



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL
TECNOLOGIA AMBIENTAL E RECURSOS HÍDRICOS

FELIPE FILGUEIRAS DE ALMEIDA

**BIORREMEDIAÇÃO ANAERÓBIA DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL
CONTAMINADO POR FENANTRENO**

Recife

2022



CARACTERIZAÇÃO E SIMULAÇÃO DE RESERVATÓRIOS, ENERGIAS RENOVÁVEIS
E BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

Apoio



Gestão



FELIPE FILGUEIRAS DE ALMEIDA

**BIORREMEDIAÇÃO ANAERÓBIA DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL
CONTAMINADO POR FENANTRENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Bruna Soares Fernandes.

Recife

2022

Catálogo na fonte
Bibliotecária Rosineide Mesquita G. Luz, CRB-4 / 1368

A624b Almeida, Felipe Filgueiras de.
Biorremediação anaeróbia de sedimento de manguezal contaminado por fenantreno - / Felipe Filgueiras de Almeida. – 2022.
68 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sávia Gavazza dos Santos Pessoa.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Bruna Soares Fernandes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2022.

Inclui Referências.

1. Engenharia Civil. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 3. Processos anaeróbios. 4. Biorremediação. 5. Biotransformação. 6. Ecótono marinho. I. Pessoa, Sávia Gavazza dos Santos (Orientadora). II. Fernandes, Bruna Soares (Coorientadora). III. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2022-62

FELIPE FILGUEIRAS DE ALMEIDA

**BIORREMEDIAÇÃO ANAERÓBIA DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL
CONTAMINADO POR FENANTRENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, Área de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Aprovada em 21/02/2022.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sávia Gavazza dos Santos Pessoa - UFPE

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Bruna Soares Fernandes - UFPE

BANCA EXAMINADORA

Participação por videoconferência

Prof^a. Dr^a. Sávia Gavazza dos Santos Pessoa (orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Participação por videoconferência

Prof^a. Dr^a. Giovana Tommaso (examinadora externa)

Universidade de São Paulo

Participação por videoconferência

Prof. Dr. Fabrício Motteran (examinador externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à melhoria da qualidade de vida gerada pela ciência brasileira.

AGRADECIMENTOS

À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, por meio do Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – PRH-ANP/FINEP, pelo apoio financeiro, suportado com recursos provenientes do investimento de empresas petrolíferas qualificadas na Cláusula de P, D&I da Resolução ANP nº 50/2015. Em particular ao PRH 48.1 “Caracterização e Simulação de Reservatórios, Energias renováveis e Biotecnologia Ambiental” (PROCESSO ANP Nº48610.201019/2019-38), do Departamento de Energia Nuclear do Centro de Tecnologia e Geociências da UFPE.

Às minhas orientadoras, Sávia Gavazza e Bruna Fernandes e ao professor Fabrício Motteran, que sempre apoiaram e incentivaram trilhar o duro e lindo caminho que é ser um pesquisador e cientista. Devo a todos os professores e especialmente a vocês cada pedaço de conhecimento que me encantou e me incentiva todos os dias nesse rumo que decidimos tomar. Obrigado.

À minha parceira de linha de pesquisa, Danúbia Freitas, por ter apoiado e me ensinado o “bê-a-bá” do laboratório. Obrigado pela paciência, dedicação e paixão pelo nosso laboratório e pela ciência. Sem sua ajuda este trabalho nunca teria saído do papel.

À banca examinadora composta por Giovana Tommaso e Fabrício Motteran por aceitarem o convite e participar da defesa, além das pertinentes contribuições ao presente trabalho.

A todos os técnicos do LSA, pela paciência, por atender pedidos de inúmeras vidrarias e insumos de última hora, e, por, acima de tudo, ensinar e passar o conhecimento da melhor forma possível.

Ao professor Antonio Antonino, pelo apoio na pesquisa e fornecimento do sedimento do manguezal para análises.

A todos os professores com quem cruzei durante esse percurso, seja em disciplinas, congressos ou reuniões. Com certeza vocês forneceram os pilares para que uma base sólida de conhecimento fosse construída. Agradeço também aos servidores do programa, em especial a Andrea Negromonte, pela ajuda com documentos e procedimentos.

Agradeço também aos meus parceiros de laboratório, Gabs, Osmar, Belle, Luiz, Nanda, Natércia, Jucélia, Devson, Júlio, Manu, Rafael, Vitor, Sofia, Ouci e demais alunos do Laboratório de Saneamento Ambiental, especialmente aos Gavazza et al., que sempre participaram das discussões e pelas trocas realizadas nas reuniões ou no próprio laboratório.

Ver pessoas tão apaixonadas pela ciência quanto eu me considero ser, renova as energias. Obrigado.

Agradeço individualmente a Osmar, Sofia e Natanna, por servirem de exemplo de pesquisadores no qual me inspiro diariamente para alcançar.

Agradeço imensamente aos meus amigos Matheus Paraíso, Luciana Soares e João Nepomuceno, por, dentre inúmeras coisas, apoiarem cada decisão, pessoal ou profissional, escutarem meus choros e rir das minhas piadas. Agradeço-os por serem os melhores amigos que eu poderia ter, irmãos que escolhi.

Obrigado a Carol Leal, que me acompanhou e apoiou por tanto tempo, e, seja como companheira ou amiga, sempre me deu impulso para continuar.

Obrigado à minha família. Minha mãe Sandra Rabêlo, meu pai Júlio Cesar e meu irmão Matheus Filgueiras. Por sempre estarem dispostos a ajudar, pelo amor, carinho e incentivo durante todo esse processo.

Obrigado a toda equipe da UFPE, gestão do LSA e administração do LITPEG, pelas ações tomadas para que as atividades de pesquisa fossem realizadas minimizando os riscos devido a COVID-19, salvando valiosas vidas.

Por fim, faço em forma de citação um trecho de agradecimento da dissertação de um dos meus melhores amigos, Matheus Paraíso, visto que não encontrei palavras nem de perto tão adequadas quanto as usadas por ele: *“Gostaria de agradecer a todos os profissionais da linha de frente ao combate da pandemia de COVID-19. Obrigado por arriscarem suas vidas para tentar salvar de tantos outros e de conter o aumento no número de casos quando não há nem o mínimo de suporte para o vosso trabalho. Viva o SUS e que o SUS viva.”*

RESUMO

Biomassas sensíveis, como os ecossistemas costeiros, têm se tornado cada vez mais suscetíveis aos impactos ambientais causados pela logística e armazenamento do petróleo, que, embora mais eficientes nos dias de hoje, ainda causam derramamentos. Assim, as técnicas de biorremediação chamam a atenção pelo baixo impacto no meio ambiente. Dentre os compostos derivados do petróleo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são conhecidos por seu potencial de impacto e persistência no meio ambiente. Portanto, a bioaugmentação e atenuação natural de HPAs são, notadamente, técnicas capazes de mitigar os efeitos desses compostos poluentes no meio ambiente. No entanto, há ainda lacunas de compreensão das condições do processo de crescimento microbiano, que podem resultar em escolhas pouco eficientes dos métodos de biorremediação. Visando contribuir para diminuir esta lacuna, neste estudo foi utilizado sedimento proveniente do manguezal do rio Massangana, em Suape, Pernambuco para montagem de reatores biológicos anaeróbios, artificialmente contaminados com Fenantreno (100mg/kg de sedimento). Lodo petroquímico e têxtil foram utilizados como inóculo. Os reatores foram operados com adição de inóculo (bioaugmentação) e sem esta adição (atenuação natural). As análises foram efetuadas utilizando reatores de sacrifício, monitorando o consumo do composto de interesse por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este estudo sugere que a degradação anaeróbia de sedimentos contaminados por Fenantreno, permitiram a diminuição na concentração em mais de 35% em 80 dias de experimento. O modelo cinético de primeira ordem foi o que melhor representou a degradação do Fenantreno, sendo a melhor condição obtida com inóculo petroquímico, com constante cinética (k_1) de 0,0078 d⁻¹. Diversos gêneros microbianos relacionados com degradação de HPAs foram encontrados nas amostras dos inóculos, no término da operação dos reatores de bioaugmentação e de atenuação natural. Merece destaque a presença dos gêneros *Thiobacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*. Dessa forma, a bioaugmentação com o uso de culturas anaeróbias do sedimento de estudo, quando contaminado por Fenantreno e, potencialmente por outros HPAs, é uma estratégia promissora e que deve ser melhor estudada a fim de minimizar impactos na remediação de áreas afetadas por acidentes ambientais.

Palavras-chave: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; processos anaeróbios; biorremediação; biotransformação; ecótono marinho.

ABSTRACT

Sensitive biomes, such as coastal ecosystems, have become increasingly susceptible to the environmental impacts caused by oil logistics and storage, which, although more efficient today, still cause spills. Thus, bioremediation techniques draw attention for their low impact on the environment. Among the compounds derived from petroleum, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are known for their potential impact and persistence in the environment. Therefore, the bioaugmentation and natural attenuation of PAHs are, notably, techniques capable of mitigating the effects of these polluting compounds in the environment. However, there are still gaps in understanding the conditions of the microbial growth process, which can result in inefficient choices of bioremediation methods. Aiming to contribute to reduce this gap, in this study, sediment from the Massangana river mangrove, in Suape, Pernambuco, was used to assemble anaerobic biological reactors, artificially contaminated with Phenanthrene (100mg/kg of sediment). Petrochemical and textile sludge were used as inoculum. The reactors were operated with the addition of inoculum (bioaugmentation) and without this addition (natural attenuation). The analyzes were performed using sacrificial reactors, monitoring the consumption of the compound of interest by means of high-performance liquid chromatography (HPLC). This study suggests that the anaerobic degradation of sediments contaminated by Phenanthrene, allowed a decrease in concentration by more than 35% in 80 days of experiment. The first order kinetic model was the one that best represented the degradation of Phenanthrene, being the best condition obtained with petrochemical inoculum, with kinetic constant (k_1) of 0.0078 d⁻¹. Several microbial genera related to PAH degradation were found in the inoculum samples, at the end of the operation of the bioaugmentation and natural attenuation reactors. The presence of the genera *Thiobacillus*, *Clostridium* and *Desulfotomaculum* deserves to be highlighted. Thus, bioaugmentation with the use of anaerobic cultures of the study sediment, when contaminated by Phenanthrene and, potentially by other PAHs, is a promising strategy that should be better studied in order to minimize impacts in the remediation of areas affected by environmental accidents.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons; anaerobic processes; bioremediation; biotransformation; marine ecotone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química dos 16 HPA considerados poluentes prioritários pela EPA.....	16
Figura 2 –	Local de coleta do sedimento.....	31
Figura 3 –	Esquema de montagem dos microcosmos de degradação de Fenantreno.....	33
Figura 4 –	Reatores biológicos com inóculos petroquímicos e têxtil após montagem.....	34
Figura 5 –	Monitoramento de Produção de Biogás para Reativação - Lodo Petroquímico.....	40
Figura 6 –	Monitoramento de Produção de Biogás para Reativação - Lodo Têxtil.....	40
Figura 7 –	Cinética de produção de biogás para a reativação do lodo petroquímico.....	41
Figura 8 –	Cinética de produção de biogás para a reativação do lodo têxtil....	42
Figura 9 –	Cromatograma exemplo da análise do Fenantreno em amostra de sedimento.....	43
Figura 10 –	Estrutura química dos 16 HPA considerados poluentes prioritários pela EPA.....	43
Figura 11 –	Local de coleta do sedimento.....	45
Figura 12 –	Esquema de montagem dos microcosmos de degradação de Fenantreno.....	46
Figura 13 –	Reatores biológicos com inóculos petroquímicos e têxtil após montagem.....	50
Figura 14 –	Monitoramento de Produção de Biogás para Reativação - Lodo Petroquímico.....	52
Figura 15 –	Monitoramento de Produção de Biogás para Reativação - Lodo Têxtil.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores orientadores de concentrações de HPA em sedimentos marinhos e de água doce, solo e na coluna d’água (água doce) no Canadá.....	17
Tabela 2 –	Valores orientadores de concentração de HPA em sedimentos (marinho e de água doce) e na coluna d’água (água doce e marinha) nos EUA.....	18
Tabela 3 –	Propriedades físico-químicas dos HPAs prioritários.....	19
Tabela 4 –	Dez principais acidentes em manguezais de acordo com área afetada.....	21
Tabela 5 –	Concentrações dos compostos no meio nutricional.....	30
Tabela 6 –	Caracterização granulométrica do sedimento utilizado.....	31
Tabela 7 –	Taxas de consumo de primeira ordem (k_1) e coeficiente R^2 para as diferentes condições de degradação de Fenantreno.....	47
Tabela 8 –	Taxas de consumo de degradação rápida (k_1) e degradação lenta (k) e coeficiente R^2 para as diferentes condições de degradação de Fenantreno de acordo com a cinética de degradação bifásica....	47
Tabela 9 –	Índices de diversidade para o sedimento e nos reatores biológicos de bioaumentação e atenuação natural, em âmbito de gênero.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Abundância Relativa
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
Chao-1	Indicador de Riqueza
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
D	Índice de dominância de Simpson
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fl	Fluoreno
FEN	Fenantreno
Pir	Pireno
H	Índice de Shanon
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPLC	Cromatógrafo líquido de alta eficiência
ITOPF	International Tanker Owners Pollution Federation Limited
J	Índice de equitabilidade
K	Coefficiente cinético de decaimento
PBDE	Éteres difenílicos polibromados
pH	Potencial hidrogeniônico
rRna	Ácido ribonucleico ribossômico
R ²	Qualidade do ajuste
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
T	Tempo
t _{1/2}	Tempo de meia vida
U.S. EPA	Agência de Proteção Ambiental Norte-americana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	UMA VISÃO GERAL SOBRE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	15
2.2	HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÕES.....	19
2.3	ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO.....	23
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	METODOLOGIA.....	29
4.1	REAGENTES QUÍMICOS UTILIZADOS.....	29
4.2	INÓCULO E MEIO DE NUTRIENTES.....	29
4.3	CONFIGURAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	30
4.3.1	Sedimento do rio Massangana.....	30
4.3.2	Reativação dos lodos de inoculação.....	31
4.3.3	Montagem dos reatores.....	32
4.3.4	Procedimento analítico para determinação do Fenantreno em amostras de sedimento.....	34
4.5	AJUSTE DE PARÂMETROS CINÉTICOS.....	36
4.6	ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	REATIVAÇÃO DOS INÓCULOS.....	39
5.2	RESULTADOS DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DO FENANTRENO.....	42
5.3	DEGRADAÇÃO DO FENANTRENO.....	44
5.4	COMUNIDADE MICROBIANA.....	48
5.5	IMPLICAÇÕES TECNOLÓGICAS.....	57
6	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos presentes em petróleo e são consideradas substâncias poluentes prioritárias por instituições globais de controle ambiental (MULABAGAL et al., 2013). Alguns HPAs, incluindo o Fenantreno, estão associados à ocorrência de câncer em humanos e animais aquáticos e podem causar mutagenicidade em organismos presentes em solo contaminado e sedimentos. Além do impacto ambiental, contaminações por derivados de petróleo podem ter impacto econômico no turismo e na economia pesqueira, como ocorreu com o derramamento de Deepwater Horizon, na costa do Golfo do México, em que as partes responsáveis foram obrigadas a compensar economicamente as vítimas (OMOKHAGBOR ADAMS et al., 2015).

De agosto de 2019 a janeiro de 2020, grande quantidade de óleo foi encontrada ao longo de aproximadamente 3.000 km de costa brasileira, indo da costa norte à costa sudeste. Apesar de ser um acontecimento catastrófico, diversos outros derramamentos petrolíferos bastante significantes aconteceram em solo Brasileiro: Tarik Ibn Ziyad em 1975 (6 mil toneladas de óleo); Manguezal do Rio Iriri em 1983 (3.5 milhões de litros); Repar 2000 (4 milhões de litros); Reduc 2000 (1.3 milhões de litros); Bacia de Campos em 2001 (1200 m³ de óleo diesel e 350 m³ de petróleo bruto); OSBAT em 2004 (266 m³ de petróleo); Saga Mascot, 2005 (14 mil litros); Orla de Tramandaí em 2012 (33.6 mil litros de óleo); Tebig 2015 (852 litros) e diversos outros.

Apesar dos enormes esforços aplicados para remoção dos resíduos de petróleo nas áreas afetadas, a remoção manual ou mecânica sozinha não remove toda contaminação, sendo então necessário o uso de remediação química ou biológica. Principalmente se tratando de áreas sensíveis como manguezais, devido à sua heterogeneidade, a biorremediação é identificada como o método mais apropriado (KATHIRESAN; QASIM, 2005; MOREIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2011). Como se apenas sua sensibilidade a agressões externas não bastasse, este tipo de ecossistema possui importante tarefa na proteção costeira e estabilização de erosão, agindo como barreiras ao cisalhamento provocado pelo vento em áreas posteriores, além de manter a qualidade da água costeira estável, capturando sedimentos contaminantes através das raízes da vegetação (HOFF et al., 2014).

Dentre as técnicas utilizadas para a mitigação dos impactos decorrentes de derramamentos, a biorremediação se destaca pelo baixo impacto ambiental, principalmente se tratando de áreas sensíveis, como manguezais, onde ações de remediação física geram grande impacto ambiental perante a macro e microfauna local. A biorremediação é um processo que ocorre naturalmente ou artificialmente, tomando como base os microrganismos ou seus

subprodutos para reduzir os contaminantes no sistema. O uso dessa técnica já tem sido relatado, principalmente na literatura internacional (KE et al., 2005; LANG et al., 2016). Entretanto, ainda é pouco abordada a degradação de HPAs em ambientes anaeróbios com utilização de sedimento.

Neste contexto, é possível notar que diversos fatores, tais como pH, temperatura, concentração do aceptor de elétron e condições nutricionais podem afetar o desempenho da biorremediação (SANTOS et al., 2011; TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011). O oxigênio é relatado na literatura como o principal aceptor de elétrons na degradação de HPAs em sistemas ex situ, o qual proporciona o menor tempo para a degradação destes compostos devido a presença da microbiota aeróbia. Porém, sua ocorrência in situ é limitada pela camada superficial quando se trata de solos pouco porosos, tais como manguezais, demonstrando a relevância de estudos e da otimização de sistemas sob condições anaeróbias.

Alguns estudos sobre biorremediação de manguezais têm sido relatados principalmente na literatura internacional. (RAMSAY et al., 2000) relataram que a aeração ativa e a adição de fertilizantes de liberação lenta estimularam significativamente o crescimento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos em sedimentos de mangue contaminados com óleo. (YU et al., 2005) compararam a eficiência de degradação de uma mistura contendo os HPAs fluoreno (Fl), fenantreno (Phe) e pireno (Pyr) por atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação em sedimentos de mangue.

