

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo deste
trabalho será disponibilizado
somente a partir de
06/03/2019.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL UTILIZANDO
BIOSSURFACTANTES E *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL**

ELIS MARINA TURINI CLARO

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada)

Setembro - 2017

**BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL UTILIZANDO
BIOSSURFACTANTES E *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL**

ELIS MARINA TURINI CLARO

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Otenio

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Rio Claro – SP
Setembro - 2017

620.1122 Claro, Elis Marina Turini

C613b Biodegradação de gasolina e óleo diesel utilizando
biossurfactantes e *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL /
Elis Marina Turini Claro. - Rio Claro, 2017
166 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Ederio Dino Bidoia

Coorientador: Marcelo Henrique Otenio

1. Biodegradação. 2. Biodegradação de hidrocarbonetos.
3. Hidrocarbonetos. 4. BTE(o-)X. 5. Biossurfactante. 6.
Ecotoxicidade. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL UTILIZANDO BIOSURFACTANTES E Pseudomonas putida com plasmídeo TOL

AUTORA: ELIS MARINA TURINI CLARO

ORIENTADOR: EDERIO DINO BIDOIA

COORIENTADOR: MARCELO HENRIQUE OTENIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EDERIO DINO BIDOIA
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Prof.ª. MARCIA NITSCHKE
Departamento de Físico-Química / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. ADRIANO PINTO MARIANO
Departamento de Desenvolvimento de Processos e Produtos / UNICAMP

Prof.ª. Dra. ROBERTA BARROS LOVAGLIO
Universidade Federal de São Carlos / Universidade Federal de São Carlos

Prof.ª. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 06 de setembro de 2017

Dedico aos meus pais, Wilson e Silvia
e aos meus irmãos Caio e João Guilherme.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, luz e sabedoria proporcionadas na realização do trabalho e na estruturação pessoal que me capacitou para percorrer esta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia, cuja orientação foi essencial na minha formação profissional. Todo seu incentivo, sabedoria e apoio desde minha graduação, foram fundamentais para o meu caminho acadêmico e pessoal.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Henrique Otenio, que me acompanha desde a graduação, contribuindo para o crescimento daquela estagiária do SAAE. Obrigada pela oportunidade de vislumbrar novas experiências e por todo apoio, confiança e incentivo para minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada e ao Instituto de Biociências da UNESP, campus Rio Claro, por me conceder esta oportunidade.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geologia do Petróleo e Ciências Ambientais Aplicadas ao Setor de Petróleo e Gás e de Biocombustíveis (PRH-05) pela bolsa concedida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia. Em especial aos técnicos de laboratório: Adriano, que tanto me ensinou com os equipamentos e dúvidas, Beto, Carmen e Fátima, por toda ajuda com os empréstimos de materiais. Também, ao Zito e ao Marcio pelo empréstimo de materiais.

À Profa. Dra. Pricila Veiga dos Santos e ao técnico João, do Laboratório de Tecnologia de produtos de origem animal, na Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu pelas análises para caracterização do soro de ricota.

Ao Prof. Dr Jonas Contiero pela permissão em utilizar o Laboratório de Microbiologia Industrial e especialmente ao Vinicius Luiz da Silva pelo auxílio na produção e caracterização dos biossurfactantes.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales pela parceria e permissão em utilizar o Laboratório de Mutagênese e em especial a doutoranda Nádia Corroqué por todo ensinamento e pela paciência.

A todos os amigos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas em Meio Ambiente (Ana Paula Juntiniano, Carolina Rosai, Érica Almeida, Gabriela M. Quiterio, Guilherme Dilarri, Jaqueline M. Cruz, José Rubens Moraes Júnior, Paulo Renato M. Lopes, Renato N. Montagnolli e a agregada Lorena T. Lacerda), pela rotina de trabalho compartilhada,

companheirismo, festas e eventos Lab Multi. Faço um agradecimento especial a Jaqueline e ao Renato por toda ajuda, paciência, incentivo e ensinamentos compartilhados. Vocês foram fundamentais!

Ao meu amigo Jefferson Eduardo Silveira, que mesmo longe, sempre se encontra presente. Obrigada por todos os ensinamentos compartilhados desde o mestrado e por sempre se dispor a me ajudar.

À minha querida amiga Juliana Montesino, pela cumplicidade, inúmeras risadas e pela atenção que sempre me dedicou. Você me faz muita falta!

Aos meus pais, Wilson Turini e Silvia Turini, por serem meus pilares e sempre me darem incentivo, apoio e conselhos em minhas decisões. Se hoje caminho ativa e realizo grandes feitos, esses são seus legados. Aos meus irmãos Caio e João Guilherme.

Ao meu namorado Fábio Girardi Filho, pelo incentivo, companheirismo e carinho. Tenho ciência que meu débito com você pelo ouvido amigo é enorme!

Agradeço a todos que tornaram possível a realização dessa tese, que não se trata apenas de um esforço individual. Todo o trabalho foi construído com significativas contribuições em diferentes esferas por pessoas que surgiram pelo caminho e deixaram seu nome registrado na minha história. A gratidão, os ensinamentos e os momentos estarão sempre presentes.

“Nunca é tarde demais para ser aquilo que sempre se desejou ser”
(Adelaide Anne Procter)

Resumo

Grande atenção vem sendo dada a contaminação por hidrocarbonetos resultante das atividades da indústria petroquímica. Dentre as tecnologias utilizadas na remediação e tratamento de áreas impactadas, a biodegradação vem despontando como um dos principais campos de pesquisa em microbiologia, se apresentando como uma técnica bastante eficaz. Dessa forma, o presente trabalho visou estudar a biodegradação de gasolina, óleo diesel e dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno (BTE(o-)X) por *Pseudomonas putida* CCM1 852 com plasmídeo TOL pWW0, com aplicação de biossurfactante, para aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir do soro de ricota, como fonte de carbono e com avaliação da toxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*) e genotoxicidade com sementes de cebola (*Allium cepa*), antes e após a biodegradação. Foi observado um potencial de produção de biossurfactantes do tipo ramnolipídios em soro de ricota como substrato alternativo para produção, com rendimento de 0,45 g L⁻¹. O monitoramento da biodegradação dos hidrocarbonetos, foi realizado por ensaios colorimétricos utilizando os indicadores redox DCPIP e TTC e a quantificação foi realizada por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/MS). Os testes colorimétricos foram eficientes e bastante eficaz para verificar a atividade bacteriana, indicando o potencial do micro-organismo em degradar esses compostos, fato este que comprovou-se pela análise em GC/MS. O plasmídeo TOL pWW0 encontrado naturalmente na linhagem bacteriana *P. putida* CCM1 852, confere às células a capacidade de degradarem hidrocarbonetos presentes na gasolina mais facilmente em relação ao óleo diesel e que a *P. putida* CCM1 852 não foi capaz de metabolizar o benzeno, nem individualmente, nem em misturas, indicando a via de degradação da linhagem sendo a via TOL. Em mistura BTE(o-)X, a presença do benzeno ocasionou efeito negativo na degradação do tolueno que apresentou taxa de degradação 33,5% menor do que quando individualmente, enquanto que em mistura, o etilbenzeno aumentou 50,3%. Em misturas ternárias TE(o-)X, os compostos apresentaram maior taxa de degradação em relação à presença do benzeno, com aumento de 14,2% para tolueno, seguido de 4,8% e 2,5% para o (o-)xileno e etilbenzeno, respectivamente. A sequência de degradação encontrada foi tolueno, o-xileno e etilbenzeno. O uso do biossurfactante no processo, não aumentou a taxa de biodegradação. Contudo, ao realizar testes de toxicidade (com sementes de alface) foi observado que na maioria dos ensaios foram produzidos compostos intermediários da biodegradação, mais tóxicos aos organismos-teste do que a substância original. Os testes com *A. cepa* permitiram verificar

potencial genotóxico da gasolina e do óleo diesel biodegradados após 10 dias, por alterações no índice mitótico e mutagênico dos compostos.

Palavras-chave: Biodegradação, Hidrocarbonetos, BTE(o-)X, Biossurfactante, Ecotoxicidade

Abstract

Great attention has been given to the contamination by hydrocarbons from the petrochemical industry. Among the technologies used in the remediation and treatment of impacted areas, biodegradation has emerged as a very effective technique, which is now among the main research fields in microbiology. Thus, this thesis aimed to study the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene (BTE(o-)X) by *Pseudomonas putida* CCMI 852 with the TOL pWW0 plasmid, as well as biosurfactant application to increase the bioavailability of hydrophobic compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI using ricotta serum as the source of carbon. The evaluation of toxicity with lettuce seeds (*Lactuca sativa*) and genotoxicity with onion seeds (*Allium cepa*), before and after biodegradation, was also considered. The potential production of rhamnolipidic biosurfactants in ricotta whey as an alternative substrate yielded 0.45 g L⁻¹. Monitoring the biodegradation of hydrocarbons was performed by colorimetric assays using the both DCPIP and TTC redox indicators. Quantification was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). The colorimetric tests were efficient and quite effective to verify the bacterial activity, indicating the potential of the microorganism to degrade these compounds. This fact was evidenced by GC / MS analysis. The plasmid TOL pWW0 found naturally in the bacterial line *P. putida* CCMI 852, gives the cells the ability to degrade hydrocarbons present in gasoline more easily relative to diesel oil. *P. putida* CCMI 852 was not able to metabolize benzene, nor individually, or in mixtures, indicating that the route of degradation of this specific strain is the TOL route. In the BTE(o-)X mixture, benzene caused a negative effect on the degradation of toluene, which had a degradation rate of 33.5% lower than its individual presence. While in the mixture, ethylbenzene increased its degradation rate by 50.3%. In ternary mixtures TE(o-)X, the compounds had a higher rate of degradation in relation to the presence of benzene, with a 14.2% increase in toluene, followed by 4.8% and 2.5% for xylene and ethylbenzene, respectively. The degradation sequence found was toluene, o-xylene and ethylbenzene. The use of the biosurfactant in the process did not increase the rate of biodegradation. However, when performing toxicity tests (with lettuce seeds) it was observed that in the majority of the assays, intermediate compounds of the biodegradation were produced, which were more toxic to the test organisms in the original substance. The tests with onion seeds verified the genotoxic potential of biodegraded gasoline and diesel oil after 10 days, due to changes in the mitotic and mutagenic index of such compounds.

