que esta tem características semelhantes às anteriores, apresentando capacidades de absorção até 85 vezes o seu peso (Annunciado, Sydenstricker & Amico, 2005). Literatura publicada mostra também a eficácia e capacidade de absorção da casca de arroz (Bhatnagar & Sillanpaa, 2010; Foo & Hameed, 2009) atingindo valores entre 4.6 g e 6.7 g de óleos pesados por grama de casca de arroz. Este produto constitui um bom sorvente mas tende, no entanto, a ficar encharcado em água e afunda facilmente em curtos períodos de tempo, mesmo antes de atingir a sua capacidade máxima de sorção (Schatzberg & Nagy, 1971; Sun *et al.*, 2002).

Existem dois tipos de sorção distintos: absorção e adsorção, que diferem essencialmente no mecanismo de retenção do contaminante pelo sorvente (Caldeira, 2014). Na adsorção, a acumulação do contaminante restringe-se à superfície do adsorvente, ou seja, não se verifica infiltração do contaminante no material adsorvente. Por outro lado, a absorção é um processo em que o composto a tratar penetra no adsorvente devido à ação conjugada de vários tipos de forças, tais como químicas, eletrostáticas e físicas (Annunciado, 2005).

A cortiça é uma substância 100 % vegetal, que constitui a casca do sobreiro. O sobreiro é a única árvore cuja casca tem a capacidade de se autorregenerar e, de forma geral, a cortiça pode ser descrita como uma mistura composta maioritariamente por suberina e lenhina, apresentando também polissacarídeos, ceroides e taninos (Olivella, Jové, & Oliveras, 2011). Este material é usado no fabrico de diversos produtos devido às suas características, nomeadamente leveza, elasticidade, impermeabilidade, isolamento, resistência, entre outras. Portugal é o maior produtor de cortiça a nível Mundial, sendo o mercado monopolizado pela Corticeira Amorim, com início em 1870. O principal objetivo da industrialização de cortiça foca-se na produção de

rolhas. Contudo, mais recentemente, a cortiça tem sido utilizada em diversas aplicações, nomeadamente na área de revestimentos, aglomerados compósitos, isolamentos, calçado e carteiras (Olivella, Fernández, Cano, Jové, & Oliveras, 2013).

### 2.2.1 Utilização da cortiça no controlo de derrames de óleos

Estudos recentes realizados pela Corticeira Amorim, concluíram que os grânulos de cortiça constituem um bom sorvente. Este produto apresenta uma grande capacidade de absorver/adsorver diferentes tipos de óleos, hidrocarbonetos, solventes orgânicos e produtos baseados neste tipo de compostos (Olivella *et al.*, 2013). Adicionalmente, a cortiça também pode ser utilizada para remover metais pesados tais como o cobre, zinco, níquel, chumbo, prata, entre outros (Olivella *et al.*, 2013). Outras vantagens que facilitam a utilização da cortiça como sorvente é a sua capacidade de flutuação, elevada hidrofobicidade e oleofilicidade. Assim, não é necessário associar este material a outro composto de maneira a promover a flutuabilidade, facilitando a sua utilização em situações de derrames de combustíveis em ambientes marinhos. A oleofilicidade indica a afinidade entre o composto a absorver/adsorver e o material absorvente/adsorvente (Martins & Reis, 2008). Os grânulos de cortiça são sub-produtos do processamento da cortiça. Foi demonstrado que grânulos de cortiça natural podem absorver até 5 vezes o seu peso em óleo (Martins & Reis, 2007), e grânulos de cortiça tratados termicamente com vapor de água a 380 °C podem absorver até cerca de 10 vezes o seu peso em óleo (Gil, 2015; Pintor *et al.*, 2012; Porto *et al.*, 2017). Estes grânulos tratados termicamente são designados por partículas regranuladas de cortiça (Porto *et al.*, 2017). Foi também demonstrado que a capacidade de sorção deste material é inversamente proporcional à sua granulometria.

Além de ambientes aquáticos, os grânulos de cortiça podem também ser aplicados em diferentes tipos de superfícies sólidas: zonas industriais, oficinas mecânicas, pavimentos e estradas. O residuo contaminado resultante não é atualmente reutilizado, sendo posteriormente sujeito a processos de incineração (Porto *et al.*, 2017). Contudo, este residuo pode ser valorizado através de processos de digestão anaeróbia com concomitante produção de metano (Cavaleiro *et al.*, 2015). Em alternativa, os hidrocarbonetos alifáticos sorvidos pelos grânulos de cortiça podem ser degradados aerobicamente e convertidos em lípidos de reserva por bactérias

hidrocarbonoclásticas, que por sua vez são convertidos a metano por bactérias anaeróbias (Castro *et al.*, 2017).

### 2.3. Bactérias hidrocarbonoclásticas

A persistência natural e a resistência à degradação fazem dos componentes do petróleo um problema ambiental significativo (Hu *et al.*, 2013; Oudot *et al.*, 1998). Quando comparados com métodos físicos ou químicos, a utilização de bactérias hidrocarbonoclásticas mostra-se mais eficaz em termos de custos e da recuperação do ambiente. Estudos mostram que ambientes contaminados com hidrocarbonetos apresentam diversas comunidades bacterianas capazes de realizar a degradação destes compostos (Mahjoubi *et al.*, 2013; Teramoto *et al.*, 2013). A capacidade destes microrganismos em degradar hidrocarbonetos formando compostos orgânicos mais simples através da destruição de ligações intramoleculares tem sido extensivamente estudada (Madsen, 1991; McGenity *et al.*, 2012). Algumas bactérias metabolizam apenas hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, enquanto que outras são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono. Estas últimas têm a capacidade de “ativar” vias metabólicas necessárias na presença de hidrocarbonetos de maneira a alterar o seu funcionamento, de acordo com o novo tipo de substrato disponível (Grimes *et al.*, 2011).

A concentração destas bactérias no meio depende do nível de poluição presente. Em ambientes “limpos” as concentrações de bactérias hidrocarbonoclásticas apresentam-se muito baixas, enquanto que em meio contaminado, nomeadamente por derrames de petróleo, a concentração aumenta (Ghaly & Dave, 2011; Swannell *et al.*, 1996). Quando se dá um derrame de petróleo, as bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos crescem rapidamente (Oaikhena *et al.*, 2016; Syakti *et al.*, 2013). Estas comunidades de bactérias hidrocarbonoclásticas encontram-se adaptadas à presença de óleos, verificando-se, no entanto, um período de tempo inicial (fase *lag*), necessário para o crescimento das populações hidrocarbonoclásticas em resposta ao fluxo de fonte de carbono elevado e repentino. Numa fase inicial, a quantidade de recursos ultrapassa a capacidade das bactérias em degradar estes contaminantes, e o óleo irá permanecer até que o consumo alcance a disponibilidade de fonte de carbono. Assim, ao fim de um dado período de tempo, as bactérias hidrocarbonoclásticas acabarão por tratar o local

contaminado, através do consumo destes contaminantes. Contudo, o processo pode não ser rápido o suficiente de maneira a evitar um desastre ecológico pois a rapidez deste tratamento depende de vários aspetos, tais como o local, duração e o tipo de derrame (Grimes *et al.*, 2011).

As bactérias mais estudadas para aplicação biotecnológica a nível de derrames são as Gram negativas pois estas apresentam melhores capacidades de adaptação devido à sua membrana externa adicional (Francisca, 2014). Como exemplo referem-se bactérias do género *Alcanivorax* e *Pseudomonas*, entre outros. Porém, bactérias Gram positivas também são capazes de sobreviver neste tipo de ambientes, nomeadamente membros dos géneros *Bacillus*, *Rhodococcus* e *Staphylococcus*, desencadeando alterações morfológicas como resposta ao stress ambiental (Torres *et al.*, 2011).

Neste trabalho foram selecionadas para estudo duas espécies de bactérias hidrocarbonoclásticas, *Alcanivorax borkumensis* e *Rhodococcus opacus*, sendo a primeira uma bactéria Gram negativa marinha e a segunda uma bactéria Gram positiva isolada a partir do solo. Informação mais detalhada sobre estas duas espécies será apresentada nas sub-secções seguintes.

### 2.3.1. *Alcanivorax borkumensis*

*Alcanivorax borkumensis* é uma bactéria Gram negativa que coloniza exclusivamente ambientes marinhos, especialmente águas contaminadas com óleos. Em águas não poluídas esta espécie está geralmente presente em pequeno número, devido à limitação de uma fonte de carbono necessária para o seu crescimento. Porém, na presença de um excesso de matéria orgânica e défice de nutrientes, como é o caso de um derrame de petróleo, esta espécie torna-se dominante (Cappello *et al.*, 2007), constituindo de 80 % a 90 % de toda a comunidade de bactérias que degradam estes compostos. Adicionalmente, esta espécie apresenta um crescimento acelerado em ambientes com fósforo e azoto, nutrientes que estimulam a degradação de óleo (Cappello *et al.*, 2007).

Uma das suas características mais importantes é a utilização quase exclusiva de alcanos como fonte de carbono e energia (Baik, 2010), conseguindo também metabolizar alguns ácidos orgânicos (Hara *et al.*, 2004). A descoberta desta espécie ocorreu em 1998 no Mar do Norte e



foi classificada como uma proteobactéria (Liu & Shao, 2005). Posteriormente, foram isoladas várias sequências de rRNA a partir de amostras marinhas em diferentes pontos do globo, mostrando a sua ubiquidade (Golyshin *et al.*, 2003). *A. borkumensis* possui mais do que um sistema genético para a oxidação de alcanos, nomeadamente os genes *alkB1* e *alkB2* que codificam hidroxilases responsáveis pela oxidação de alcanos (Sabirova *et al.*, 2006).

Compostos hidrofóbicos, tais como os hidrocarbonetos, apresentam uma baixa solubilidade em água, o que dificulta o acesso das bactérias a estes compostos. *A. borkumensis* possui genes responsáveis pela produção de um lípido surfactante (Liu *et al.*, 2010) aumentando a solubilidade dos óleos. A formação de emulsões óleo/água vai aumentar a área de contacto e a biodisponibilidade dos contaminantes, levando a uma maior biodegradação. Esta característica do seu genoma fornece uma vantagem competitiva porque consegue consumir uma maior quantidade de alcanos e assim tornar-se a espécie dominante em meios contaminados (Golyshin *et al.*, 2003). Estas descobertas indicam que *Alcanivorax borkumensis* tem um papel crítico na manutenção da qualidade de ambientes marinhos contaminados com óleos, constituindo uma base para estratégias biotecnológicas que acelerem processos de remediação ambiental tal como biorremediação e potencial aplicação em processos de biocatálise e produção de biossensores (Golyshin *et al.*, 2003).

### 2.3.2. *Rhodococcus opacus*

*Rhodococcus opacus* apresenta a capacidade de degradar alcanos, tanto de cadeia curta como longa, aromáticos e alifáticos (Sameshima *et al.*, 2008), usando-os como fonte de carbono e energia. É uma espécie de bactéria Gram positiva com potencial para a biorremediação de locais contaminados, uma vez que pode ser encontrada em diferentes ambientes, nomeadamente solos, sedimentos e água (Alvarez *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2008).