Tendo em pauta então os efeitos dessa classe de compostos e a dificuldade encontrada na sua remoção do meio ambiente, principalmente em ambientes mais vulneráveis, o presente estudo pretendeu contribuir para o entendimento do processo de biorremediação de sedimento de manguezal, contaminado por Fenantreno, em ambiente anaeróbio. Um entendimento mais aprofundado dos processos anaeróbios pode auxiliar na elucidação dos mecanismos de degradação microbiológica desse composto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

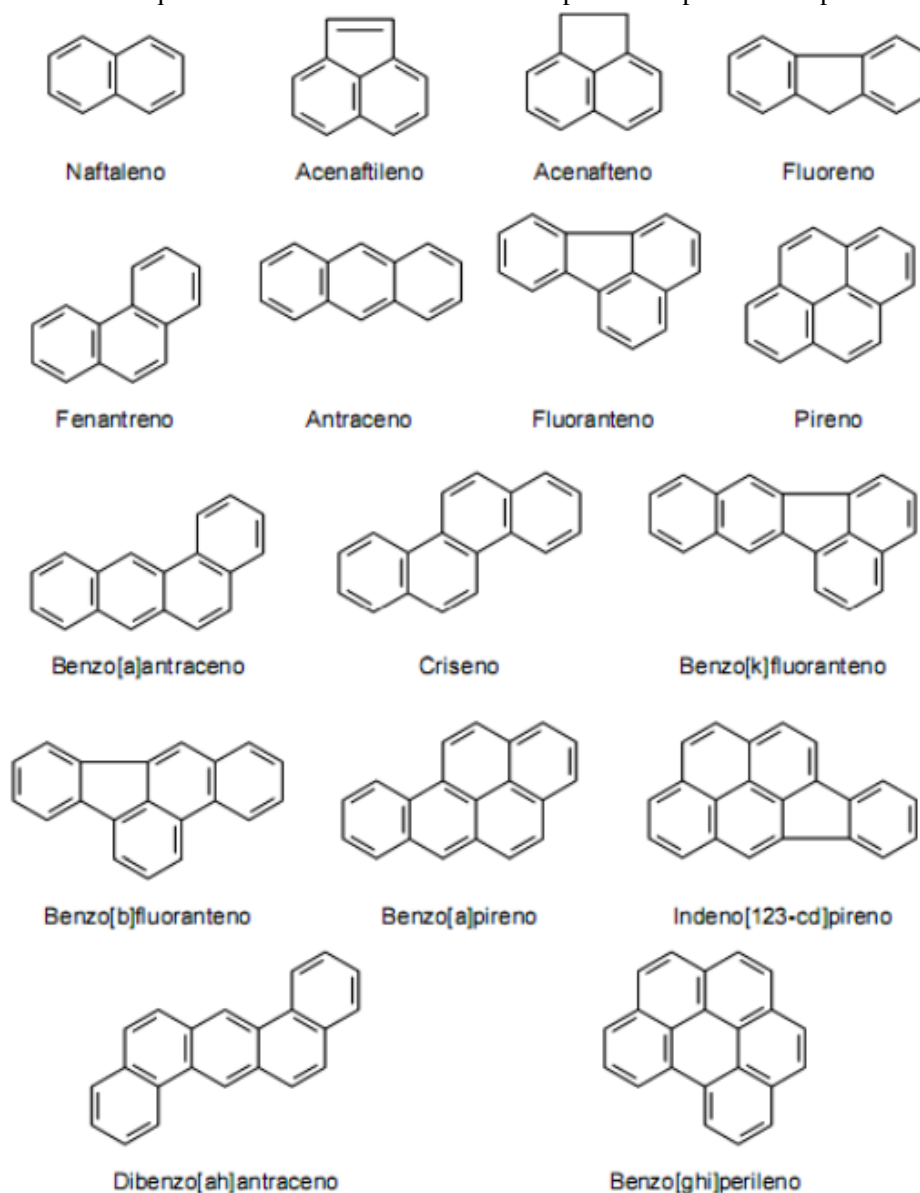
Para melhor se entender o contexto que esse estudo se propõe a discutir, primeiro se deve introduzir noções sobre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, suas ocorrências, e as estratégias de biorremediação.

2.1 UMA VISÃO GERAL SOBRE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) formam uma classe de compostos oriundos da degradação incompleta de combustíveis fósseis, e estão amplamente presentes na natureza (CERNIGLIA, 1993) . Além disso, alguns deles são associados com a ocorrência de câncer em humanos e animais, podem causar mutações em organismos presentes no ambiente contaminado e são hidrofóbicos e recalcitrantes, podendo permanecer no ambiente por anos. Os HPAs, devido a essas características, são considerados poluentes prioritários pelos órgãos de controle internacional (BEIRAS, 2018; EPA, 2008; MULABAGAL et al., 2013; QI et al., 2017).

Existem mais de 100 combinações de HPAs, entretanto, em 1997 a Agência de Proteção Ambiental Norte-americana (U.S. EPA) juntamente com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) elaborou uma lista conhecida como *Priorit List*, elencando as substâncias potencialmente perigosas para os seres humanos. A partir dessa lista a EPA priorizou 16 HPAs em seus estudos, devido à sua grande ocorrência na natureza, toxicidade e exposição humana, sendo recomendados para análises de sedimentos. São esses compostos: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, Fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno. A estrutura química dos 16 HPAs prioritários está disposta na Figura 1.

Figura 1- Estrutura química dos 16 HPA considerados poluentes prioritários pela EPA.



Fonte: (EPA, 2008)

HPAs são classificados em duas categorias, de acordo com seu número de anéis: HPAs de baixo peso molecular e HPAs de alto peso molecular. A primeira categoria tende a ter em sua estrutura dois ou três anéis aromáticos (por exemplo: naftaleno, acenaftaleno, acenaftileno, fluoreno, antraceno e Fenantreno) já os HPAs de alto peso molecular têm em sua composição mais de quatro anéis aromáticos, como o fluoranteno, pireno, benzo(a)pireno e os benzofluorantenos.

Devido ao seu alto potencial de carcinogenicidade e mutagenicidade, algumas instituições internacionais estabeleceram valores de referência para HPAs nos diversos tipos de solo (Tabela 1 e Tabela 2). É possível notar valores limites de próximos a 500 ng g^{-1} ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) para o Fenantreno em todos os limites internacionais, valores estes inferiores aos

comumente utilizados em experimentos de biorremediação, próximos a 100 mg kg^{-1} , mais próximo de valores de contaminações reais (BUCHMAN, 2008; CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT, 2001; MENICONI, 2007).

Tabela 1 - Valores orientadores de concentrações de HPA em sedimentos marinhos e de água doce, solo e na coluna d'água (água doce) no Canadá.

Composto	Sedimento de Água Doce (ng g^{-1})		Sedimento de Água Marinha (ng g^{-1})		Solo (mg kg^{-1})	Água Doce ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	ISQG	PEL	ISQG	PEL	Agricultura	Vida aquática
Naftaleno	34,6	391,0	34,6	391,0	0,1	1,1
Acenaftileno	5,87	128,0	5,87	128,0	-	-
Acenafteno	6,71	88,9	6,71	88,9	-	5,8
Fluoreno	21,2	144,0	21,2	144,0	-	3,0
Fenantreno	41,9	515,0	86,7	544,0	0,1	0,4
Antraceno	46,9	245,0	46,9	245,0	-	0,012
Fluoranteno	111,0	2355,0	113,0	1494,0	-	0,04
Pireno	53,0	875,0	153,0	1398,0	0,1	0,025
Benzo(a)antraceno	31,7	385,0	74,8	693,0	0,1	0,018
Criseno	57,1	862,0	108,0	846,0	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	0,1	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	-	0,1	-
Benzo(a)pireno	31,9	782,0	88,8	763,0	0,1	0,015
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	-	-	-	-	0,1	-
Dibenzo(a,h)antraceno	6,22	135,0	6,22	135,0	0,1	-
Benzo(ghi)perileno	-	-	-	-	-	-
2-Metil naftaleno*	20,2	201	20,2	201,0	-	-

ISQG: Diretrizes provisórias de qualidade de sedimentos; PEL: Limite de exposição permitido. Destaque para o fenantreno, composto de interesse deste estudo

Fonte: CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT, (2001)

Tabela 2 - Valores orientadores de concentração de HPA em sedimentos (marinho e de água doce) e na coluna d'água (água doce e marinha) nos EUA.

Composto	Sedimento de Água Doce (ng g ⁻¹)			Sedimento de Água Marinha (ng g ⁻¹)				Água Marinha (µg L ⁻¹)
	TEL	PEL	UET	TEL	ERL	PEL	AET	CMC
Naftaleno	34,6	391	600	34,6	160	391	230	2350
Acenaftileno	5,87	128	160	5,87	44	128	71	300
Acenafteno	6,71	88,9	290	6,71	16	88,9	130	970
Fluoreno	21,2	144	300	21,2	19	144	120	300
Fenantreno	41,9	515	800	86,7	240	544	660	7.7
Antraceno	46,9	245	160	46,9	85,3	254	280	300
Fluoranteno	111	2355	1500	113	600	1494	1300	40
Pireno	53	875	1000	153	665	1398	2400	300
Benzo(a)antraceno	31,7	385	500	74,8	261	639	960	300
Criseno	57,1	862	800	108	384	846	950	300
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	-	-	1800	300
Benzo(k)fluoranteno	-	-	13400	-	-	-	1800	300
Benzo(a)pireno	31,9	782	700	88,8	430	763	1100	300
Indeno(1,2,3-c,d)pireno								300
Dibenzo(a,h)antraceno	6,22	135	100	6,22	63,4	135	230	300
Benzo(ghi)perileno	-	-	300	-	-	-	670	300
HPAs Totais	-	-	12000	1684	4022	16770	-	300

TEL: Diretrizes provisórias de qualidade de sedimentos; PEL: Limite de exposição permitido; UET: Limiares de efeitos superiores; ERL: Limites de ecotoxicidade; AET: Limites de efeitos aparentes

Destaque para o fenantreno, composto de interesse deste estudo

Fonte: BUCHMAN, (2008)

Já no Brasil, as definições são feitas a partir da resolução CONAMA nº 357, onde são definidas as concentrações dos HPAs Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)antraceno em águas doces, salinas e salobras e de acordo com os padrões de qualidade de água. Para todos os HPAs citados acima, para corpos hídricos de água doce, os limites são de 0,05 µg L⁻¹ ou de 0,018 µg L⁻¹ para corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo. Já para potabilidade, apenas o Benzo(a)pireno é levado em conta, com limite de 0,7 µg L⁻¹ para enquadramento como classe III.

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos têm baixa solubilidade em água, parâmetro que ainda diminui de acordo com o aumento de massa molar (ou número de anéis aromáticos), como é possível observar na Tabela 3. Dentre os 16 principais HPAs, apenas o Naftaleno é classificado como composto semivolátil, devido a sua elevada pressão de vapor quando comparado aos demais HPAs. O parâmetro log do Coeficiente de partição octanol/água – (Kow), utilizado para medir a relação entre a solubilidade em solventes orgânicos e a

solubilidade em água, mostra que essa classe de compostos tem baixa solubilidade em água e propriedades hidrofóbica. Logo, sabe-se então que os HPAs tendem a adsorver na matéria orgânica sólida em suspensão e/ou depositados em sedimentos, ressaltando a importância dos sedimentos como depósitos desses compostos (BUDZINSKI et al., 1997; GARRIGUES et al., 1995).

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos HPAs prioritários

Composto	*1 	Massa Molar (g/mol)	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Pressão de Vapor (Pa a 25°C)	Log do coeficiente de partição octanol/água (Kow)	Constante de Henry (Pa.m ³ /mol)
Naftaleno	2	128,171	80,260	217,900	10,400	3,370	43,000
Acenaftileno	3	150,192	91,800	280,000	0,900	4,000	8,396
Acenafteno	3	154,207	93,400	279,000	0,900	3,920	12,170
Fluoreno	3	166,218	114,770	295,000	0,090	4,180	7,873
Fenantreno	3	178,229	99,240	340,000	0,020	4,570	3,240
Antraceno	3	178,229	215,760	339,900	0,001	4,540	3,961
Fluoranteno	4	202,250	110,190	384,000	0,001230	5,220	0,957
Pireno	4	202,250	150,620	404,000	0,0006	5,180	0,919
Benzo(a)antraceno	4	228,288	1660,500	438,000	2,18E-05	5,910	0,581
Criseno	4	228,288	255,500	448,000	5,70E-07	5,600	0,065
Benzo(b)fluoranteno	5	252,309	168,000	481,000	-	5,800	-
Benzo(k)fluoranteno	5	252,309	217,000	480,000	5,20E-08	6,000	0,016
Benzo(a)pireno	5	252,309	181,100	495,000	7,00E-08	6,040	0,046
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	6	276,330	162,000	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	5	278,346	269,500	524,000	3,70E-10	6,750	1,72E-04
Benzo(ghi)perileno	6	276,330	272,500	-	-	6,500	-

Destaque para o fenantreno, composto de interesse deste estudo

*1 Se refere ao número de anéis aromáticos do composto

Fonte: MACKAY et al., (2006)

Além disso, Mackay et al., (2006) também exibe valores de meia-vida dos HPAs em diferentes meios. O tempo de meia-vida também aumenta de acordo com a massa molecular e o número de anéis. Quando se trata do meio aquoso, o tempo de meia-vida varia entre 1 semana e 2 meses, entretanto, ao se referir a sedimentos, os HPAs listados pelo autor demoram entre 8 meses e 6 anos para que sua massa caia à metade da massa inicial.

1.2 HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÕES

De acordo com a classificação do ITOPF (*International Tanker Owners Pollution Federation Limited*), os derramamentos de óleo podem ser classificados em pequenos, médios

e grandes (menores que 7 toneladas; 7 a 700 toneladas e mais de 700 toneladas, respectivamente). Nos últimos quarenta anos mais de 15 derramamentos de médio a grande porte resultaram em aproximadamente 2,5 milhões de toneladas despejados em alto mar, afetando mangues, praias, vida marinha e a subsistência de diversas pessoas (CEDRE, 2020; ITOPF, 2020). De Almeida et al., (2021) mostraram, em levantamento bibliográfico, que mesmo que a frequência dos derramamentos tenha diminuído, o volume derramado tem crescido. Tal fato se dá devido ao aumento da atenção aos vazamentos de óleo e o avanço na tecnologia de transporte e armazenagem de petróleo e seus derivados.

O maior vazamento de óleo da história ocorreu em 2010, quando a plataforma *Deepwater Horizon* explodiu, liberando 779000 toneladas de óleo no Golfo do México, Estados Unidos (ITOPF, 2020).

O Brasil possui cerca de 1400000 de hectares de manguezais, sendo que foram reportadas contaminações por petróleo em toda a costa do Nordeste chegando a atingir o estado do Rio de Janeiro. Isso representa um potencial de poluição de 51% das áreas dos manguezais nacionais (ATLAS DOS MANGUEZAIS DO BRASIL, 2018). Na literatura internacional, Duke, (2016) reportou ao menos 238 ocorrências entre 1960 a 2016. Os 10 principais derramamentos petrolíferos que afetaram manguezais estão listados na Tabela 4. Mais de 5,5 milhões de toneladas atingiram aproximadamente 1,94 milhões de hectares de ecossistema de manguezal, demonstrando a relevância de se estudar mecanismos de descontaminação desses locais, como por exemplo, por meio da biorremediação.

Na década de 1980, ocorreram seis importantes desastres ambientais, responsáveis por mais de 1100 toneladas de derramamento de óleo nos mares da Grécia, África do Sul, Mar do Norte, Canadá, Estados Unidos e Espanha. Nas décadas subsequentes, o número total de acidentes de média a alta gravidade diminuiu. Na década de 1990, ocorreram três acidentes em Angola, Itália e França, onde cerca de 221 mil toneladas de óleo foram lançadas no meio ambiente, causando danos significativos à fauna, pesca, maricultura e turismo. No início dos anos 2000, foram identificados quatro grandes acidentes de petróleo com aproximadamente 293000 toneladas de petróleo despejados, sendo de grande importância no contexto ambiental da Espanha, Paquistão, Brasil e Coreia. Na última década, três derramamentos envolvendo as costas dos Estados Unidos, China e Brasil foram de extrema importância nesse contexto, em que mais de 800000 toneladas de óleo foram despejadas no mar (CEDRE, 2020; ITOPF, 2020).

Tabela 4 - Dez principais acidentes em manguezais de acordo com área afetada

Derramamento	Ano, País	Características do Óleo	Massa despejada (t)	Área de manguezal afetada (ha)
Witwater	1968, Panama	Diesel	2544	49
Showa Maru	1975, Indonesia	Óleo cru	7.367	20
Poço Funiwa 5	1980, Nigeria	Óleo cru	57400	5.107
Rompimento de Tubulação	1983, Brasil	Óleo cru	3000	300
Tanque de Combustível JP-5 na Estrada Roosevelt	1986, Puerto Rico	Combustível de Jato	185	60
Refinaria de óleo Texaco	1986, Panama	Óleo cru	6400	377
Tanque de Combustível JP-5 na Estrada Roosevelt	1999, Porto Rico	Combustível de Jato	352	20
Kyowa Violet	2002, Micronesia	Óleo combustível intermediário	10000	1000
Sabotagem de Tubulação	2011, Nigeria	Óleo cru	1600	366

Fonte: Duke, (2016)

Diversos acidentes petrolíferos tem ocorrido em costas e solo brasileiro ao longo dos anos, entretanto, existem lacunas de informação consolidada sobre os mesmos. Dentre os inúmeros acidentes ocorridos, apenas na década de 1970, pelo menos quatro grandes desastres aconteceram: o naufrágio dos petroleiros Sinclair Petrolore (1970), Takimya Maru (1974), Brazilian Marina (1978) e o Tarik Ibn Ziyad (1975). Em janeiro de 2000, ocorreu um dos maiores acidentes petrolíferos nacionais, o rompimento do oleoduto na Baía da Guanabara, e já em março de 2001, aconteceu o naufrágio da plataforma P36 na Bacia de Campos (ANP, 2001). Recentemente, no final de 2019, óleo cru atingiu mais de 3000 km de costa do nordeste brasileiro, atingindo um total de 11 estados em 900 localidades, se tornando o desastre mais extenso e severo da história do país. Diversas instituições brasileiras e envolveram na remediação física das localidades afetadas, removendo mais de 5000 toneladas de resíduos oleosos de praias, manguezais e corais (BRUM; CAMPOS-SILVA; OLIVEIRA, 2020).

É importante ressaltar que mesmo após décadas de um derramamento de petróleo, é possível ainda encontrar um ambiente degradado, com fauna e flora afetados pelo derramamento inicial, como no caso reportado por Santos et al. (2012) onde foram avaliadas através de geoprocessamento imagens satelitárias entre os anos de 1962 e 2003, constatando que o derramamento de 1983 no manguezal da baixada santista afetou nitidamente a cobertura

vegetal ao longo dos anos avaliados. Além disso, Santa-cruz, (2004) relata que ainda existiam manchas de petróleo retidas no sedimento do manguezal mais de 20 anos após o derramamento.

Em relação à concentração, (ARAÚJO; RAMALHO; MELO, 2020) relataram concentração total de HPAs (38 compostos, incluindo seis grupos alquil) variando de 34,4 a 977,3 ng g⁻¹ em sedimentos de manguezais contaminados ao longo da costa brasileira. Considerando apenas os 16 HPAs listados pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), a concentração variou de 5,9 a 129,5 ng g⁻¹. Os maiores valores foram encontrados no rio Suruí, no Rio de Janeiro, próximo à Bacia da Guanabara, e está associado à indústria do petróleo e às atividades no terminal portuário (FARIAS et al., 2008).

