



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

MANOELLA ALMEIDA CANDIDO

**ISOLAMENTO E ENRIQUECIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS PARA  
PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE FENANTRENO PROVENIENTES DE  
ÓLEO BRUTO**

Recife

2024



**CARACTERIZAÇÃO E SIMULAÇÃO DE RESERVATÓRIOS, ENERGIAS RENOVÁVEIS  
E BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL**

Apoio



Gestão



MANOELLA ALMEIDA CANDIDO

**ISOLAMENTO E ENRIQUECIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS PARA  
PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE FENANTRENO PROVENIENTES DE  
ÓLEO BRUTO**

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

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientada: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Bruna Soares Fernandes

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sávvia Gavazza

Recife

2024

Catálogo na fonte  
Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

C217i Candido, Manoella Almeida.  
Isolamento e enriquecimento de micro-organismos para processos de biorremediação de fenantreno provenientes de óleo bruto / Manoella Almeida Candido, 2024.  
96 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Bruna Soares Fernandes.  
Coorientadora: Profa. Dra. Sávvia Gavazza.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Recife, 2024.  
Inclui referências.

1. Engenharia civil. 2. Derramamentos de petróleo. 3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 4. Impactos ambientais. 5. Biorremediação. 6. Isolamento bacteriano. 7. Estação de tratamento de efluentes industrial. I. Fernandes, Bruna Soares (Orientadora). II. Gavazza, Sávvia (Coorientadora). III. Título.

624 CDD (22. Ed.)

UFPE  
BCTG / 2024 - 96

**MANOELLA ALMEIDA CANDIDO**

**ISOLAMENTO E ENRIQUECIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS  
PARA PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE FENANTRENO  
PROVENIENTES DE ÓLEO BRUTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRA em Engenharia Civil.  
Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Aprovada em 22/05/2024

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Bruna Soares Fernandes – UFPE  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sávia Gavazza dos Santos – UFPE

**BANCA EXAMINADORA**

participação por videoconferência  
Prof. Dr. Fabricio Motteran (examinador interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

participação por videoconferência  
Dr.<sup>a</sup> Shyrlane Torres Soares Veras (examinadora externa)  
Aegea Saneamento

participação por videoconferência  
Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite (examinador interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer de coração a Deus e Nossa Senhora por me sustentarem e guiarem até aqui. Sem a intercessão dEles não sei onde estaria hoje.

Quero expressar minha mais profunda gratidão aos meus pais, Maria de Fátima de Farias e Maurício do Nascimento Candido. Eles representam muito mais do que simplesmente meus pais; são meus pilares, meus confidentes, e sempre estiveram presentes para apoiar-me em todas as minhas empreitadas, mesmo quando eu mesma duvidava de mim e das minhas capacidades.

Se alcancei este ponto, devo-o inteiramente ao apoio incansável que sempre me proporcionaram. Em meio às adversidades, nunca me senti sozinha, pois vocês estiveram ao meu lado, fortalecendo-me e encorajando-me a perseverar. Meu maior desejo é continuar a honrar o amor e dedicação que vocês têm dedicado a mim, e fazer com que se sintam orgulhosos de cada passo que dou.

Agradeço-lhes por existirem em minha vida; o amor que sinto por vocês transcende tudo, é mais profundo que qualquer sentimento que tenha por mim mesma.

Um enorme agradecimento aos meus amigos que a vida universitária me proporcionou: Jocimar, Ester, Henrique Cesar, Ingrid, Marcela, Agnes, Marília, Bianca, Milena, Karolayne, Sayonara, Lucas Araújo, Júlia, Marcus Vinicius, Marcos Sales, Raphaella Vasconcelos, Lucas Freitas, Devson, Gilberto, Jucelia, Bárbara Alencar, Neto, Tássia, Lamarck, Daniela, Marcélio, Gabrielly, Alfredo, Alyne, Antonio Augusto, Bruna Kelly, Dicla, Karen, Nathália, Paulo, Tatiane, Gabriel Tiberius e Danúbia. Vocês foram mais do que amigos, foram minha família durante essa jornada. Cada um de vocês me ensinou o verdadeiro significado da amizade.

Quando mais precisei, vocês estavam ali com palavras de conforto, abraços, piadas, comidinhas, conselhos, apoio e broncas. Mesmo seguindo caminhos diferentes, vocês sempre estiveram presentes na minha vida. Sou fã de cada um do jeitinho que são, com todas as suas peculiaridades. Sou imensamente grata por tudo que fizeram por mim!

