



Copyright 2004, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás - IBP

Este Trabalho Técnico Científico foi preparado para apresentação no 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, a ser realizado no período de 2 a 5 de outubro de 2005, em Salvador. Este Trabalho Técnico Científico foi selecionado e/ou revisado pela Comissão Científica, para apresentação no Evento. O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pelo IBP. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões do Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás, Sócios e Representantes. É de conhecimento e aprovação do(s) autor(es) que este Trabalho será publicado nos Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE DERIVADOS DE PETRÓLEO.

Cynthia S. Souza, Rita de Cássia M. de Miranda, Kêsia X.F.R. de Sena, Janete Magali de Araújo, Alda de A. Chiappeta & Maria de Fátima V. Q. Sousa

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Campus universitário, CEP 50.670-901, mfvqs@ufpe.br

Resumo – Este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar microrganismos que têm potencialidade para degradar óleo Diesel, gasolina, *bunker* e querosene de amostras coletadas na Lagoa da Barra, localizada próxima ao porto de Suape, em Pernambuco-Brasil, visando utilizá-los em processo de biorremediação. No isolamento foram aplicados dois métodos: nebulização e incorporação. Para seleção das linhagens foi empregada a técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol. Pela técnica de incorporação foram isolados 21 linhagens e pela técnica de nebulização foram isoladas 65 linhagens. No que se refere a seleção, duas bactérias, um fungo filamentosos e quatro leveduras apresentaram potencialidade para degradar óleo Diesel e duas bactérias quatro fungos filamentosos e cinco leveduras para degradar gasolina. No caso de *bunker* onze bactérias, três fungos filamentosos e uma levedura mostraram potencialidade para degradação e para querosene encontrou-se uma bactéria, seis fungos filamentosos e três leveduras.

Palavras-Chave: Microrganismos, óleo Diesel, gasolina, *bunker*, querosene.

Abstract – This study aims to isolate and select strains which have potential to degrade Diesel oil, gasoline, bunker and kerosene from samples collected in the Barra Lagoon, located near the Suape port in the State of Pernambuco-Brazil, with a view to use them in bioremediation process. It was applied two methods for the isolation: nebulization and incorporation. To selection of the strains it was employed the indicator redox 2,6- dichlorophenol indophenol technique. Twenty one strains were isolated using the incorporation technique and sixth five using the nebulization technique. Two bacteria, one filamentous fungi and four yeasts presented potential to degrade Diesel oil and two bacteria, four filamentous fungi and five yeasts to degrade gasoline. In the case of bunker, eleven bacteria, three filamentous fungi and one yeast showed potentiality to degradation and to kerosene, the figures were one bacteria, six filamentous fungi and three yeasts.