A maioria dos relatórios sobre derramamentos de óleo disponíveis em bancos de dados online, como CEDRE e ITOPF, possivelmente não apresentam todas as áreas impactadas por acidentes. Na maioria dos casos, eles relatam volumes gerais de óleo lançados no meio ambiente, e pouco é relatado sobre os efeitos e contaminação em manguezais.

Segundo relatório de desmobilização do IBAMA sobre o acidente na costa brasileira de 2019, em janeiro de 2020 deu-se início à fase de limpeza residual e acompanhamento dos vestígios. Entretanto, segundo o mesmo relatório, locais ambientalmente sensíveis como manguezais, foram estabelecidos pontos de término (locais onde as ações intensivas de remediação seriam finalizadas) mesmo com a presença expressiva de óleo na área. Tal medida se justifica por conta da penetração do óleo em camadas mais profundas causada pela remoção manual e mecânica utilizadas pelas equipes do IBAMA (IBAMA, 2019a). Além disso, nas demais áreas afetadas, pontos de término são estabelecidos através de três inspeções visuais com óleo não observado, em três semanas consecutivas e na maré baixa (IBAMA, 2019b).

Em relação aos impactos causados por derramamentos de óleo no meio ambiente, a localização da contaminação é um fator extremamente importante, pois algumas áreas têm maior capacidade de absorção de óleo do que outras (CHEN et al., 2019; PATIN, 2013). Assim, mesmo pequenos derramamentos de óleo em uma área sensível (geralmente áreas costeiras) podem ter um grande impacto ambiental, como os causados pelos petroleiros Exxon Valdez, Erika, Hebei Spirit e Tasman Spirit, que resultaram em graves danos à fauna, pesca, maricultura e turismo (CEDRE, 2020; ITOPF, 2020).

Em 2 de setembro de 2019 o Plano Nacional de Contingência (PNC) para incidentes de poluição por óleo em águas nacionais deveria ter sido instituído, dado que nessa data o derramamento já havia afetado Pernambuco, Sergipe e Paraíba, com um total 19 praias atingidas, entretanto o PNC só foi oficialmente formalizado 41 dias depois, em 11 de outubro (CONGRESSO NACIONAL, 2019). Essas inércia e negligência governamentais, associadas a

um desastre em grande escala pode ter amplificado os impactos sociais, econômicos e ambientais (SOARES et al., 2020). Dessa forma, é imprescindível que medidas como o PNC, munidas de técnicas científicas efetivas sejam implantadas e acionadas o mais rápido possível em casos similares ao derramamento de 2019 no Brasil.

Logo, é visível que, principalmente se tratando de áreas sensíveis, é imprescindível ter preparadas medidas de mitigação à impactos deste nível. O estudo biorremediação aparece então como uma oportunidade de solucionar este tipo de problemas em áreas tão sensíveis como os manguezais.

1.3 ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO

Existem vários métodos de remediação para mitigar os impactos causados por derramamentos de óleo e seus produtos. Isso inclui métodos físicos, químicos e biológicos. Os processos físicos comumente usados são remoções mecânicas e manuais, lavagem, realocação de sedimentos e contenção física. Embora esses processos sejam comumente usados como a primeira opção de resposta, eles raramente podem limpar completamente as áreas impactadas pelo derramamento de óleo (ZHU; SUIDAN; VENOSA, 2004a).

Devido à baixa solubilidade da maioria dos hidrocarbonetos de petróleo em água, a biodegradação desses compostos ocorre na interface hidrocarboneto-água. Assim, a área de superfície em relação ao volume de óleo pode afetar significativamente a taxa de biodegradação (ATLAS; HAZEN, 2011). No entanto, o uso de dispersantes para diminuir a concentração do óleo em águas próximas a habitats costeiros pode exercer efeitos tóxicos nas comunidades existentes de animais marinhos e vegetação (ZHU et al., 2004; ZHU; SUIDAN; VENOSA, 2004b).

A biorremediação pode ser feita *in situ*, isto é, no local da contaminação ou *ex situ*, quando o sedimento ou material contaminado é retirado e levado a um local de tratamento. O monitoramento *ex situ* permite um monitoramento mais fácil e controlado, fazendo com que o processo de mineralização ou degradação do composto alvo ocorra mais rapidamente. Entretanto, na biorremediação *ex situ* custos de remoção, transporte e armazenagem passam a existir, além da possibilidade de uma contaminação no local de armazenamento, caso medidas de segurança não sejam tomadas. Já nas estratégias *in situ* não é requerido a remoção do contaminante do local, logo, bioaumentação ou bioestimulação é aplicada. A bioaumentação consiste na adição de microrganismos ou consórcios microbianos autóctones capazes de degradar o composto alvo, podendo ser da mesma espécie dos já existentes no local ou de outras espécies.

Já a bioestimulação consiste na adição de aceptores de elétrons ou nutrientes de forma a proporcionar o aumento da população microbiana ou um estímulo na sua atividade. Entretanto, as estratégias *in situ*, seja bioaumentação ou bioestimulação, tendem a ser mais difíceis de monitorar e controlar o processo, devido à interferência de diversos fatores ambientais, como chuva, marés, evaporação e percolação (MARGESIN; SCHINNER, 2001; OMOKHAGBOR ADAMS et al., 2015; THAKKAR; VINCENT, 2021).

A biorremediação explora a diversidade microbiana e a capacidade metabólica dos microrganismos para transformar contaminantes em produtos finais menos tóxicos. A biodegradação bem-sucedida de contaminantes de óleo depende da presença de microrganismos específicos e de condições ambientais adequadas. A biorremediação é considerada a técnica de remediação menos agressiva para o meio ambiente e a mais adequada para manter o equilíbrio ecológico (GOVARTHANAN et al., 2020). No entanto, a biorremediação de manguezais é muito mais complexa principalmente por causa da forte influência dos ciclos de marés, deslocando os sedimentos entre condições aeróbias e anaeróbias (LI et al., 2009). O tratamento *in situ* costuma ser a técnica mais utilizada para casos de contaminação de grandes extensões, devido a inviabilidade de deslocar todo o material contaminado até estações de tratamento fora do local da contaminação.

A biodegradação de HPAs é um processo complexo, que depende de diversos fatores ambientais e nutricionais, além da presença de microrganismos com capacidade de degradação, o que pode ser um fator limitante para a recuperação do meio (XU et al., 2018). Dito isso, a caracterização do local da contaminação é de extrema importância para a escolha do processo de biorremediação a ser utilizado, pois mesmo pequenos derramamentos de petróleo em áreas sensíveis, tais como manguezais, podem ter grandes impactos na fauna, pesca, maricultura e turismo, como foi o caso dos derramamentos causados pelos navios petroleiros Exxon Valdez, Erika, Tasman Spirit e Hebei Spirit (CEDRE, 2020; ITOPIF, 2020).

Alguns estudos sobre biorremediação de manguezais têm sido relatados principalmente na literatura internacional. (RAMSAY et al., 2000) relataram que a aeração ativa e a adição de fertilizantes de liberação lenta estimularam significativamente o crescimento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos em sedimentos de mangue contaminados com óleo. (YU et al., 2005) compararam a eficiência de degradação de uma mistura contendo fluoreno (FL), Fenantreno (FEN) e pireno (PIR) por atenuação natural, bioaumentação e bioestimulação em sedimentos de manguezais. Após 4 semanas, a atenuação natural provou ser o método mais adequado para remediar sedimentos de manguezais contaminados por Fluoreno e fenantreno, e a bioestimulação foi o mais adequado para a degradação do Pireno. Já Lang et

al., (2016) usaram uma cepa bacteriana exógena para avaliar a biodegradação de uma mistura de HPAs, comparando a atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação e uma combinação de bioestimulação e bioaumentação em sedimentos de manguezais. Os autores relataram que a combinação de bioestimulação e bioaumentação foi o tratamento mais eficaz para a degradação de HPAs. Os resultados apresentados neste parágrafo demonstram que não há um entendimento universal de qual técnica de biorremediação seria a mais apropriada para a mitigação da contaminação por óleo, especificamente por HPAs

A degradação anaeróbia de HPAs já foi reportada envolvendo diferentes aceptores de elétron, tais como Nitrato, Sulfato, Ferro e Manganês (COATES; ANDERSON; LOVLEY, 1996; MAILLACHERUVU; PATHAN, 2009; MIHELIC; LUTHY, 1988; ROCKNE et al., 2000). Entretanto a biorremediação de HPAs pode não acontecer quando altos valores de matéria orgânica estão presentes no sedimento, mesmo quando os aceptores de elétron estão disponíveis, pois essa classe de compostos tende a aderir na fase não-aquosa e na matéria orgânica. (JOHNSEN; WICK; HARMS, 2005).

Rockne et al., (2000) avaliou a degradação anaeróbia do naftaleno, utilizando duas culturas degradadoras diferentes em condições de redução de nitrato. A primeira cultura, enriquecida com Fenantreno, atingiu um grau de mineralização superior a 90%, enquanto a cultura enriquecida com naftaleno atingiu 20% de mineralização. O baixo fator de mineralização reportado na última cultura enriquecida pode ser associado ao alto valor de naftaleno aderido às células, segundo o autor.

Ainda se tratando da redução de nitrato, por ser o aceptor de elétron anaeróbio mais facilmente utilizado, Li et al. (2009) reportou concentrações de nitrato de $45 \mu\text{g g}^{-1}$ na camada superficial de solo de manguezal em Hong Kong. Tal valor diminuiu a $15 \mu\text{g g}^{-1}$ em camadas inferiores, indicando que o processo de desnitrificação ocorreu no sedimento. Em outros manguezais, concentrações ainda menores foram encontradas, tal como o valor de $4,7 \mu\text{g g}^{-1}$ por Ezekoye, Amakoromo e Ibiene (2015).

Já em estudos de degradação aeróbia Ramsay et al., (2000) avaliou o bombeamento de ar em uma contaminação de óleos em manguezais australianos, associado à injeção de fertilizantes de ação lenta. Entretanto, principalmente por se tratar de um cosmo predominantemente anóxico, não foi constatada biodegradação dos óleos contaminantes por 2 meses após a contaminação. Após os 2 meses classificados como fase lag dos microrganismos, 90% dos hidrocarbonetos totais já haviam sido removidos dos sedimentos por evaporação ou dissolução, e apenas o restante passou pelo processo de biodegradação.

Além de avaliar a degradação dos HPAs, também é imprescindível identificar qual microrganismo é responsável pelo processo da biorremediação. Diversos estudos reportam gêneros bacterianos capazes de degradar hidrocarbonetos. Romero et al., (1998) isolou cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodotorula glutinis* provenientes de biopilhas, que foram capazes de promover a degradação de Fenantreno. Bactérias do gênero *Acinetobacter*, extremamente comuns em ambientes anaeróbios, como manguezais, também são capazes de degradar diversos compostos aromáticos, incluindo os HPAs (OGAWA; ISHIDA; URANO, 2009).

Entretanto, alguns estudos relatam gêneros bacterianos menos comuns na degradação de HPAs, como o *Halomonas*, um gênero bacteriano halofílico, capaz de degradar mais de 74% de pireno e Fenantreno quando a concentração de NaCl era superior a 4% (GOVARTHANAN et al., 2020). Ou o gênero *Alcanivorax*, também halofílico, capaz de atuar na degradação de óleo cru em pH entre 4,0 e 9,0 e salinidades entre 0 e 10 g L⁻¹ de NaCl. Gêneros comuns em solo, esgoto e manguezais, como *Bacillus* também são relatados por degradar HPAs, principalmente o pireno e o naftaleno, facilitando os processos de biorremediação de áreas contaminadas.

O estudo mais recente se tratando de biodegradação anaeróbia de Fenantreno, é através de uma cepa filogeneticamente próxima do gênero *Desulfotomaculum*, através de rotas de redução de sulfato (ZHANG et al., 2021). Entretanto neste estudo a cultura de degradação foi feita em meio líquido. Também estava presente nessa cultura o gênero *Geobacter*, com 9,3% de abundância relativa. Este estudo sugeriu, através de análises de GC-MS que a etapa inicial da degradação do Fenantreno se dá através do ácido 2-fenantroico. Nas etapas seguintes à carboxilação inicial, foram detectadas as produções dos ácidos dihidro-, tetrahydro-, hexahydro e octahydro-2-fenantroicos.

Não só bactérias são reportadas na literatura como capazes de degradar os HPAs. Fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Cephalosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Diplosporium* sp., *Microsporium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., e *Verticillium* sp também foram isoladas de biopilhas contaminadas com petróleo (BISOGNIN et al., 2018).

É importante salientar que diferentes estratégias de biorremediação tendem a formar ambientes propícios à mudança na comunidade microbiana, principalmente quando se tratando de culturas mistas (GRACE LIU et al., 2011). Entretanto, a caracterização do ambiente onde a remediação será feita é de extrema importância, visto que diferentes comunidades microbianas são mais adaptadas a determinados ambientes.

Ainda assim, não há consenso quanto à aplicação das técnicas de biorremediação, pois cada estudo usa diferentes tipos de substratos, microrganismos e condições, gerando informações dispersas (ANDERSEN; KRISTENSEN, 1988; BIANCO et al., 2020; LI et al., 2009; REDDY; D'ANGELO; HARRIS, 2000; ROSENBERG; RON, 1996). A microbiota, quando avaliada pela literatura, normalmente aparece apenas como uma complementação de dados, não considerando e avaliando sua possibilidade de adaptação *in situ* (BROOIJMANS; PASTINK; SIEZEN, 2009). Além da escassez de artigos de biorremediação em ambientes anaeróbios, poucos tratam a biorremediação *in situ* em manguezais. Este trabalho busca elucidar alguns comportamentos da biorremediação de HPAs, mais especificamente o Fenantreno, em sedimentos provenientes de manguezais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a degradação anaeróbia do Fenantreno em sedimento de manguezal por meio de atenuação natural e bioaugmentação

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar e identificar a diversidade microbiana presente em sedimento de manguezal exposto à contaminação por petróleo;
- b) Aumentar os microrganismos autóctones do sedimento do manguezal sob condições anaeróbias na presença de Fenantreno;
- c) Avaliar a biotransformação de Fenantreno por meio de atenuação natural e bioaugmentação em condições anaeróbias;
- d) Estabelecer modelo e parâmetros cinéticos para a degradação do Fenantreno por meio de atenuação natural e bioaugmentação em condições anaeróbias;
- e) Caracterizar e identificar os consórcios microbianos aumentados e provenientes da atenuação natural e da bioaugmentação utilizando técnicas de microbiologia e biologia molecular;

4 METODOLOGIA

Nos tópicos a seguir estão dispostas as metodologias laboratoriais e de análises utilizadas durante a pesquisa.

4.1 REAGENTES QUÍMICOS UTILIZADOS

Foram utilizados os compostos: Fenantreno (FEN), $C_{14}H_{10}$, peso molecular 178,23 g/mol, CAS # 85-01-8, 98% de pureza), Sulfato de Sódio Anidro, Granular (Na_2SO_4 , peso molecular 142,04 g/mol, CAS # 7757-82-6, 99,5% de pureza), Metanol (MEOH, CH_3OH , peso molecular 32,04 g/mol, CAS # 67-56-1, grau HPLC), fabricados pela Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA); e Hexano (C_6H_{14} , peso molecular 86,18 g/mol, CAS # 67-56-1, padrão analítico), produzido pela Química Moderna (Recife, PE, Brasil).

4.2 INÓCULO E MEIO NUTRIENTE

Os inóculos utilizados foram lodo anaeróbio-microaerofílico, proveniente de um reator em bateladas sequenciais utilizado para o tratamento de efluente têxtil (MENEZES et al., 2019), e lodo granular anaeróbio, proveniente de um reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente (UASB), em escala industrial, utilizado para o tratamento de efluente petroquímico (porto de Suape, Ipojuca - PE).

As soluções utilizadas para preparação do meio nutriente ($mg \cdot L^{-1}$) do experimento seguiram metodologia adaptada de Edwards e Grbic-Galic, (1994). As concentrações estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações dos compostos no meio nutricional

Solução	Composto	Concentração (mg L ⁻¹)
Solução tampão	K ₂ HPO ₄	348,00
	KH ₂ PO ₄	272,00
Solução Salina	NH ₄ Cl	535,00
	CaCl ₂ .2H ₂ O	47,90
	FeCl ₂ .4H ₂ O	20,00
	H ₃ Bo ₃	60,00
	ZnCl	0,20
Solução de Micronutrientes	MnCl ₂	2,00
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,20
	Al ₂ (SO ₄) ₃ .18H ₂ O	0,20
	CoCl ₂ .6H ₂ O	3,00
	NiCl ₂ .6H ₂ O	1,50
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,20
Solução de indicador redox	Rezazurina	1,00

Fonte: Edwards e Grbic-Galic, (1994)

4.3 CONFIGURAÇÕES EXPERIMENTAIS

Para todos os experimentos e condições testadas materiais estéreis foram utilizados. As esterilizações dos materiais por autoclavagem (30 minutos e pressão entre 1 e 1,5 atm).

4.3.1 Sedimento do Rio Massangana

O sedimento utilizado para a montagem dos microcosmos foi proveniente do estuário do rio Massangana (Figura 2), coletado em 19/12/2019, aproximadamente 4 meses após as primeiras manchas de óleo terem atingido a região (ARAÚJO; RAMALHO; MELO, 2020). Todo o sedimento, previamente à utilização nos microcosmos, foi peneirado (malha de 1 mm) para retirada de materiais como pedras e raízes.

Figura 2 - Local de coleta do sedimento



Fonte: Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) (2019)

A caracterização física do sedimento, realizada pelo Departamento de Energia Nuclear da UFPE, está descrita na Tabela 6.

Tabela 6 - Caracterização granulométrica do sedimento utilizado

Camada (cm)	Granulometria				
	Areia (g kg ⁻¹)			Silte (g kg ⁻¹)	Argila (g kg ⁻¹)
	Grossa	Fina	Total		
0-20	371	596	967	13	20
20-40	289	533	822	10	38

Fonte: Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE), 2019.

Para os reatores de controle abióticos foi utilizado o sedimento autoclavado segundo a metodologia descrita por Menezes et al., (2019), autoclavando por três dias consecutivos (1h no primeiro dia e 30 minutos nos dias consecutivos – e pressão mantida entre 1 e 1,5 atm). Dessa forma, se intencionou garantir que mesmo que houvesse a formação de esporos após a primeira autoclavagem, os mesmos fossem inativados nos dois dias seguintes de autoclavagem. Além disso, formaldeído foi adicionado para aumentar a inibição do crescimento microbiano nos reatores de controle abiótico.

4.3.1 Reativação dos lodos de inoculação

Como os inóculos estavam armazenados em geladeira no laboratório haviam 3 anos, a reativação dos inóculos foi realizada para minimizar a fase de adaptação dos microrganismos

ao entrar em contato com o contaminante. Para esta fase foram utilizados frascos de Boro-silicato de 900 mL com tampa de butila.