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos técnicos do LSA: Ronaldo, Luiz Galdino e Iago, agradeço por todo o suporte e conhecimento compartilhado ao longo deste período. Em particular, gostaria de dedicar uma palavra especial à Danúbia que sem sua inestimável ajuda, apoio e paciência, muitas vezes atuando como uma mentora/orientadora espetacular, eu certamente teria enfrentado mais dificuldades. Danúbia, sua capacidade de transformar o que parecia difícil em algo fácil e acessível foi verdadeiramente tranquilizador para mim. Sua presença foi essencial durante os anos em que tivemos o privilégio de trabalhar juntas.

Agradeço de coração por tudo que você fez por mim e desejo sinceramente que sua vida seja repleta de felicidade e realizações em todas as áreas.

Um agradecimento especial à Karol e à Gabriela, minhas irmãs de coração. Amo vocês e mal posso esperar para abraçar vocês novamente e poder conversar sem nem perceber que passaram anos sem nos vermos. Vocês são amigas maravilhosas e sinto muito orgulho de vocês. Esse amor e carinho se estende ao meu irmão que gostaria de dar um abraço agora, mas sei que está torcendo por mim de longe, saudades de você Alessandro do Nascimento Candido, eu te amo.

Luiz Filipe, meu bem, quero expressar minha imensa gratidão pela sua dedicação e persistência em nossa relação. Você é muito mais do que apenas meu namorado; é meu melhor amigo, confidente e, até mesmo meu professor particular. Sua disposição para aprender e compartilhar conhecimento comigo é algo que verdadeiramente admiro. Você sempre está disposto a mergulhar em tudo o que me interessa sem pensar duas vezes, acreditando que duas cabeças pensam melhor do que uma.

Estudar ao seu lado é uma experiência encantadora, pois transformamos até os temas mais complexos em algo divertido e compreensível. Agradeço imensamente por renunciar do seu tempo para me auxiliar em minha dissertação, demonstrando uma paciência e apoio inestimáveis durante esta fase importante da minha vida. Saiba que o amor e o apoio que você me oferece não passam despercebidos e saiba que é totalmente recíproco, e estarei sempre aqui para retribuir todo esse carinho quando você precisar. Eu te amo.

Não poderia deixar de agradecer com muito carinho aos professores Mario Kato e Maria de Lourdes Florêncio por todo apoio, conselhos e estrutura que proporcionaram para o desenvolvimento do meu projeto. Para mim, o LSA é como a Disney para um pesquisador(a). Lá tive a oportunidade de sonhar e realizar sonhos.

Não posso deixar de expressar minha gratidão ao meu pai científico, Professor Sidney Fernandes. Agradeço sinceramente por sua constante crença em mim, por compartilhar minhas alegrias nas conquistas e por seu inabalável apoio, orientação e conselhos nos momentos em que mais precisei. Tenho imenso orgulho de ter sido sua aluna e orientanda, e reconheço que muito do que aprendi devo ao senhor.

Gostaria também de estender meu profundo agradecimento à Professora Marlene Boccato, Rossana Virga, Daniele Carvalho, Debora Mandaji, Luciana Lee, Andrea Bombonatte, Mara Lucia Zucheran, Raquel Meneses, Thaís e ao professor Rafael. Cada uma de vocês foi e continua sendo um exemplo inspirador de profissionalismo para mim. É uma honra ter tido a

oportunidade de aprender com professores excepcionais que estão além do comum. Meu desejo é que mais alunos tenham a sorte de cruzar seus caminhos.

Agradeço por cada conhecimento compartilhado, por terem mostrado a importância e a satisfação de seguir uma carreira que amamos, sempre guiando-nos pelo caminho da humildade e ética. Vocês tornaram o desafiador em alcançável, e por isso sou e eternamente serei profundamente grata.

Agradeço aos professores Wanderli Leite e Bruna Magnus por cada conselho, apoio, momento de descontração, abraços calorosos e, acima de tudo, por estarem sempre presentes para me auxiliar em todas as situações. A lembrança do apoio incondicional que vocês me proporcionaram durante esta etapa da minha jornada acadêmica será eterna, e jamais esquecerei o impacto positivo que tiveram em minha vida.

Expresso meu desejo de que vocês nunca percam essa essência única que os caracteriza. Sua dedicação e gentileza deixaram uma marca positiva em minha jornada educacional, e sou profundamente grata por isso.