*R. opacus* adere às gotículas de óleo devido à superfície hidrofóbica da sua membrana. Consegue também produzir surfactantes, o que lhe fornece uma vantagem competitiva no consumo de hidrocarbonetos. Semelhante a *A. borkumensis*, também tem a capacidade de estabilizar emulsões entre líquidos e óleos, o que é extremamente importante em processos de biorremediação (Rapp & Gabriel-Jürgens, 2003).

*R. opacus* apresenta a capacidade de sintetizar vários compostos, tal como lípidos de reserva (Castro et al., 2017) que podem ser utilizados em diferentes áreas. Um destes produtos são os polihidroxicanoatos, para a produção de plásticos, os triacilgliceróis, utilizados para a produção de biodiesel, cosmética e aditivos alimentares, e por último as ceras, aplicadas em diferentes indústrias tais como a farmacêutica, a alimentar e a cosmética (Alvarez *et al.*, 2013; Martinková *et al.*, 2009). A acumulação destes compostos dá-se devido ao excesso de fonte de carbono e défice de azoto presente no meio. Quando na ausência de uma fonte estável de carbono, esta bactéria apresenta a capacidade de degradar os compostos de reserva acumulados, assegurando assim a sua sobrevivência (Francisca, 2014).

### 3. Objetivos

Os derrames de petróleo constituem um dos desastres ambientais mais graves provocados pelo Homem, e são responsáveis pela deterioração da qualidade dos recursos naturais. Uma das estratégias mais utilizadas para remediação de locais contaminados com petróleo é a contenção do derrame e remoção dos hidrocarbonetos por materiais com capacidades sorventes. Materiais naturais tais como a cortiça têm sido aplicados com sucesso na remediação de derrames. Pelas suas características físico-químicas, a cortiça pode constituir um bom suporte para o crescimento de bactérias aeróbias hidrocarbonoclásticas, ou conter substâncias que estimulem o seu crescimento, facilitando assim a ocorrência de biorremediação *in situ*.

O trabalho que se apresenta pretende avaliar o potencial dos grânulos de cortiça para estimularem a biorremediação aeróbia de hidrocarbonetos. Tem como objetivos específicos estudar a degradação aeróbia de hidrocarbonetos alifáticos sorvidos em grânulos de cortiça por bactérias hidrocarbonoclásticas, *Alcanivorax borkumensis* SK2 e *Rhodococcus opacus* B4, bem como avaliar o efeito da presença da cortiça no crescimento destas duas espécies. Pretende-se com este estudo contribuir para o desenvolvimento de uma solução económica e ambientalmente sustentável para o problema dos derrames de petróleo, utilizando uma combinação de métodos físicos (sorventes) e métodos biológicos (biorremediação).



## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Testes preliminares

Nestes ensaios usaram-se partículas regranuladas de cortiça (Cort) com cerca de 0.3 a 1 mm de granulometria, cedidas pela Corticeira Amorim. De acordo com a literatura (Silva *et al.*, 2005), poderão existir na cortiça compostos apolares extraíveis com hexano, que serão depois detetados conjuntamente com os alcanos a estudar. Para avaliar esta situação prepararam-se três matrizes contendo apenas partículas de cortiça (25 mg) e água destilada (50 mL). Estes ensaios foram a agitar a 150 min<sup>-1</sup> a 30 °C durante 48 horas. No final dos ensaios procedeu-se à extração e quantificação dos hidrocarbonetos de acordo com o descrito na secção 4.5.2.

### 4.2. Culturas puras

Nos ensaios realizados foram utilizadas duas culturas puras de bactérias hidrocarbonoclásticas. *R. opacus* B4 (NBRC 108011) foi adquirido ao Centro de Recursos Biológicos do Instituto Nacional de Tecnologia e Avaliação (NBRC, Tokyo, Japão) e *A. borkumensis* SK2 (DSM 11573) à Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemanha). O crescimento e a manutenção das culturas foram realizados usando os meios ONR7a (Dyksterhouse *et al.*, 1995) com agar e piruvato de sódio (10 g L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono para as culturas de *A. borkumensis* SK2, e o meio 802 com agar para as culturas de *R. opacus* B4. O meio 802 é resultante de uma mistura de polipeptona (10 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (0,5 g L<sup>-1</sup>) e sulfato de magnésio heptahidratado (1 g L<sup>-1</sup>).

### 4.3. Ensaios de crescimento de *A. borkumensis* SK2 e *R. opacus* B4 na presença de alcanos

Preparou-se uma mistura de alcanos (Alc) composta por tetradecano (C14), hexadecano (C16), eicosano (C20) e tetracosano (C24), dissolvidos em hexano, com uma concentração individual de 50 g L<sup>-1</sup>.

Os pré-inóculos de cada cultura foram preparados a partir de colônias isoladas. Uma a duas colônias de *A. borkumensis* SK2 e de *R. opacus* B4 foram recolhidas de meio sólido com uma hansa estéril e inoculadas em 50 mL de meio ONR7a suplementado com 10 g L<sup>-1</sup> de piruvato de sódio e meio MS (Schlegel, Kaltwasser, & Gottschalk, 1961) suplementado com 40 g L<sup>-1</sup> de glucose, respetivamente. A incubação foi realizada a 30 °C com agitação (150 min<sup>-1</sup>), até ao meio da fase exponencial de crescimento, isto é, densidade ótica (DO) 0,78 e 2,8 para *A. borkumensis* SK2 e *R. opacus* B4, respetivamente. A curva de crescimento de *R. opacus* PD630 (ANEXO II) foi usada como referência para *R. opacus* B4. Estes valores foram determinados experimentalmente no grupo de trabalho BRIDGE, apresentando-se as respetivas curvas de crescimento no ANEXO II. A densidade ótica foi medida a 600 nm em espectrofotómetro U-1500 Hitachi (Tokyo, Japan). Os pré-inóculos foram recolhidos, centrifugados a 13000 min<sup>-1</sup> durante 10 minutos a 20 °C, e lavados com tampão fosfato salino (PBS). O procedimento foi repetido 2 vezes. As células bacterianas foram colocadas novamente em suspensão em 50 mL do respetivo meio de cultura estéril (densidade final a 600 nm de 0,2) contendo solução de alcanos numa concentração final de 500 mg L<sup>-1</sup> de cada alcano. As culturas foram colocadas a 30 °C com agitação de 150 min<sup>-1</sup>, e o crescimento foi acompanhado por medição de azoto orgânico. Os ensaios foram efetuados em triplicado.

### 4.4. Degradação de alcanos sorvidos em partículas regranuladas de cortiça por *A. borkumensis* SK2 e *R. opacus* B4

Nesta experiência adicionou-se 25 mg de partículas de cortiça a matrizes estéreis de 250 mL, seguido de adição de 0,5 mL de mistura de alcanos com seringa de vidro e à chama

(concentração final de 500 mg L<sup>-1</sup> de cada alcano), e 50 mL de meio de cultura ONR7a ou MS para os ensaios com *A. borkumensis* SK2 e *R. opacus* B4, respetivamente. Os pré-inóculos e inóculos de ambas as culturas foram preparados como descrito no ponto 4.3. e adicionados aos matrizes, a uma DO inicial de 0,2. Paralelamente, foram efetuados ensaios de controlo: i) sem cortiça, ii) sem mistura de alcanos e iii) sem inóculo. As culturas foram colocadas a 30 °C com agitação de 150 min<sup>-1</sup>. Definiram-se 3 tempos de amostragem ao longo da experiência. Para cada tempo de amostragem foram sacrificadas 3 réplicas para extração e análise de hidrocarbonetos e 3 réplicas para análise do crescimento bacteriano por quantificação do azoto orgânico, perfazendo assim um total de 18 matrizes para cada cultura bacteriana.

## 4.5. Métodos analíticos

### 4.5.1. Quantificação de Azoto Orgânico

A concentração de biomassa, na forma de azoto orgânico, foi determinada nas células bacterianas obtidas após centrifugação da amostra ( $N_{org}$ ), usando o kit de teste em cuvette LCK 238 (Hach-Lange, Berlin, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 10000 min<sup>-1</sup>, durante 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 25 mL de água ultrapura, com o objetivo de remover vestígios de azoto inorgânico presente no meio de cultura. Este passo foi repetido três vezes. A totalidade da amostra foi usada, seguindo as instruções do kit, na gama adequada.

### 4.5.2. Análise de alcanos

Para a análise dos alcanos, o conteúdo total de cada matraz foi acidificado com HCl 8 mol L<sup>-1</sup> para um pH inferior a 2 e os alcanos extraídos através de extração líquido-líquido. As amostras foram transferidas para balões de decantação onde se adicionou sulfato de magnésio para minimizar a ocorrência de emulsões. Antes da extração foi adicionado heptadecano (C17) a uma concentração final de 200 mg L<sup>-1</sup>, para avaliar a eficiência do processo

de extração. A extração foi efetuada sequencialmente três vezes, usando 15 mL de hexano como solvente de acordo com o procedimento descrito pelo método padrão ISO 9337-2 para a quantificação de hidrocarbonetos totais do petróleo. Os funis foram agitados durante 2 minutos. Após 5 a 10 minutos de repouso, a fase orgânica foi recolhida. A esta fase foi adicionado tiosulfato de sódio para remover quantidades residuais de água eventualmente presentes.

De seguida, as amostras foram filtradas através de colunas de Florisil® (Sep-Pak Florisil 6cc, Waters, Milford, MA) previamente condicionadas com hexano, usando um sistema de vácuo. As amostras foram concentradas até secura usando sistema de evaporação TurboVap® LV (Biotage, Uppsala, Sweden). Os extratos foram ressuspensos em 1 mL de hexano e guardados a -20 °C até análise. A concentração de alcanos foi analisada através de cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID) (GC-MS Varian® 4000) O undecano (C11) foi adicionado antes da análise como padrão interno (PI). A coluna usada foi a VF1-ms (Agilent, USA) 30 cm comprimento x 0.025 mm diâmetro interno, composta por sílica fundida revestida com dimetilpolisiloxano como fase estacionária. O hélio foi usado como gás de arraste a 1 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do detetor e injetor foram 300 °C e 285 °C, respetivamente. A temperatura da coluna foi mantida a 60 °C durante 1 minuto seguida de um aumento até 290 °C a uma taxa de 8 °C min<sup>-1</sup>.



## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Testes preliminares

A quantificação dos alcanos escolhidos para os ensaios foi realizada em GC-FID usando retas de calibração construídas a partir de padrões externos, tal como se pode observar no ANEXO I. Na figura 2 está representado o cromatograma obtido para a solução stock de alcanos após diluição de 500 vezes (correspondente a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de cada alcano), salientando-se o respetivo tempo de retenção. Neste cromatograma não está presente o C17, que é adicionado para avaliar a eficiência de extração. Este composto tem um tempo de retenção de aproximadamente 13,6 minutos.