O lodo têxtil foi concentrado através de centrifugação a fim de passar de 0,233 gSSV/L para 0,5 gSSV/L. Já o lodo petroquímico foi diluído em água-ultrapura para passar de 49,11 gSSV/L para 0,5 gSSV/L. Logo, ambos os lodos tinham inicialmente, o mesmo teor de SSV.

Foram montados dois reatores com volume reacional de 350 mL, volume total de 900 mL, sendo um para cada inóculo. Os reatores continham 100 mL de lodo de inóculo (0,5 gSSV/L) e 250 mL de meio mineral suplementado com extrato de levedura. A concentração de extrato de levedura foi de 200 mg/L no meio reacional. O *headspace* foi purgado com gás N₂ (100%), a fim de proporcionar anaerobiose aos reatores. De tal forma, a biomassa é permitida crescer utilizando um substrato de fácil degradação como fonte de carbono, para que quando levada aos reatores de degradação de Fenantreno, promovendo o crescimento microbiano de grupos adaptados ao extrato de levedura.

O monitoramento da atividade microbiana foi feito por meio da análise da produção de biogás, utilizando cromatógrafo gasoso com detector de condutividade térmica GC-TCD SHIMADZU®, com coluna Carboxen 1010Plot (Supelco® 30m x 0.53mm) utilizando argônio como gás de arraste numa vazão de 5,66 mL/min. A temperatura do injetor foi de 220 °C e a do detector 230 °C. O método de injeção foi o *Split* 5:1, com volume de amostra de 200 µL e forno a temperatura de 100 °C. Os gases detectados foram descritos em volume (µL) de gás existente em 200 µL do headspace, sendo detectados N₂, CH₄, CO₂ e H₂. Para a coleta das amostras de *headspace* dos reatores foram utilizadas seringas do tipo GASTIGHT® de 200 µL com trava de segurança, evitando a contaminação pelo ar atmosférico. O tipo de injeção utilizado nos experimentos envolvendo o GC-TCD foi manual.

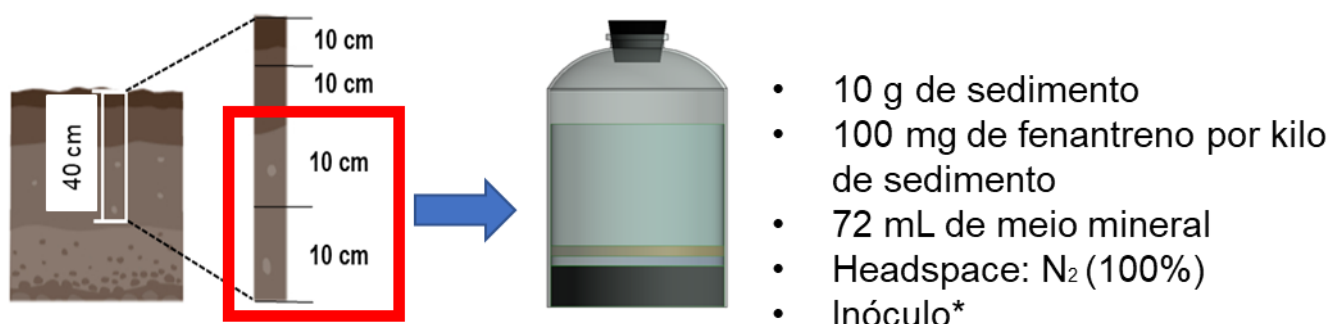
O monitoramento do consumo do substrato se deu até que a produção de biogás se tornasse estável, indicando que toda a matéria orgânica disponível havia sido consumida, possibilitando então realimentação com esta fonte de carbono ou a transferência para os microcosmos de degradação de Fenantreno, após o segundo consumo.

4.3.2 Montagem dos microcosmos

Todas as condições de avaliação de degradação do Fenantreno foram ensaiadas em batelada em frascos de vidro de 120 mL (microcosmos) com volume reacional de 72 mL, selados com tampas de butila e lacres de alumínio. Foram adicionados 1,5% v/v de inóculo (0,5

g SSV/L) nos microcosmos (1080 μ L). Os meios líquido e gasoso foram purgados com fluxo contínuo de N_2 (100%) por 1 minuto para a remoção do oxigênio.

Figura 3 - Esquema de montagem dos microcosmos de degradação de Fenantreno



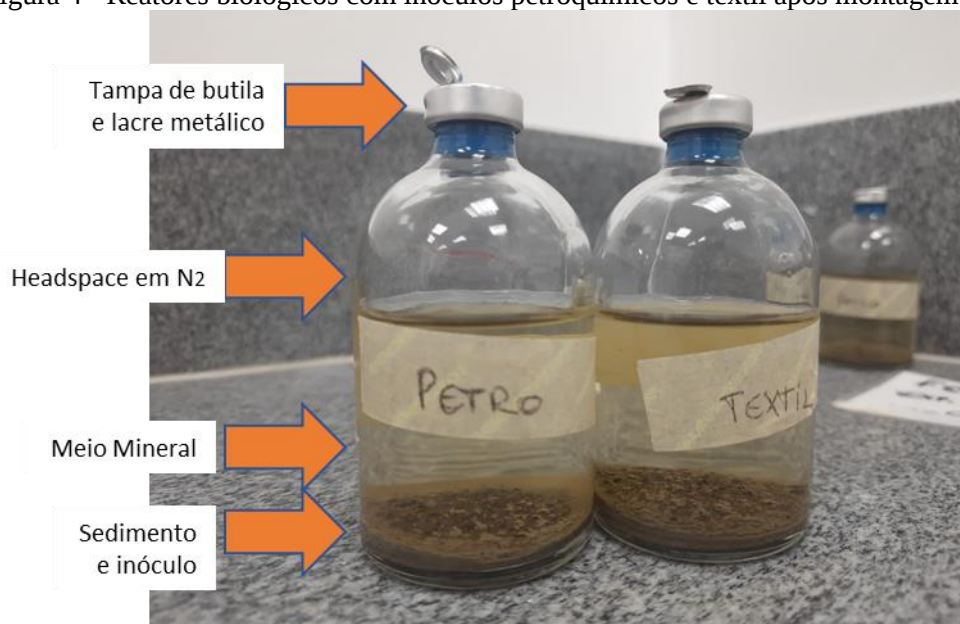
* Inóculo presente apenas nos reatores de bioaugmentação

Fonte: O Autor (2022)

Os reatores foram montados por meio da adição de: 1) 10g de sedimento proveniente dos segundos 20 cm (Figura 4) de uma amostra deformada de 40 cm de sedimento coletado no manguezal do rio Massangana, pesados dentro do microcosmo (10g autoclavados para reatores abióticos); 2) 200 μ L de uma solução de 5000 mg/L de Fenantreno dissolvido em acetona dentro do microcosmo, totalizando 100 mg FEN/kg de sedimento, valores baseados em Mueller e Shann, (2006) e Steffen et al., (2007).

Os frascos com sedimento contaminados por Fenantreno foram deixados em capela química por 24h para evaporação do solvente. Passadas as 24h, 72 mL da solução de meio mineral foi inserida no microcosmo, e 1,5% v/v de lodo biológico ($\cong$ 1 mL) foi adicionado nos reatores de bioaugmentação (Figura 3). Os microcosmos de 120 mL foram fechados então com tampa de butila e lacres metálicos, e agitados vigorosamente. O *Headspace* foi então purgado por meio de fluxo contínuo de gás N_2 (100%) por 1 minuto para eliminação do oxigênio interno ao reator (Figura 4).

Figura 4 - Reatores biológicos com inóculos petroquímicos e têxtil após montagem



Fonte: O Autor (2022)

Quatro tipologias de reatores distintas foram montadas:

- Reatores abióticos: Compostos por sedimento autoclavado, sem inóculos
- Reatores de atenuação natural: Compostos por sedimento natural, sem inóculos
- Reatores de bioaugmentação por inóculo petroquímico: Compostos por sedimento natural com inóculos proveniente de reator de degradação e efluente petroquímico
- Reatores de bioaugmentação por inóculo têxtil: Compostos por sedimento natural com inóculos proveniente de reator de degradação e efluente têxtil

4.3.3 Procedimento analítico para determinação do Fenantreno em amostras de sedimento

O procedimento analítico padrão para a análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos é o Método 610 da Agência de Proteção Norte-Americana (EPA), utilizado para a determinação por Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC), sendo a determinação por HPLC a mais recomendada pela EPA. Segundo o mesmo documento, os limites de detecção variam de acordo com o HPA estudado, sendo o maior 1,8 µg/L para o naftaleno e o menor de 0,043 para o Indeno (1,2,3-cd)pireno.

Já para análises de sedimento, a EPA dispõe da metodologia 8310 para análise em HPLC. Tal metodologia referencia os processos de limpeza da amostra, utilizando o Método 3630 (para coluna de sílica gel) e os métodos 3540 e 3550 para extração dos HPAs para o solvente. Na metodologia 3540C o solvente (300 mL) é aquecido, passando pela amostra de solo ou sedimento continuamente por 24h, gerando um volume final de aproximadamente 200 mL, que necessita ser concentrado. Já a metodologia 3550C aborda o uso de ultrassom, que agita a amostra imersa em solvente orgânico, entretanto, apesar de requerer menos tempo de análise, é recomendado para amostras com concentrações maiores que 20 mg/kg.

Devido à complexidade, longo tempo de extração, alto custo com vidrarias e reagentes e limitações impostas pelas metodologias 3550C e 3540C da EPA, a quantificação do Fenantreno foi realizada seguindo a metodologia proposta por Wannoussa et al., (2015), utilizando 1g de sedimento úmido, proveniente dos microcosmos, que são transferidos para tubos de vidro de 18 mL. Foi inserido então 1g de sulfato de sódio anidro, e 10 mL de hexano como solvente. Os tubos então foram agitados em vórtex (10 segundos) e então colocados em banho de ultrassom por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, tais tubos foram agitados por 16 h em agitador horizontal a 100 rpm, protegidos da luz, em ambiente com temperatura controlada ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Ao final das 16 h, a fase líquida (orgânica) era então transferida para tubos de fundo cônico de polipropileno de 15 mL, onde era centrifugada (Centrífuga Hermle, modelo Z 206 A - 5000 Rpm, 10 minutos) A fase orgânica era então transferida para um novo tubo de fundo cônico de polipropileno de 50 mL, e reservado. Os tubos iniciais, com o sedimento, receberam então mais 10 mL de hexano para uma segunda extração do sedimento, onde passaram mais uma vez por todo o processo descrito. Após outras 16 h, a fase orgânica proveniente da segunda extração era também centrifugada em tubos de fundo cônico de 15 mL e adicionada ao tubo 50 mL com a fase orgânica da primeira extração, totalizando então 20 mL de fase orgânica contendo os HPAs extraídos do sedimento. O hexano era então evaporado para troca de solventes para metanol utilizando o Concentrador de Amostras EZ-2 Elite com os seguintes parâmetros:

- Modo: Low BP – Utilizado para solventes com baixo ponto de ebulição
- Tempo para Fase final: 29 minutos (Sob atuação da temperatura)
- Tempo de Fase Final: 6 minutos (Aquecimento desligado)
- Temperatura: 60°C

O extrato seco era então re-eluido em 10 mL de metanol, e 1 mL dessa solução era transferida para frasco de HPLC (1,5 mL) para análise cromatográfica. As análises cromatográficas de monitoramento de degradação foram feitas usando cromatógrafo a líquido

de alta eficiência (HPLC) da Shimadzu, modelo LC20AT, configurado com sistema de bombas quaternárias, degaseificador da fase móvel, sistema de injeção de amostras automático, compartimento termostaticado para a coluna analítica, detector de arranjo de diodos (DAD) e índice de refração (RID), utilizando uma coluna C18 (LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART® 250-4). A fase móvel para a análise era constituída de água/acetonitrila, na proporção 20/80%, com volume de injeção de 20 µL

4.5 AJUSTE DE PARÂMETROS CINÉTICOS

Para se analisar a remoção de Fenantreno foram feitas análises cinéticas dos microcosmos. A velocidade (r) de produção ou consumo se dá pela variação da concentração do tal composto pela variação do tempo. A equação 1 mostra essa relação, onde m é a ordem da reação, C a concentração do composto alvo e t é o tempo (LEVENSPIEL, 2000). A constante k compatibiliza a curva com os dados obtidos. Os valores negativos obtidos neste trabalho representam o consumo, e quanto maior o valor, em módulo, maior a sua velocidade cinética.

$$r = \frac{dC}{dt} = k \cdot C^m \quad (1)$$

Quando a ordem da reação é zero ($m=0$) a equação 1 resulta na equação 2 pela integração com os limites de integração tempo inicial (t_0) a um tempo qualquer (t). A constante cinética k_0 neste caso representa a declividade da própria reta e C_0 representa a concentração no tempo t_0 . Reações classificadas como de ordem zero indicam que não há relação entre a velocidade da reação e a concentração do composto alvo.

$$C = C_0 + k_0(t - t_0) \quad (2)$$

Reações classificadas como de primeira ordem ($m=1$) são representadas pela equação 3, que é obtida através da integração da equação 1. Onde k_1 representa a inclinação da reta, $-\ln(C/C_0)$ o parâmetro dependente, no eixo das ordenadas, e $[1/t]$ o parâmetro independente no eixo das abscissas. Em reações de primeira ordem a velocidade da reação é linearmente proporcional a concentração do composto alvo.

$$C = C_0 \cdot e^{k_1(t-t_0)} \quad (3)$$

Foi utilizado o coeficiente R^2 para se determinar a qualidade da reta ajustada aos dados. O R^2 indica o quanto da variação é descrita pela regressão linear entre valores de 0 a 1, descrita pela equação 4. Onde, SE_{reta} é o erro quadrado da reta da forma $y = mx + b$ dado pela equação 5 e $SE_{\bar{y}}$ representa a variação total de y pela variação em x , onde $\bar{y}$ é a média dos valores das ordenadas dos dados, dada pela equação 6.

$$R^2 = 1 - \frac{SE_{\text{reta}}}{SE_{\bar{y}}} \quad (4)$$

$$SE_{\text{reta}} = \sum_{i=1}^n (y_i - (mx_i + b))^2 \quad (5)$$

$$SE_{\bar{y}} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (6)$$

Também foi avaliada a cinética de primeira ordem bifásica, a fim de avaliar se a degradação biológica do composto acontecia em duas fases (MADRID et al., 2016). Dessa forma, a degradação é avaliada de forma gráfica, e escolhido um ponto onde se considera a mudança de comportamento dos reatores. O tempo onde isso acontece é denominado t_b . As equações que regem a degradação cinética de primeira ordem bifásica são as seguintes:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_1(t-t_0)} \text{ quando } t \leq t_b \quad (7)$$

$$C = C_{01} \cdot e^{-k_1(t_b)} \cdot C_{02} \cdot e^{-k_2(t-t_b)} \text{ quando } t > t_b \quad (8)$$

Onde C_0 é a concentração inicial do composto alvo e k_1 e k_2 são as constantes cinéticas de degradação rápidas e lentas, respectivamente.

Logo, entende-se que para melhores resultados, o R^2 deve ser o mais próximo de 1 possível, o que significa que menor deve ser o erro quadrado dessa equação (SE_{reta}). Por isso, o critério de escolha do modelo cinético utilizado dentre o de ordem zero ou de primeira ordem foi a reta resultante que apresentasse o R^2 mais próximo de 1.

Além disso, também foi avaliado o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que é definido como o tempo que a cultura levaria para degradar 50% do composto. O tempo de meia vida é definido pela equação 9.

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_1 \quad (9)$$

4.6 ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA

O DNA foi extraído das amostras utilizando o PowerSoil® DNA isolation kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A qualidade do DNA extraído foi medida no espectrofotômetro ND-2000 (Nanodrop Inc., Wilmington, DE, EUA), e considerada aceitável quando a relação da absorbância lida em 260 e 280 nm fosse maior que 1,8, que indica que a amostra de DNA está pura o suficiente para análise. Em seguida, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C. O sequenciamento do rRNA 16S foi realizado pela empresa Go Genetic (Curitiba, PR).

Análise de componentes principais dos dados de abundância relativa dos gêneros foi realizada utilizando o programa NextGen Sequence Workbench v 3.2.3 disponibilizado e desenvolvido pela QIAGEN. Avaliados então os dados de abundância relativa, foi realizado o levantamento bibliográfico para o entendimento da dinâmica microbiana dos experimentos aqui elencados. O banco de dados utilizados para o cruzamento dos dados FASTq foi o Banco de Dados SILVAng (SSU). Foram gerados também índices de diversidade de Dominância, de Shannon, Equitabilidade e Chao-1, a fim de expressar a complexidade da comunidade, sua riqueza presente na amostra e a sua proporção (abundância relativa) nos reatores biológicos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

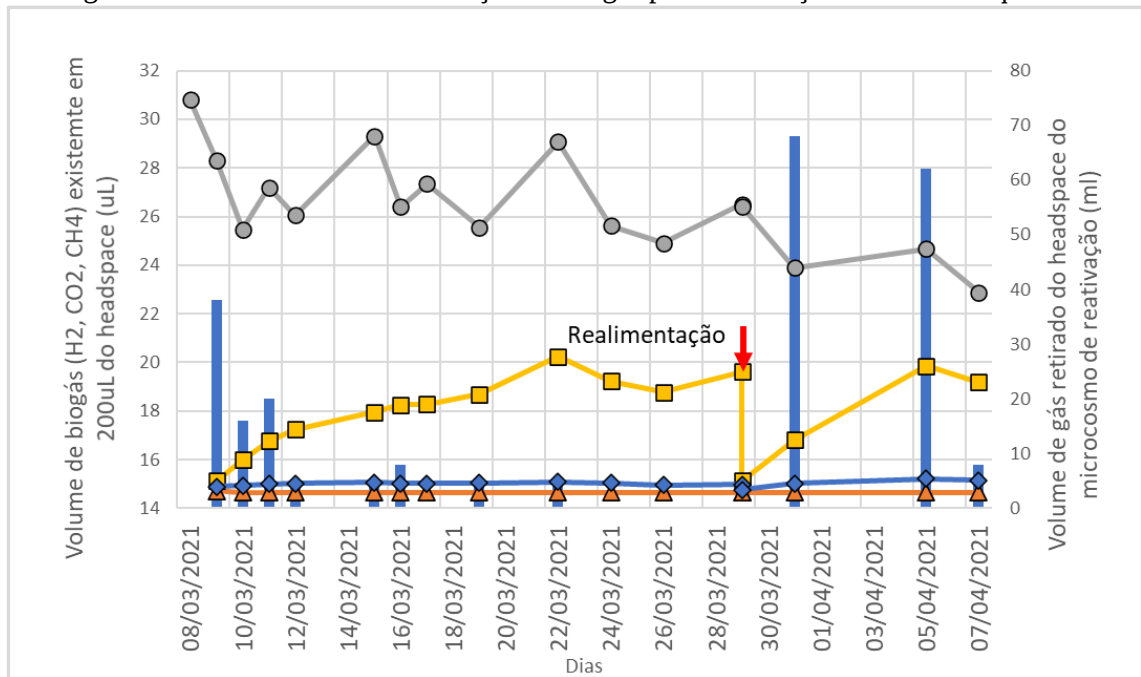
Nos tópicos a seguir serão discutidos os resultados e análises desta pesquisa. Os resultados se dividem em quatro grandes áreas: reativação dos inóculos, resultados da metodologia de determinação de Fenantreno, degradação do Fenantreno e análise da comunidade microbiana.