Keywords: Microorganisms, Diesel oil, gasoline, bunker, kerosene

1. Introdução

Atualmente o setor petrolífero constitui a principal fonte energética, sendo responsável pela geração de 40% de toda energia mundial. Com a exploração e comercialização do petróleo e de seus derivados, vazamentos indevidos e acidentais vêm ocorrendo gerando graves danos ao meio ambiente o que torna imprescindível o desenvolvimento de tratamentos. A biorremediação é uma tecnologia que utiliza microrganismos para minimizar ou remover poluentes de hidrocarbonetos de petróleo do ambiente (Autry & Ellis, 1992). Biorremediação é o uso para ambientes contaminados de microrganismos ou processos microbianos, com inúmeras aplicações, incluindo a limpeza de águas subterrâneas, solos, lagos e processos para tratamento de esgotos (Boopathy, 2000). Biorremediação é uma metodologia bem aceita pela opinião pública e muito eficiente na recuperação de ambientes poluídos por hidrocarbonetos (Desai & Banat, 1997), porque não afeta o equilíbrio ecológico. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são agentes transformadores eficazes, face a sua habilidade em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias. Por assimilarem tais substâncias como fonte de carbono e/ou de energia, os microrganismos vêm se apresentando como poderosa alternativa aos métodos convencionais de tratamento, sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais (Ururahy, 1998). Mais de setenta gêneros microbianos, capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, foram relatados (Atlas, 1986). Algumas pesquisas vem sendo desenvolvidas, objetivando estimular a atividade da microflora local que utiliza o hidrocarboneto como fonte de carbono (Hart, 1996) ou introduzir linhagens potencialmente ativas de microrganismos que degradam hidrocarbonetos no local poluído. (Baddock *et al*, 1997). A tecnologia de biorremediação tem a vantagem de ser relativamente simples, ter baixo custo que conduz à total mineralização, resultando na eliminação permanente dos contaminantes, poder se realizar no local, evitando custos com transportes, além de ter mecanismo biológico que evita o risco associado com resíduos sintéticos perigosos (Baker & Herson, 1994). Tal transformação depende das interações ambientais entre os componentes do petróleo e as populações de microrganismos que atuam em cometabolismo e/ou de forma sinérgica. Inúmeros estudos focalizam que as técnicas convencionais de mitigação de impactos ambientais, sejam de natureza física, química ou físico-química, devem ser completadas com a biorremediação (Crapez *et al*), multiplicando-se a capacidade de depuração do ambiente, além de permitir o restabelecimento da vida vegetal e animal.

2. Objetivo

Este trabalho visa isolar e selecionar linhagens, com potencialidade para degradar óleo Diesel, gasolina, *bunker* e querosene, de amostras coletadas na lagoa da Barra, situada no Terminal Portuário de Suape-PE, visando uma aplicação no processo de biorremediação, uma vez que o referido terminal se localiza numa área de grande potencial turístico, ecológico e histórico e as praias adjacentes estão voltadas para o turismo e veraneio, sendo vulneráveis a derrames desses poluentes.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção das Amostras

Amostras poluídas com derivado de petróleo foram coletadas às margens da Lagoa da Barra, situada na região Portuária de Suape - PE, visando isolar culturas microbianas com potencialidade para degradar fontes oleosas. Todas as amostras, acondicionadas em recipientes plásticos, foram submetidas ao isolamento de microrganismos, utilizando como fonte de carbono os petroderivados óleo Diesel, gasolina, *bunker* e querosene, movimentados pelo terminal Portuário de Suape - PE. A escolha da lagoa da Barra para a realização da coleta de amostras foi determinada por indicação do Complexo Industrial Portuário de Suape, que detectou o derrame indevido de petroderivado.

3.2 Enriquecimento

As amostras (10g ou 10mL) foram inicialmente enriquecidas, em 100mL do meio mineral de Bushnell Haas – BH composto de 1g de KH_2PO_4 , 1g de K_2HPO_4 , 1g de NH_4NO_3 , 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05g de FeCl_3 , 0,02g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, para 1L de H_2O (Atlas, 1995), contendo um dos petroderivados como fonte de carbono 1%. As amostras foram submetidas à agitação de 200rpm e temperatura de $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 21 dias e a cada sete dias foi realizado um isolamento.

3.3 Isolamento

O isolamento foi realizado em meio de BH sólido, adicionando-se as fontes de carbono (óleo Diesel, gasolina, *bunker* e querosene), pela técnica de nebulização ou por incorporação, sobre o meio semeado com as amostras previamente enriquecidas. As colônias isoladas foram purificadas por estrias em placas de Petri, contendo os meios sólidos, Tryptic Soy Agar - TSA (meio pronto da Oxoid) para bactérias e Sabouraud – SAB, 40,0g/L de peptona, 10,0g/L de glicose, 15,0g/L de agar (Atlas, 1995) para fungos filamentosos e leveduras. Passado o período de incubação a 35°C (bactérias) e 30°C (leveduras e fungos filamentosos), as colônias foram transferidas para tubos de ensaio, contendo os referidos meios sólidos. As culturas purificadas foram mantidas sob refrigeração (4°C) para realização dos

ensaios subseqüentes. Cada isolado foi transferido para frasco-ampola contendo os meios sólidos citados específicos, recobertos com óleo mineral esterilizado, e depositado na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

3.4 Identificação Preliminar dos Microrganismos

A morfologia dos isolados foi analisada através da microscopia óptica para a caracterização dos diferentes grupos microbianos.