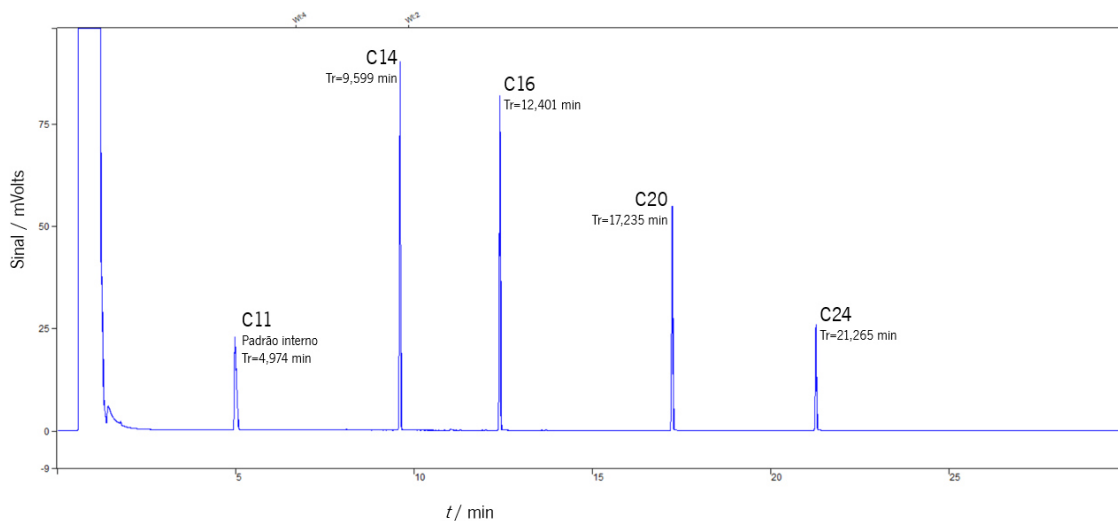


Figura 2 - Cromatograma da solução stock de alcanos na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

O cromatograma obtido após extração de compostos apolares a partir das partículas de cortiça (Figura 3) mostra a existência de picos entre os 15 e os 30 minutos, sendo que estes surgem como uma boça e também alguns picos discretos por volta dos 20 minutos. No entanto, salienta-se que esta amostra se encontra 50 vezes concentrada relativamente à concentração a usar nos ensaios, pelo que não se antevê interferências relevantes na análise aos hidrocarbonetos pela presença da cortiça.

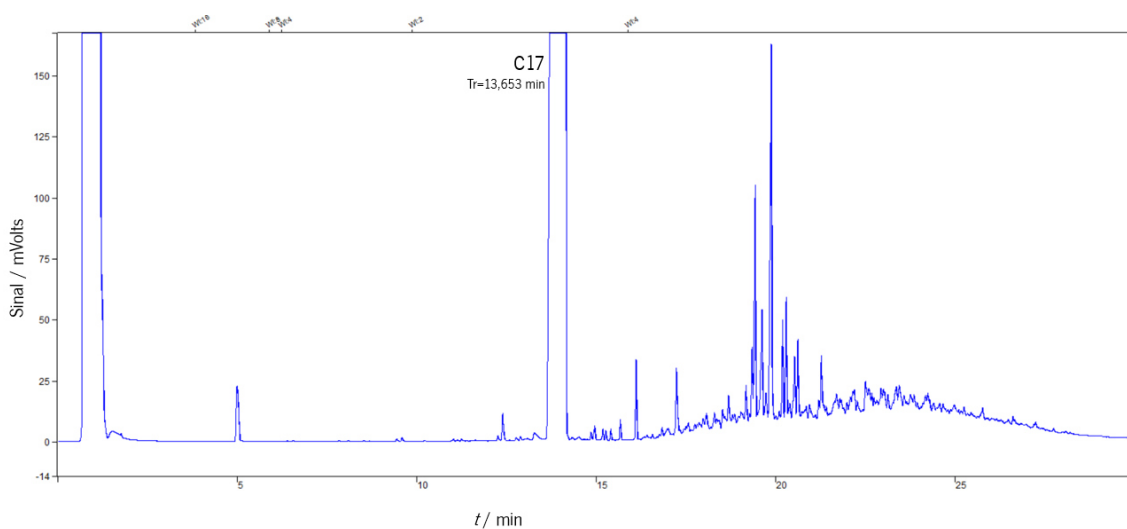


Figura 3 - Cromatograma resultante da extração de compostos apolares a partir das partículas de cortiça.

## 5.2. Ensaio de crescimento e degradação de alcanos sorvidos na cortiça por *A. borkumensis* SK2

Inicialmente procedeu-se à realização de ensaios com o objetivo de estudar o crescimento de *Alcanivorax borkumensis* SK2 na presença de alcanos, através da quantificação de azoto orgânico nas células bacterianas em suspensão (Figura 4). Verificou-se que *A. borkumensis* SK2 foi capaz de usar a mistura de alcanos fornecida como fonte de carbono, medindo-se de cerca de 1700 mg L<sup>-1</sup> de azoto orgânico após 150 horas de incubação. Este valor manteve-se aproximadamente constante até ao final do ensaio, mostrando que se havia já atingido o final da fase exponencial de crescimento. Com base nestes resultados, foram selecionados os tempos de amostragem para o ensaio com a cortiça.

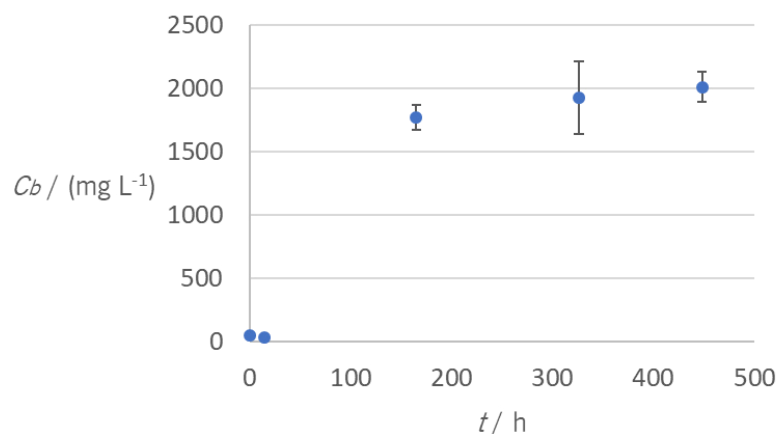


Figura 4 - Concentração de biomassa ( $C_b$ ), em mg de azoto orgânico por L, de *A. borkumensis* SK2 na presença de alcanos ao longo do tempo. Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras representam o desvio padrão calculados em cada tempo de amostragem.

Nos ensaios realizados com alcanos sorvidos em partículas de cortiça, comparou-se o crescimento da cultura de *A. borkumensis* SK2 suplementada com alcanos na presença (Ab+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ab+Alc). Estes resultados estão compilados na Figura 5. É possível verificar que na presença da cortiça o crescimento foi mais lento, uma vez que após 166 horas de incubação se mediu cerca de  $1100 \text{ mg N}_{\text{org}} \text{ L}^{-1}$ , enquanto que na ausência de cortiça a concentração de biomassa era de aproximadamente  $2200 \text{ mg N}_{\text{org}} \text{ L}^{-1}$ . Isto poderá ser devido ao facto dos alcanos se encontrarem sorvidos na cortiça, o que pode reduzir a sua biodisponibilidade. No entanto, no final do ensaio (452 horas) verificou-se um maior crescimento da cultura na presença de cortiça, atingindo valores de  $3060 \pm 150 \text{ mg N}_{\text{org}} \text{ L}^{-1}$ , o que sugere um possível efeito estimulador das partículas de cortiça no crescimento. Este efeito foi efetivamente confirmado nas incubações de *A. borkumensis* SK2 com cortiça e sem adição de alcanos (Ab+Cort), onde se verificou que a concentração de biomassa aumentou a partir das 166 horas de incubação atingindo um valor aproximado de  $1400 \text{ mg N}_{\text{org}} \text{ L}^{-1}$  no final do ensaio. No ensaio de controlo realizado sem adição de inóculo, ou seja, apenas contendo a mistura de alcanos e as partículas de cortiça, não se visualizou crescimento de biomassa. Assim, tendo por base este resultado, decidiu-se não efetuar as análises ao crescimento e concentração de alcanos nestes ensaios.

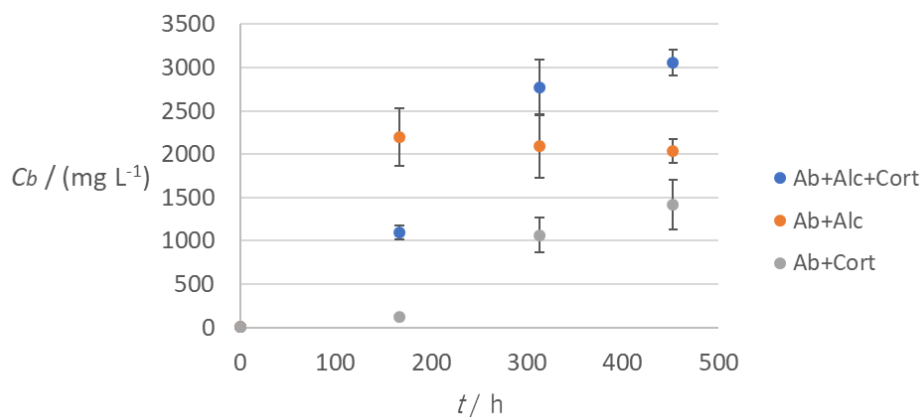


Figura 5 - Concentração de biomassa ( $C_b$ ), em mg de azoto orgânico por L, de *A. borkumensis* SK2 na presença de alcanos, sorvidos na cortiça (Ab+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ab+Alc); concentração de biomassa de *A. borkumensis* SK2 na ausência de alcanos e na presença de cortiça (Ab+Cort). Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras representam o desvio padrão calculado em cada tempo de amostragem.

A quantificação de alcanos nos ensaios Ab+Alc+Cort e Ab+Alc mostrou uma diminuição da concentração de cada um destes compostos ao longo do tempo, sendo esta mais acentuada nas primeiras 150 horas de incubação (Figura 6).