5.1 REATIVAÇÃO DOS INÓCULOS

Os microcosmos de ativação dos inóculos apresentaram resposta positiva ao substrato utilizado (extrato de levedura), produzindo principalmente metano (CH_4) durante seu consumo. Tal fator reflete a boa capacidade do inóculo de converter proteínas e aminoácidos sinergicamente até metano, sugerindo a presença de microbiota fermentativa e ocorrência de microrganismos metanogênicos nas culturas. Os volumes de hidrogênio (H_2) e gás carbônico (CO_2) permaneceram praticamente constantes mesmo após a segunda alimentação com 250 mg L^{-1} de extrato de levedura, tanto na reativação com lodo proveniente de degradação de efluentes têxteis quanto o proveniente de indústria petroquímica, indicando a respiração celular de bactérias heterotróficas.

Os microcosmos levaram 21 dias até a estabilização da produção de biogás, momento este em que se deu a realimentação. Após 9 dias da segunda alimentação, a concentração de biogás no *headspace* já havia atingido valores superiores à degradação inicial do substrato, como se nota na Figura 5 e Figura 6.

Figura 5 - Monitoramento de Produção de Biogás para Reativação - Lodo Petroquímico

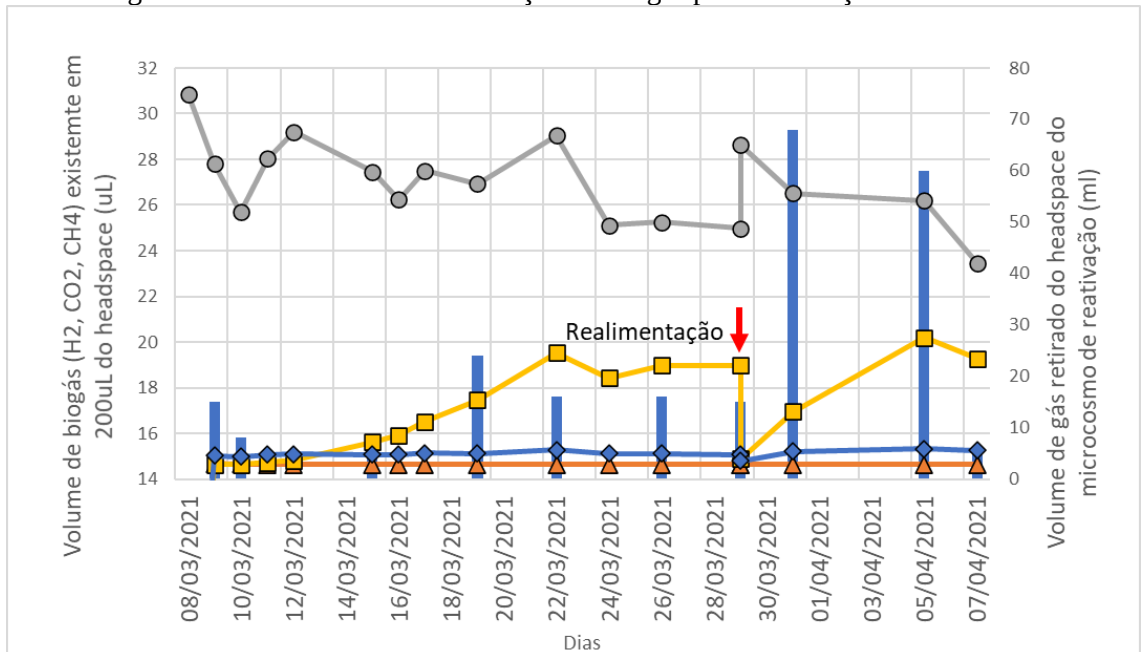


Legenda: Volume de biogás produzido em mL (■);

Volumes de biogás existentes em 200 µL do headspace (µL): H₂ (▲), N₂ (●), CH₄ (■), CO₂ (◆).

Fonte: O Autor (2022)

Figura 6 - Monitoramento de Produção de Biogás para Reativação - Lodo Têxtil



Legenda: Volume de biogás produzido em mL (■);

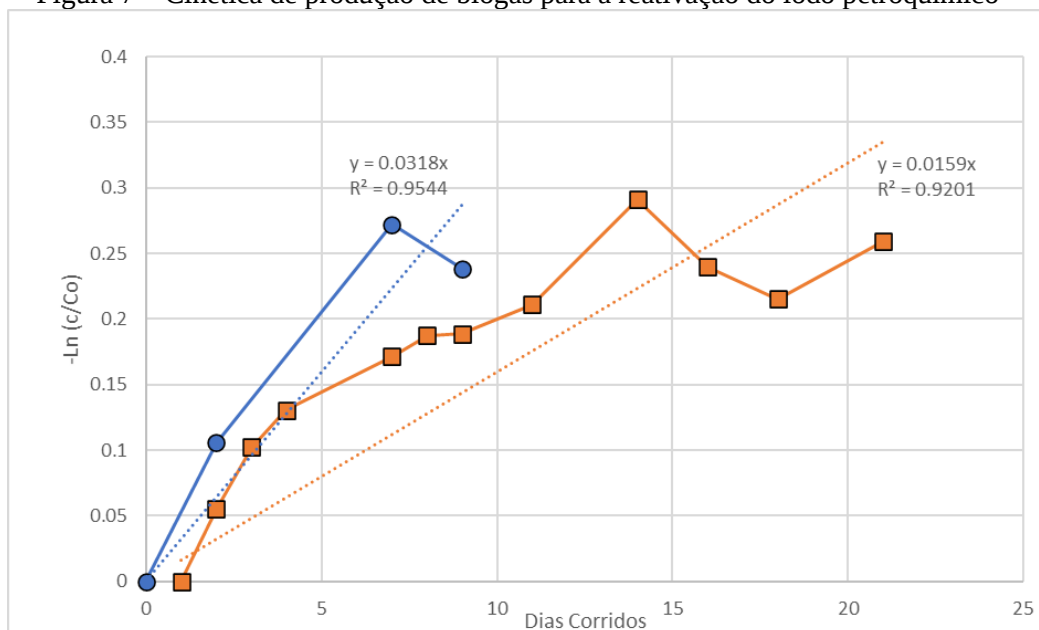
Volumes de biogás existentes em 200 µL do headspace (µL): H₂ (▲), N₂ (●), CH₄ (■), CO₂ (◆).

Fonte: O Autor (2022)

A partir dos gráficos de degradação do extrato de levedura, é possível notar que houve produção contínua de metano no microcosmo, com fase lag aparente de 3 e 4 dias para os inóculos petroquímico e têxtil, respectivamente. Esse procedimento teve como objetivo fazer com que a microbiota presente nos inóculos tivesse sua atividade microbiana ativada, para que quando inserida na próxima fase do experimento, já estivesse em pleno funcionamento.

Também foi avaliada a cinética da produção do biogás, disposta nas Figura 7 e Figura 8. É possível notar que em todos os casos os valores de R^2 foram superiores a 90%, indicando boa adequação à cinética de primeira ordem. Além disso, o K_1 , coeficiente responsável por expressar a velocidade da produção de biogás, passou de 0,0159 para 0,0318 no lodo petroquímico e de 0,0141 para 0,0353 no lodo têxtil, indicando que os microrganismos, após a segunda alimentação do substrato estavam mais ativos, degradando em maior velocidade a mesma quantidade de alimento disponível.

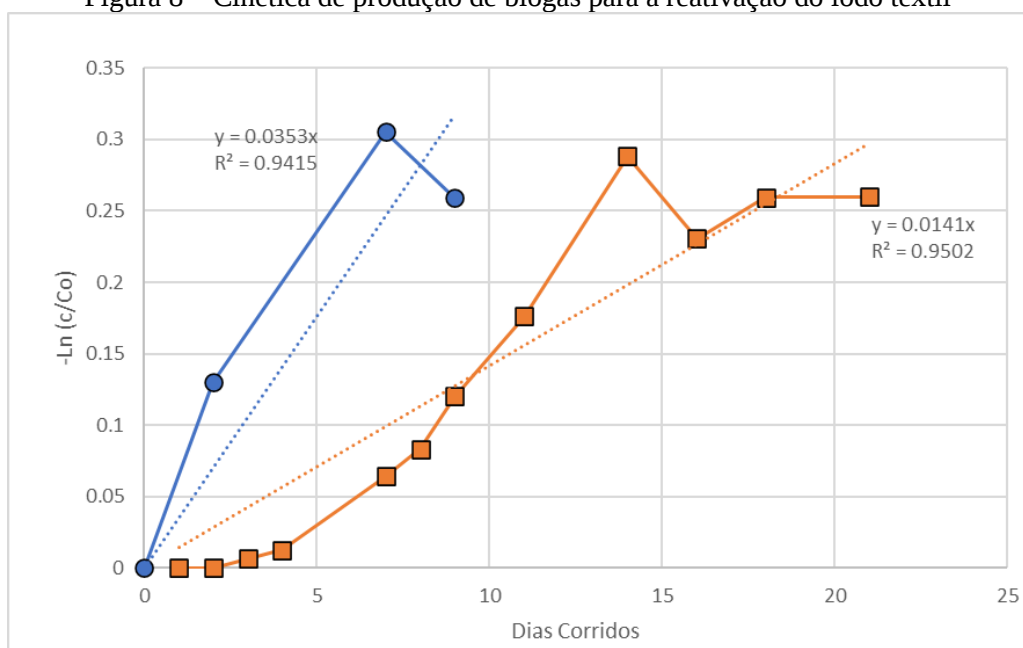
Figura 7 – Cinética de produção de biogás para a reativação do lodo petroquímico



Legenda: Primeira alimentação (—■—), Ajuste de primeira ordem da primeira alimentação (.....), Segunda Alimentação (—●—), Ajuste de primeira ordem da segunda alimentação (.....).

Fonte: O Autor (2022)

Figura 8 – Cinética de produção de biogás para a reativação do lodo têxtil



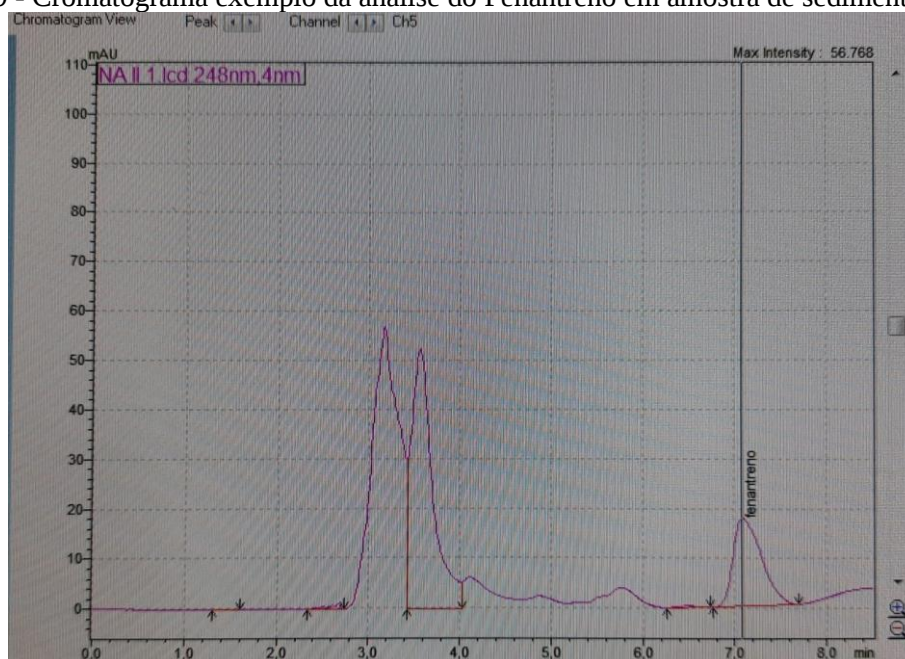
Legenda: Primeira alimentação (—■—), Ajuste de primeira ordem da primeira alimentação (.....), Segunda Alimentação (—●—), Ajuste de primeira ordem da segunda alimentação (.....).

Fonte: O Autor (2022)

5.2 RESULTADOS DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DO FENANTRENO

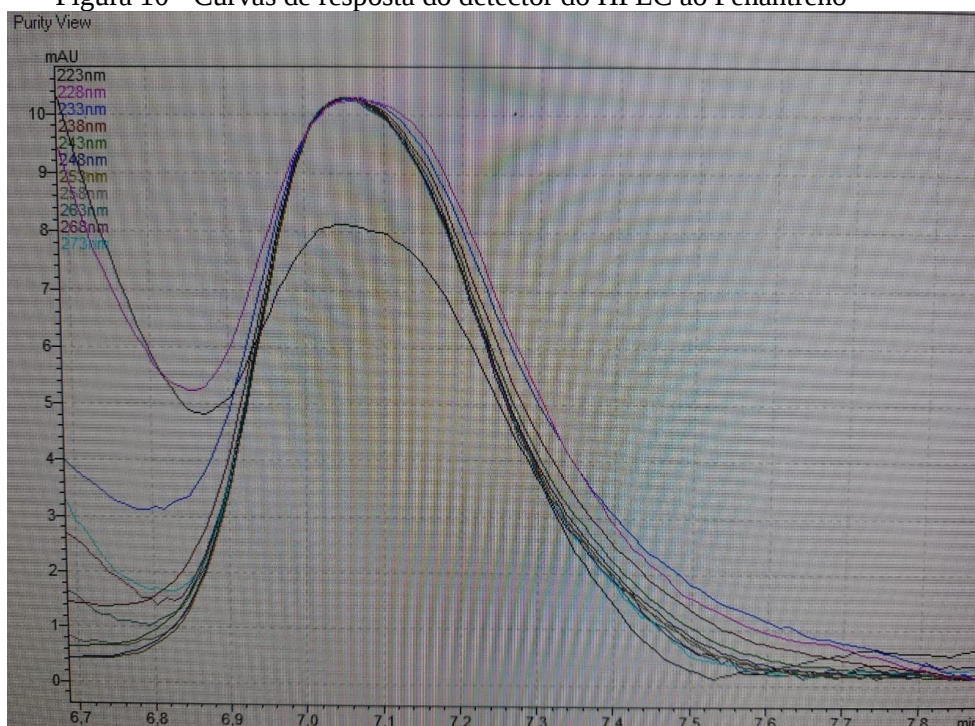
O tempo total de cada análise no HPLC levava 8,5 minutos utilizando uma composição de acetonitrila (20%) e água (80%), com o tempo de retenção do Fenantreno sendo aproximadamente 7,5 minutos (Figura 9). As concentrações do Fenantreno foram medidas utilizando o comprimento de onda de 248 nm, que apresentou resposta positiva mais nítida (Figura 10).

Figura 9 - Cromatograma exemplo da análise do Fenantreno em amostra de sedimento



Fonte: O Autor (2022)

Figura 10 - Curvas de resposta do detector do HPLC ao Fenantreno



Fonte: O Autor (2022)

Esta metodologia foi implantada no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) para o desenvolvimento deste trabalho. O fator de recuperação médio foi de 46%, validado a partir de amostras abióticas do sedimento do manguezal Massangana. De tal forma, todos os resultados de degradação do Fenantreno aqui explicitados estão corrigidos por este fator de

recuperação. Diversos autores relatam usar metodologias alternativas à metodologia explicitada pela EPA, obtendo bons resultados de recuperação, como mostrado por Hawthorne et al., (2000) que obtiveram fator de recuperação de entre 66 e 98% em diversas técnicas de extração.

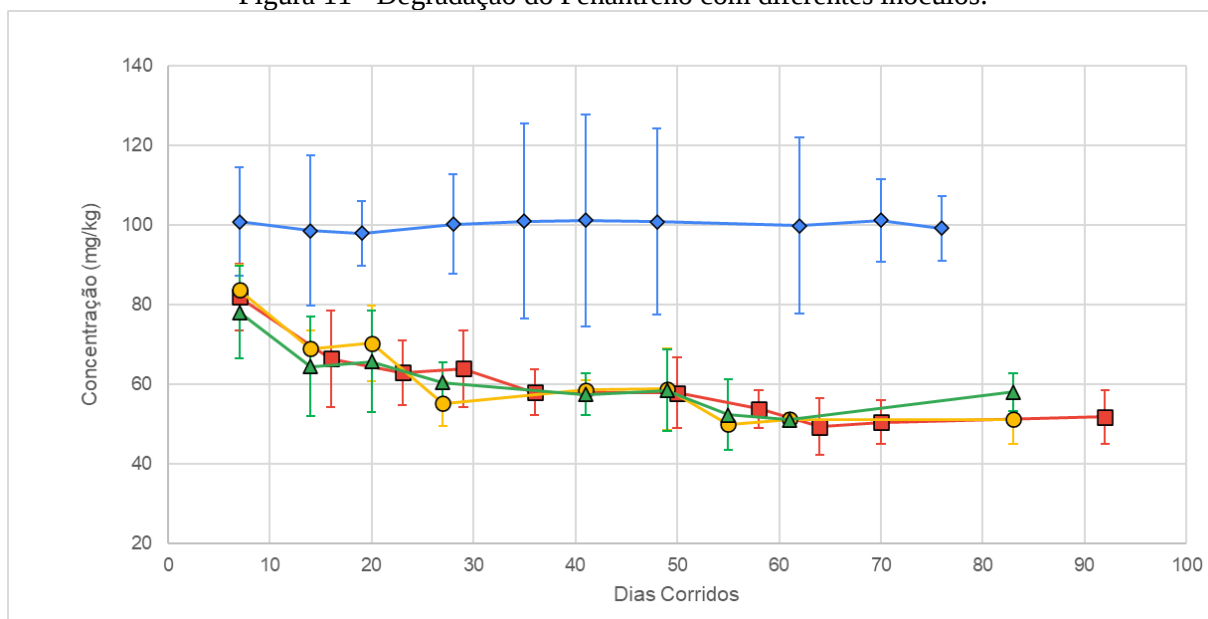
5.3 DEGRADAÇÃO DO FENANTRENO

Através de análise ANOVA teve como objetivo mostrar a diferença estatística entre as 3 condições testadas, verificando se o fator-P seria menor que 0,05, indicando a diferença com 95% de confiabilidade. Entretanto, após essa análise, o fator-P verificado foi de 0,80, significativamente maior, indicando que as amostras não tem diferença estatística entre si quanto ao percentual de degradação. Tal fato pode ser justificado devido ao baixo valor de SSV utilizado para a inoculação (0,5 g SSV/L). Durante o experimento de degradação do Fenantreno notou-se um aumento do pH do meio líquido, que passou de 5,80 a aproximadamente 6,15 em todas as condições bióticas. Este aumento de pH pode estar associado a etapa de carboxilação anaeróbia do Fenantreno, com a incorporação de CO₂ proveniente da degradação de matéria orgânica residual no sedimento, mediada por enzima carboxilase (ZHANG; YOUNG, 1999).