3.5 Ensaios de Seleção de Bactérias e Leveduras

A potencialidade de degradação das bactérias e leveduras, foi avaliada em placas multipoços, contendo 250µL de meio BH, 25µL de suspensão microbiana padronizada em 10^8 UFC/mL, 10µL da fonte oleosa (óleo Diesel, gasolina ou querosene), 5µL do indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol - DCPIP, controle positivo (biótico) e o controle negativo (abiótico) segundo a metodologia de Hanson *et al* (1993). Quando o *bunker* foi utilizado como fonte de carbono, foram empregados frascos Erlenmeyer, contendo 100mL de meio BH, 5mL de suspensão microbiana padronizada em 10^8 UFC/mL e 1% de *bunker*. Após 12 horas sob agitação de 200rpm a $30 \pm 1^\circ$ C foi adicionado 0,5mL do indicador DCPIP, que tem a finalidade de sinalizar a ocorrência de oxidação biológica dos referidos petroderivados através de mudança de coloração do meio de cultivo de azul para incolor, ou seja, viragem do indicador da forma reduzida para a forma oxidada.

3.6 Ensaios de Seleção de Fungos Filamentosos

O potencial degradador dos fungos foi testado segundo a metodologia de Gomes, (2004). Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer (500mL) contendo 100mL do meio de Bushnell Haas, com 1% da fonte de carbono os quais foram inoculados com fungos filamentosos crescidos em blocos circulares de gelose com diâmetro de aproximadamente 6 mm. Após 48 horas de aclimação, sob agitação de 200rpm e a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ foi adicionado 0,5mL do indicador redox DCPIP para avaliar o tempo gasto para a oxidação biológica do petroderivado testado.

4. Resultado e Discussão

4.1 Obtenção das Amostras

Foram coletadas na Lagoa da Barra, situada no Terminal Portuário de Suape-PE, quatro amostras sólidas (esponja, solo, folhas e bagacilho) e uma líquida (água da lagoa), poluídas com derivado de petróleo, cujos valores de pH se situarem na faixa entre 4,0 e 5,5 como observado na tabela 1.

Tabela1. Amostras coletadas na Lagoa da Barra (Suape-PE), poluídas com derivado de petróleo e seus respectivos valores de pH.

Symbol	Sample	pH
A1	Esponja	5,5
A2	Solo	4,5
A3	Folhas das margens da lagoa	5,0
A4	Água da lagoa	5,0
A5	Bagacilho	4,0

No momento da coleta, o local já havia sido submetido à um tratamento de despoluição por remoção mecânica, através de esponja de poliuretano e bagacilho, os quais se encontravam depositados às margens da lagoa, impregnados com petroderivado. Nas figuras 1, e 2 estão mostrados os aspectos gerais das margens e da lagoa, no dia da coleta.



Figure 1 – Esponja de poliuretano localizada às margens da lagoa da Barra



Figure 2 – Margem da lagoa da Barra, localizada no terminal Portuário de Suape-PE

4.2 Isolamento

As amostras coletadas na lagoa da Barra (Suape-PE) foram submetidas, inicialmente, à um enriquecimento por 21 dias nos diferentes petroderivados (óleo Diesel, gasolina, *bunker* e querosene) para em seguida proceder ao isolamento a cada sete dias. Com a aplicação das duas técnicas de isolamento: incorporação e nebulização da fonte de carbono foram obtidos 86 morfotipos dos diferentes grupos microbianos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), resultados apresentados na figura 3. Quando a fonte de carbono utilizada foi o *bunker*, foram isolados 14 microrganismos por incorporação e 30 por nebulização, enquanto com o querosene, não foi observado o crescimento de microrganismos por incorporação. Da contagem total de microrganismos (86) 21 foram isolados pela técnica de incorporação e 65 por nebulização, indicando ser esta última, a melhor para o isolamento nestas condições.