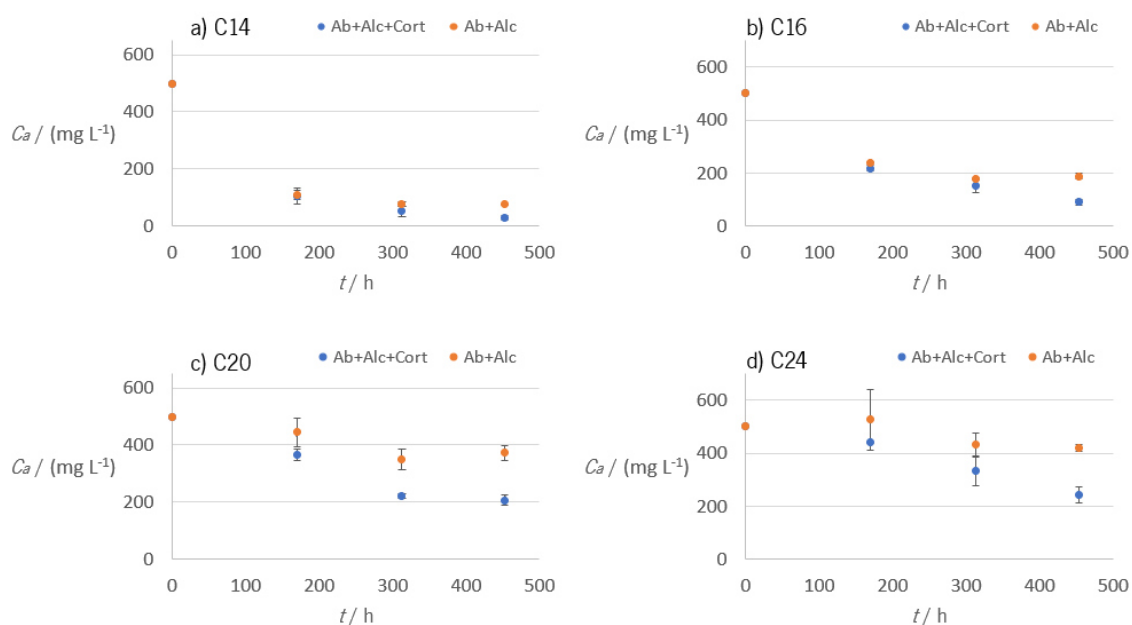


Figura 6 – Concentração ( $C_a$ ) de C14 (a), C16 (b), C20 (c) e C24 (d) ao longo do tempo, nas culturas de *A. borkumensis* SK2 crescidas em alcanos sorvidos na cortiça (Ab+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ab+Alc). Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras representam o desvio padrão calculado em cada tempo de amostragem.

As culturas de *A. borkumensis* SK2, crescidas tanto na presença como na ausência de cortiça, degradaram mais rapidamente os alcanos de cadeia mais curta, nomeadamente o C14 e o C16 (Figura 6). Por outro lado, a degradação dos alcanos foi maior na presença de cortiça, sendo este efeito mais notório para os alcanos de cadeia mais longa (C20 e C24) (Figura 6 e Tabela 1).

Tabela 1 - Percentagem de remoção de cada alcano por *A. borkumensis* SK2 no tempo final.

	Ab+Alc+Cort	Ab+Alc
C14	94±2 %	85±0 %
C16	82±2 %	63±2 %
C20	59±4 %	26±5 %
C24	51±6 %	16±2 %

Na figura 7 encontra-se representada a concentração total de alcanos, calculada através da soma das massas dos quatro alcanos em estudo, e a concentração de biomassa ao longo do tempo, nas incubações de *A. borkumensis* SK2 na presença e ausência de cortiça. Verifica-se uma relação diretamente proporcional entre a degradação dos alcanos e o crescimento de *A. borkumensis* SK2 nas duas condições, evidenciando o papel estimulador da cortiça na degradação dos alcanos e consequente crescimento de *A. borkumensis* SK2. No final do ensaio, esta cultura teve a capacidade de degradar 72 % e 47 % dos alcanos totais adicionados na presença e na ausência de cortiça, respetivamente. Considerando que membros do género *Alcanivorax* se tornam o grupo dominante de comunidades bacterianas presentes em águas marinhas contaminadas com petróleo (Cappello *et al.*, 2007), a utilização de cortiça como biosorvente apresenta grande potencial para estimular a biorremediação *in situ* neste tipo de ambientes.

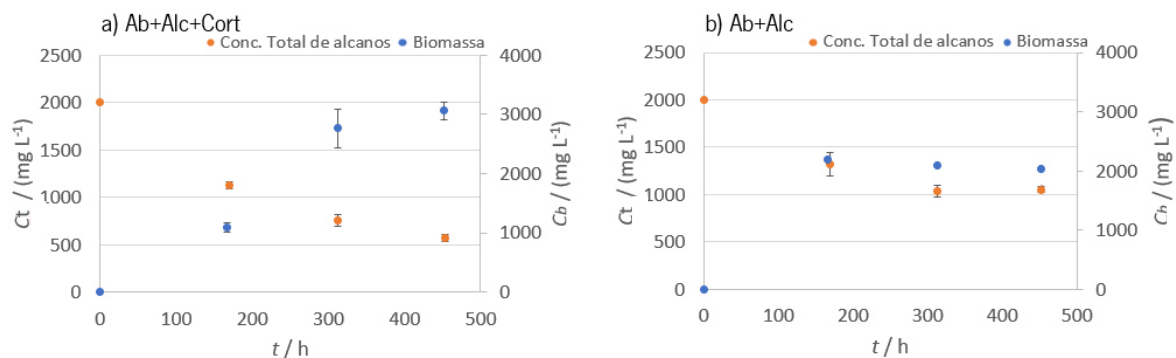


Figura 7 - Concentração total de alcanos ( $C_t$ ) e de biomassa ( $C_b$ ) ao longo do tempo, nas culturas de *A. borkumensis* SK2 crescidas em alcanos sorvidos na cortiça, Ab+Alc+Cort (a) e na ausência de cortiça, Ab+Alc (b). Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras representam o desvio padrão calculado em cada tempo de amostragem.

### 5.3. Ensaio de crescimento e degradação de alcanos sorvidos na cortiça por *R. opacus* B4

À semelhança do que foi anteriormente descrito para *A. borkumensis* SK2, procedeu-se à realização de ensaios para avaliar o crescimento de *R. opacus* B4 com a mistura de alcanos em estudo (Figura 8). Esta cultura apresentou uma fase *lag* de aproximadamente 250 horas, sendo por isso mais lenta do que *A. borkumensis* SK2. No entanto, após 403 horas de incubação, os valores de azoto orgânico atingiram cerca de 8600 mg L<sup>-1</sup>, sendo este valor 4 vezes superior ao verificado em *A. borkumensis* SK2. Uma vez que estes resultados mostram que ainda não foi atingida a fase estacionária, decidiu-se realizar o ensaio na presença de cortiça durante um período de tempo mais alargado (715 horas).

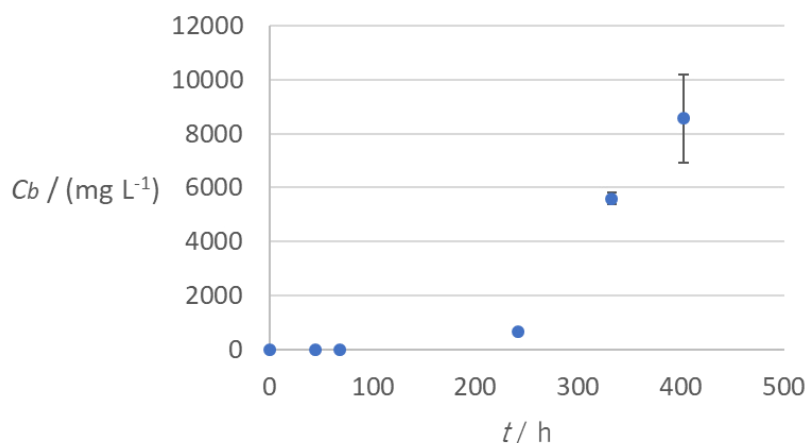


Figura 8 - Concentração de biomassa ( $C_b$ ), em mg de azoto orgânico por L, de *R. opacus* B4 na presença de alcanos ao longo do tempo. Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras representam desvio padrão calculado em cada tempo de amostragem.

O crescimento de *R. opacus* B4 em alcanos sorvidos na cortiça (Ro+Alc+Cort) ou livres no meio de cultura (Ro+Alc) foi semelhante, atingindo aproximadamente 20000 mg N<sub>org</sub> L<sup>-1</sup> após 715 horas de incubação (Figura 9). Ao contrário do que se verificou para *A. borkumensis* SK2, a presença de cortiça não estimulou o crescimento de *R. opacus* B4. Este facto foi também verificado nas incubações realizadas apenas na presença de cortiça e na ausência de alcanos (Ro+Cort), onde o crescimento foi inferior a 50 mg N<sub>org</sub> L<sup>-1</sup> (Figura 9). No ensaio controlo sem adição de inóculo não se visualizou crescimento de biomassa.

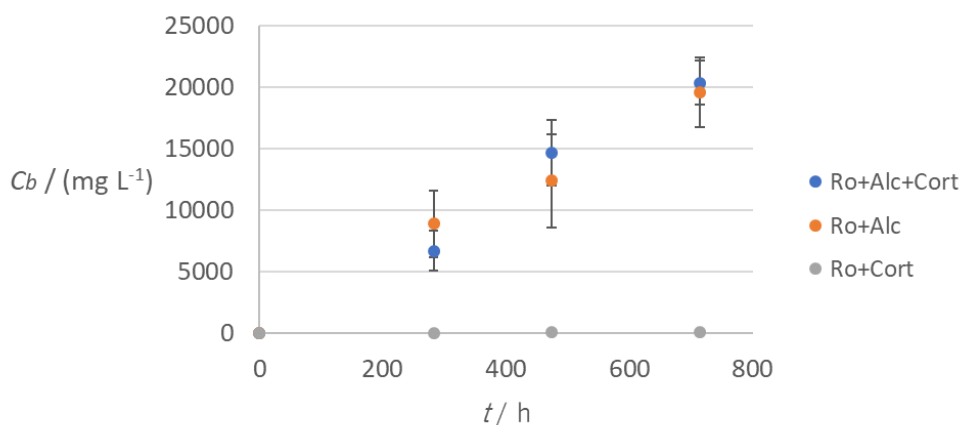


Figura 9 - Concentração de biomassa ( $C_b$ ), em mg de azoto orgânico por L, de *R. opacus* B4 na presença de alcanos, sorvidos na cortiça (Ro+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ro+Alc); concentração de biomassa de *R. opacus* B4 na ausência de alcanos e na presença de cortiça (Ro+Cort). Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras representam o desvio padrão calculado em cada tempo de amostragem.

A degradação por *R. opacus* B4 de todos os alcanos sorvidos na cortiça foi rápida e praticamente completa, uma vez que já não foi possível detetar C14, C16 e C20 após 283 horas de incubação, e C24 foi degradado até uma concentração de cerca de 75 mg L<sup>-1</sup> (Figura 10). Na ausência de cortiça, a degradação de C14 e C16 foi total após 283 horas, enquanto que para o C20 detetaram-se concentrações inferiores a 60 mg/L. Para este mesmo período de tempo detetaram-se concentrações de C24 de aproximadamente 200 mg L<sup>-1</sup>, que se mantiveram inalteradas até ao final do ensaio (Figura 10). *R. opacus* R7, uma estirpe taxonomicamente próxima de *R. opacus* B4, revelou também a capacidade de degradar diferentes alcanos, nomeadamente apresentou 69 %, 51 % e 78 % de degradação em mistura de 1 g L<sup>-1</sup> de C16, C20 e C24, respetivamente, ao fim de 80 horas (Zampolli *et al.*, 2014).