Professor Fabricio Motteran, só tenho a agradecer por ser meu psicólogo, irmão mais velho, conselheiro, professor e amigo. O senhor cumpriu esses papéis diversas vezes durante esses anos no LSA e sempre esteve presente quando mais precisei.

Obrigada por acreditar em mim e no meu trabalho, mesmo quando meus pensamentos estavam fora da caixinha. O senhor nunca cortou minhas asas, mas me ensinou a voar com responsabilidade e consciência. Obrigada por tudo que fez por mim, e desejo que sua vida seja sempre leve, tranquila e feliz ao lado da sua amada Thais e da Cloe. Que o senhor continue alcançando cada vez mais degraus na vida, porque sei que quando chegar ao topo continuará sendo a mesma pessoa que é atualmente.

Agradeço também ao Filipe Filgueiras, Luiz Pereira, Vitor Emanuel e Rafael Marques por toda ajuda, desde antes do meu ingresso no mestrado, e que continuou durante esses dois anos. Obrigada pela paciência e ajuda durante esses anos.

Sou grata também pelos ICs que me ajudaram em determinados momentos durante a jornada que tive o prazer de aprender com eles e junto deles e ensinar também, meu agradecimento especial ao Renan, que foi meu braço direito e esquerdo em muitas ocasiões, e sempre se mostrou pronto para ajudar.

Agradeço aos demais do LSA que de alguma forma me ajudaram, independentemente de como tenha sido.

Agradeço à orientação e coorientação das professoras Bruna Soares Fernandes e Sália Gavazza durante esses anos.

**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, suportado com recursos provenientes do investimento de empresas petrolíferas qualificadas na Cláusula de P, D&I da Resolução ANP N° 50/2015. Em particular ao **PRH 48.1 “Caracterização e Simulação de Reservatórios, Energias Renováveis e Biotecnologia Ambiental”** (PROCESSO ANP N°48610.201019/2019- 38), sediado no Departamento de Energia Nuclear do Centro de Tecnologia e Geociências da UFPE, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Derramamentos de petróleo representam sérias ameaças ao meio ambiente devido à liberação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), especificamente o fenantreno caracterizado por ser tóxico, bioacumulativo e de difícil degradação, classificando-o como composto recalcitrante. Este estudo teve como objetivo isolar uma cepa bacteriana do lodo de uma estação de tratamento de efluentes industriais, visando a remoção do fenantreno viabilizando a biorremediação desse composto no meio ambiente impactado. A cepa bacteriana foi isolada a partir do lodo da Lagoa 1 através de uma série de estriamentos e repiques em placas de Petri contendo meio marinho de ZoBell e Johnson. Após a obtenção de uma cultura pura, foi realizado um enriquecimento aeróbio em 14 frascos de 100 mL, utilizando algodão hidrofóbico para permitir a troca atmosférica, e meio líquido de ZoBell e Johnson modificado com adição de fenantreno como uma das fontes de carbono. Posteriormente, três erlenmeyers de 1L foram utilizados como reatores biológicos aeróbios, também tampados com algodão hidrofóbico, contendo o meio marinho modificado sem extrato de levedura, peptona e ágar, mas com fenantreno e a biomassa bacteriana isolada. A degradação do composto foi monitorada ao longo de intervalos regulares de tempo: 0, 3, 7, 14, 20, 25 e 30 dias. Para avaliar a eficiência de degradação, foi utilizada uma técnica adaptada de extração líquido-líquido para extrair o fenantreno dos reatores biológicos, e os níveis de remoção foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência ao longo do experimento. O crescimento microbiano foi monitorado por espectrofotometria a 660 nm ao decorrer dos 30 dias. Os resultados demonstraram uma remoção de 26,7% do fenantreno, indicando que a bactéria foi capaz de crescer na presença deste composto recalcitrante, utilizando uma via metabólica aeróbia e produzindo CO<sub>2</sub> e água como produtos finais. Análises adicionais de coloração de Gram revelaram que a cepa isolada é gram-positiva, apresentando forma de bacilos. O sequenciamento da região 16S rRNA (V3 e V4) identificou a bactéria como *Bacillus cereus*, uma espécie frequentemente associada à degradação de fenantreno e outros hidrocarbonetos aromáticos na literatura científica. Esses resultados destacam a promissora aplicação da biorremediação de hidrocarbonetos utilizando microorganismos provenientes de estações de tratamento de efluentes industriais, oferecendo uma solução ecoeficiente e sustentável para mitigar os impactos ambientais de vazamentos de petróleo e seus derivados, como o fenantreno, e para a recuperação de áreas contaminadas.