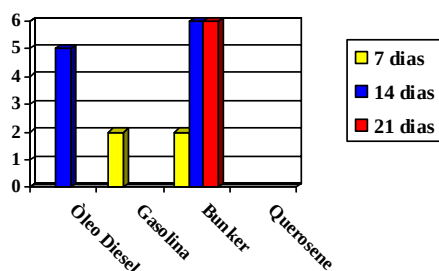


Figura 3. Total de microrganismos isolados com 7, 14 e 21 dias, nos quatro petroderivados óleo Diesel ,gasolina *bunker* e querosene aplicando-se as técnicas de incorporação.

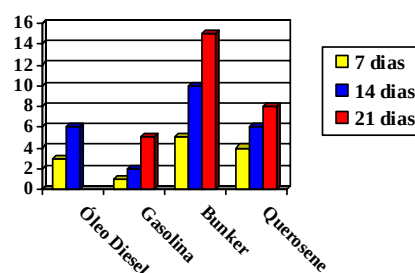


Figura 4. Total de microrganismos isolados com 7, 14 e 21 dias, nos quatro petroderivados óleo Diesel ,gasolina *bunker* e querosene aplicando-se as técnicas de nebulização.

Observa-se na figura 3, que as maiores quantificações foram obtidas quando se utilizou o *bunker*, como fonte de carbono, na técnica de incorporação, obtendo-se 14 microrganismos enquanto que na figura 4, observa-se o isolamento de 30 microrganismo quando o *bunker* foi utilizado como fonte de carbono, o que pode ser visualizado nas figuras 5 e 6. Empregando-se a técnica por incorporação, obteve-se em segundo lugar na quantificação microbiana, os isolados que assimilaram o óleo Diesel como fonte de carbono. Quando aplicada a técnica por nebulização, o querosene foi a segunda melhor fonte de carbono, havendo sido isolados 18 microrganismos. A técnica de isolamento por nebulização da fonte de carbono se mostrou mais apropriado para isolar microrganismos nativos a partir das amostras poluídas com petroderivado.



Figura 5 – Colônias de microrganismos isoladas pela técnica de incorporação utilizando o *Bunker* como fonte de carbono.



Figura 6 - Colônias de microrganismos isoladas pela técnica de nebulização utilizando o *Bunker* como fonte de carbono.

4.3. Identificação Preliminar dos Isolados

Através da microscopia óptica verificou-se representantes de 3 diferentes grupos de microrganismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias). Dentre os 86 microrganismos isolados, 26% são bactérias Gram-negativas (23/86), 20% são bactérias Gram-positivas (17/86), 27% fungos filamentosos (23/86) e 27% são leveduras (23/86), como pode ser visto na figura 7.

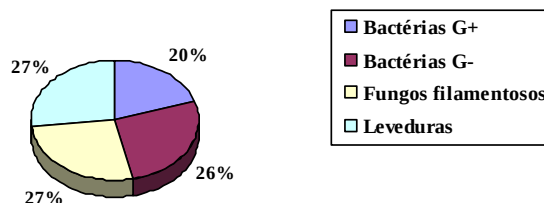


Figura 7. Percentuais dos grupos de microrganismos obtidos no isolamento.

Chaillan *et al* (2004), isolaram 61 linhagens, sendo 12 bactérias heterotróficas, 19 bactérias hidrocarbonoclásticas, 12 fungos filamentosos totais, 14 fungos filamentosos hidrocarbonoclásticos e 4 leveduras hidrocarbonoclásticas de solos poluídos por petróleo na Indonésia, utilizando meios de cultivo distintos em que o óleo denominado BAL 150 como fonte de carbono. Chaerun *et al* (2004), isolaram 39 bactérias a partir de óleo, água do mar e areia de três locais diferentes na costa do mar no Japão, as linhagens foram isoladas em meio mineral Bushnell Haas acrescido com cloreto de sódio. Xia *et al* (2005) isolaram de solo contaminado com óleo, através da técnica de enriquecimento utilizando o meio mineral Bushnell Hass (BH) e o fenantreno como única fonte de carbono, uma bactéria Gram negativa com morfologia em bastonete, de coloração amarela e flagelo polar, identificada posteriormente através de técnicas moleculares por *Sphingomonas paucimobilis*. Margesin *et al* (2003) isolaram duas bactérias e duas leveduras de solos contaminados com derivados de petróleo na Austrália, utilizando meio mineral contendo óleo Diesel ou hexadecano como fonte de carbono, através da técnica de contagem de células viáveis.