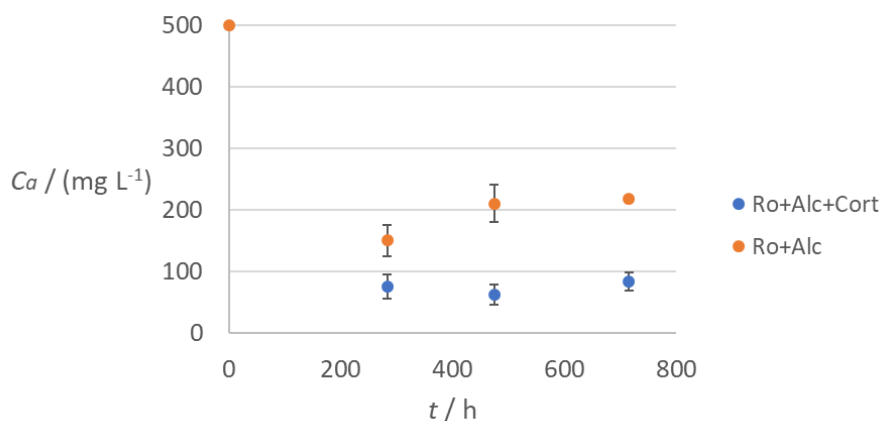


Figura 10 - Concentração de C24 ( $C_a$ ) ao longo do tempo, nas culturas de *R. opacus* B4 crescidas em alcanos sorvidos na cortiça (Ro+Alc+Cort) e na ausência de cortiça (Ro+Alc). Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras representam o desvio padrão calculado em cada tempo de amostragem.

Neste ensaio não foi possível visualizar uma relação direta entre a concentração total de alcanos e a concentração de biomassa, tanto na presença como na ausência de cortiça, uma vez que a degradação dos alcanos ocorreu nas primeiras 283 horas e só se verifica um aumento exponencial do crescimento após este período (Figura 11). *R. opacus* B4 demonstrou ser altamente eficiente na degradação da mistura de alcanos, atingindo 96±1 % e 89±3 % de degradação dos alcanos na presença e na ausência de cortiça, respetivamente. Assim, não se observou um efeito considerável da cortiça neste processo.



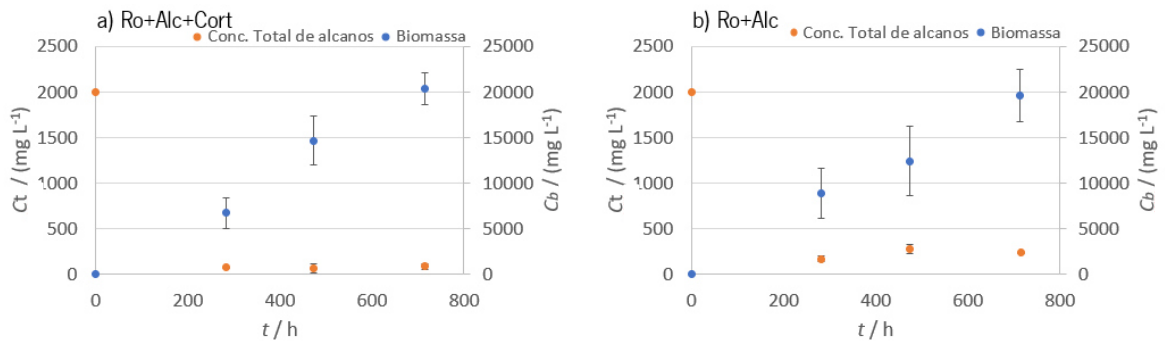


Figura 11 - Concentração total de alcanos ( $C_t$ ) e de biomassa ( $C_b$ ) ao longo do tempo, nas culturas de *R. opacus* B4 crescidas em alcanos sorvidos na cortiça, Ro+Alc+Cort (a) e na ausência de cortiça, Ro+Alc (b). Os pontos representam a média de 3 réplicas e as barras representam o desvio padrão calculado em cada tempo de amostragem.



## 6. Conclusões e perspectivas de trabalho

Nos ensaios, relativamente a *Alcanivorax borkumensis* SK2, verifica-se que a cortiça tem um efeito estimulador direto sobre o crescimento desta, pois as culturas crescem mais e degradam mais alcanos quando na presença das partículas regranuladas de cortiça. *Alcanivorax borkumensis* SK2 degradou  $72\pm 2\%$  e  $47\pm 2\%$  dos alcanos totais adicionados na presença e na ausência de cortiça, respetivamente, após 452 horas de incubação.

Quanto a *Rhodococcus opacus* B4, os valores de concentração de biomassa atingem valores superiores, comparativamente a *Alcanivorax borkumensis* SK2. A cortiça não teve um efeito estimulador sobre o crescimento, e tanto na presença como na ausência de cortiça, a degradação de todos os alcanos foi rápida e praticamente completa após 283 horas de incubação. *Rhodococcus opacus* B4 degradou  $96\pm 1\%$  e  $89\pm 3\%$  dos alcanos totais adicionados na presença e na ausência de cortiça, respetivamente.

Os resultados obtidos nesta tese abrem perspectivas para a realização de trabalho futuro nesta área. Uma vez que a cortiça apresentou um efeito estimulador no crescimento de *A. borkumensis* SK2 e consequente degradação de alcanos, a realização de ensaios futuros será uma mais valia para clarificar a razão do efeito estimulador da cortiça nestes aspetos. Relativamente a *R. opacus* B4, será interessante estudar as primeiras 250 horas de incubação de forma a perceber melhor o crescimento e a consequente degradação de alcanos por parte desta estirpe bacteriana. Será também interessante estudar a degradação de alcanos de cadeia mais longa.

Considerando que os ensaios experimentais foram efetuados em laboratório, utilizando uma mistura sintética e definida de alcanos, seria particularmente interessante estudar esta abordagem, aplicando-a a um contexto mais real, em condições *in situ*. Deste modo, é importante estudar a aplicação da cortiça em ambientes contaminados por hidrocarbonetos e o seu efeito nas comunidades bacterianas presentes. Para aumentar o nível de conhecimento e posterior aplicação do uso de bio-sorventes como potenciais agentes estimuladores da degradação de hidrocarbonetos, outra vertente interessante de estudo, seria então, testar a mesma abordagem usada neste trabalho, aplicando diferentes bio-sorventes e diferentes culturas bacterianas.



## Bibliografia

- Abdullah, M. A., Rahmah, A. U., & Man, Z. (2010). Physicochemical and sorption characteristics of Malaysian *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn. as a natural oil sorbent. *Journal of Hazardous Materials*, *177*(1–3), 683–691. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.12.085>
- Adebajo, M. O., Frost, R. L., Kloprogge, J. T., Carmody, O., & Kokot, S. (2003). Porous materials for oil spill cleanup: a review of synthesis and absorbing properties. *Journal of Porous Materials*, *10*(3), 159–170. <https://doi.org/10.1023/A:1027484117065>
- Al-Majed, A. A., Adebayo, A. R., & Hossain, M. E. (2012). A sustainable approach to controlling oil spills. *Journal of Environmental Management*, *113*, 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.034>
- Al-Majed, A. A., Adebayo, A. R., & Hossain, M. E. (2014). A novel technology for sustainable oil spills control. *Environmental Engineering and Management Journal*, *13*(2), 265–274.
- Alberti, F., Bienati, B., Bottino, A., Capannelli, G., Comite, A., Ferrari, F., & Firpo, R. (2007). Hydrocarbon removal from industrial wastewater by hollow-fibre membrane bioreactors. *Desalination*, *204*(1–3), 24–32. <https://doi.org/10.1016/J.DESAL.2006.05.010>
- Alloway, B., & Ayres, D. C. (1997). *Chemical Principles of Environmental Pollution*. Second Edition, CRC Press. Retrieved from [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=Y5x1KHrDKBQC&oi=fnd&pg=PR11&dq=environmental+pollution+by+oil&ots=aQK7Belil&sig=whKYr9g3lmDduXFlu00awXsf11s&redir\\_esc=y#v=onepage&q=environmental+pollution+by+oil&f=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=Y5x1KHrDKBQC&oi=fnd&pg=PR11&dq=environmental+pollution+by+oil&ots=aQK7Belil&sig=whKYr9g3lmDduXFlu00awXsf11s&redir_esc=y#v=onepage&q=environmental+pollution+by+oil&f=false)
- Alvarez, H. M., Silva, R. A., Cesari, A. C., Zamit, A. L., Peressutti, S. R., Reichelt, R., Steinbüchel, A. (2004). Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress. *FEMS Microbiology Ecology*, *50*(2), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.06.002>
- Alvarez, M. H., Arabolaza, A., Rodriguez, E., Gramajo, H., & Alvarez, H. M. (2013). The *atf2* gene is involved in triacylglycerol biosynthesis and accumulation in the oleaginous *Rhodococcus opacus* PD630. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(5), 2119–2130. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4360-1>

- Alvarez, P. J., & Vogel, T. M. (1991). Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 2981–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1746958>
- Ambicare. (2013). *Ficha Técnica do Produto*. Retrieved from [https://www.ambicare.com/sites/ambicare.com/files/produtos/fichas-tecnicas/ft\\_naturesorb.pdf](https://www.ambicare.com/sites/ambicare.com/files/produtos/fichas-tecnicas/ft_naturesorb.pdf)
- Annunciado, T. R. (2005). Estudo da *Chorisia speciosa* e outras fibras vegetais como sorventes para o setor de petróleo. Dissertação de pós-graduação, Universidade Federal do Paraná, Brasil. Retrieved from <http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/2146/disserta%E7%E3o1.pdf?sequence=1>
- Annunciado, T. R., Sydenstricker, T. H. D., & Amico, S. C. (2005). Experimental investigation of various vegetable fibers as sorbent materials for oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 50(11), 1340–1346. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2005.04.043>
- Atlas, R. M. (1995). Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4–12), 178–182. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00113-2](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00113-2)
- Atlas, R. M. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Bioremediation and Biodegradation*. 35(1-3), 317-327. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(95\)00030-9](https://doi.org/10.1016/0964-8305(95)00030-9)
- Baik, S.-H. (2010). Biotransformation of medium-chain alkanes using recombinant P450 monooxygenase from *Alcanivorax borkumensis* SK2 expressed in *Escherichia coli*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27(3), 905–909. <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0131-9>
- Ball, A. S., Stewart, R. J., & Schliephake, K. (2012). A review of the current options for the treatment and safe disposal of drill cuttings. *Waste Management & Research*, 30(5), 457–473. <https://doi.org/10.1177/0734242X11419892>
- Banerjee, S., Joshi, M., & Jayaram, R. V. (2006). Treatment of oil spill by sorption technique using fatty acid grafted sawdust. *Chemosphere*, 64(6), 1026–1031. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.01.065>