**Palavras-chave:** derramamentos de petróleo; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; impactos ambientais; biorremediação; isolamento bacteriano; estação de tratamento de efluentes industrial.

## ABSTRACT

Oil spills pose serious threats to the environment due to the release of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), specifically phenanthrene, which is toxic, bioaccumulative and difficult to degrade, classifying it as a recalcitrant compound. The aim of this study was to isolate a bacterial strain from the sludge of an industrial effluent treatment plant, with the aim of removing phenanthrene and enabling the bioremediation of this compound in the impacted environment. The bacterial strain was isolated from the sludge of Lagoon 1 through a series of streaks and repiques in Petri dishes containing ZoBell and Johnson marine medium. After obtaining a pure culture, aerobic enrichment was carried out in 14 100 mL flasks, using hydrophobic cotton to allow atmospheric exchange, and modified ZoBell and Johnson liquid medium with the addition of phenanthrene as one of the carbon sources. Subsequently, three 1L erlenmeyer flasks were used as aerobic biological reactors, also capped with hydrophobic cotton, containing the modified marine medium without yeast extract, peptone and agar, but with phenanthrene and the isolated bacterial biomass. The degradation of the compound was monitored over regular time intervals: 0, 3, 7, 14, 20, 25 and 30 days. To assess degradation efficiency, an adapted liquid-liquid extraction technique was used to extract phenanthrene from the biological reactors, and removal levels were quantified by high-performance liquid chromatography throughout the experiment. Microbial growth was monitored by spectrophotometry at 660 nm over the course of 30 days. The results showed a 26.7% removal of phenanthrene, indicating that the bacteria were able to grow in the presence of this recalcitrant compound, using an aerobic metabolic pathway and producing CO<sub>2</sub> and water as end products. Additional Gram stain analyses revealed that the isolated strain is gram-positive, with a bacillus shape. Sequencing of the 16S rRNA region (V3 and V4) identified the bacterium as *Bacillus cereus*, a species frequently associated with the degradation of phenanthrene and other aromatic hydrocarbons in scientific literature. These results highlight the promising application of hydrocarbon bioremediation using microorganisms from industrial wastewater treatment plants, offering an eco-efficient and sustainable solution to mitigate the environmental impacts of oil spills and their derivatives, such as phenanthrene, and to recover contaminated areas.

**Keywords:** oil spills; polycyclic aromatic hydrocarbons; environmental impacts; bioremediation; bacterial isolation; industrial effluent treatment plant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Propriedades físico-químicos dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos prioritários da us environmental protection agency.....	30
Figura 1 -	Demonstração da região côncova de baia formada em uma molécula de hpa.....	32
Figura 2 -	Representação do anel aromático do benzeno, mostrando as estruturas de ressonância.....	33
Figura 3 -	Estrutura molecular do fenantreno.....	35
Figura 4 -	Estruturas moleculares do fenantreno e do antraceno.....	36
Figura 5 -	Características dos tipos de biorremediação.....	40
Figura 6 -	Localização da ETE Multifábril e do complexo industrial, no município de Jaboatão dos Guararapes.....	51
Figura 7 -	Lagoas da Estação de Tratamento de Efluentes e o ponto de coleta do inóculo.....	52
Figura 8 -	Procedimento de plaqueamento e isolamento microbiano.....	55
Figura 9 -	Etapas da técnica de Coloração de Gram.....	56
Figura 10 -	Enriquecimento microbiano proveniente da cepa isolada.....	57
Figura 11 -	Superfície da lagoa 1 apresentando espessa camada de matéria orgânica.....	63
Figura 12 -	Cepa isolada – análise macroscópica (a) e morfologia celular – análise microscópico (b).....	64
Figura 13 -	Perfil de eficiência de remoção do fenantreno.....	65
Figura 14 -	Via metabólica da degradação de fenantreno aeróbia.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Detalhamento dos principais derramamentos de petróleo dos últimos 60 anos.....	24
Tabela 2 -	Parâmetros físico-químicos da lagoa 1.....	53
Tabela 3 -	Concentrações do meio marinho 2216 adaptado para utilização no processo de isolamento bacteriano do inóculo da lagoa.....	54
Tabela 4 -	Concentrações do meio líquido 2216 adaptado para utilização na montagem dos reatores.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcF	Acenafteno
Aci	Acenaftileno
Ant	Antraceno
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
BbF	Benzo[b]fluoranteno
BkF	Benzo[k]fluoranteno
BP	Benzo[g,h,i]perileno
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sub>2</sub>	Carbono
Cri	Criseno
DAD	Detector de arranjo de diodos
DbA	Dibenzo[a,h]antraceno
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ETES	Estação de Tratamento de Efluentes
Fe (III)	Ferro (III)
Fen	Fenantreno
Flt	Fluoranteno
Flu	Fluoreno
H <sub>2</sub> O	Água
HCL 2-N	Ácido clorídrico 2 Normal
HPAS	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HTP	Hidrocarbonetos totais de petróleo
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer
IP	Indenol[1,2,3-c]pireno
MMS	Meio mineral de salino
NaCl	Cloreto de Sódio
Naf	Naftaleno
OH	Hidroxila
Pir	Pireno