Keywords: Biodegradation, Hydrocarbons, BTEX, Biosurfactant, Ecotoxicity

Lista de abreviaturas

AC – Aberrações cromossômicas

ANP – Agência Nacional do Petróleo

BH – Bushnell-Haas

BH1: soro de ricota com adição direta de sais do meio Bushnell-Haas

BH2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% de meio mineral Bushnell-Haas BH3: 50% de soro de ricota suplementado de 50% de meio mineral Bushnell-Haas

Bs - Biossurfactante

BTE(o-)X – Benzeno, tolueno, etilbenzeno e orto-xileno

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CMC – Concentração Micelar Crítica

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DCPIP - 2,6-diclorofenol indofenol

DQO – Demanda Química de Oxigênio

E₂₄ - Índice de emulsificação

%G - Taxa de germinação das sementes

Gas – Gasolina

GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IG - Índice de germinação

In – Inóculo

IM – Índice mitótico

MMM – Meio Mineral Mínimo

MMS – Metilmetano sulfonato

MN – Micronúcleos

%R – Alongamento da raiz

RL – Ramnolipídio

SR - Sais de Robert

SR1: soro de ricota com adição de sais do meio mineral sais de Robert

SR2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert

SR3: 50% de soro de ricota suplementado de 50% do meio mineral sais de Robert
TPF - 1,3,5-trifenilformazan

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição das fontes de contaminação, por atividade, no Estado de São Paulo, em dezembro de 2016.....	12
Figura 2 – Vias de degradação aeróbia do tolueno (pela ação das enzimas tolueno 2- e 3-monooxigenases e tolueno dioxigenase)	21
Figura 3 – Estrutura dos biossurfactantes e formação de micelas	23
Figura 4 – Estrutura dos quatro principais homólogos dos ramnolipídios	26
Figura 5 – Fluxograma de obtenção do soro de ricota	28
Figura 6 – Esquema experimental do processo de produção de biossurfactantes por <i>P. aeruginosa</i> LBI em soro de ricota como fonte de carbono	34
Figura 7 – Erlenmeyers contendo 150 mL do meio de produção (100% soro de ricota)	34
Figura 8 – Curva padrão de biomassa x absorvância (600 nm).....	35
Figura 9 – Curva padrão da concentração de ramnose x absorvância (400 – 430 nm).....	36
Figura 10 – a) Extração de ramnolipídios com solvente acetato de etila e separação das fases orgânica (superior) e aquosa (inferior); b) Concentração da fase orgânica do caldo livre de células no rotavapor a 40 °C	42
Figura 11 – Efeito do soro de ricota como meio de cultivo sobre o crescimento celular, pH e produção de ramnose	45
Figura 12 – Meio de cultivo evidenciando a produção de pioverdina, um pigmento verde fluorescente, característico da <i>P. aeruginosa</i> em diferentes tempos de fermentação.....	47
Figura 13 – Produção de biossurfactantes em diferentes meios de cultivo, em termos de ramnose por <i>P. aeruginosa</i> LBI, em diferentes tempos e concentrações de soro de ricota	48
Figura 14 – Valores da tensão superficial (mN m^{-1}) do caldo livre de células, nos diferentes tempos de fermentação. Onde: BH2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% de meio mineral Bushnell-Haas; SR2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert.....	50
Figura 15 – Quantificação de espécies homólogas e do total de ramnolipídios (R total) produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LBI, utilizando meio SR2 (75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert).....	52
Figura 16 – Cromatografia de camada delgada do biossurfactante produzido por <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio SR2 (75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert), extraído com acetato de etila em rotavapor após 72 h de fermentação	53

Figura 17 - Obtenção do biossurfactante produzido por <i>P. aeruginosa</i> LBI, após extração em rotavapor com solvente acetato de etila. Onde: a) Biossurfactante concentrado logo após extração; b) Biossurfactante bruto extraído após ser seco em estufa	54
Figura 18 – Determinação da concentração micelar crítica em função da tensão superficial (mN m^{-1}), utilizando-se diferentes diluições de uma solução concentrada do biossurfactante extraído	56
Figura 19 – Teste para medida do índice de emulsificação, antes da emulsificação e após emulsificação. Na sequência: Gasolina (1) e óleo diesel (2), Biossurfactante (a) e Tween80 (b)	57
Figura 20 – Mecanismo da oxirredução do 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio a 1,3,5-trifenilformazan pela enzima desidrogenase	60
Figura 21 – Reação de oxirredução do 2,6-diclorofenol indofenol como aceptor de elétrons	62
Figura 22 – Ensaio do potencial de biodegradação de hidrocarbonetos por <i>P. putida</i> CCMI 852 utilizando TTC, antes da leitura em espectrofotômetro.....	67
Figura 23 – Reta padrão do 1,3,5-trifenilformazan e seu espectro de absorção em diferentes concentrações.....	68
Figura 24 – Leitura dos ensaios colorimétricos em espectrofotômetro Nanocolor® UV/Vis-Macherey-Nagel a 600 nm	71
Figura 25 – Reta padrão do indicador redox DCPIP e seu espectro de absorção UV-Vis em diferentes concentrações.....	72
Figura 26 – Ensaio para aclimação da <i>P. putida</i> CCMI 852, onde: a) gasolina e b) óleo diesel como fontes de carbono, após 48 h de incubação.....	74
Figura 27 - Gráfico dos valores preditos (teóricos) pelos observados, da atividade da enzima desidrogenase utilizando o indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).....	75
Figura 28 - Superfície de resposta sobre o efeito do inóculo (A), temperatura (B) e agitação (C) na atividade da enzima desidrogenase, utilizando o indicador redox TTC.....	78
Figura 29 - Medida qualitativa da atividade da enzima desidrogenase pelo indicador redox TTC em diferentes tempos de tratamento	79
Figura 30 - Atividade da enzima desidrogenase pelo indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) em diferentes tempos de biodegradação e diferentes compostos	80
Figura 31 – Efeito de diferentes concentrações de tolueno no crescimento da linhagem <i>P. putida</i> CCMI 852.....	81

Figura 32 – Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP _{ox} em função do tempo. Onde: a) amostras controle e inóculos com gasolina; b) Inóculos com óleo diesel; c) Inóculos com BTE(o-)X em mistura; d) Inóculos com TE(o-)X individuais	83
Figura 33 - Curva de decaimento de pseudo-primeira ordem nas condições estabelecidas, ao longo do tempo de degradação	86
Figura 34 - Constantes de velocidade obtidas pela cinética de pseudo-primeira ordem para biodegradação de diferentes hidrocarbonetos.....	87
Figura 35 - Frascos de 100 mL utilizados nos experimentos de biodegradação de hidrocarbonetos por <i>P. putida</i> CCMI 852	94
Figura 36 – Curva de calibração em GC/MS para os compostos BTE(o-)X	96
Figura 37 – Cromatograma de BTE(o-)X, obtido por GC/MS. Os sinais de resposta indicam diferentes substâncias com base nos diferentes tempos de retenção, sendo respectivamente, benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno	97
Figura 38 – Curvas de degradação do benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno, em misturas e individuais. Onde: In.: Inóculo de <i>P. putida</i> CCMI 852; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota	98
Figura 39 - Cromatograma de mistura de compostos BTE(o-)X, extraídas por <i>headspace</i> para análise em GC/MS, em 48 h de biodegradação utilizando <i>P. putida</i> CCMI 852	101
Figura 40 - Cromatograma da gasolina, extraída por <i>headspace</i> para análise em GC/MS após 48 h de biodegradação. Onde: In.: Inóculo; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota	103
Figura 41 - Cromatograma do óleo diesel, extraído por <i>headspace</i> para análise em GC/MS após 29 dias de biodegradação. Onde: In.: Inóculo; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota	103
Figura 42 - Disposição das sementes de alface (<i>L. sativa</i>) utilizadas como organismos-teste nos bioensaios de toxicidade	102
Figura 43 – (a) Taxa de germinação das sementes de alface, em relação ao controle negativo, e (b) índice de germinação, antes e após a biodegradação da gasolina e óleo diesel, por <i>P. putida</i> CCMI 852	115

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas e características dos compostos BTEX	8
Tabela 2 – Potencial de degradação de compostos BTEX por diferentes micro-organismos	15
Tabela 3 – Produção de biossurfactantes por diferentes micro-organismos.....	25
Tabela 4 – Composição de sais do meio mineral Bushnell-Haas	37
Tabela 5 – Composição do meio mineral sais de Robert.....	38
Tabela 6 – Condições de cultivo do biossurfactante em diferentes meios de fermentação	39
Tabela 7 – Características físico-químicas do soro de ricota utilizado como fonte de carbono para produção de biossurfactantes	44
Tabela 8 – Rendimento do processo de produção de biossurfactante a partir de soro de ricota	54
Tabela 9 – Índice de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>P. aeruginosa</i> LBI a partir de soro de ricota e do Tween80, com diferentes hidrocarbonetos após 24 h	57
Tabela 10 – Propriedades do indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio	60
Tabela 11 – Propriedades do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol	61
Tabela 12 – Variáveis independentes e seus respectivos níveis empregados no planejamento experimental	65
Tabela 13 – Composição de sais no preparo de meio mineral salino acrescido de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	66
Tabela 14 – Composição dos ensaios acrescidos de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	67
Tabela 15 – Composição dos ensaios colorimétricos utilizando indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)	70
Tabela 16 - Análise de variância do modelo ajustado para atividade enzimática utilizando metodologia de superfície de resposta	76
Tabela 17 - Porcentagem de descoloração (D%) em relação aos controles, constantes de velocidade (k) e tempo de meia vida ($T_{1/2}$).....	85
Tabela 18 - Composição dos ensaios de biodegradação utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).	93
Tabela 19 – Condições utilizadas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, para biodegradação de hidrocarbonetos.	95