- Barstow, D., Rohde, D., & Saul, S. (2010). Deepwater Horizon's Final Hours. *The New York Times*. Retrieved from <http://www.nytimes.com/2010/12/26/us/26spill.html?pagewanted=all>
- Bhatnagar, A., & Sillanpaa, M. (2010). Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment—A review. *Chemical Engineering Journal*, *157*(2–3), 277–296. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2010.01.007>
- Bourne, W. R. P. (1979) The impact of Torrey Canyon and Amoco Cadiz oil on north French seabirds. *Marine Pollution Bulletin*, *10*(5), 124. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(79\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0025-326X(79)90068-7)
- Boyes, S., & M. Elliott. "Oil spill case study-amoco cadiz." (2010). Retrieved 05 October 2017 from <http://www.chemgapedia.de/vsengine/16/uc/vlus/amococadizoilspill.vlu.html>.
- Britannica. (2013). Petroleum products and their uses. Retrieved October 30, 2017, from <https://www.britannica.com/technology/petroleum-refining/Petroleum-products-and-their-uses#toc81808>
- Caldeira, F. (2014). *Towards Forest Products and Processes With Lower Environmental Impact*. Edições Universidade Fernando Pessoa. ISBN: 978-989-643-122-8
- Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., & Yakimov, M. M. (2007). Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on “oil spill bioremediation” in mesocosms. *Microbiological Research*, *162*(2), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.010>
- Carmody, O., Frost, R., Xi, Y., & Kokot, S. (2007). Adsorption of hydrocarbons on organo-clays—Implications for oil spill remediation. *Journal of Colloid and Interface Science*, *305*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2006.09.032>
- Carvalho, A. R. C. (2015). Hydrocarbonoclastic bacteria : from bioremediation to bioenergy feedstock. Tese de Doutoramento, University of Minho, Portugal.
- Castelo-Grande, T., Augusto, P. A., Barbosa, D. (2007). Técnicas de Descontaminação de Solos: Uma Revisão. Dossier Comunicações, Ingenium, 98, 126-131.
- Castro, A. R., Guimarães, M., Oliveira, J. V., & Pereira, M. A. (2017). Production of added value bacterial lipids through valorisation of hydrocarbon-contaminated cork waste. *Science of the*

*Total Environment*, 605–606, 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.216>

- Cavaleiro, A. J., Neves, T. M., Guedes, A. P., Alves, M. M., Pinto, P., Silva, S. P., & Sousa, D. Z. (2015). *Anaerobic co-digestion of cork based oil sorbent and cow manure or sludge*. In *Wastes: Solutions, Treatments and Opportunities*. C. Vilarinho, F. Castro and M. Russo (Eds.), pp. 43-48, Taylor and Francis Group. ISBN: 978-1-138-02882-1. Retrieved from <https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=wdCYCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA43&dq=Cavaleiro+AJ,+Neves+TM,+Guedes+AP,+Alves+MM,+Pinto+P,+Silva+SP,+Sousa+DZ.+Anaerobic+co-digestion+of+cork+based+oil+sorbent+and+cow+manure+or+sludge.+In+Wastes:+Solutions,+Treatme>
- Chavan, A., & Mukherji, S. (2008). Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: Effect of N:P ratio. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1–3), 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2007.09.106>
- Cleveland, C. J., C. M. Hogan, & P. Saundry. "Deepwater Horizon oil spill, Encyclopedia of the Earth." (2010). Retrieved 25 September 2017 from [http://www.eoearth.org/article/Deepwater\\_Horizon\\_oil\\_spill](http://www.eoearth.org/article/Deepwater_Horizon_oil_spill)
- Cojocaru, C., Macoveanu, M., & Cretescu, I. (2011). Peat-based sorbents for the removal of oil spills from water surface: Application of artificial neural network modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384(1–3), 675–684. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2011.05.036>
- Cruz, A., Cavaleiro, A. J., Paulo, A. M. S., Louvado, A., Alves, M. M., Almeida, A., & Cunha, Â. (2016). *Microbial Remediation of Organometals and Oil Hydrocarbons in the Marine Environment*. In *Marine Pollution and Microbial Remediation*. M.M. Naik and S.K.Dubey (Eds.), pp. 41-66, Springer Singapore. DOI: 10.1007/978-981-10-1044-6\_4. Print ISBN: 978-981-10-1042-2. Online ISBN: 978-981-10-1044-6. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1044-6>
- Cutler, J., C. J. Cleveland, and P. Saundry. (2013) "Exxon Valdez oil spill." Encyclopedia of Earth. [http://www.eoearth.org/article/Exxon\\_Valdez\\_oil\\_spill](http://www.eoearth.org/article/Exxon_Valdez_oil_spill) (accessed 23.09. 17).
- Daghio, M., Aulenta, F., Vaiopoulou, E., Franzetti, A., Arends, J. B. A., Sherry, A., *et al.* (2017).



- Electrobioremediation of oil spills. *Water Research*, 114, 351–370.  
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.02.030>
- Daly, K. L., Passow, U., Chanton, J., & Hollander, D. (2016). Assessing the impacts of oil-associated marine snow formation and sedimentation during and after the Deepwater Horizon oil spill. *Anthropocene*, 13, 18-33.  
<https://doi.org/10.1016/j.ancene.2016.01.006>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011, Article ID 941810, 13 pages.  
<https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Deuren J. V., Lloyd T., Chhetry S., Liou R., Peck J., (2002). Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, 4th Edition. Federal Remediation Technology Roundtable (FRTR), Aberdeen Proving Ground, MD.
- Dyksterhouse, S. E., Gray, J. P., Herwig, R. P., Lara, J. C., & Staley, J. T. (1995). *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 116–123.  
<https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-116>
- Enzler, S. M. "Top 10 of Anthropogenic and Natural Environmental Disasters. Lenntech, Delft, the Netherlands." (2006). Retrieved from [https://www.lenntech.com/environmental-disasters.htm#5.\\_Major\\_oil\\_spills\\_of\\_the\\_20th\\_and\\_21st\\_century](https://www.lenntech.com/environmental-disasters.htm#5._Major_oil_spills_of_the_20th_and_21st_century)
- EPA (2004). How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. US Environmental Protection Agency. (EPA 510-R-04-002). Retrieved from [https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/tum\\_ch12.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/tum_ch12.pdf) (Accessed 20 October 2017)
- Euronews. (2013). Prestige: O maior desastre ambiental em Espanha. Retrieved from <http://pt.euronews.com/2013/11/13/prestige-o-maior-desastre-ambiental-em-espanha>
- Fernandes, R. (2001). Modelação de derrames de Hidrocarbonetos, 67. *Instituto Superior Técnico / Departamento de Engenharia do Ambiente*.
- Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2009). An overview of landfill leachate treatment via activated carbon adsorption process. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1–3), 54–60.

<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.06.038>

- Francisca, M. (2014). Produção de triacilgliceróis por *Rhodococcus opacus* B4 a partir de aglomerados de cortiça contaminados com hidrocarbonetos. *Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Portugal*.
- FWECBC (1998). Overview of thermal desorption technology. contract report CR 98.008-ENV. Naval Facilities Engineering Service Center, California, 27 pp
- Galastri, L. (2010). Os 5 piores desastres envolvendo petróleo do mundo. Retrieved October 18, 2017, from <https://hypescience.com/os-5-piores-desastres-envolvendo-petroleo-do-mundo/>
- Galp Energia. (2014). Origem e composição do petróleo - Galp. Retrieved October 18, 2017, from <http://www.galpenergia.com/PT/agalpenergia/os-nossos-negocios/Exploracao-Producao/fundamentos-engenharia-petroleo/Paginas/Origem-e-composicao-do-petroleo.aspx>
- Ghaly, A. E., & Dave, D. (2011). Remediation technologies for marine oil spills: a critical review and comparative analysis. *American Journal of Environmental Sciences*, 7(5), 423–440. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/bd7b/2dd2b4da7f22f7675d76fb3c62fd90ff3304.pdf>
- Gibb, A., Chu, A., Wong, R. C. K., & Goodman, R. H. (2001). Bioremediation kinetics of crude oil at 5°C. *Journal of Environmental Engineering*, 127(9), 818–824. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2001\)127:9\(818\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2001)127:9(818))
- Gil, L. (2015). New cork-based materials and applications. *Materials*, 8(2), 625–637. <https://doi.org/10.3390/ma8020625>
- Golyshin, P. N., Martins dos Santos, V. A. P., Kaiser, O., Ferrer, M., Sabirova, Y. S., Lunsdorf, H., Timmis, K. N. (2003). Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. *Journal of Biotechnology*, 106(2–3), 215–220. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2003.07.013>
- Grimes, D. J., Hazen, T. C., King, G. M., Prince, R. C., Carolina, N., Ward, C. H. H., ... Maloy, S. (2011). Microbes & oil spills. *Environmental Protection*, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-777X\(77\)80110-8](https://doi.org/10.1016/S0378-777X(77)80110-8)

- Guidi, G., Sliskovic, M., Violante, A. C., & Vukic, L. (2016). Best available techniques (BATs) for oil spill response in the Mediterranean Sea: calm sea and presence of economic activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1944–1953. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5543-y>
- Hara, A., Baik, S., Syutsubo, K., Misawa, N., Smits, T. H. M., van Beilen, J. B., & Harayama, S. (2004). Cloning and functional analysis of *alkB* genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Environmental Microbiology*, 6(3), 191–197. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00550.x>
- Hassanshahian, M., & Cappello, S. (2013). Crude oil biodegradation in the marine environments. In *Biodegradation - Engineering and Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55554>
- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1348>
- Hu, G., Li, J., & Zeng, G. (2013). Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 470–490. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2013.07.069>
- International Energy Agency. (2017). Oil Market Report. Retrieved 10 October 2017 from <https://www.iea.org/oilmarketreport/omrpublic/>
- Karakasi, O. K., & Moutsatsou, A. (2010). Surface modification of high calcium fly ash for its application in oil spill clean up. *Fuel*, 89(12), 3966–3970. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2010.06.029>
- Khan, F. I., Husain, T., & Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71(2), 95–122. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2004.02.003>
- Kimes, N. E., Callaghan, A. V, Suflita, J. M., & Morris, P. J. (2014). Microbial transformation of the Deepwater Horizon oil spill-past, present, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, 603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00603>
- Kleindienst, S., Paul, J. H., & Joye, S. B. (2015). Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 388–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3452>