A condição de anaerobiose dos reatores prevaleceu nos sistemas, confirmada pelo emprego do indicador redox resazurina, que, em meio que contém oxigênio, faz com que os reatores tenham sua coloração transparente transformada em um róseo claro, fato que não ocorreu em nenhum dos reatores utilizados no experimento.

Se tratando de porcentagem de remoção do Fenantreno, os três reatores biológicos tiveram aproximadamente a mesma eficiência de degradação. No reator de atenuação natural se obteve $37 \pm 7,9\%$ de remoção em 80 dias. Para o mesmo intervalo de tempo o reator com inóculo petroquímico apresentou remoção de $39 \pm 6,2\%$ e no reator com inóculo têxtil o valor foi de $35 \pm 7,1\%$ (Figura 11). Tais valores são inferiores aos obtidos no estudo de Bianco et al., (2020), que obtiveram degradação entre 53 e 55% em experimentos com duração de 120 dias. No entanto, os autores empregaram cosubstratos provenientes da fração orgânica de resíduo sólido municipal, que são de fácil degradação, possibilitando o transporte de energia na forma de ATP entre outros cofatores importantes para o processo de transformação dos intermediários da degradação do Fenantreno.

Figura 11 - Degradação do Fenantreno com diferentes inóculos.



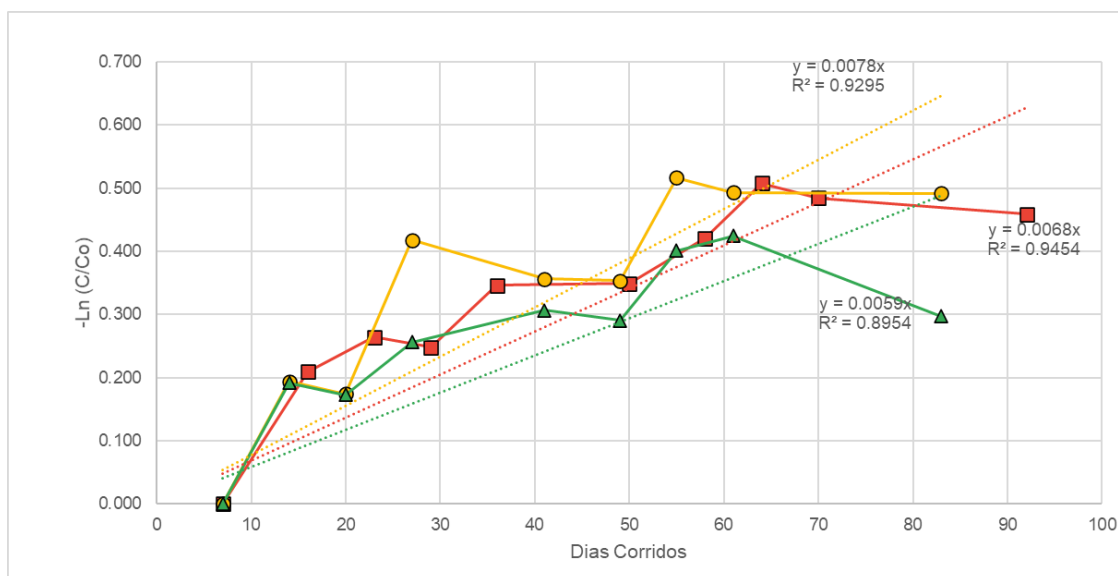
Legenda: Microcosmos com inóculos de lodo petroquímico (●), microcosmos de atenuação natural (■), Microcosmos com inóculos de lodo têxtil (▲), concentração do controle abiótico (◆). As concentrações indicadas refletem na média das triplicatas. As barras de erro representam o desvio padrão.

Fonte: O Autor (2022)

Os desvios padrões amostrais da degradação do Fenantreno, em reatores biológicos variaram entre 1% e 10%, com média de 7%. Já os reatores abióticos, utilizados para o controle da degradação, tiveram desvios padrões analíticos entre 8 e 24% do valor médio. Tal resultado se deu, possivelmente, pelo uso do formaldeído para inibição da atividade microbiana, composto orgânico com baixo ponto de ebulição (-19 °C), e sua presença pode ter causado arraste do Fenantreno, que é solúvel em compostos orgânicos, junto com a volatilização do formaldeído. Neste sentido, novos reatores abióticos foram montados, sem o uso de formaldeído, e observou-se a diminuição do desvio padrão para menos de 5% em dois pontos amostrais ($t_0 = 0$ dias e $t_1 = 40$ dias).

Para as análises de desempenho complementar foram ajustados a modelos cinéticos com o intuito de representar a degradação do Fenantreno nos microcosmos estudados, e o modelo de cinética de primeira ordem, foi o que melhor representou a cinética de degradação do composto. Os dados obtidos apresentaram ajuste adequado ao modelo de primeira ordem, apresentando valores de R^2 entre 0,89 e 0,94, para todas as condições testadas (Tabela 7), e constantes cinéticas de $0,0059 \text{ d}^{-1}$, $0,0078 \text{ d}^{-1}$, $0,0068 \text{ d}^{-1}$ para os seguintes inóculos: Têxtil, Petroquímico e Atenuação Natural, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – Ajuste dos microcosmos à cinética de primeira ordem



Legenda: Microcosmos com inóculos de lodo petroquímico (●), microcosmos de atenuação natural (■), Microcosmos com inóculos de lodo têxtil (▲). As linhas pontilhadas refletem o ajuste à cinética de primeira ordem.

Fonte: O Autor (2022)

Estudos anteriores reportaram a degradação anaeróbia de HPAs em concentrações de 200 mg.kg^{-1} de Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno e pireno em sedimento, utilizando diferentes condições de inoculação e suprimento de nutrientes, obtendo valores de constante cinética de primeira ordem (k_1) entre $0,023 \text{ d}^{-1}$ e $0,055 \text{ d}^{-1}$ (BIANCO et al., 2020), valores uma ordem de grandeza superiores ao encontrado nesse estudo, possivelmente devido ao uso de cosubstratos ricos em carbono e nutrientes pelos citados autores. Entretanto, Bianco et al., (2020) ressaltaram que a combinação com inóculos provenientes da fração orgânica do lixo municipal tiveram efeitos positivos no curto prazo (<10 dias), enquanto o suprimento nutricional teve efeito a longo prazo (>10 dias) na remoção dos HPA.

Bociu et al., (2019) relataram valores de $0,0073 \text{ d}^{-1}$ para a constante cinética de primeira ordem (k_1) da degradação do Fenantreno, valor similar ao encontrado neste experimento, e valores ainda menores para HPAs de maior peso molecular, tal como $0,0008 \text{ d}^{-1}$ para o benzo(c)fenantreno. Outros estudos avaliaram a influência de diversos substratos na degradação de Fenantreno e pireno em condições anaeróbia, obtendo valores maiores de constantes cinéticas de primeira ordem (k_1) para diferentes substratos utilizados para auxiliar a degradação, tendo valores entre $0,007$, utilizando Cu, e $0,028 \text{ d}^{-1}$, utilizando Lactato (CHANG; CHANG; YUAN, 2008). Li et al., (2015) obteve taxas de degradação de $0,012$ e $0,011 \text{ d}^{-1}$ para fluoranteno e pireno, respectivamente, em sedimentos de manguezal aumentados com consórcio bacteriano

enriquecido, entretanto a uma concentração de 10 mg de HPA/kg de sedimento por 125 dias, concentração inferior as utilizadas neste estudo.

Os tempos de meia vida (Tabela 7) também corroboram com experimentos de Chang, Chang e Yuan, (2008), que variaram entre 33 dias e 99 dias para a adição de diversos substratos para degradação de Fenantreno por culturas anaeróbias, mostrando que diferentes substratos podem afetar tanto positiva quanto negativamente a degradação de HPAs, sendo que os substratos Lactato, Piruvato, Ferro de valência zero e celulose, de mais fácil degradação, auxiliaram na redução do tempo de degradação do Fenantreno.

Tabela 7 - Taxas de consumo de primeira ordem e ordem zero (k_1) e coeficiente R^2 para as diferentes condições de degradação de Fenantreno.

Condição	Degradação de Ordem Zero $C = C_0 + k_0(t-t_0)$			Degradação de Primeira Ordem $C = C_0 \cdot e^{k_1(t-t_0)}$		
	C_0	k_0	R^2	k_1 (d ⁻¹)	R^2	$T_{1/2}$ (dias)
Inóculo Têxtil	70,556	-0,2504	0,5866	0,0059	0,8954	117,5
Inóculo Petroquímico	75,697	-0,3818	0,7007	0,0078	0,9295	88,90
Atenuação Natural	73,602	-0,3154	0,7480	0,0068	0,9454	101,9

Fonte: O Autor (2022)

Tabela 8 - Taxas de consumo de degradação rápida (k_1) e degradação lenta (k_2) e coeficiente R^2 para as diferentes condições de degradação de Fenantreno de acordo com a cinética de degradação bifásica

Condição	Degradação rápida: $t < t_b^*$ $C = C_0 \cdot e^{k_1(t-t_0)}$		Degradação Lenta: $t > t_b^*$ $C = C_{01} \cdot e^{-k_1(t-t_b)} \cdot C_{02} \cdot e^{-k_2(t-t_b)}$	
	k_1 (d ⁻¹)	R^2	k_2 (d ⁻¹)	R^2
Inóculo Têxtil	0,0095	0,9385	0,0020	0,3023
Inóculo Petroquímico	0,0127	0,9167	0,0035	0,6806
Atenuação Natural	0,0099	0,9413	0,0043	0,8457

* t_b = 30 dias adotado.

Fonte: O Autor (2022)

A baixa adaptação ao modelo cinético de ordem zero e a boa adaptação ao modelo de primeira ordem indicam que não houve excesso de substrato no meio, isto é, a concentração de fenantreno disponibilizada aos microrganismos provavelmente foi abaixo do limite que inibiria sua atividade.

Já para o modelo bifásico, que busca avaliar se a remoção do Fenantreno pode ser representada por um modelo com duas etapas, os valores de R^2 da etapa lenta variaram de 0,302 a 0,846, sugerindo que o modelo cinético não seja o mais adequado para descrever a degradação do Fenantreno observada nos experimentos realizados nesta pesquisa (Tabela 8), somente a condição de atenuação natural apresentou um ajuste adequado na fase lenta. Os valores da constante cinética k_2 também foram ligeiramente menores que os encontrados na literatura,

entretanto corroboram com a faixa de $0,001\text{ d}^{-1}$ a $0,005\text{ d}^{-1}$, observada por Bianco et al., (2020), mas foram menores que as taxas de degradação observadas por Madrid et al., (2016), que reportam valores de k_2 entre $0,010\text{ d}^{-1}$ e $0,178\text{ d}^{-1}$ para concentração inicial de 100 mg/kg . A diferença em mais de uma ordem de grandeza dos resultados do presente trabalho quando comparados com os reportados por Madrid et al., (2016) possivelmente se deve ao uso de hidroxipropil- β -ciclodextrin pelos autores, que teve como objetivo aumentar a disponibilidade dos HPAs utilizados no experimento (fluoreno e pireno) no sedimento. Além disso, também merece destaque o uso de diferente matriz do sedimento pelos autores, que foi proveniente de área de agricultura, com 59% de sua composição de areia, 19,4% silte e 21,0% argila, além de ser proveniente da camada superior (0-20cm).

Apesar de um valor relativamente alto para o microcosmo de atenuação natural para o R^2 do modelo cinético bifásico na degradação lenta, nota-se um melhor enquadramento ao modelo cinético de primeira ordem. De tal forma, observa-se que para o período analisado os processos de bioaumentação não tiveram impacto positivo no processo de remoção do Fenantreno. Entretanto, nota-se que este foi degradado, indicando que o sedimento estudado tem microrganismos com habilidade de degradar anaerobicamente o Fenantreno.

5.4 COMUNIDADE MICROBIANA

Ao todo, nos reatores biológicos e inóculos, foram caracterizados 13 gêneros bacterianos com abundância relativa superior a 5% em pelo menos algum deles. Dos 13 gêneros, 6 foram previamente descritos como portadores de mecanismos de degradação de HPAs ou de seus subprodutos.

Os índices de diversidade estão dispostos na Tabela 9, e indicam a complexidade da comunidade microbiana, abordando a riqueza da população e sua abundância relativa nos reatores biológicos.

Tabela 9 – Índices de diversidade para o sedimento e nos reatores biológicos de bioaugmentação e atenuação natural, em âmbito de gênero.

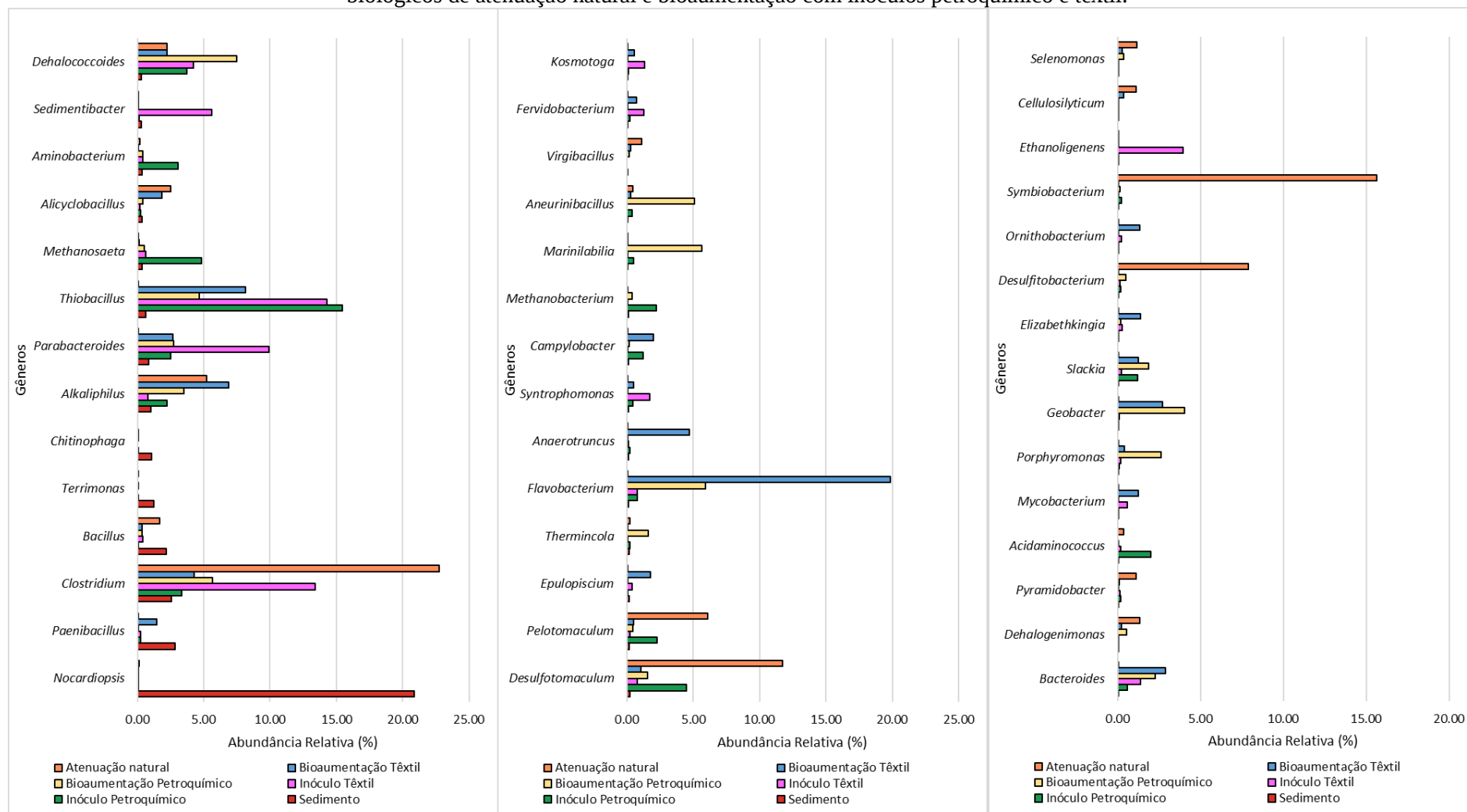
Índices	Amostra					
	Sedimento	Inóculo Petroquímico	Inóculo Têxtil	Reator de Bioaugmentação com inóculo petroquímico	Reator de Bioaugmentação com inóculo têxtil	Reator de Atenuação Natural
Gêneros (AR>0,1%)	48	64	78	60	63	42
Dominância (D)	0,2155	0,08215	0,08713	0,05429	0,08657	0,1269
Shannon (H)	2,914	3,406	3,311	3,436	3,295	2,643
Equitabilidade (J)	0,4738	0,5599	0,5635	0,5717	0,563	0,454
Chao-1	654,1	625,5	517,9	564,3	510,3	443,2

Fonte: O Autor (2022)

O índice de dominância de Simpson (D) tem como objetivo avaliar se existe predominância de algum microrganismo nas amostras analisadas, refletindo a probabilidade de dois indivíduos, escolhidos ao acaso, pertencerem ao mesmo grupo. Quanto mais próximos de zero, menor é a predominância de um grupo microbiano. Nas amostras analisadas, o sedimento, como era de se esperar, possui maior variedade microbiana, ($D = 0,22$), que diminui no reator de atenuação natural ($D = 0,13$) e mais ainda nos microcosmos (0,05 para microcosmo inoculado com lodo petroquímico e 0,09 para lodo têxtil). Tal resultado corrobora com o resultado do índice de Shannon (H), que traz informações quanto à biodiversidade na microbiota, indicando que o inóculo aumentou de forma significativa a diversidade microbiana, possivelmente carregando organismos degradadores de hidrocarbonetos. O valor mais baixo foi no sedimento ($H = 2,914$) e mais alto nos reatores de bioaugmentação por inóculos petroquímicos ($H = 3,436$) e têxtil ($H = 3,295$).

A riqueza microbiana é expressa pelos números de gêneros (com abundância relativa superior a 0,1%) e pelo índice Chao-1. Ao total 43 gêneros foram obtidos em abundância relativa superior a 1%, e estão dispostos na Figura 13. Apesar do número de gêneros ser menor no sedimento, o índice Chao-1 é maior que nos microcosmos e inóculos, indicando que nos inóculos há um maior número de gêneros, mas em menor quantidade de indivíduos por gênero. O menor valor do número de gêneros do sedimento se deu devido ao elevado número de bactérias com abundância relativa menor que 0,1%. Essa menor riqueza microbiana se dá à especialização na degradação do composto de interesse tanto dos inóculos quanto dos reatores. Nota-se também uma diminuição do valor do índice Chao-1 quando relacionando o inóculo petroquímico (625,5) e têxtil (517,9) aos reatores biológicos respectivos (564,3 e 510,3).

Figura 13 – Gêneros microbianos que apresentaram abundância relativa maior que 1%, presentes no sedimento, inóculos petroquímicos e têxtil e reatores biológicos de atenuação natural e bioaugmentação com inóculos petroquímico e têxtil.