4.4 Seleção dos Microrganismos Isolados

No teste de seleção de microrganismos com potencialidade para os derivados de petróleo (óleo Diesel, gasolina, Bunker e querosene), foram testadas 86 linhagens, dentre as quais 40 são bactérias, 23 são leveduras e 23 são fungos filamentosos. Quando o óleo Diesel foi utilizado como fonte de carbono, 5% (2/40) das quarenta bactérias, 4% (1/23) dos fungos filamentosos e 17% (4/23) das leveduras testadas descoloriram o meio de cultivo com até 24 horas, após a adição do indicador DCPIP. Quando utilizada a gasolina como fonte de carbono, 5% (2/40) das bactérias, 4% (1/23) dos fungos filamentosos e 22% (5/23) das leveduras apresentaram resultado positivo com até 24 horas após adição do indicador. Em relação ao petroderivado bunker 26% (11/40) das bactérias, 13% (3/23) dos fungos filamentosos e 4% (1/23) das linhagens descoloriram o meio com até 24 horas após adição do DCPIP, e quando o querosene foi utilizado como fonte de carbono, 3% (1/40) das bactérias, 23% (6/23) dos fungos filamentosos e 16% (3/23) das leveduras, ocasionaram a descoloração do meio com até 24 horas após a adição do indicador DCPIP, como pode ser visualizado na figura 8.

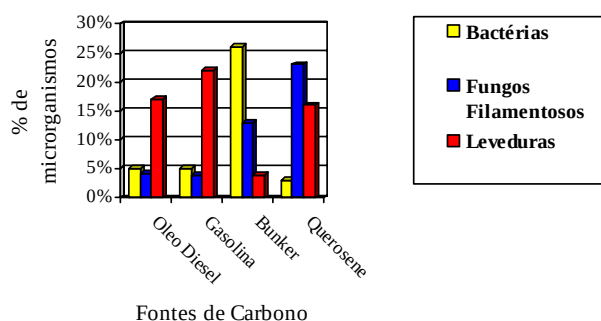


Figura 8. Percentuais de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, com potencialidade para degradar óleo Diesel, gasolina, bunker e querosene.

Richard e Vogel (1999) analisaram a cinética de degradação de óleo Diesel por duas linhagens de *Pseudomonas fluorescens* e constataram que 10,4% e 12,3% dos hidrocarbonetos foram degradados pelas mesmas ao final de 50 dias de experimento. Bento & Gaylard (2001) isolaram, de tanques de estocagem de óleo Diesel, bactérias dos gêneros *Bacillus* sp.