- Kujawinski, E. B., Kido Soule, M. C., Valentine, D. L., Boysen, A. K., Longnecker, K., & Redmond, M. C. (2011). Fate of dispersants associated with the Deepwater Horizon oil spill. *Environmental Science & Technology*, *45*(4), 1298–1306.  
<https://doi.org/10.1021/es103838p>
- Lefebvre, O., & Moletta. (2006). Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Research*, *40*(20), 3671–3682.  
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.08.027>
- Lessard, R. ., & DeMarco, G. (2000). The significance of oil spill dispersants. *Spill Science & Technology Bulletin*, *6*(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/S1353-2561\(99\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S1353-2561(99)00061-4)
- Lim, T.-T., & Huang, X. (2007). Evaluation of hydrophobicity/oleophilicity of kapok and its performance in oily water filtration: Comparison of raw and solvent-treated fibers. *Industrial Crops and Products*, *26*(2), 125–134. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2007.02.007>
- Liu, C., & Shao, Z. (2005). *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(3), 1181–1186. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63443-0>
- Liu, G., Ye, Z., Tong, K., & Zhang, Y. (2013). Biotreatment of heavy oil wastewater by combined upflow anaerobic sludge blanket and immobilized biological aerated filter in a pilot-scale test. *Biochemical Engineering Journal*, *72*, 48–53.  
<https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.12.017>
- Liu, Y.-C., Li, L.-Z., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L.-P., Xu, L., ... Shen, B. (2010). Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene. *Bioresource Technology*, *101*(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.08.028>
- Madsen, E. L. (1991). Determining in situ biodegradation. *Environmental Science & Technology*, *25*(10), 1662–1673. <https://doi.org/10.1021/es00022a001>
- Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Amor, S. Ben, Jouini, A., Cherif, H., ... Cherif, A. (2013). Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnology*, *30*(6), 723–733. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2013.03.004>
- Martinková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nesvera, J., & Kren, V. (2009). Biodegradation potential

- of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35(1), 162–177.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2008.07.018>
- Martins, S. P. A. da S. E., & Reis, R. L. G. dos. (2008). Meio de absorção/adsorção à base de derivados de cortiça para absorção/adsorção de óleos.
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 10.  
<https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-10>
- Miola, A., Paccagnan, V., Massarutto, A., Perujo, A., & Turvani, M. (2009). External costs of transportation case study: maritime transport. Retrieved from  
[http://www.eurosfaire.prd.fr/7pc/doc/1269355029\\_eur\\_23837\\_en.pdf](http://www.eurosfaire.prd.fr/7pc/doc/1269355029_eur_23837_en.pdf)
- Nathanail, C. P., & Bardos, P. (2004). *Reclamation of contaminated land*. Wiley. Retrieved from  
[https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=Gh0o0IHRA4oC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Nathanail+and+Bardos,+2004&ots=E62qh8-73K&sig=NueM20Pd6U9WYLQr02vWD55hjXQ&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Nathanail+and+Bardos%2C+2004&f=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=Gh0o0IHRA4oC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Nathanail+and+Bardos,+2004&ots=E62qh8-73K&sig=NueM20Pd6U9WYLQr02vWD55hjXQ&redir_esc=y#v=onepage&q=Nathanail+and+Bardos%2C+2004&f=false)
- Netto, A. D. P., Moreira, J. C., Dias, A. E. X. O., Ferreira, L. F. V., Oliveira, A. S., & Barek, J. (2000). Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): Uma revisão metodológica, 765–773.
- Oaikhena, E. E., Makaije, D. B., Denwe, S. D., Namadi, M. M., & Haroun, A. A. (2016). Bioremediation potentials of heavy metal tolerant bacteria isolated from petroleum refinery effluent. To cite this article :, 5(2), 29–34. <https://doi.org/10.11648/j.ajep.20160502.12>
- Olajire, A. A. (2014). Review of ASP EOR (alkaline surfactant polymer enhanced oil recovery) technology in the petroleum industry: Prospects and challenges. *Energy*, 77, 963–982.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2014.09.005>
- Olivella, M. A., Fernández, I., Cano, L., Jové, P., & Oliveras, A. (2013). Role of chemical components of cork on sorption of aqueous polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Environmental Research*, 7(1), 225–234.
- Olivella, M. À., Jové, P., & Oliveras, A. (2011). The use of cork waste as a biosorbent for persistent organic pollutants-Study of adsorption/desorption of polycyclic aromatic

- hydrocarbons. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 46(8), 824–832.  
<https://doi.org/10.1080/10934529.2011.579845>
- Oudot, J., Merlinb, F. X., & Pinvidicb, P. (1998). Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments. *Marine Environmental Research*, 45(2), 113–125. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00024-X)
- Pala, D. M., Carvalho, D. D., Pinto, J. C., & Sant'Anna Jr, G. (2006). A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58(3–4), 254–260. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2006.06.026>
- Paulo, J. S. (2015). *A Autoridade Marítima Nacional*. Retrieved from <https://books.google.pt/books?id=ZUwwDgAAQBAJ&pg=PT51&dq=plano+mar+limpo&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwj6gcWm2JTXAhWluBoKHSZBBycQ6AEIJzAA#v=onepage&q=plano+mar+limpo&f=false>
- Peng, F., Wang, Y., Sun, F., Liu, Z., Lai, Q., & Shao, Z. (2008). A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 698–705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03816.x>
- Pintor, A. M. A., Ferreira, C. I. A., Pereira, J. C., Correia, P., Silva, S. P., Vilar, V. J. P., ... Boaventura, R. A. R. (2012). Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Research*, 46(10), 3152–3166.  
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2012.03.048>
- Porto, P. S. S., Souza, R. S., Pesqueira, J. F. J. R., Boaventura, R. A. R., & Vilar, V. J. P. (2017). Mineral oil recovery from cork granules by a mechanical compression method: Compression cycles analysis. *Journal of Cleaner Production*, 147, 442–450.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.117>
- Rapp, P., & Gabriel-Jürgens, L. H. E. (2003). Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. *Microbiology*, 149(10), 2879–2890. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26188-0>
- Sabirova, J. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2006). Proteomic

- insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3763–73.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00072-06>
- Sameshima, Y., Honda, K., Kato, J., Omasa, T., & Ohtake, H. (2008). Expression of *Rhodococcus opacus* alkB genes in anhydrous organic solvents. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(2), 199–203. <https://doi.org/10.1263/JBB.106.199>
- Schatzberg, P., & Nagy, K. V. (1971). Sorbents for oil spill removal. *International Oil Spill Conference Proceedings*, 1971(1), 221–233. <https://doi.org/10.7901/2169-3358-1971-1-221>
- Schlegel, H. G., Kaltwasser, H., & Gottschalk, G. (1961). Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Archiv Fur Mikrobiologie*, 38(3), 209–222. <https://doi.org/10.1007/BF00422356>
- Shabir G, Afzal M, Tahseen R & Khalid Siqmkzm (2013) Treatment of oil refinery wastewater using pilot scale fed batch reactor followed by coagulation and sand filtration. *American Journal of Environmental Protection*1: 10-13.
- Silva, S. P., Sabino, M. A., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., & Reis, R. L. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50(6), 345–365. <https://doi.org/10.1179/174328005X41168>
- Silva, M. S. C. R. P. da. (2008). Avaliação e Remediação de Zona Contaminada por Hidrocarbonetos. *Faculdade de Ciências E Tecnologia / Departamento de Ciências E Engenharia Do Ambiente*.
- Swannell, R. P., Lee, K., & McDonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*, 60(2), 342–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8801437>
- Syakti, A. D., Yani, M., Hidayati, N. V., Siregar, A. S., Doumenq, P., & Made Sudiana, I. M. (2013). The bioremediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from a mangrove contaminated by petroleum hydrocarbons on the cilacap coast, Indonesia. *Bioremediation Journal*, 17(1), 11–20. <https://doi.org/10.1080/10889868.2012.731446>
- Teramoto, M., Queck, S. Y., & Ohnishi, K. (2013). Specialized hydrocarbonoclastic bacteria

- prevailing in seawater around a port in the Strait of Malacca. *PLoS ONE*, 8(6), e66594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066594>
- Torres, S., Pandey, A., & Castro, G. R. (2011). Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: Applications and biotechnological potentials. *Biotechnology Advances*, 29(4), 442–452. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.04.002>
- USEPA (2015a) Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2013, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Walter J. Weber, J. . and, & Kim, H. S. (2005). Optimizing contaminant desorption and bioavailability in dense slurry systems. 1. Rheology, Mechanical Mixing, and PAH Desorption. <https://doi.org/10.1021/ES049565B>
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 237–241. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00205-6)
- Xiao-Feng Sun, RunCang Sun, RunCang Sun, Sun, J.-X. (2002). Acetylation of rice straw with or without catalysts and its characterization as a natural sorbent in oil spill cleanup. <https://doi.org/10.1021/JF0203920>
- WTIC (1997). Site Remediation Technologies: A Reference Manual Contaminated Sites Management Working Group. Water Technology International Corp . Ontario, 123 pp
- Zampolli, J., Collina, E., Lasagni, M., & Di Gennaro, P. (2014). Biodegradation of variable-chain-length n-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism. *AMB Express*, 4(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0073-4>
- Zhao, X., Wang, Y., Ye, Z., Borthwick, A. G. L., & Ni, J. (2006). Oil field wastewater treatment in Biological Aerated Filter by immobilized microorganisms. *Process Biochemistry*, 41(7), 1475–1483. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2006.02.006>



# ANEXOS

## ANEXO I: Retas de calibração para cada alceno

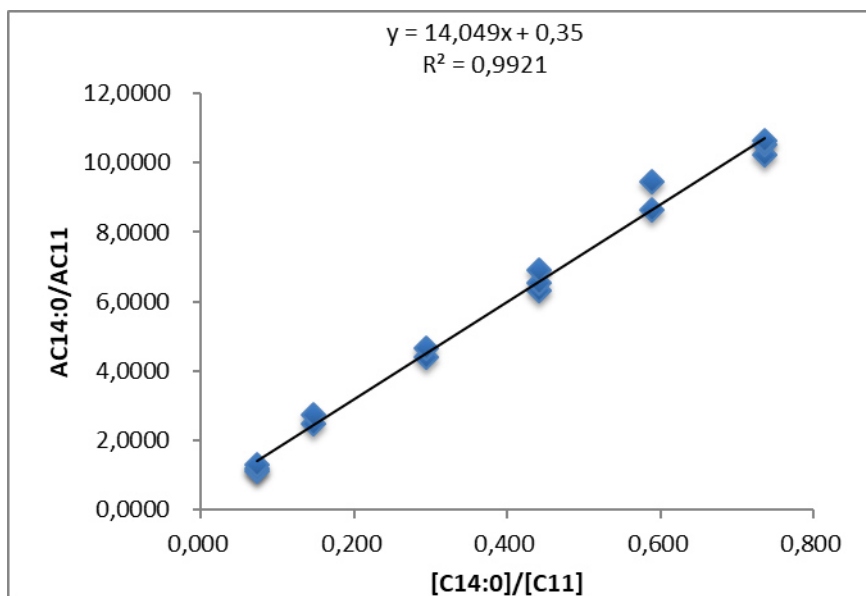


Figura A I - Reta de calibração para o C14.