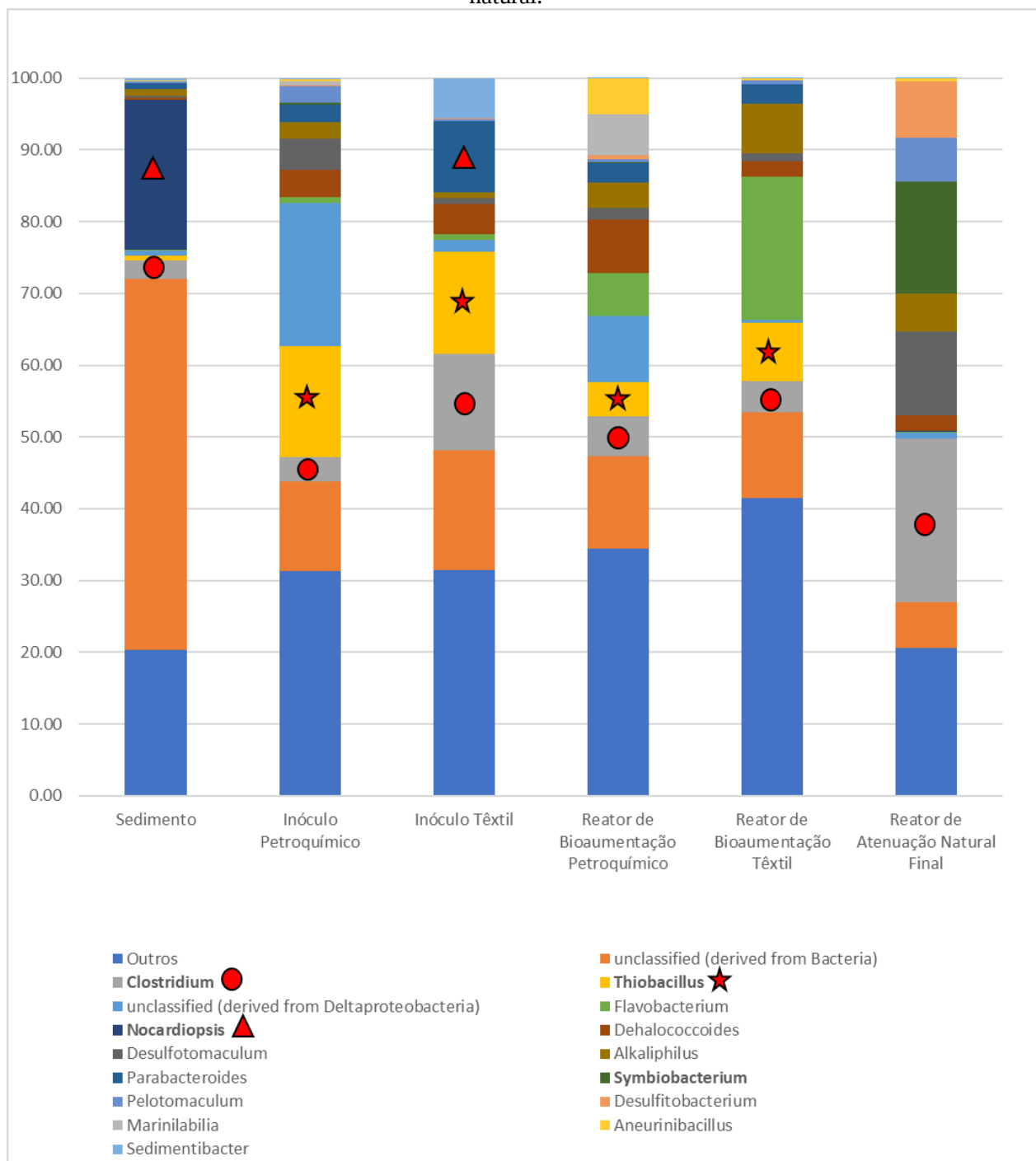
Fonte: O Autor (2022)

O índice de equitabilidade (J) busca mostrar o quão uniforme é a distribuição dos indivíduos, e têm ligação direta com o índice de Shannon (H). Os resultados do índice J mostram que além do aumento da diversidade, houve também uma distribuição mais uniforme dos gêneros microbianos.

O lodo petroquímico apresentou menor variação na abundância relativa quanto aos gêneros microbianos, fato que, quando comparado aos outros sistemas, justifica o menor tempo de meia vida. De tal forma, nota-se que o lodo petroquímico é mais especializado em degradação de compostos similares ao Fenantreno.

A capacidade de microrganismos em degradar compostos xenobióticos deriva do processo de evolução a partir da exposição à compostos previamente existentes com estruturas moleculares semelhantes, adaptando o processo de catabolismo em função de exposições de longo prazo a esses compostos (SEMPLE; MORRISS; PATON, 2003). Apesar da degradação de HPAs ser dominada por cepas de bactérias e fungos de uma variada gama de grupos, bactérias ainda são os microrganismos mais presentes na biorremediação. Entretanto, poucas bactérias são reportadas na literatura como capazes de degradar HPAs com cinco ou mais anéis aromáticos em uma cultura pura. Isso pode ser justificado devido à retenção destes compostos na fase sólida, e sua baixa transferência de massa às células bacterianas, insuficiente para suprir o seu metabolismo. Neste trabalho, os principais gêneros microbianos encontrados durante o experimento estão dispostos na Figura 14, e serão discutidos logo em seguida.

Figura 14 – Principais gêneros microbianos presentes nas amostras de sedimento, inóculos têxtil e petroquímico, nos reatores biológicos de bioaugmentação (têxtil e petroquímicos) e de atenuação natural.



Fonte: O Autor (2022)

As análises da diversidade microbiana do sedimento do manguezal Massangana mostram maior abundância relativa (AR) do gênero *Nocardiopsis* (20,87%). Esse microrganismo, pertencente ao filo *Actinobacteria* é conhecido pela sua versatilidade e capacidade de produção de diversos metabólitos bioativos, além de grande adaptabilidade ambiental (LI et al., 2013). Dentre os metabólitos bioativos capazes de serem produzidos por

este gênero, podemos destacar os biosurfactantes lipopeptídicos, compostos importantes para emulsão e miscibilidade de contaminações envolvendo petróleo (GANDHIMATHI et al., 2009). É possível que tal gênero já estivesse presente no sedimento devido à contaminação inicial decorrente do derramamento de petróleo de 2019 na costa brasileira, propiciando um ambiente adequado para seu crescimento, principalmente quando levada em conta sua haloresistência. Entretanto, bactérias do gênero *Nocardiopsis* são reportadas como aeróbias, halotolerantes, indicando que o sedimento, mesmo que de camadas mais profundas (20 a 40cm), ainda possuía algum grau de oxigenação, em decorrência da rizosfera das raízes do manguezal.

Após o processo de degradação de Fenantreno, os microcosmos sem inóculos biológicos (atenuação natural) tiveram suas culturas adaptadas, mudando as abundâncias relativas ao sedimento inicial. Destacaram-se os gêneros *Clostridium* (22,74%), *Symbiobacterium* (15,65%) e *Desulfotomaculum* (11,72%). Este último gênero microbiano possui uma rota metabólica chamada de supervia de degradação de pirimidina ribonucleosídeo, composto similar ao benzeno, mas com um anel heterocíclico com átomos de nitrogênio substituindo o carbono na posição 1 e 3. É possível que as vias metabólicas para degradação de HPAs, mais especificamente o Fenantreno, sejam similares às utilizadas para a degradação da pirimidina.

O gênero *Clostridium*, mais abundante neste reator, é reportado na literatura como capaz de degradar o Pireno e Fenantreno anaerobiamente com diferentes co-substratos (CHANG; CHANG; YUAN, 2008). Entretanto, no sedimento proveniente do manguezal este gênero possuía apenas 2,55% de abundância relativa, indicando que a anaerobiose e o substrato disponível, além do meio mineral pobre, foram propícios para o crescimento deste. Berdugo-Clavijo et al., (2012) mostrou que as bactérias mais intimamente relacionadas para as Clostridiaceae foram as bactérias dominantes envolvidas na biodegradação do Naftaleno em condições metanogênicas. condição esperada, uma vez que não houve suplementação de aceptores de elétrons.

O gênero *Symbiobacterium*, conhecido pelo comensalismo microbiano, é reportado como capaz de crescer em ambientes tanto aeróbios quanto anaeróbios, sendo um gênero termofílico. Entretanto, pouco é relatado sobre esse gênero quanto a sua capacidade de degradação de HPAs, porém sua presença em sedimentos contaminados com estes compostos já foi reportada na literatura, após a aplicação de fitorremediação, com aumento na sua abundância relativa (LU et al., 2019). Sua abundância relativa passou de 0,1% do sedimento a 15,65% nos reatores de atenuação natural, ressaltando sua importância nos mecanismos de degradação do composto. Esse é pertencente à família Incertae Sedis, da classe Clostridia, onde

também estão presentes gêneros microbianos com capacidades de degradação de HPAs, como por meio de redução de sulfato, tal como o *Sulfobacillus* (SCHWARZ et al., 2018).

O gênero *Alkaliphilus*, da família Clostridiaceae, anaeróbio e alcalílico, que apareceram nos três reatores biológicos (Petroquímico, têxtil e atenuação natural, com 3,52, 6,89 e 5,19% de AR respectivamente) já foram reportadas na literatura para a degradação do 2-metilnaftaleno em condições metanogênicas (FOLWELL et al., 2016).

Já o gênero *Desulfotomaculum* é composto por bactérias redutoras de sulfato, reportado como um microrganismo presente em reservatórios de óleos e manguezais contaminados (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; PANNEKENS et al., 2019). Assim como o gênero *Clostridium*, esse gênero tem capacidade de atuar nas etapas iniciais da rota de degradação anaeróbia, permitindo que arqueas metanogênicas promovam a etapa metanogênica da degradação dos compostos derivados de óleos. A degradação de HPAs é um processo sintrófico, onde cada espécie realiza uma etapa diferente do metabolismo, que não pode ser efetuado por apenas um gênero específico (MCINERNEY; SIEBER; GUNSALUS, 2009). Estudos recentes já reportam a capacidade do gênero *Desulfotomaculum* na degradação do Fenantreno, e inclusive reportam as etapas iniciais da rota metabólica através da redução de sulfato, na etapa de carboxilação do Fenantreno a ácido 2-fenantróico (ZHANG et al., 2021). É provável que este gênero tenha se utilizado de sulfato residual, presente no sedimento para o crescimento nos reatores de atenuação natural.

Já em ambos inóculos e biorreatores inoculados, o gênero *Thiobacillus* se destacou em termos de abundância relativa. Esse gênero microbiano quimioautótrofo é abundantemente encontrado em ambientes marinhos e terrestres, capazes de oxidar enxofre, produzindo sulfato, e transformando Fe^{+2} em Fe^{+3} . A literatura aponta esse gênero, juntamente com o *Stenotrophomonas* como potenciais degradadores de Fenantreno em sedimentos de rio quando utilizados uma combinação de *biochar* e nitrato, utilizando este último como aceptor de elétrons (YANG et al., 2018). Bactérias do gênero *Thiobacillus* e outras bactérias da mesma família foram reportadas também como presentes em culturas degradadoras de HPAs de alto peso molecular, como o benzo(a)pireno quando associados com fenol como co-substrato (WU et al., 2019). Entretanto, mesmo que abundantes em ambos inóculos, dada a baixa disponibilidade de fontes de enxofre no meio reacional, tiveram redução em sua abundância relativa. Para o reator petroquímico a diminuição foi de 15,47% para 4,67% e para o têxtil de 14,27% para 8,15%.

Os reatores petroquímicos tiveram uma ampla gama de gêneros com abundância relativa superior a 4%: *Dehalococcoides* (7,50%), *Flavobacterium* (5,94%), *Marinilabilia* (5,67%), *Clostridium* (5,66%), *Aneurinibacillus* (5,09%), *Thiobacillus* (4,67%) e *Geobacter* (4,05%). O

gênero mais abundante, *Dehalococcoides*, é reportado por ser um microrganismo anaeróbio que utiliza hidrogênio como doador de elétron na desalogenação redutiva de compostos halogenados orgânicos, e já foi reportado como presente em ambiente contaminado por éteres difenílicos polibromados (PBDE) e HPAs, entretanto, relacionado com a degradação do primeiro composto.

Pouco é relatado sobre os gêneros *Flavobacterium* e *Marinilabilia* quanto à degradação de HPAs. O primeiro é reportado, em experimentos de microcosmos com sedimentos de manguezais, como capaz de degradar HPAs de baixo peso molecular (AHMAD et al., 2019). É possível notar que este gênero teve aumento significativo em sua abundância relativa em ambos reatores biológicos, sendo mais significante no reator têxtil (19,88%). Em outros experimentos, este gênero é reportado, juntamente com *Pseudomonas*, como capazes de degradar uma mistura de HPAs em sedimento (TRZESICKA-MLYNARZ; WARD, 1995).

Já o gênero *Marinilabilia* apresentou um aumento em sua abundância relativa nos reatores petroquímicos (5,67%), entretanto é apenas citado como constituinte minoritário de uma comunidade capaz de degradar óleos em sedimentos arenosos (FITCH, 2016). Bactérias pertencentes ao filo *Bacteroidetes*, como a *Marinilabilia*, são conhecidas pela sua capacidade de degradação de compostos de alto peso molecular. Similarmente ao reportado por Kleindienst et al., (2014), é possível que estes microrganismos tenham utilizado biomassa em lise celular ou outra interação trófica com os consumidores primários do Fenantreno do que participaram na própria degradação do mesmo.

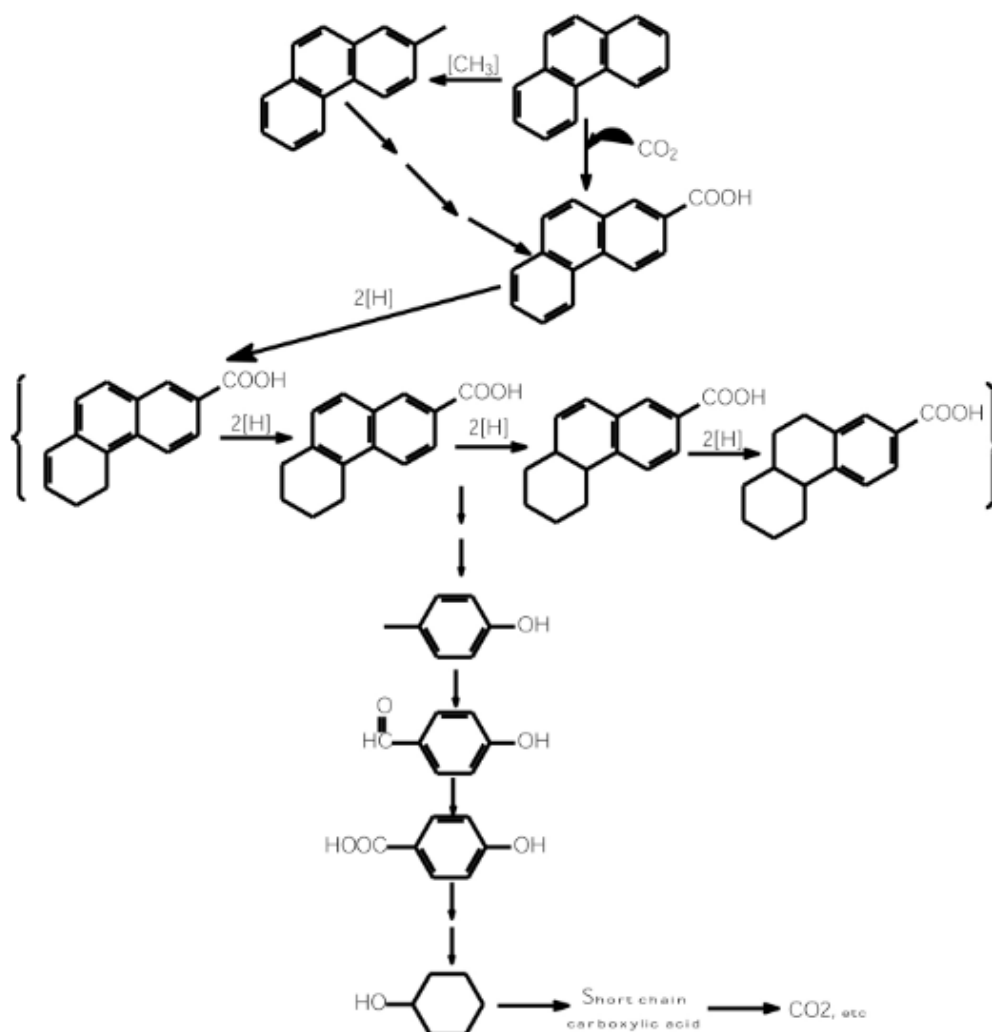
O reator têxtil teve um aumento significativo da abundância relativa do gênero *Flavobacterium* (0,77% no inóculo para 19,88% no reator). Esse gênero é encontrado em ambiente de água doce e é amplamente reportado como eficiente degradador de HPAs, incluindo aqueles com alto peso molecular, como o benzo(a)pireno (AHMAD et al., 2019). Fenantreno e pireno também foram reportados na literatura como possíveis de serem degradados por esse gênero, principalmente em associação com *Pseudomonas* (KAPPELL et al., 2014).

Pouco é disponível sobre as rotas metabólicas anaeróbias e enzimas envolvidas na biodegradação do Fenantreno, entretanto, acredita-se que essa acontece análoga ao já estudado para o Naftaleno. Uma das rotas descritas para o naftaleno aponta para carboxilação ou metilação com subsequente adição de fumarato e oxidação do ácido fenantroico (FOGHT, 2008; MECKENSTOCK; MOUTTAKI, 2011). Devido a ocorrência de estudos da degradação conjunta de naftaleno e Fenantreno, é assumido que as mesmas enzimas capazes de atacar o naftaleno podem ser utilizadas para a degradação do Fenantreno em rotas paralelas, tendo o

ácido 2-fenantroico o produto da carboxilação, mesmo que os microrganismos que executem a degradação desses compostos sejam diferentes, como sugerido por Chang, Um e Holoman, (2006). Na rota de carboxilação, para o Naftaleno e 2-metil-naftaleno, a principal enzima reportada é a naphthoate carboxilase, em condições de redução de sulfato (BERGMANN; SELESI; MECKENSTOCK, 2011). Estudo que utilizou bicarbonato (13 °C) marcado sugeriu que este foi incorporado ao Fenantreno para sua degradação através de carboxilação como etapa inicial para o metabolismo anaeróbico (MA et al., 2015). Além disso, nesse mesmo estudo, é avaliada a mudança metagenômica durante o processo de degradação de HPAs, mostrando um aumento na abundância dos genes responsáveis pelas funções celulares de transporte de íons inorgânicos e seu metabolismo, produção, conversão energética e tráfego intracelular, transporte e secreção vesicular.