Tabela 20 – Eficiência de biodegradação por <i>P. putida</i> CCMI 852 dos compostos BTE(o-)X em diferentes condições, em 48 h de tratamento.....	99
Tabela 21 - Frequência de alterações celulares e cromossômicas observadas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , antes e após a biodegradação utilizando <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852.....	116

Sumário

1 Introdução	1
2 Objetivos.....	4
2.1 Objetivos Gerais	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 Revisão de Literatura	6
3.1 Óleo Diesel	6
3.2 Gasolina.....	7
3.3 Compostos BTEX.....	7
3.4 Impactos ambientais	10
3.5 Processo biotecnológico e a biodegradação de hidrocarbonetos	12
3.6 Biossurfactantes.....	22
3.7 Soro de ricota.....	27
4 Capítulo 1 Viabilidade de aproveitamento do soro de ricota como meio de cultivo para produção de biossurfactantes por <i>P. aeruginosa</i> LBI	30
4.1 Introdução	30
4.2 Material e Métodos	32
4.2.1 Caracterização físico-química do soro de ricota como meio de produção	32
4.2.2 Micro-organismo	33
4.2.3 Preparo do inóculo.....	33
4.2.5 Ensaios com meios de cultivo salino adicionado de soro de ricota.....	36
4.2.6 Condições de cultivo	38
4.2.7 Processamento das amostras.....	39
4.2.8 Avaliação da produção de ramnolipídios	39
4.2.9 Recuperação dos ramnolipídios.....	41
4.2.10 Caracterização das propriedades tensoativas.....	42
4.3 Resultados e discussão.....	44
4.3.1 Caracterização do soro de ricota.....	44
4.3.2 Ensaio preliminar da produção de biossurfactante	45
4.3.4 Meio mineral salino adicionado ao soro de ricota.....	47
4.3.7 Rendimento na produção bruta de ramnolipídios.....	53
4.3.8 Caracterização do biossurfactante	55

5 Capítulo 2 - Avaliação do potencial de biodegradação de hidrocarbonetos por <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852	59
5.1 Introdução	59
5.1.1 Indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio	59
5.1.2 Indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol	61
5.2 Material e Métodos	63
5.2.1 Preparo do inóculo	63
5.2.2 Adaptação bacteriana	63
5.2.3 Potencial de biodegradação utilizando o indicador redox TTC	64
5.2.4 Determinação da concentração de hidrocarbonetos	68
5.2.5 Potencial de biodegradação utilizando o indicador redox DCPIP	69
5.3 Resultados e Discussão	74
5.3.1 Verificação da adaptação bacteriana	74
5.3.2 Otimização dos parâmetros para a biodegradação	75
5.3.3 Biodegradação utilizando indicador redox TTC	79
5.3.4 Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de hidrocarbonetos	81
5.3.5 Biodegradação utilizando indicador redox DCPIP	82
6 Capítulo 3 Acompanhamento da biodegradação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	89
6.1 Introdução	89
6.2 Material e métodos	92
6.2.1 Montagem dos ensaios	92
6.2.2 Determinação por <i>headspace</i> estático	94
6.2.3 Análises cromatográficas	94
6.2.4 Construção de curvas analíticas para a quantificação dos BTE(o-)X	95
6.3 Resultados e Discussão	97
7 Capítulo 4 - Toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade da gasolina e óleo diesel, antes e após biodegradação por <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852	106
7.1 Introdução	106
7.1.1 Ensaio de toxicidade utilizando sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>)	106
7.1.2 Bioensaios com sementes de cebola (<i>Allium cepa</i>)	107
7.2 Material e métodos	110
7.2.1 Ensaios de toxicidade	110
7.2.2 Bioensaios com células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	111

7.3 Resultados e discussão.....	114
7.3.1 Bioensaios de toxicidade com sementes de alface (<i>L. sativa</i>).....	114
8 Considerações Finais	119
Referências	121

1 Introdução

A contaminação do ambiente por compostos orgânicos é uma das principais preocupações enfrentadas pela sociedade no século XXI (COLEDAM et al., 2017). Grande atenção vem sendo dada a contaminação por hidrocarbonetos resultante das atividades da indústria petroquímica, sendo considerado um dos principais problemas ambientais (NOEL et al., 2016; DONG et al., 2017; MNIF et al., 2017). Em março de 2017, a produção de petróleo no Brasil totalizou 2,550 milhões de barris por dia, o que representou um crescimento de 12,6% em relação ao mesmo mês em 2016, de acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2017a).

Episódios de acidentes envolvendo hidrocarbonetos de petróleo são relatados com bastante frequência, principalmente em função da exploração, refino, transporte e armazenamento, resultando em uma degradação ambiental considerável, principalmente devido à capacidade limitada dos ecossistemas absorverem esses impactos (FARHADIAN et al., 2008; CESARINO et al., 2013; GUARINO et al., 2017; TURNER e RENEGAR, 2017).

Alguns derivados de petróleo, como o óleo diesel e a gasolina, são pouco solúveis em água e alguns compostos orgânicos presentes na composição desses combustíveis exigem maior atenção, quanto aos seus possíveis danos ambientais. Os hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, conhecidos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e três isômeros de xileno, orto-, meta- e para-xileno), são listados como poluentes prioritários pela *United States Environmental Protection Agency* - USEPA (QU et al., 2015; LUEDERS, 2017, MÊÇABIH, 2017), além de estarem incluídos na Lista de Poluentes Atmosféricos Perigosos (*Hazardous Air Pollutants List*) como uma das 275 substâncias identificadas como potencial ameaça à saúde humana (RAHUL e BALOMAJUMDER, 2013; AKMIRZA et al., 2017).

Tais compostos são os constituintes mais solúveis e abundantes na gasolina, o que lhes confere alta toxicidade, mobilidade e consequente biodisponibilidade (MITRA e ROY, 2011), podendo migrar do solo para a água subterrânea e alcançar locais de abastecimento de água mesmo longe de sua origem de contaminação. Os BTEX possuem como característica principal a presença do anel benzênico nas suas estruturas moleculares e apresentam potencial de poluição elevado, devido a suas propriedades, neurotóxicas, carcinogênicas e teratogênicas, cientificamente comprovadas, representando um sério risco ao meio ambiente e ao ser humano (ATSDR, 1999; FUCHS et al., 2011; ALMEDA et al., 2013).

Dentre as tecnologias utilizadas na remediação e tratamento de áreas impactadas por combustíveis derivados de petróleo, a biodegradação, por meio da atividade de micro-organismos, vem despontando como uma técnica bastante eficaz, podendo ser utilizada como complemento às tecnologias convencionais, por serem relativamente de baixo custo e não invasiva (BENTO et al., 2005; OTENIO et al., 2005; DAS e CHANDRAN, 2011; EL-NAAS et al., 2014).

Porém, a eficiência da biodegradação pode ser reduzida em virtude de os compostos hidrofóbicos serem imiscíveis em solução aquosa e por estarem adsorvidos às partículas de sedimento, limitando sua biodisponibilidade à microbiota. Dessa forma, a fim de promover maior acessibilidade destas moléculas ao metabolismo microbiano e o desenvolvimento da microbiota endêmica, os biossurfactantes tem se mostrado uma ferramenta em potencial para este fim (MUKHERJEE et al., 2006; ARAUJO et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; GONG et al., 2015).

Os biossurfactantes agem como tensoativos e são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos, dentre eles bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, que sintetizam biossurfactantes do tipo ramnolipídios. Esses biotensoativos vêm recebendo considerável interesse nos últimos anos, devido a sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações (LOVAGLIO et al., 2015; DOBLER et al., 2016).

A produção dos biossurfactantes em escala industrial não tem recebido tanta atenção devido aos elevados custos de processamento, sendo a escolha de substratos de baixo custo importante para a economia global do processo (NITSCHKE e PASTORE, 2002; RUFINO et al., 2014). Esses compostos podem ser produzidos a partir de substratos renováveis, como soro de leite, soro de ricota, manipueira, entre outros, que podem viabilizar economicamente o processo (BENINCASA et al., 2002; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008; MARIANO et al., 2008; LOVAGLIO et al., 2014; GUDIÑA et al., 2015a).

A ricota é uma alternativa de aproveitamento do soro resultante da fabricação de queijo, sendo utilizado para coagulação e precipitação das proteínas não coaguláveis pelo coalho, gerando como subproduto da fabricação, o denominado soro de ricota, um fluido opaco, verde-amarelado. Esse soro de ricota possui alto teor de ácido láctico, cálcio e fósforo e, pelo seu forte sabor ácido, é pouco utilizado, tendo apenas usos como coagulante na fabricação do queijo branco, ração animal e para suplementar sucos de frutas ácidas, mas pode deixar um gosto residual salgado, o que o torna menos aceito pelos consumidores (MIZUBUTI, 1994; CARVALHO et al., 2013; MAGALHÃES-GUEDES et al., 2013).

Muitas indústrias ainda consideram o soro de ricota como um efluente, o qual, quando indevidamente tratado, gera um sério problema ambiental devido à sua elevada carga orgânica. O governo tem incentivado o desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento do soro de uma forma que seja viável, tanto do ponto de vista econômico como tecnológico (ALVES et al., 2014).