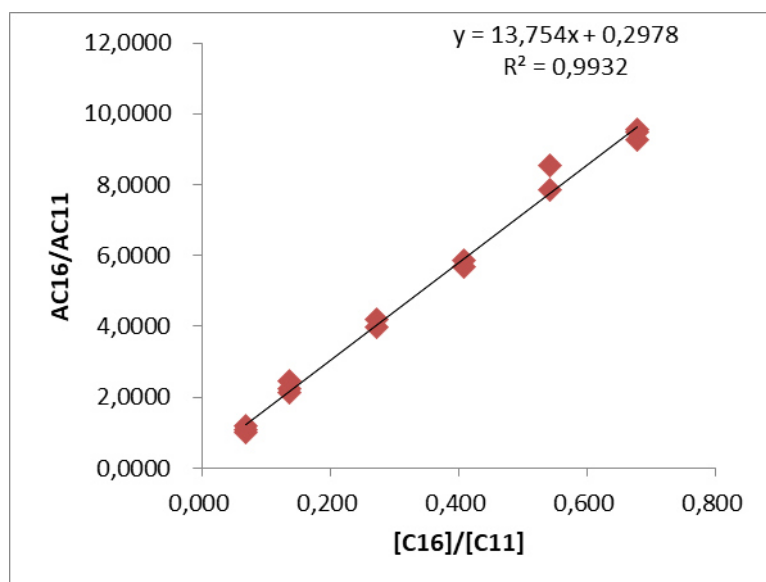


Figura A II - Reta de calibração para o C16.

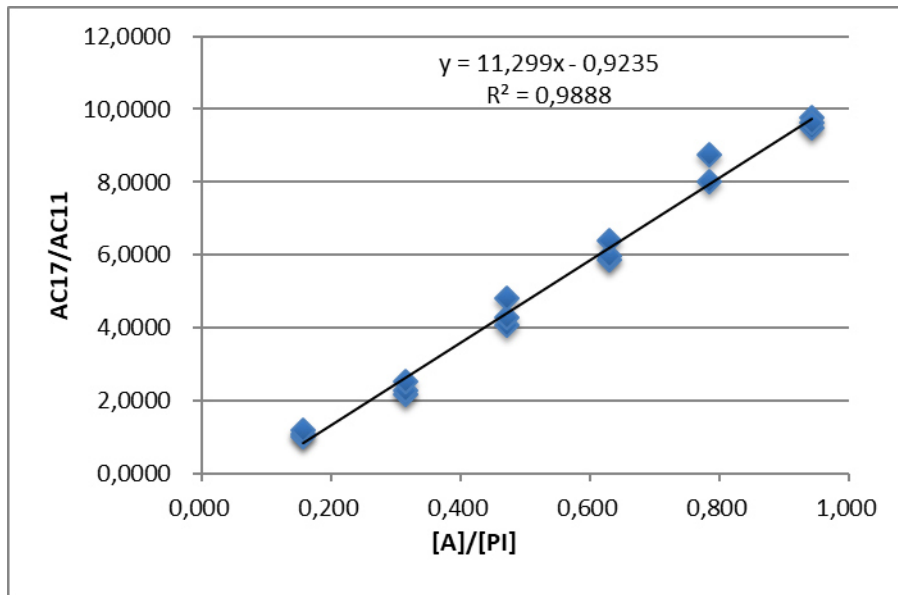


Figura A III - Reta de calibração para o C17 .

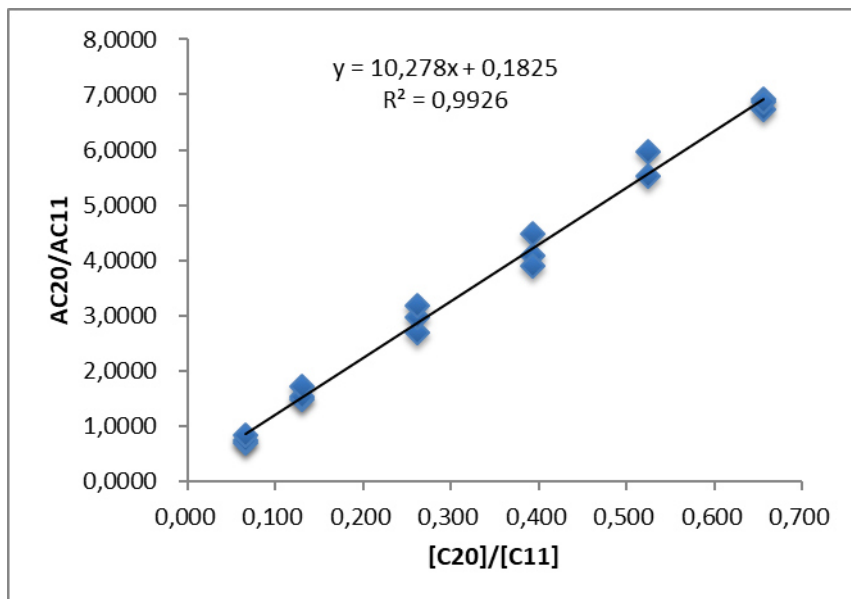


Figura A IV - Reta de calibração para o C20.

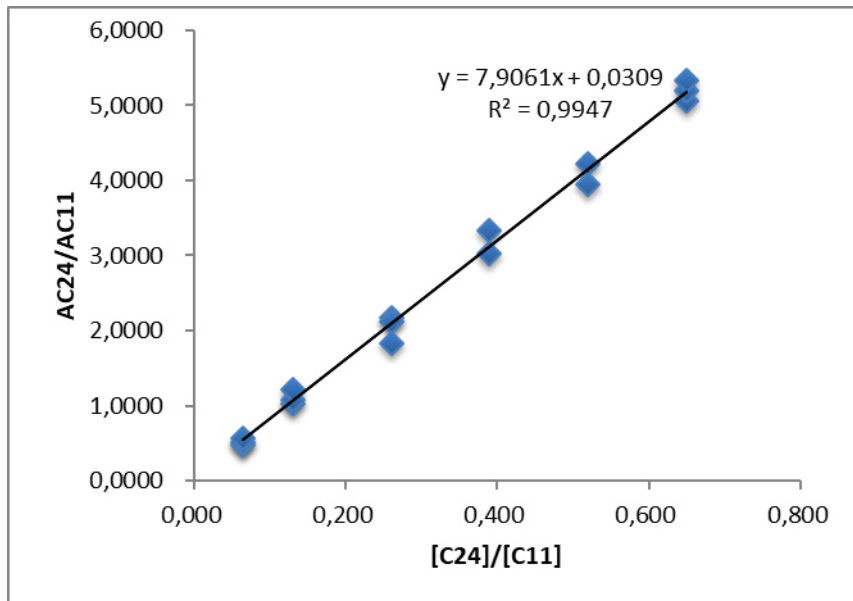


Figura A V - Reta de calibração para o C24.

## ANEXO II: Curvas de crescimento de *A. borkumensis* SK2 e *R. opacus* PD630

Dados gentilmente cedidos pelo investigador Valdo Ricardo Martins.

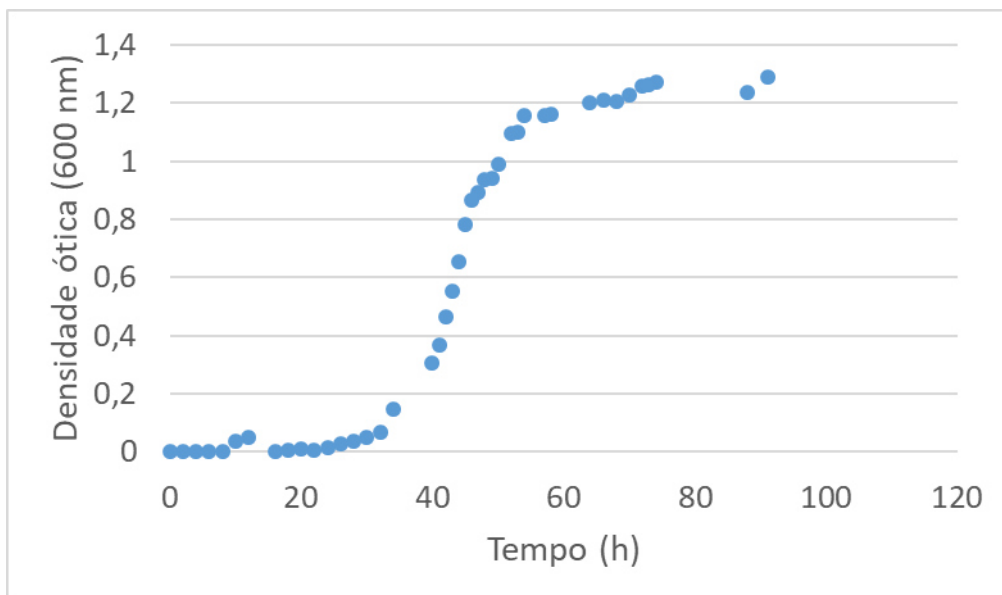


Figura A VI - Curva de crescimento de *A. borkumensis* SK2 em meio ONR7a e fonte de carbono piruvato de sódio (10 g/L).

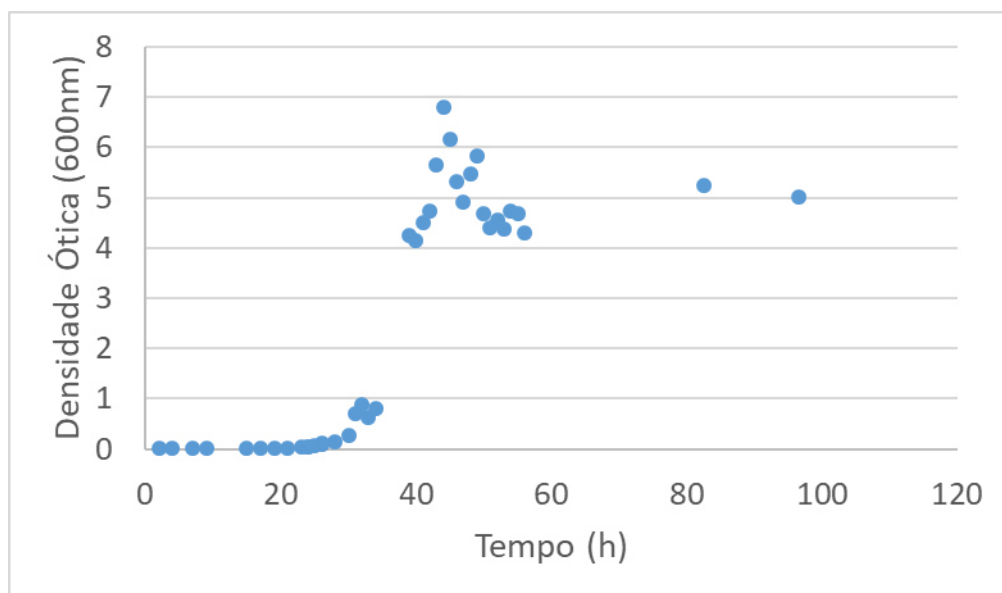


Figura A VII - Curva de crescimento de *R. opacus* PD630 em meio MS e fonte de carbono glucose (40 g/L).