e *Pseudomonas* sp. capazes de crescer em meio mineral de Bushnell-Haas, contendo óleo Diesel como única fonte de carbono. Van Gesel *et al* (2003), testando diferentes tratamentos de biodegradação em solo, isolaram uma linhagem de *Rhodococcus* sp. de solo poluído com óleo Diesel e constataram uma degradação de 85% do referido petroderivado em amostra de solo contaminada pela citada linhagem. Morgan *et al* (1993) estudaram a taxa e a extensão da biodegradação de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) por microrganismos naturais de água subterrânea contaminada com gasolina. Todos os compostos foram degradados sob condições aeróbicas e não houve aumento na degradação quando se elevou a temperatura de incubação em 10°C ou quando suplementos nutricionais orgânicos ou inorgânicos foram adicionados, sendo o oxigênio o maior fator limitante. Sob condições anaeróbicas denitrificantes houve biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno, *m*-xileno e *p*-xileno, mas não de *o*-xileno. Randall e Hemmingsen (1994) utilizaram a técnica de contagem de colônias em placas de Petri (UFC/mL), contendo, isoladamente, tolueno e xileno como únicas fontes de carbono, obtendo quantificações semelhantes em ambas as fontes. Kao e Wang (2001) relataram que em zonas redutoras de ferro (aquífero subterrâneo contaminado com gasolina), tolueno e *o*-xileno são removidos mais rapidamente do que *m*- e *p*-xileno, benzeno e etilbenzeno. Entretanto, em zonas denitrificantes, a ordem da degradação foi tolueno, *m*- e *p*-xileno, etilbenzeno, *o*-xileno e benzeno. Duke *et al* (2000) relataram que a ação microbiana facilitou a sobrevivência de espécies de *Rhizophora stylosa* vegetação típica em solo de mangue contaminado com *bunker* C nos campos de Gladstone, na Austrália. Sharon *et al* (2001) quantificaram a população bacteriana de amostras de solo de praia e avaliaram a biodegradação de *bunker* C neste local durante 50 dias, constatando o início da degradação com dez dias. Jézéquel *et al* (2003) estudaram a biodegradação natural em rochas contaminadas por *bunker*. Prince *et al* (2003) relataram a biodegradação de *bunker* C em 60% da amostra derramada de um navio no Canadá. Nocentini *et al* (2000) contaminaram solos com diferentes petroderivados, entre eles o querosene, e relataram que o microcosmo presente no solo Richard e Vogel (1999) analisaram a cinética de degradação de óleo Diesel por duas linhagens de *Pseudomonas fluorescens* e constataram que 10,4% e 12,3% dos hidrocarbonetos foram degradados pelas mesmas ao final de 50 dias de experimento. Bento & Gaylard (2001) isolaram, de tanques de estocagem de óleo Diesel, bactérias dos gêneros *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. capazes de crescer em meio mineral de Bushnell-Haas, contendo óleo Diesel como única fonte de carbono. Van Gesel *et al* (2003), testando diferentes tratamentos de biodegradação em solo, isolaram uma linhagem de *Rhodococcus* sp. de solo poluído com óleo Diesel e constataram uma degradação de 85% do referido petroderivado em amostra de solo contaminada pela citada linhagem. Morgan *et al* (1993) estudaram a taxa e a extensão da biodegradação de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) por microrganismos naturais de água subterrânea contaminada com gasolina. Todos os compostos foram degradados sob condições aeróbicas e não houve aumento na degradação quando se elevou a temperatura de incubação em 10°C ou quando suplementos nutricionais orgânicos ou inorgânicos foram adicionados, sendo o oxigênio o maior fator limitante. Sob condições anaeróbicas denitrificantes houve biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno, *m*-xileno e *p*-xileno, mas não de *o*-xileno. Randall e Hemmingsen (1994) utilizaram a técnica de contagem de colônias em placas de Petri (UFC/mL), contendo, isoladamente, tolueno e xileno como únicas fontes de carbono, obtendo quantificações semelhantes em ambas as fontes. Kao e Wang (2001) relataram que em zonas redutoras de ferro (aquífero subterrâneo contaminado com gasolina), tolueno e *o*-xileno são removidos mais rapidamente do que *m*- e *p*-xileno, benzeno e etilbenzeno. Entretanto, em zonas denitrificantes, a ordem da degradação foi tolueno, *m*- e *p*-xileno, etilbenzeno, *o*-xileno e benzeno. Duke *et al* (2000) relataram que a ação microbiana facilitou a sobrevivência de espécies de *Rhizophora stylosa* vegetação típica em solo de mangue contaminado com *bunker* C nos campos de Gladstone, na Austrália. Sharon *et al* (2001) quantificaram a população bacteriana de amostras de solo de praia e avaliaram a biodegradação de *bunker* C neste local durante 50 dias, constatando o início da degradação com dez dias. Jézéquel *et al* (2003) estudaram a biodegradação natural em rochas contaminadas por *bunker*. Prince *et al* (2003) relataram a biodegradação de *bunker* C em 60% da amostra derramada de um navio no Canadá. Nocentini *et al* (2000) contaminaram solos com diferentes petroderivados, entre eles o querosene, e relataram que o microcosmo presente no solo degrada quase que totalmente o querosene em 100 dias de experimento.