8 Considerações Finais

- O potencial do soro como substrato alternativo para produção de biossurfactante por micro-organismos foi evidente, contudo é importante considerar que as diferenças de produção em relação a outros autores, bem como as propriedades do biossurfactante produzido podem ter sido afetadas pelas condições de cultivo utilizadas.
- *Pseudomonas aeruginosa* LBI também foi capaz de sintetizar ramnolipídios utilizando soro de ricota como fonte de carbono, embora em pequena quantidade quando a mesma é comparada à quantidade gerada utilizando substratos hidrofóbicos.
- O rendimento da produção do biossurfactante foi de 0,45 g L⁻¹ a partir do soro de ricota, sugerindo-que esse substrato possa ser utilizado, desde que busque maior adaptação dos isolados ou de novos micro-organismos a estes resíduos e/ou complementação de nutrientes.
- A adição do biossurfactante preparado nessas condições, representou pouco aumento no metabolismo microbiano para a biodegradação;
- O teste utilizando o indicador redox TTC foi eficiente para verificar a degradação de óleo diesel e gasolina, porém, a técnica utilizando o indicador redox DCPIP se mostrou mais sensível e demonstrando o potencial da linhagem *P. putida* CCMI 852 em degradar os hidrocarbonetos, se mostrando uma boa técnica para identificação de micro-organismos degradadores de compostos orgânicos.
- Pelas análises de GC/MS comprovou-se a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos TE(o-)X pela *P. putida* CMMI 852 com plamídio TOL pWW0.

- A *P. putida* não foi capaz de metabolizar o benzeno, nem individualmente, nem em misturas, indicando a via de degradação da linhagem sendo via TOL.
- Em presença do benzeno, ocorreu um efeito negativo na degradação do tolueno que apresentou taxa de degradação 33,5% menor do que quando degradado individualmente, enquanto que em mistura, o etilbenzeno aumentou em 50,3% a sua taxa de degradação.
- Em misturas ternárias, os compostos TE(o-)X apresentaram maior taxa de degradação, em relação a mistura BTE(o-)X, apresentando aumento de 14,2% para tolueno, seguido de 4,8% e 2,5% para (o-)xileno e etilbenzeno, respectivamente. Assim, a bactéria apresentou a seguinte sequência de degradação: tolueno, o-xileno e etilbenzeno.
- A linhagem *P. putida* CCM1 852 também se mostrou capaz de metabolizar compostos presentes na gasolina e no óleo diesel, ainda que mais lentamente, se mostrando eficiente em utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de energia.
- Esse estudo também evidenciou a toxicidade para gasolina e óleo diesel frente a sementes de alface (*L. sativa*), assim como o óleo diesel apresentou genotoxicidade e mutagenicidade. A gasolina não apresentou genotoxicidade, que pode ser devido ao pequeno desenvolvimento das células meristemáticas em presença dos compostos, todavia, esse fato permite concluir que o composto teve efeito sobre o material genético de células em divisão.
- O uso da *P. putida* CMM1 852 como micro-organismo degradador de ambientes impactados por hidrocarbonetos, possui um potencial promissor, sendo capazes de degradar gasolina, óleo diesel e seus compostos aromáticos TE(o-)X.

Referências

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1323–1336, 2010.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, p. 143–151, 2008.

AHMED, Z.; SONG, J. Removal of gaseous toluene using immobilized *Candida tropicalis* in a fluidized bed bioreactor. **Biotechnology**, v. 1, p. 111-116, 2011.

AISLABIE, J.; SAUL, D. J.; FOGHT, J. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**, v. 10, p. 171-179, 2006.

AKMIRZA, I.; PASCUAL, C.; CARVAJAL, A.; PÉREZ, R.; MUÑOZ, R.; LEBRERO, R. Anoxic biodegradation on BTEX in a biotrickling filter. **Science of the Total Environment**, v. 1, p. 457-465, 2017.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALEF, K. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995, p. 193-270.

ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K., NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**, Academic Press, London, 1996, p. 228-231.

ALMEDA, R.; WAMBAUGH, Z.; CHAI, C.; WANG, Z.; LIU, Z.; BUSKEY, E. J. Effects of crude oil exposure on bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and survival of adult and larval stages of gelatinous zooplankton. **Plos One**, v. 8, p. 1-15, 2013.

ALRUMMAN, S. A.; STANDING, D. B.; PATON, G. I. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. **Journal of King Saud University – Science**, v. 27, p. 31-41, 2015.

- ALSOHIM, A. S.; TAYLOR, T. B.; BARRETT, G. A.; GALLIE, J.; ZHANG, X.; JUNQUEIRA, A. E. A.; JOHNSON, L. J.; RAINEY, P. B.; JACKSON, R. W. The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 2267-2281, 2014.
- ALVAREZ, P. J. J.; HUNT, C. S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 44, p. 83-104, 2002.
- ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O.; RODRIGUES JR, P. H.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. Soro de leite: Tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 212-226, 2014.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo. Investigação do incidente de vazamento de petróleo no Campo de Frade - Relatório final. 2012. Disponível em: <www.anp.gov.br/SITE/acao/download/?id=61108>. Acesso em: 09 fev. 2017.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo. Etanol anidro na gasolina sobe para 27% a partir de 16/03/16. 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=80025&m=gasolina&t1=&t2=gasolina&t3=&t4=&ar=0&ps=1&1460034118766>>. Acesso em: 27 jul. 2016.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo. Produção de petróleo aumenta 12,6% na comparação com março de 2016. 2017a. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/noticias/anp-e-p/3723-producao-de-petroleo-aumenta-12-6-na-comparacao-com-marco-de-2016>>. Acesso em: 18 jun. 2017.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo. Gasolina. 2017b. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/petroleo-derivados/155-combustiveis/1855-gasolina>>. Acesso em: 18 jun. 2017.
- APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23-29, 2012.
- ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants: anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. **Química Nova**, v. 36, p. 848-858, 2013.
- ASIA, L.; MAZOUZ, S.; GUILIANO, M.; DOUMENQ, P.; MILLE, G. Occurrence and distribution of hydrocarbons in surface sediments from Marseille Bay (France). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 443-451, 2009.
- ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 52, p. 149, 156, 1991.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for fuel oils. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1995. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp75.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2017.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease registry. Public Health Statement Total petroleum hydrocarbons. 1999. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp123-c1-b.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2016.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX). U.S. Department of Health and Human Services, Public

- Health Service. 2004. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/IP-btex/ip05.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2016.
- BAI, L.; McCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 71-79, 2016.
- BALD, J. A.; VINCENZI, A.; GENNARI, A.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no Vale do Taquari, RS. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 4, p. 90-99, 2014.
- BALSEIRO-ROMERO, M.; KIDD, P. S.; MONTERROSO, C. Leachability of volatile fuel compounds from contaminated soils and the effect of plant exudates: A comparison of column and batch leaching tests. **Journal of Hazardous Materials**, v. 304, p. 481-489, 2016.
- BANASZEWSKA, A.; CRUIJSSEN, T. F.; CLAASSEN, G. D. H.; VORST, A. J. VAN DER. Effect and key factors of byproducts valorization: The case of dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1893-1908, 2014.
- BANAT, I. M.; SATPURE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-14, 2014.
- BANKS, M. K.; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 167, p. 211-219, 2005.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2002, 405 p.
- BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TOTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresourch Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1-8, 2004.
- BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. **Current Microbiology**, v. 54, p. 445-449, 2007.
- BENINCASA, M.; ACCORSINI, F. R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresourch Technology**, v. 99, p. 3843-3849, 2008.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, bioestimulation and bioaugmentation. **Bioresourch Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- BEUKER, J.; BARTH, T.; STEIER, A.; WITTGENS, A.; ROSENAU, F.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R. High titer heterologous rhamnolipid production. **AMB Express**, v. 6, p. 1-10, 2016.

- BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. **Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study**. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Méndez-Vilas, A. (Ed.), 2010, p. 1277-1288.
- BLACKBURN, T. M.; BROWN, V. K.; DOUBE, B. M. M.; GREENWOOD, J. J. D.; LAWTON, J. H.; STORK, N. E. The relationship between abundance and body size in natural animal assemblages. **Journal of Animal Ecology**, v. 62, p. 519 – 528, 1993.
- BOLDEN, A. L.; KWIATKOWSKI, C. F.; COLBORN, T. New look at BTEX: are ambient levels a problem? **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 5261–5276, 2015.
- BONILLA, N. B.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G.; GONZÁLEZ, R. R. Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 156–164, 2009.
- BOOTH, A. M.; SUTTON, P. A.; LEWIS, C. A.; LEWIS, A. C.; SCARLETT, A.; CHAU, W.; ROWLAND, S. J. Unresolved complex mixtures of aromatic hydrocarbons: thousands of overlooked persistent, bioaccumulative, and toxic contaminants in mussels. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 457-464, 2007.
- BOSSE, R.; WIRTH, M.; KONSTANZ, A.; BECKER, T.; WEISS, J.; GIBIS, M. Determination of volatile marker compounds in raw ham using headspace-trap gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 219, p. 249-259, 2017.
- BOWEN, S. E.; HANNIGAN, J. H. Development toxicity of prenatal exposure to toluene. **The AAPS Journal**, v. 8, p. 419-424, 2006.
- BRADDOCK, J. F.; CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, v. 3, p. 81-84, 1999.
- BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. 1998. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm>. Acesso em 27 out. 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Relatório sobre o impacto ambiental causado pelo derramamento de óleo na Baía de Guanabara. 2001. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/processos/67B2E6A7/artigo5.doc>. Acesso em: 25 jul. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. 2006. Disponível em: <<https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinke.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 16 jan. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de

vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria MS nº 2.914/2011. 2011a. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acesso em: 30 mai 2017.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005. 2011b. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/res43011.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

BURDOCK, T. J.; BROOKS, M. S.; GHALY, A. E. A Dehydrogenase activity test for monitoring the growth of *Streptomyces venezuelae* in a nutrient rich medium. **Bioprocessing & Biotechniques**, v. 1, p. 1-10, 2011.

BURLAGE, R. S.; HOOPER, S. W.; SAYLER, G. S. The TOL (pWW0) catabolic plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1323-1328, 1989.

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CAPELINI, T. L. **Produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes fontes de carbono e condições de cultivo**. 52 f. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, 52 f. 2009.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.

CARMONA, M.; ZAMARRO, M. T.; BLÁZQUEZ, B.; DURANTE-RODRÍGUEZ, G.; JUARÉZ, J. F.; VALDERRAMA, A.; BARRAGÁN, M. J. L.; GARCÍA, J. L.; DÍAZ, E. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, p. 71-133, 2009.