Em condições de redução de nitrato a rota anaeróbia aparenta permanecer a mesma, com a carboxilação do Fenantreno, como mostrado por Zhang et al. (2020) com a cultura dominante por *Pseudomonas stutzeri* PheN9 ou analogamente pela metilação (Figura 15). A presença de UbiD carboxilase na cultura PheN9 mais uma vez embasa a ocorrência inicial da carboxilação nessa cultura redutora de nitrato. Enzimas dessa família são conhecidas por utilizarem o cofator prFMN para atingir a descarboxilação reversível de compostos aromáticos (MARSHALL et al., 2021). Já na rota que se inicia com a metilação, a enzima reportada é a UbiE metiltransferase também para a cultura PheN9. A UbiD carboxilase já foi reportada, segundo a base de dados UniProt como presente em bactérias da classe *Clostridia*.

Figura 15 – Processo de biodegradação anaeróbica do Fenantreno por PheN9 sob condições de redução de nitrato



Fonte: (ZHANG et al., 2020)

5.5 IMPLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

Os resultados de remoção de Fenantreno obtidos tanto nos microcosmos inoculados, quanto nos submetidos a atenuação natural indicam haver atividade microbiana para a biorremediação de locais contaminados. Os inóculos utilizados neste estudo não resultaram em diferença estatística quando comparados com a atenuação natural quanto ao percentual de degradação do composto alvo, o que indica dizer que no caso deste trabalho, o caminho preferível é a atenuação natural. Experimentos utilizando maior quantidade de biomassa pode mostrar resultados diferentes, mais promissores na remoção de HPAs em sedimentos, e devem ser testados. Da mesma forma, também se recomenda a utilização de aceptores externos de

elétrons, como nitrato e/ou sulfato nos meios minerais para avaliação da degradação anaeróbia em experimentos futuros.

Este estudo focou na avaliação da possibilidade da degradação anaeróbia do Fenantreno, entretanto, os conceitos utilizados podem ser aproveitados em outros estudos para a degradação de HPAs.

6 CONCLUSÕES

O Fenantreno (100 mg/kg de sedimento) adicionado a microcosmos anaeróbios, contendo sedimento de manguezal, foi parcialmente removido nas condições de atenuação natural (37%) e de bioaugmentação com lodo têxtil (39%) e petroquímico (35%) em 80 dias. O sedimento de manguezal já apresentava microrganismos com arcabouço metabólico capaz de degradar compostos aromáticos, representado pelos gêneros *Clostridium* e *Thiobacillus*. Após passar pelo processo de atenuação natural, verificou-se o aumento da abundância relativa dos gêneros *Desulfotomaculum*, *Symbiobacterium*, *Alkaliphilus* e *Clostridium*, este último já presente significativamente no sedimento.

Já nos microcosmos com inóculos petroquímicos, destacaram-se a presença dos gêneros *Thiobacillus*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Marinilabilia* e *Dehalococcoides*. Similarmente, nos microcosmos com inóculo têxtil, destacaram-se os gêneros *Thiobacillus*, *Clostridium*, *Flavobacterium* e *Alkaliphilus*. Essa similaridade entre a microbiota encontrada, mesmo que em diferentes abundâncias relativas, pode indicar a ocorrência de semelhante rota de degradação entre os microcosmos inoculados. Dessa forma, devido à grande presença de bactérias da classe Clostridiaceae em todos os microcosmos, sugere-se que o mecanismo de degradação ocorrido nos reatores tenha sido fermentativo-metanogênico, condição esperada, uma vez que não houve suplementação com aceptores de elétrons.

Entretanto, é visível a diferença entre os gêneros presentes nos microcosmos bioaugmentados e de atenuação natural, sugerindo que, mesmo que a eficiência de remoção de fenantreno seja similar, diferentes grupos microbianos podem ser capazes de participar dessa atividade.

Nos experimentos realizados em microcosmos com Fenantreno foi observada pequena influência do uso de inóculos para a degradação do Fenantreno, com tempo de meia vida 13% menor para os reatores inoculados com lodo petroquímico quando comparados aos reatores de atenuação natural.

Os valores do coeficiente cinético de primeira ordem e meia vida (k_1 e $t_{1/2}$) encontrados neste estudo sugere que, além da inoculação não ter sido eficiente, devido ao baixo teor de sólidos adicionado, os microrganismos já presentes no sedimento precisariam de um tempo maior de aclimação para uma degradação de Fenantreno mais rápida, devido à complexidade e toxicidade das moléculas. Aceptores de elétron como sulfato e nitrato não estavam disponíveis através do meio nutricional utilizado. Dito isso, os microrganismos que tinham preferência por essa rota só tiveram disponível os aceptores presentes no sedimento.

Estudos posteriores devem ser focados em otimização de processo, utilizando cepas microbianas especializadas nessa degradação. Melhorias quanto ao meio nutricional utilizado, disponibilizando sulfato e/ou nitrato devem ser levadas em conta em trabalhos futuros. Além disso, lacunas bibliográficas como as rotas de degradação anaeróbias e enzimas produzidas pelos microrganismos são pontos-chave para os próximos estudos, que podem vir a permitir melhorias significantes nas variáveis envolvidas no processo de biorremediação.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. et al. The distinct response of phenanthrene enriched bacterial consortia to different PAHs and their degradation potential: a mangrove sediment microcosm study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 380, n. May, p. 120863, 2019.
- ANDERSEN, F.; KRISTENSEN, E. Oxygen microgradients in the rhizosphere of the mangrove *Avicennia marina*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 44, n. 1985, p. 201–204, 1988.
- ARAÚJO, M. E. DE; RAMALHO, C. W. N.; MELO, P. W. DE. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 36, n. 1, p. 1–6, 2020.
- ATLAS DOS MANGUEZAIS DO BRASIL. **Atlas dos manguezais do Brasil**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018.
- ATLAS, R. M.; HAZEN, T. C. Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. history. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 16, p. 6709–6715, 2011.
- BEIRAS, R. Hydrocarbons and Oil Spills. **Marine Pollution**, p. 89–106, 2018.
- BERDUGO-CLAVIJO, C. et al. Methanogenic biodegradation of two-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, n. 1, p. 124–133, 2012.
- BERGMANN, F. D.; SELESI, D.; MECKENSTOCK, R. U. Identification of new enzymes potentially involved in anaerobic naphthalene degradation by the sulfate-reducing enrichment culture N47. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 241–250, 2011.
- BIANCO, F. et al. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons during anaerobic biostimulation of marine sediments. **Science of the Total Environment**, v. 709, p. 136141, 2020.
- BISOGNIN, R. P. et al. Analysis of microbial potential of a biopile in soil bioremediation contaminated by petroleum hydrocarbons. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 3, p. 517–526, 2018.
- BOCIU, I. et al. Decomposition of sediment-oil-agglomerates in a Gulf of Mexico sandy beach. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- BROOIJMANS, R. J. W.; PASTINK, M. I.; SIEZEN, R. J. Hydrocarbon-degrading bacteria: The oil-spill clean-up crew. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 587–594, nov. 2009.
- BRUM, H. D.; CAMPOS-SILVA, J. V.; OLIVEIRA, E. G. Brazil oil spill response: Government inaction. **Science**, v. 367, n. 6474, p. 155–156, 2020.

BUCHMAN, M. F. **NOAA Screening Quick Reference Tables** NOAA OR&R **REPORT 08-1**. Seattle WA: [s.n.].

BUDZINSKI, H. et al. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. **Marine Chemistry**, v. 58, n. 1–2, p. 85–97, 1997.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. **Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Summary tables** Canadian Environmental Quality Guidelines. [s.l: s.n.].

CEDRE. **Database of spill incidents and threats in waters around the world**. Disponível em: <http://wwz.cedre.fr/en/Resources/Spills?year=default>. Acesso em: 6 dez. 2021.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 331–338, jun. 1993.

CHANG, B. V.; CHANG, I. T.; YUAN, S. Y. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 145–149, 2008.

CHANG, W.; UM, Y.; HOLOMAN, T. R. P. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 6, p. 425–430, 2006.

CHEN, J. et al. Oil spills from global tankers: Status review and future governance. **Journal of Cleaner Production**, v. 227, p. 20–32, 2019.

COATES, J. D.; ANDERSON, R. T.; LOVLEY, D. R. Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Sulfate-Reducing Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1099–1101, mar. 1996.

CONGRESSO, E. F. **Governo violou instruções de manual que trata sobre poluição por óleo**. Disponível em: <https://congressoemfoco.uol.com.br/meioambiente/governo-violou-instrucoes-de-manual-que-trata-sobre-poluicao-por-oleo/>. Acesso em: 19 dez. 2021.

DE ALMEIDA, F. F. et al. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated mangroves: Understanding the historical and key parameter profiles. **Marine Pollution Bulletin**, v. 169, n. November 2020, 2021.

DUKE, N. C. Oil spill impacts on mangroves: Recommendations for operational planning and action based on a global review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 2, p. 700–715, 2016.

EDWARDS, E. A.; GRBIC-GALIC, D. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 313–322, 1994.

EPA. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**. Disponível em: <https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/pahs.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2021.

EZEKOYE, C.; AMAKOROMO, E.; IBIENE, A. Bioremediation of Hydrocarbon Polluted Mangrove Swamp Soil from the Niger Delta using Organic and Inorganic Nutrients. **British Biotechnology Journal**, v. 6, n. 2, p. 62–78, 2015.

FARIAS, C. O. et al. Origin and degradation of hydrocarbons in mangrove sediments (Rio de Janeiro, Brazil) contaminated by an oil spill. **Organic Geochemistry**, v. 39, n. 3, p. 289–307, 2008.

FITCH, L. R. Biodegradation of Buried MC252 Oil in Coastal Beach Sands by PAH Degraders in Response to Oxygen Biostimulation. n. August, 2016.

FOGHT, J. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 2–3, p. 93–120, 2008.

FOLWELL, B. D. et al. Exploring the capacity for anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and naphthenic acids by microbes from oil-sands-process-affected waters. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 108, p. 214–221, 2016.

GANDHIMATHI, R. et al. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiosis alba* MSA10. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 6, p. 825–835, 2009.

GARRIGUES, P. et al. Pyrolytic and Petrogenic Inputs in Recent Sediments: A definitive Signature Through Phenanthrene and Chrysene Compound Distribution. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 7, n. 4, p. 275–284, 1995.

GOVARTHANAN, M. et al. Significance of allochthonous brackish water *Halomonas* sp. on biodegradation of low and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. **Chemosphere**, v. 243, 1 mar. 2020.

GRACE LIU, P. W. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 8, p. 1119–1127, 2011.

HAWTHORNE, S. B. et al. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: Recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 892, n. 1–2, p. 421–433, 2000.

HOFF, R. et al. Oil Spills in Mangroves. **Noaa**, n. September, p. 96, 2014.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n. 4, p. 265–278, 2001.

IBAMA. **Cartilha informativa sobre a trajetória do acidente/desmobilização**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/manchasdeoleo-desmobilizacao>. Acesso em: 14 dez. 2021a.

IBAMA. **Orientação Técnica: Vistoria De Acompanhamento E Limpeza Do Litoral**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2019/manchasdeoleo/10.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2021b.

ITOPF. **Oil Tanker Spill Statistics 2020**. Disponível em: <https://www.itopf.org/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>. Acesso em: 19 dez. 2021.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 1, p. 71–84, 2005.

KAPPELL, A. D. et al. The polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential of Gulf of Mexico native coastal microbial communities after the Deepwater Horizon oil spill. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAY, p. 1–14, 2014.

KATHIRESAN, K.; QASIM, S. Z. Biodiversity of mangrove ecosystems. **Hindustan Publishing**, v. 2, p. 251, 2005.

KE, L. et al. Spatial and vertical distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments. **Science of the Total Environment**, v. 340, n. 1–3, p. 177–187, 2005.

KLEINDIENST, S. et al. Diverse sulfate-reducing bacteria of the Desulfosarcina/Desulfococcus clade are the key alkane degraders at marine seeps. **ISME Journal**, v. 8, n. 10, p. 2029–2044, 2014.

LANG, F. S. et al. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mangrove Sediments Under Different Strategies: Natural Attenuation, Biostimulation, and Bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 9, 2016.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. 3. ed. Oregon: Editora Blucher, 2000.

LI, C. H. et al. Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 21, p. 5772–5779, 2009.

LI, C. H. et al. Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO₃. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 30, p. 148–156, 2015.

LI, H. W. et al. Comparative Genomic Analysis of the Genus *Nocardiopsis* Provides New Insights into Its Genetic Mechanisms of Environmental Adaptability. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

LU, H. et al. Mixed-surfactant-enhanced phytoremediation of PAHs in soil: Bioavailability of PAHs and responses of microbial community structure. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 658–666, 2019.

MA, B. et al. Reconstructed metagenomes reveal changes of microbial functional profiling during PAHs degradation along a rice (*Oryza sativa*) rhizosphere gradient. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 890–900, 2015.

MACKAY, D. et al. **Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals**. 1992–1997. ed. [s.l.] CRC Press, 2006. v. III

MADRID, F. et al. Natural attenuation of fluorene and pyrene in contaminated soils and assisted with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Effect of co-contamination. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 42–49, 2016.

MAILLACHERUVU, K. Y.; PATHAN, I. A. Biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and pyrene under anaerobic conditions. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 44, n. 13, p. 1315–1326, 2009.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3127–3133, 2001.

MARSHALL, S. A. et al. UbiD domain dynamics underpins aromatic decarboxylation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2021.

MCINERNEY, M. J.; SIEBER, J. R.; GUNSALUS, R. P. Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 623–632, 2009.

MECKENSTOCK, R. U.; MOUTTAKI, H. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 406–414, 2011.

MENEZES, O. et al. Coupling intermittent micro-aeration to anaerobic digestion improves tetra-azo dye Direct Black 22 treatment in sequencing batch reactors. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 146, p. 369–378, 2019.

MENICONI, M. DE F. G. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos No Meio Ambiente: Diferenciação De Fontes Em Sedimentos E Metabólitos Em Bile De Peixes**. [s.l.: s.n.].

MIHELICIC, J. R.; LUTHY, R. G. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1182–1187, 1988.

MOREIRA, Í. T. A. et al. Strategies of Bioremediation for the Degradation of Petroleum Hydrocarbons in the Presence of Metals in Mangrove Simulated. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 44, n. 6, p. 631–637, 2016.

MUELLER, K. E.; SHANN, J. R. PAH dissipation in spiked soil: Impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. **Chemosphere**, v. 64, n. 6, p. 1006–1014, 2006.

MULABAGAL, V. et al. Chemical fingerprinting of petroleum biomarkers in Deepwater Horizon oil spill samples collected from Alabama shoreline. **Marine Pollution Bulletin**, v. 70, n. 1–2, p. 147–154, 2013.

OGAWA, G.; ISHIDA, M.; URANO, N. Isolation and identification of dibutyl phthalate-degrading bacteria from hydrospheres in Tokyo. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 261–265, 2009.

OMOKHAGBOR ADAMS, G. et al. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28–39, 2015.

PANNEKENS, M. et al. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. **New Biotechnology**, v. 49, n. November 2018, p. 1–9, 2019.

PATIN, S. **Environmental Impact of Crude Oil Spills**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013.

QI, Y.-B. et al. Removal Capacities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by a Newly Isolated Strain from Oilfield Produced Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 2, p. 215, 22 fev. 2017.

RAMSAY, M. A. et al. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, n. 7–12, p. 413–419, 2000.

REDDY, K. R.; D'ANGELO, E. M.; HARRIS, W. G. Biogeochemistry of wetlands. In: **Handbook of Soil Science**. M. E. Sumn ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. p. G89–G119.

ROCKNE, K. J. et al. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1595–1601, 2000.

ROMERO, M. C. et al. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. **Environmental Pollution**, v. 101, n. 3, p. 355–359, 1998.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioremediation of petroleum contamination. In: **Biotechnology Research Series 6**. [s.l: s.n.]. v. 6p. 100–124.

SANTA-CRUZ, J. **Foraminíferos Atuais Em Um Manguezal Impactado Por Petróleo 20 Anos Atrás : O Rio Irii , Canal De Bertioga, Santos-SP**. [s.l: s.n.].

SANTOS, H. F. et al. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 216, n. 1–4, p. 329–350, 2011.

SANTOS, L. C. M. et al. Long-term effects of oil pollution in mangrove forests (Baixada Santista, Southeast Brazil) detected using a GIS-based multitemporal analysis of aerial photographs. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 2, p. 159–170, 2012.

SCHWARZ, A. et al. Microbial Degradation of Phenanthrene in Pristine and Contaminated Sandy Soils. **Microbial Ecology**, v. 75, n. 4, p. 888–902, 2018.

SEMPLE, K. T.; MORRISS, A. W. J.; PATON, G. I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 809–818, 2003.

SOARES, M. O. et al. Brazil oil spill response: Time for coordination. **Science**, v. 367, n. 6474, p. 155–155, 10 jan. 2020.

STEFFEN, K. T. et al. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. **Biodegradation**, v. 18, n. 3, p. 359–369, 2007.

THAKKAR, H.; VINCENT, V. Application of Microorganisms in Bioremediation. In: SINGH, S. P.; UPADHYAY, S. K. (Eds.). **Bioprospecting of Microorganism-Based Industrial Molecules**. [s.l.] Wiley, 2021. v. 1p. 77–103.

TRZESICKA-MLYNARZ, D.; WARD, O. P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 470–476, 1995.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; DE CARVALHO, C. C. C. R. **Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes** *Biodegradation*, 2011.

WANNOUSSA, W. et al. Effect of Iron Nanoparticles Synthesized by a Sol-Gel Process on *Rhodococcus erythropolis* T902.1 for Biphenyl Degradation. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 07, n. 03, p. 264–277, 2015.

WU, H. et al. Structure and function of microbial community associated with phenol co-substrate in degradation of benzo[a]pyrene in coking wastewater. **Chemosphere**, v. 228, p. 128–138, 2019.

XU, X. et al. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, dez. 2018.

YANG, X. et al. Enhanced phenanthrene degradation in river sediments using a combination of biochar and nitrate. **Science of the Total Environment**, v. 619–620, p. 600–605, 2018.

YU, K. S. H. et al. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 8–12, p. 1071–1077, 2005.

ZHANG, X.; YOUNG, L. Y. Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia (Applied and Environmental Microbiology (1997) 63:12 (4759-4764)). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2279, 1999.

ZHANG, Z. et al. Investigation of anaerobic phenanthrene biodegradation by a highly enriched co-culture, PheN9, with nitrate as an electron acceptor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 383, n. April 2019, p. 121191, 2020.

ZHANG, Z. et al. Anaerobic phenanthrene biodegradation by a newly isolated sulfate-reducer, strain PheS1, and exploration of the biotransformation pathway. **Science of the Total Environment**, v. 797, p. 149148, 2021.

ZHU, X. et al. Guidelines for the bioremediation of oil-contaminated salt marshes. **Epa**, n. July, p. 1–61, 2004.

ZHU, X.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. Literature review on the use of commercial cleanup of oil-contaminated estuarine environments. n. July, 2004a.

ZHU, X.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. **Literature review on the use of commercial bioremediation agents for cleanup of oil-contaminated estuarine environments**. Cincinnati: [s.n.]. Disponível em: <https://www.epa.gov/emergency-response/literature-review-use-commercial-bioremediation-agents-cleanup-oil-contaminated>.