5. Conclusão

Das amostras poluídas por petroderivados, coletadas na lagoa da Barra (Suape-PE), foram isolados 86 microrganismos, compreendendo 40 bactérias (23 Gram-negativas e 17 Gram-positivas), 23 leveduras e 23 fungos filamentosos, os quais foram testadas quanto à potencialidade de degradar os derivados de petróleo (óleo Diesel, gasolina, *bunker* e querosene, movimentados pelo terminal portuário de Suape-PE. No teste de seleção, verificou-se em todos os grupos microbianos a ocorrência de oxidação biológica com 24 horas de incubação do meio de cultivo a 30 ± 1°C, sinalizada pelo indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP).

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à FINEP/CNPq/CTPETRO pelo apoio financeiro.

7. Referências Bibliográficas

- Atlas, R.M. Fate of Petroleum Pollutants in Arctic Ecosystems. *Water Science Technology*, v. 18(2), p. 59-67, 1986.
- Autry, A. R. & Ellis, G. H. (1992) *Environmental prog.*, v. 11, p. 318-323.
- Baker, K.H. & Herson, D.S., *Microbiology and Biodegradation*, In: Baker, K. H.; Herson, D. S. (Ed). *Bioremediation*, McGraw Hill, Inc: USA, 1994, cap.2, p. 11-60
- Boopathy, R. Factors Limiting Bioremediation Technologies. *BioResource Technology*, v. 72, p. 63-67, 2000.
- Braddock, J.F., Ruth, M.L. Cattedall, P.M. Walworth, J.L., McCarthy, K.A., Enhancement and Inhibition of Microbial Activity in Hydrocarbon Contaminated Arctic Soils: Implication for Nutrient Amended Biorremediation. *Environmental Science Technology*, v 31(7), p. 2078-2084, 1997.
- Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y-h., Grimont, P., Saliot, A. & Oudot, J., Identification and Biodegradation Potential of tropical Hydrocarbon- Degrading Microorganisms. *Research Microbiology*, 2004.
- Crapez, M.A.C.; Borges, A.L.N.; Bispo, M.G.S. & Pereira, D.C., Biorremediação: Tratamento para Derrames de Petróleo. *Ciência Hoje*, v. 30, p. 32-37, 2002.
- Desai, J. D. & Banat, I. M., Microbial Production of Surfactants and their Comercial Potential. *Microbial Molecular Review*, v. 61, p. 47-64, 1997.
- GOMES, E. B. Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-PE. 2004. 104f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco.
- Hart, S. In Situ Bioremediation: Defining the limites. *Environmental Science Technology*, v 30(9), p. 398A-401A, 1996.
- Margesin, R.; Labbé, D.; Schinner, F.; Greer, C.W., and Whyte, L.G. Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populatioes in Contaminated and Pristine Alpine Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v 69, p. 3085-3092, 2003
- Ururahy, A.F.P.; Pereira Jr, N. & Marins, M. D. M. Desempenho de um Biorreator do Tipo CSTR no Processo de Degradação de Borra Oleosa. *Boletim Técnico PETROBRÁS*, Rio de Janeiro, 41 (3/4): 125-132, jul/dez, 1998
- Shaerun, S. H., Takai, K., Asada, R. & Kogure, K., Bioremediation of Coastal Areas 5 Years after the *Nakhodka* Oil Spill in the Sea of Japan: Isolation and Characterization of Hydrocarbon-degrading Bacteria *Environmental International*, 2004.
- Ying X.; Min,H.; Rao, G.; Zhen, M.L.; Ji, l.; Yang,F. & Xue-jun, D. Isolation and Characterization of phenanthrene-degrading. *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodegradation*, v 16, p. 393-402, 2005