CAROTA, E.; CROGNALÉ, S.; D’ANNIBALE, A.; GALLO, A. M.; STAZI, S. R.; PETRUCCIOLI, M. A sustainable use of ricotta cheese whey for microbial biodiesel production. **Science of the Total Environment**, v. 584-585, p. 554-560, 2017.

CARREIRA, R. S.; RIBEIRO, P. V.; SILVA, C. E. M. Hidrocarbonetos e esteróis como indicadores de fontes e destino de matéria orgânica em sedimentos da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 32, p. 1805-1811, 2009.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

CASIDA, L.; KLEIN, D.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v. 98, p. 371-376, 1964.

CAVALCA L, DI GENNARO P, COLOMBO M, ANDREONI V, BERNASCONI S, RONCO I, BESTETTI G. Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. **Researcher Microbiology**, v. 151, p. 877-887, 2000.

CERESER, N. D.; ROSSI JR., O. D.; MARCHI, P. G. F.; SOUZA, V.; CARDOZO, M. V.; MARTINELLI, T. M. Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do Estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, p. 149-145, 2011.

- CESARINO, I.; CESARINO, V.; MORAES, F. C.; FERREIRA, T. C. R.; LANZA, M. R. V.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Electrochemical degradation of benzene in natural water using silver nanoparticle-decorated carbon nanotubes. **Materials Chemistry and Physics**, v. 141, p. 304-309, 2013.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. São Paulo, 2016, 14 p. Disponível em: <<http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2013/11/Texto-explicativo-1.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2017.
- CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 846-850, 1985.
- CHANDRASEKARAN, E. V.; BEMILLER, J. N. **Constituent analysis of glycoaminoglycans**. In: Methods in carbohydrate chemistry, v. III, Academic Press, New York, 1980, p. 89-96.
- CHAPRA, S. C. **Surface Water-Quality Modeling**. New York: Waveland Press, 2008. 844 p.
- CHEN, S-Y.; WEI, Y-H.; CHANG, J-S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhaminolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 76, p. 67-74, 2007.
- CHEN, Y. D.; BARKER, J. F.; GUI, L. A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: a microcosm study. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 96, p. 17-31, 2008.
- CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C.; CHIKERE, B. O. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. **3 Biotech**, v. 1, p. 117-138, 2011.
- COIMBRA, C. D.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology**, v. 58, p. 245-251, 2009.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 809-813, 2008.
- COLEDAM, D. A. C.; PUPO, M. M. S.; SILVA, B. F.; SILVA, A. J.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AQUINO, J. M. Electrochemical mineralization of cephalixin using a conductive diamond anode: A mechanistic and toxicity investigation. **Chemosphere**, v. 168, p. 638-647, 2017.
- COLLINS, C. Implementing phytoremediation of petroleum hydrocarbons. **Methods in Biotechnology**, v. 23, p. 99-108, 2007.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2011.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.
- CORSEUIL, H. X.; WEBER JR, W. J. Potential biomass limitations on rates of degradation on monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Water Research**, v. 28, p. 1415-1423, 1994.

- CORSEUIL, H. X.; GOMEZ, D. E.; SCHAMBECK, C. M.; RAMOS, D. T.; ALVAREZ, P. J. J. Nitrate addition to groundwater impacted by ethanol-blended fuel accelerates ethanol removal and mitigates the associated metabolic flux dilution and inhibition of BTEX biodegradation. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 174, p. 1-9, 2015.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 34-38, 2008.
- COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: Rhamnolipídios e polihidroxialcanoatos (PHAs)**. 138 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2010, 139 p.
- COZZARELI, I. M.; BEKINS, B. A.; EGANHOUSE, R. P.; WARREN, E.; ESSAID, H. I. In situ measurements of volatile aromatic hydrocarbon biodegradation rates in groundwater. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 111, p. 48-64, 2010.
- CUNHA, P. O.; GUIMARÃES, J. R. D.; VARGAS JR., E. A.; SILVA, M. I. P. Study of biodegradation processes of BTEX-ethanol mixture in tropical soil. **Water Air Soil Pollution**, v. 181, p. 303-317, 2007.
- D'ALVISE, P. W.; SJØHOLM, O. R.; YANKELEVICH, T.; JIN, Y.; WUERTZ, S.; SMETS, B. F. TOL plasmid carriage enhances biofilm formation and increases extracellular DNA content in *Pseudomonas putida* KT2440. **FEMS Microbiology Letters**, v. 312, p. 84-92, 2010.
- DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-13, 2011.
- DAS, S.; DASH, H. R. Microbial biodegradation and bioremediation. A potential toll for restoration of contaminated areas. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**, p. 1-22, 2014.
- DAS, P.; MA, L. Z. Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. **International Biodeterioration & biodegradation**, v. 85, p. 278-283, 2013.
- DEEB, R. A.; SHARP, J. O.; STOCKING, A.; MCDONALD, S.; WEST, K. A.; LAUGIER, M.; ALVAREZ, P. J. J.; KAVANAUGH, M. C.; ALVAREZ-COHEN, L. Impact of ethanol on benzene plume lengths: Microbial and modeling studies. **Journal of Environmental Engineering**, v. 128, p. 868-875, 2002.
- DIEZ, M. C. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science Plant Nutrition**, v. 10, p. 244-267, 2010.
- DIFCO MANUAL, 10ed. Detroit: Difco Laboratories, 1984.
- DOBLER, L.; VILELA, L. F.; ALMEIDA, R. V.; NEVES, B. C. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. **New Biotechnology**, v. 33, p. 123-135, 2016.
- DOMÍNGUEZ-CUEVAS, P.; MARQUÉS, S. Current view of the mechanisms controlling the transcription of the TOL plasmid aromatic degradation pathways. In: ROJO, F. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*. Springer International Publishing, 2017, p. 1-22.
- DONG, C-D.; TSAI, M-L.; CHEN, C-W.; HUNG, C-M. Heterogeneous persulfate oxidation of BTEX and MTBE using Fe₃O₄-CB magnetite composites and the cytotoxicity of degradation products. **International Biodeterioration & Biodegradation**, *In Press*, 2017.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, v. 40, p. 419-426, 2000.

DÖRR, F. **Consórcios degradadores de btex: isolamento, caracterização e avaliação do potencial de degradação**. 176 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DUBEY, K. V.; CHARDE, P. N.; MESHRAN, S. U.; SHENDRE, L. P.; SUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanesis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 368-374, 2012.

DUTKA, B. Short-term root elongation toxicity bioassay - Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute (NWRI), Canada, 1989.

EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M. G.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F. Cytotoxic and genotoxic potential as surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 435-441, 2007.

EL-FOULY, M. Z.; SHARAF, A. M.; SHAHIN, A. A. M.; EL-BIALY, H. A.; OMARA, A. M. A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, p. 36-48, 2015.

EL-NAAS, M. H.; ACIO, J. A.; EL TELIB, A. E. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and prospects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1104-1122, 2014.

ELSHAFIE, A. E.; JOSHI, S. J.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-BERMANI, A. S.; AL-BAHRY, S. N.; AL-MAQBALI, D.; BANAT, I. M. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-11. 2015.

EL-SHESHTAWY, H. S.; AIAD, I.; OSMAN, M. E.; ABO-ELNASR, A. A.; KOBISY, A. S. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 24, p. 155-162, 2015.

EMTIAZI, G.; SHAKARAMI, H.; NAHVI, I.; MIRDAMADIAN, S. H. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 172-176, 2005.

ENSIGN, S. A. Microbial metabolism of aliphatic alkenes. **Biochemistry**, v. 40, p. 5845-5853, 2001.

ESPÍNOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J.; ESPINOLA, E. L. G. (Org.) **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi Guaçu**. São Carlos: Rima, 2003, p.129-148.

EVSEEVA, T. I.; GERASKIN, S. A.; SHUTOMOVA, I. I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 68, p. 235-248, 2003.

FAI, A. E. C.; SIMIQUELI, A. P. R.; ANDRADE, C. J.; GHISELLI, G.; PASTORE, G. M. Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: An integrated process. **Biocatalysis and Agricultura Biotechnology**, v. 4, p. 535-542, 2015.

- FARHADIAN, M.; DUCHEZ, D.; VACHELARD, C.; LARROCHE, C. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors-a review. **Water Research**, v. 42, p. 1325-1341, 2008.
- FARRINGTON, J. W.; QUINN, J. G. Unresolved Complex Mixture (UCM): A brief history of the term and moving beyond it. **Marine Pollution Bulletin**, v. 96, p. 29-31, 2015.
- FATHEPURE, B. Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-16, 2014.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FREITAS, B. G.; BRITO, J. G. M.; BRASILEIRO, P. P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-9, 2016.
- FRYSINGER, G. S.; GAINES, R. B.; XU, L.; REDDY, C. M. Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 1653-1662, 2003.
- FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 803-816, 2011.
- GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. Embrapa, Circular Técnica, p. 1-9, 2006. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT63.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, p. 155-166, 2006.
- GERHARDT, A.; MONTEIRO, B. W.; GENNARI, A.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas utilizando soro de ricota e colágeno hidrolisado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 41-50, 2013.
- GIBSON, D. T.; SUBRAMANIAN, V. **Microbial degradation of aromatic hydrocarbons**. In: GIBSON, D. T. (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, Inc. New York, NY, 1984, p. 181-252.
- GILBERT-LÓPEZ, B.; ROBLES-MOLINA, J.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS). **Talanta**, v. 83, p. 391-399, 2010.
- GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, M. F. Comparação entre injeção na coluna ("on-column") e *headspace* dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, 2001.
- GONG, H.; LI, Y.; BAO, M.; LV, D.; WANG, Z. Petroleum hydrocarbon degrading bacteria associated with chitosan as effective particle-stabilizers for oil emulsification. **RSC Advances**, v. 5, p. 37640-37647, 2015.
- GONZÁLEZ, J. L.; PELL, A.; LÓPEZ-MESAS, M.; VALIENTE, M. Simultaneous determination of BTEX and their metabolites using solid-phase microextraction followed by HPLC or GC/MS: An application in teeth as environmental biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 603-604, p. 109-117, 2017.

- GUO, Y.-P., HU, Y.-Y., GU, R. R., AND LIN, H. Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 331, p. 356–363, 2009.
- GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, v. 281, p. 89-92, 1982.
- GREATER, A.; LAMBERTSEN, L.; WILLIAMS, P. A.; THOMAS, C. M. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 856-871, 2002.
- GUARINO, C.; SPADA, V.; SCIARRILLO, R. Assessment of three approaches of bioremediation (natural attenuation, landfarming and bioaugmentation – assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. **Chemosphere**, v. 170, p. 10–16, 2017.
- GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 87-93, 2015a.
- GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E. C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers Microbiology**, v. 6, p. 1-7, 2015b.
- GUDIÑA, E. J.; PEREIRA, J. F. B.; COSTA, R.; EVTUGUIN, D. V.; COUTINHO, J. A. P.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, L. R. Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 1-11, 2015c.
- GUSMÃO, V. R.; MARTINS, T. H.; CHINALIA, F. A.; SAKAMOTO, I. K.; THIEMANN, O. H. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1391-1400, 2006.
- HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.
- HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I. L.; KNUDSEN, L. E.; LINDHOLM, C.; NORPPA, H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Research**, v. 64, p. 2258-2263, 2004.
- HAMAD, H. A.; SADIK, W. A.; EL-LATIF, M. M. A.; KASHYOUT, A. B.; FETEHA, M. Y. Photocatalytic parameters and kinetic study for degradation of dichlorophenol-indophenol (DCPIP) dye using highly active mesoporous TiO₂ nanoparticles. **Journal of Environmental Sciences**, v. 43, p. 26-39, 2016.
- HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993.

- HAQ, I.; KUMAR, S.; RAJ, A.; LOHANI, M.; SATYANARAYANA, G. N. V. Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using *Allium cepa* test. **Chemosphere**, v. 169, p. 642-650, 2017.
- HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. *In vitro* and *in vivo* investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State – Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321-330, 2017.
- HARRIS, D. C. Análise química quantitativa. 8.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- HARVEY, S.; ELASHVILI, L.; VALDES, J. J.; KAMELY, D.; CHAKQABRARTY, V. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. **Biotechnology**, v. 8, p. 228-238, 1990.
- HAZRA, C.; KUNDU, D.; GHOSH, P.; JOSHI, S.; DANDIA, N.; CHAUDHARIA, A. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using lowcost agro-based raw materials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 185-198, 2011.
- HELENO, F. H.; LIMA, A. C.; AFONSO, R. J. C. F.; COUTRIM, M. C. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por *headspace* e microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 33, p. 329-336, 2010.
- HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.
- HOLLENDER, J.; ALTHOFF, K.; MUNDT, M.; DOTT, W. Assessing the microbial activity of soil samples, its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test. **Chemosphere**, v. 53, p. 269-275, 2003.
- HORI, K.; ICHINOHE, R.; UNNO, H.; MARSUDI, S. Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 196-202, 2002.
- IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coord: ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4. Ed. 2008 p. 1020. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2016.
- IARC. International Agency Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Some Industrial Chemicals. In: Ethylbenzene, Lyon, France: World Health Organization, v. 77, p. 227-266. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK390856/pdf/Bookshelf_NBK390856.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2016.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro, v. 43, p. 1-49, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2017.

- IEMMA, A. F.; RODRIGUES, M. I. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2 ed. Campinas: Cárita Editora, 2009, 326 p.
- IRSHAID, F. I.; JACOB, J. H. Screening and characterization of aerobic xylene-degrading bacteria from gasoline contaminated soil sites around gas stations in northern Jordan. **Journal of Biological Sciences**, v. 15, p. 167-176, 2015.
- JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. **Colloids Surf. B. Biointerfaces**, v. 110, p. 379-386, 2013.
- JEON, S-K.; KWON, D.; LEE, S. Identification of weathered multiple petroleum products in contaminated soils by characterizing unresolved complex mixture hump in gas chromatograph data. **Science of the Total Environment**, v. 607-608, p. 42-72, 2017.
- JOHNSON, S. J.; WOOLHOUSE, K. J.; PROMMERA H.; BARRYA, D. A.; HRISTOFI N. Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. **Engineering Geology**, v. 2186, p. 1-7, 2003.
- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 195-199, 2008.
- JOUTEY, N. T.; BAHAFID, W.; SAYEL, H.; EL GHACHTOULI, N. Biodegradation: Life of Science. In: **Biodegradation: Involved microorganisms and genetically engineered microorganisms**. Publisher: InTech, 2013, p. 289-320.
- KANALY, R. A.; BARTHA, R.; WATANABE, K.; HARAYAMA, S. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4205-4211, 2000.
- KALYANI, A. L. T.; NAGA, S. G.; ADITYA, A. K. G.; GIRIJA, S. G.; PRABHAKAR, T. Production optimization of rhamnolipid biosurfactant by *Streptomyces coelicoflavus* (NBRC 15399^T) using Plackett-Burman design. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 1, p. 07-13, 2014.
- KHODAEI, K.; NASSERY, H. R.; ASADI, M. M.; MOHAMMADZADEH, H.; MAHMOODLU, M. G. BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 234-242, 2017.
- KINDER, K. M.; GELLASCH, C. A.; DUSENBURY, J. A.; TIMMES, T. C.; HUGHES, T. M. Evaluating the impact of ambient benzene vapor concentrations of product water from condensation water from air technology. **Science of the Total Environmental**, v. 590-591, p. 60-68, 2017.
- KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I. E.; MĘDRZYCKA, K.; HALLMANN, E.; KARPENKO, E.; POKYNBRODA, T.; MACIERZANKA, A.; JUNGnickel, C. Rhamnolipid CMC prediction. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 488, p. 10-19, 2017.
- KOCH, A. K.; REISER, J. KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production. **Nature – Biotechnology**, p. 1335-1339, 1988.
- KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbons-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, v. 19, p. 749-757, 2008.

- KUMAR, M.; KHANNA, S. Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal tar-contaminated site undergoing active bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1252–1262, 2010.
- KUMAR, S.; CHAUDHURI, S.; MAITI, S. K. Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil - a review. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 13, p. 898-906, 2013.
- KWAPISZ, E.; WSZELAKA, J.; MARCHUT, O.; BIELECKI, S. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 61, p. 214-222, 2008.
- LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, p. 37-56, 1987.
- LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográfico de análise**, RiMa, São Carlos, 2004, 62 p.
- LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants, In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. (ed). **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987.
- LAPERTOT, M.; SEIGNEZ, C.; EBRAHIMI, S.; DELORME, S.; PERINGER, P. Mass production of bacterial communities adapted to the degradation of volatile organic compounds (TEX). **Biodegradation**, v. 18, p. 343-350, 2007.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.
- LEE, J. Y.; ROH, J. R.; KIM, H. S. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene mixture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 1146-1152, 1994.
- LEE, J. Y.; JUNG, K. H.; CHOI, S. H.; KIN, H. S. Combination of the tod and the tol pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene, and p-xylene mixture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2211-2217, 1995.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.
- LI, P.; CAI, Q.; LIN, W.; CHEN, B.; ZHANG, B. Offshore oil spill response practices and emerging challenges. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, p. 6-27, 2016.
- LIMA, T. M. S.; PROCÓPIO, L. C.; BRANDÃO, F. D.; LEÃO, B. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2957-2964, 2011.
- LIMA, S. D.; OLIVEIRA, A. F.; GOLIN, R.; CAIXETA, D. S.; LIMA, Z. M.; MORAIS, E. B. Gerenciamento de áreas contaminadas por postos de combustíveis em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 12, p. 209-315, 2017.
- LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 369-81.
- LIU, J. S. C.; DERITO, C. M.; MADSEN, E. L. Field-based and laboratory stable isotope probing surveys of the identities of both aerobic and anaerobic benzene-metabolizing microorganisms in freshwater sediment. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 1964-1977, 2008.

LITTLEJOHNS, J. V.; DAUGULIS, A. J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. **Process Biochemical**, 43, p. 1068-1076, 2008.

LOPES, P. R. M. **Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2014, 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, 2014.

LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S. G. V. A. O.; LIMA, C. J. B.; CORTEZI, M.; CONTIERO, J. Effect of C/N ratio and physicochemical conditions on the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Research Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 19-24, 2010.

LOVAGLIO, R. B. **Produção de ramnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 148 f. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, 2011.

LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J.; JAFELICCI JUNIOR, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 301–305, 2011.

LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; CAPELINI, T. L.; EBERLIN, M. N.; HAUSMANN, R.; HENKEL, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipids production by a *Pseudomonas aeruginosa* LBI mutant: solutions and homologs characterization. **Tenside, Surfactants, Detergents**, v. 51, p. 397-405, 2014.

LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1715-1726, 2015.

LOVANH, N.; HUNT, C. S.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. **Water Research**, v. 36, p. 3739-3746, 2002.

LUEDERS, T. The ecology of anaerobic degraders of BTEX hydrocarbons in aquifers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, p. 1-13, 2017.

LUZ, C. C.; SANTOS, E. A.; SANTOS, M. O. S.; MUSSY, M. Y.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W. R.; BRUCHA, G.; REIS, M. M.; REIS, M. G. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia. **Química Nova**, v. 34, p. 775-779, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016. 987 p.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 355-381, 2008.

MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; RODRIGUES, A. K.; GERVASIO, I. M.; GERVASIO, I.; NASCIMENTO, A. P.; SCHWAN, R. F. Ethanol production from deproteinized cheese whey fermentations by co-cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 1121-1127, 2013.

MAHMOUND, N. S.; GHALY, A. E. Influence of temperature and pH on the nonenzymatic reduction of triphenyltetrazolium chloride. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 346-353, 2004.

- MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, p. 1-8, 2005.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. B. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, p. 1-19, 2011.
- MANCINI, S. A.; DEVINE, C. E.; ELSNER, M.; NANDI, M. E.; ULRICH, A. C.; EDWARDS, E. A.; LOLLAR, B. S. Isotopic evidence suggests different initial reaction mechanisms for anaerobic benzene biodegradation. **Environment Science and Technology**, v. 42, p. 8290-8296, 2008.
- MANRESA, A.; BATISDA, J.; MERCADÉ, M. E.; ROBERT, M.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M. J.; GUINEA, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Society for Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 133-136, 1991.
- MAPELLI, F.; SCOMA, A.; MICHOU, G.; AULENTA, F.; BOON, N.; BORIN, S.; KALOGERAKIS, N.; DAFFONCHIO, D. Biotechnologies for marine oil spill cleanup: Indissoluble ties with microorganisms. **Trends in Biotechnology**, in press, 2017.
- MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J. P. Gasoline and diesel oil biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 58, p. 441-448, 2003.
- MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 147 f. 2006. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- MARIANO, A. P.; DE ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 296-304, 2007.
- MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 269-274, 2008.
- MARIANO, A. P.; CRIVELARO, S. H. R.; DE ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. The use of vinasse as an amendment to ex-situ bioremediation of soil and groundwater contaminated with diesel oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1043-1055, 2009.
- MARTÍNEZ-ALONSO, M.; GAJU, N. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. **Ecosistemas**, v. 14, p. 79-91, 2005.
- MARTINO, C. D.; LÓPEZ, N. I.; IUSTMAN, R. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 67, p. 15-20, 2012.
- MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDER, I.; KRISCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.
- MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v. 69, p. 399-408, 2004.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4334-4340, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A.; Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2011.

MECKENSTOCK, R. U.; BOLL, M.; MOUTTAKI, H.; KOELSCHBACH, J. S.; TAROUÇO, P. C.; WEYRAUCH, P.; DONG, X.; HIMMELBERG, A. M. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 92-118, 2016.

MENDES, A. N.; FILGUEIRAS, L. A.; PINTO, J. C.; NELE, M. Physicochemical properties of rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 to applications in microemulsions. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 6, p. 64-79, 2015.

MILLIOLI, V. S.; SERVULO, E. L. C.; SOBRAL, L. G. S.; CARVALHO, D. D. Bioremediation of crude oilbearing soil: evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. **Global NEST Journal**, v. 11, p. 181-188, 2009.

MINISTÉRIO AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa nº 51 de 18/09/2002. Brasil. 2003.

MITRA, S.; ROY, P. BTEX: A serious ground-water contaminant. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 5, p. 394-398, 2011.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de Leite: Composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, p. 80-94, 1994.

MNIF, I.; SAHNOUN, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 109, p. 72-81, 2017.

MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. **Petroleum derivatives biodegradation: Environmental impact and bioremediation strategies**. Amazon, 2012, 104 p.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Screening the toxicity and biodegradability of petroleum hydrocarbons by a rapid colorimetric method. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, p. 1-12, 2014.

MONTAGNOLLI, R. N.; MATOS LOPES, P. R.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, p. 4116, 2015.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; CRUZ, J. M.; CLARO, E. M. T.; QUITERIO, G. M.; BIDOIA, E. D. The effects of fluoride based fire-fighting foams on soil microbiota activity and plant growth during natural attenuation of perfluorinated compounds. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 119-127, 2017a.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; CRUZ, J. M.; CLARO, M. T.; QUITERIO, G. M.; BIDOIA, E. D. Metabolical shifts towards alternative BTEX biodegradation intermediates induced by perfluorinated compounds in firefighting foams. **Chemosphere**, v. 173, p. 49-60, 2017b.

- MORAES, D. S. L. **Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa***. 158f. 2000. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2000.
- MORALES, C. G. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. IMTA, México, 2004.
- MORASCH, B.; SCHINK, B.; TEBBE, C. C.; MECKENSTOCK, R. U. Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. **Archives of Microbiology**, v. 181, p. 407-417, 2004.
- MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; AL-HASSAN, A. A.; FAROUK, A. Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. **Journal of Mycology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- MOUSSA, T. A. A.; MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 867-880, 2014.
- MUKHERJEE, A. K.; BORDOLOI, N. K. Biodegradation of benzene, toluene and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated bacterial consortium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 3380-3388, 2012.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.
- NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: **Soil Biochemistry**. Nova York, Cap. 6, 1990, p. 293-355.
- NASCIMENTO FILHO, I.; VIECELI, N. C.; CARDOSO, E. M.; LOVATEL, E. R. Analysis of BTEX in experimental columns containing neat gasoline and gasoline-ethanol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 410-417, 2013.
- NICHOLSON, C. A.; FATHEPURE, B. Z. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1222-1225, 2004.
- NIKOLOVA, N.; NENOV, V. BTEX degradation by fungi. **Water Science and Technology**, v. 51, p. 87-83. 2005.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid Surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005a.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADAD, R.; GONÇALVES, L. A.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005b.

- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.
- NOEL, C.; GOURRY, J. C.; DEPARIS, J.; BLESSING, M.; IGNATIADIS, I.; GUIMBAUD, C. Combining geoelectrical measurements and CO₂ analyses to monitor the enhanced bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils: A field implementation. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2016, p. 1-15, 2016.
- NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Importância do etanol na atenuação natural de águas subterrâneas impactadas por gasolina. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 259-265, 2007.
- NWANKWEGU, A.; ONWOSI, C. O. Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. **Environmental Technology & Innovation**, v. 7, p. 1-11, 2017.
- NWAOGU, L. A.; ONYEZE, G. O. C.; NWABUEZE, R. N. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1939-1943, 2008.
- OBEROI, A. S.; PHILIP, L. Variation in toxicity during the biodegradation of various heterocyclic homocyclic aromatic hydrocarbons in single and multi-substrate systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 337-346, 2017.
- OLGA, P.; PETA, K.; JELENA, M.; SRDJAN, R. Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 74, p. 110-113, 2008.
- OLIVEIRA, N. M.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A.; KNORST, A. J.; DOS SANTOS, A. L.; PIZZOLATO, T. M.; PERALBA, M. C. Biodegradation of commercial gasoline (24% ethanol added) in liquid medium by microorganisms isolated from a landfarming site. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 46, p. 86-96, 2011.
- ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L. **Bioremediation in Latin America, current research and perspectives**. In: Chapter 5. Bioremediation of soils contaminated with pesticides: experiences in Mexico. Springer: New York, 2014, p. 69-100.
- OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C.; BIDOIA, E. D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 258-261, 2005.
- OTTO, R. T.; DANIEL, H. J.; PEKIN, G.; MULLER-DECKER, K. Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p. 495-501, 1999.
- PADHI, S. K.; GOKHALE, S. Benzene biodegradation by indigenous mixed microbial culture: Kinetic modelling and process optimization. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 119, p. 511-519, 2017.
- PALÁCIO S. M.; ESPINOZA-Q. F. R.; MÓDENES A. N.; OLIVEIRA C. C.; BORBA F. H.; SILVA Jr. F. G. Toxicity assessment from electro-coagulation treated-textile dye wastewaters by bioassays. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 330-337, 2009.
- PARTICLE SCIENCES. Surfactants. Technical Brief, v. 1, 2010. Disponível em: <http://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_2010_1.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2017.

- PARTHIPAN, P.; PREETHAM, E.; MACHUCA, L. L.; RAHMAN, P. K. S. M.; MURUGAN, K.; RAJASEKAR, A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-14, 2017.
- PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- PENET, S.; MARCHAL, R.; SGHIR, A.; MONOT, F. Biodegradation of hydrocarbon cuts used for diesel oil formulation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 66, p. 40–47, 2004.
- PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–68, 2013.
- PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. **The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History**, 2. ed, V. 1, Cambridge versity Press, 2005.
- PETERSEN, K.; HULTMAN, M. T.; ROWLAND, S. J.; TOLLEFSEN, K. E. Toxicity of organic compounds from unresolved complex mixtures (UCMs) to primary fish hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 190, p. 150-161, 2017.
- PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, p. 2104-2108, 2009.
- PINTO, F. A. **Metodologia da espectroscopia no infravermelho para análise dos soros provenientes da fabricação de queijos Minas padrão e prato**. 45 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizontes, 2010.
- PIRÔLLO M. P.; MARIANO, A. P.; LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S. G.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydRocarbon-contaminated site. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p. 1484-1490, 2008.
- PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006, 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2006.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1589-1595, 2008.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; RUJIRAVANIR, R. Rhamnolipid biosurfactants: Production and their potential in environmental biotechnology. In: RAMKRISNA, S. **Biosurfactants**. Ed. Landes Bio Science & Springer Science: Bangkok, Tailândia, 2010, p. 211-221, Chapter 16.
- PRATHYUSHA, K.; MOHAN, Y. S. Y. V. J.; SRIDEVI, S.; SANDEEP, B. V. Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon degrading indigenous bacteria from contaminated sites of Visakhapatnam. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, p. 357-362, 2016.
- PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.
- PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J. T. C.; VAN GROENESTIJN, J. W. Substrate interactions during the biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene

(BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2660-2665, 2002.

PRINCE, R. C.; NASH, G. W.; HILL, S. J. The biodegradation of crude oil in the deep ocean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 111, p. 354-357, 2016.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*—A gujarat oil field isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, p. 65-68, 2003.

QU, D.; ZHAO, Y.; SUN, J.; REN, H.; ZHOU, R. BTEX biodegradation and its nitrogen removal potential by a newly isolated *Pseudomonas thivervalensis* MAH1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, p. 691-699, 2015.

RADNIECKI, T. S.; DOLAN, M. E.; SEMPRINI, L. Physiological and transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to toluene and benzene inhibition. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 4093-4098, 2008.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MACHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; BANAT, I. M.; LORD, R.; STREET, G. Environmental bioremediation technologies. In: SINGH, S. N.; TRIPATHI, R. D. **Bioremediation of Petroleum Sludge using Bacterial Consortium with Biosurfactant**. Springer: New York, 2007, 391-408 p.

RAHUL, M. A. K.; BALOMAJUMDER, C. Biological treatment and modelling aspect of BTEX abatement process in a biofilter. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 9-17, 2013.

RAMANA, K. V.; KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 249-257, 1989.

REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. B.; DUTEAU, N.; KIM, K-H. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 1005-1011. 2002.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; MORADI, M.; SALEH, A.; FARAJI, M.; NAEENI, M. H. Supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a sensitive and efficient sample preparation method for determination of organic compounds in solid samples. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 161-168, 2010.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. F.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 113-117, 2005.

RICE, D. Background on ethanol. **Underground Tank Technology Update**, v. 14, p. 2-3, 2000.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 93-100, 1999.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Revista Food Ingredients**, v. 17, p. 20-24, 2002.

- ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 1, p. 871-874, 1989.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Editora Casa do Pão, 2005. 326 p.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 191–194, 2014.
- ROUIDI, S.; HADJEM, A.; ASIA, L.; MILLE, G.; TAHAR, A. Sources and distribution of hydrocarbons in surface sediments of saf-saf oued (Skikda city, northeastern Algeria). **Annals of Biological Research**, v. 4, p. 61-69, 2013.
- RÜEGG, I.; HAFNER, T.; BUCHELI-WITSCHER, M.; EGLI, T. Dynamics of benzene and toluene degradation in *Pseudomonas putida* F1 in the presence of the alternative substrate succinate. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, p. 331–342, 2007.
- RUIZ-AGUILAR, G. M. L.; FERNANDEZ-SANCHEZ, J. M.; KANE, S. R.; KIM, D.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol and methyl-tert-butyl ether on monoaromatic hydrocarbon biodegradation: Response variability for different aquifer materials under various electron-accepting conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 2631-2639, 2002.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34-38, 2014.
- SAHA, S.; THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, p. 122-128, 2008.
- SANDU, C.; POPESCU, M.; ROSALES, E.; PAZOS, M.; LAZAR, G.; SANROMÁN, M. A. Electrokinetic oxidant soil flushing: A solution for in situ remediation of hydrocarbons polluted soils. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 1-8, 2017.
- SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, p. 1687–1692, 2009.
- SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. Optimization of ricotta cheese whey (RCW) fermentation by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9156-9162, 2010.
- SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOS, A. S.; PEREIRA, N.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p.159-166, 2002.
- SANTOS D. K. F.; RUFINO R. D.; LUNA J. M.; SANTOS V. A.; SARUBBO L. A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-31, 2016.

- SARUBBO, L. A.; ROCHA JR, R. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, p. 707–723, 2015.
- SASAKI, T.; MAKI, H.; ISHIHARA, M.; HARAYAMA, S. Vanadium as an internal marker to evaluate microbial degradation of crude oil. **Environmental Science and Technology**, v. 22, p. 3618–3621, 1998.
- SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chromatography A**, v. 693, p. 7–13, 1995.
- SEMADE. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Vazamento de combustível em Governador Valadares, MG. 2017. Disponível em: <<http://www.grifon.com.br/Portal/Griffon/noticiaDetalhe.aspx?nCdCategoria=160&nCdTemplate=20000&nCdTipoConteudo=2&nCdConteudo=61939&nRestrito=0>>. Acesso em: 08 jul. 2017.
- SCHAEFER, C.; YANG, X.; PELZ, O.; TSAO, D. T.; STREGER, S. H.; STEFFAN, R. J. Aerobic biodegradation of *iso*-butanol and ethanol and their relative effects on BTEX biodegradation in aquifer materials. **Chemosphere**, v. 81, p. 1104, 1110, 2010.
- SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 110–116, 1987.
- SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S. S.; KONG, S. H. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**, v. 16, p. 319–327, 2005.
- SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UENISHI, H.; UCHIHASHI, Y.; HIRAISHI, A.; YUKAWA, H.; YURIMOTO, H.; KATO, N. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1385–1392, 2004.
- SHUKOR, M. Y.; HASSAN, N. A. A.; JUSOH, A. Z.; PERUMAL, N.; SHAMAAN, N. A. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel-degrading strain from Antarctica. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, p. 1–6, 2009.
- SIKKEMA, J.; BONT, J. A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Review**, v. 59, p. 201–222, 1995.
- SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4720–4726, 2004.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; AGUIRRE-RAMÍREZ, M.; SÁNCHEZ, R. The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 675–677, 2005.
- SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. p. 55–67. IN: ROMERO, P. R. e CANTÚ, A. M. **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México**. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología, México, D.F., 2008.
- SONG, H. C.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 652–656, 1990.

- SOUZA, C. E.; VESSONI-PENNA, T. C.; OLIVEIRA, S. P. R. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p.88-94, 2014.
- SOUZA, M. M.; COLLA, T. T.; BÜCKER, F.; FERRÃO, M. F.; HUANG, C. T.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 141-146, 2016.
- STREVA, E. R.; PASA, V. M. D.; SODRÉ, J. R. Aging effects on gasoline–ethanol blend properties and composition. **Fuel**, v. 90, p. 2015-219, 2011.
- SZULC, A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; LAWNICZAK, L.; CYPLIK, A. P.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 121-128, 2014.
- TAMADA, I. S.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1576-1581, 2012
- TEIXEIRA, A. S. 2007, 95 f. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- THALMANN, A. Zur methodik der bestimmung der dehydrogenase aktivita triphenyltetrazolium chlorid (TTC) im bodem mittels (On a method for estimating the activity of dehydrogenase with triphenyltetrazolium chloride (TTC)). **Lanawiktsch**, v. 21, p. 249-258, 1968.
- THANIYAVARN, J.; CHIANGUTHAI, T.; SANGVANICH, P.; ROONGSAWANG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M.; THANIYAVARN, S. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, p. 2061-2068. 2008.
- THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1149-1153, 2007.
- TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. **Química Nova**, v. 27, p. 441-446, 2004.
- TRELLU, C.; MOUSSET, E.; PECHAUD, Y.; HUGUENOT, D.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; ESPOSITO, G.; OTURAN, M. A. Removal of hydrophobic organic pollutants from soil washing/flushing solutions: A critical review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 306, p. 149-174, 2016.
- TOLOSA, I.; MORA, S. J.; FOWLER, S. W.; VILLENEUVE, J. P.; BARTOCCI, J.; CATTINI, C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and Gulf of Oman. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 1619-1633, 2005.
- TURNER, N. R.; RENEGAR, D. A. Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, p. 1–16, 2017.
- UES, I.; PIZATTO, E.; BEUX, S.; ALFARO, A. T. Otimização do processo de fabricação da ricota. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 1, p. 382-392, 2006.

- VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Core flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo- and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 175– 182, 2016.
- VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.
- VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 120, p. 71-83, 2017.
- VASILEVA-TONKOVA, E.; SOTIROVA, A.; GALABOVA, D. The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater. **Current Microbiology**, v. 62, p. 427-433, 2011.
- VECINO, X.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L.; GUDIÑA, E. J.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B.; RODRIGUES, L. R. Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Article in Press**, 2017.
- VENTURA-CAMARGO, B. C.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-332, 2016.
- VENTURINI FILHO, W. G. (coord.). **Bebidas não alcoólicas**. In: Cap. 6. Bebidas lácteas. Ciência e Tecnologia, v. 2. São Paulo: Editora Blucher, 2010, p. 89-116.
- VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants - Types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, p. 181-192, 2015.
- VINCENZI, A.; MACIEL, M. J.; BURLANI, E. L.; OLIVEIRA, E. C.; VOLPATO, G.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Ethanol bio-production from ricotta cheese whey by several strains of the yeast *Kluyveromyces*. **American Journal of Food Technology**, v. 9, p. 281-291, 2014.
- VOGT, C.; KLEINSTEUBER, S.; RICHNOW, H-H. Anaerobic benzene degradation by bacteria. **Microbial Biotechnology**, v. 4, p. 710–724, 2011.
- WANG, W. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 6, p. 409-414, 1987.
- WHANG, L. M.; LIU, P. W. G.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation-effects of pH and ammonium addition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 1045-1050, 2008.
- WEELINK, S. A. B.; VAN EEKERT, M. H. A.; STAMS, A. J. M. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 9, p. 359-385, 2010.
- WILLIAMS, P. A.; MURRAY, K. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 120, p. 416-423, 1974.
- WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415-423, 1996.

- WILKES, H.; BUCKEL, W.; GOLDING, B. T.; RABUS, R. Metabolism of hydrocarbons in n-alkane utilizing anaerobic bacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 138-151, 2016.
- WOLICKA, D.; SUSZEK, A.; BORKOWSKI, A.; BIELECKA, A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. **Bioresource Technology**, v. 10, p. 3221-3227, 2009.
- WOLIŃSKA, A.; ZAPASEK, M.; STEPNIEWSKA, Z. The optimal ttc dose and its chemical reduction level during soil dehydrogenase activity assay, **Acta Agrophysica**, v. 23, p. 303-314, 2016.
- WU, J.; JU, L. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p.193-202, 1998.
- WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, M.; KUCHARSKI, J. Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by diesel oil. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, p. 501-506, 2006.
- XIE, F.; LU, Q.; TOLEDO, R. A.; SHIM, H. Combined removal of an MTBE and BTEX mixture using indigenous microbe immobilized on waste silica gel. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 7, p. 244-247, 2016.
- XU, Z.; CHAI, J.; WU, Y.; QIN, R. Transport and biodegradation modeling of gasoline spills in soil-aquifer system. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, p. 2871-2882, 2015.
- YEOM, S. H.; YOO, Y. J.; LEE, J. W. The importance of microbial adaptation in the degradation of BTX. **Global Environmental Biotechnology**, v. 66, p. 665-675, 1997.
- YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p. 223-226, 2003.
- YU, S.H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, v. 31, p. 149-154, 2005.
- ZHANG, L.; ZHANG, C.; CHENG, Z.; YAO, Y.; CHEN, J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. **Chemosphere**, v. 90, p. 1340-1347, 2013.