POPS	Poluentes orgânicos persistentes
PVC	Policloreto de vinila
RID	Detector de índice de refração
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
US EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
3.1	ACIDENTES, CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS DOS DERRAMAMENTOS DE ÓLEO NOS ECOSISTEMAS.....	20
3.2	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	27
3.3	TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	31
<b>3.3.1</b>	<b>Toxicidade e características do fenantreno.....</b>	<b>35</b>
3.4	PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO.....	37
<b>3.4.1</b>	<b>Atenuação natural.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Bioestimulação.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Bioaumentação.....</b>	<b>41</b>
3.5	MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS .....	43
3.6	CULTIVO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE HPAS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS .....	47
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>51</b>
4.1	COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO LODO EM ESTUDO.....	51
4.2	DESENVOLVIMENTO DA ESTRATÉGIA DE COLETA.....	52
4.3	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA LAGOA.....	53
4.4	MÉTODO DE ISOLAMENTO BACTERIANO.....	53
4.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA – COLORAÇÃO DE GRAM .....	55
4.6	MÉTODO DE ENRIQUECIMENTO.....	56
4.7	MONTAGEM DE REATORES AERÓBIO.....	57
4.8	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO.....	59
4.9	MONITORAMENTO DA DEGRADAÇÃO DE FENANTRENO.....	59

4.10	PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO FENANTRENO.....	59
4.11	EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO 16S.....	60
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
5.1	AMOSTRA ISOLADA DO LODO.....	62
5.2	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA CEPA ISOLADA.....	63
5.3	REATORES BIOLÓGICOS AERÓBIOS.....	64
5.4	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO 16S DA CEPA ISOLADA.....	67
5.5	BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	67
5.6	DESCRIÇÃO DA ROTA METABÓLICA PARA A DEGRADAÇÃO BACTERIANA AERÓBIA DO FENANTRENO.....	69
5.7	POTENCIAL DE ETES COMO FONTE DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE COMPOSTOS ORIUNDOS DE PETRÓLEO .....	71
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por hidrocarbonetos de petróleo, que ocorre principalmente por conta de acidentes durante a extração e grandes derramamentos durante seu transporte, representa uma ameaça significativa tanto para os seres humanos quanto para outros organismos bióticos, principalmente pela alta dispersão no ambiente e persistência (BOTELLO et al., 2015). Conforme observado por Duran e Cravo-Laureau (2016), diversos dos mais graves incidentes de derramamento de óleo resultaram principalmente na introdução significativa de grandes quantidades de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) nos ecossistemas marinhos. A Guerra do Golfo no Kuwait, o desastre do Erika na França, o acidente do Prestige na Espanha, o derramamento do Exxon Valdez no Alasca e, mais recentemente, o desastre do Deepwater Horizon no Golfo do México, o derramamento na costa do Nordeste, configuram entre os exemplos mais marcantes de derramamentos em ambientes marinhos, lançando milhares de metros cúbicos de petróleo nos oceanos. Embora esses incidentes representem menos de 10% da contaminação total por HPAs nos ecossistemas marinhos, a penetração de óleo pode contribuir para até 47% da poluição por hidrocarbonetos nesses ambientes (DURAN; CRAVO-LAUREAU., 2016).

Devido às características nocivas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, na década de 1970, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) identificou 16 HPAs como poluentes prioritários. Essa classificação se deve aos efeitos adversos desses compostos no meio ambiente e na saúde humana. Entre esses 16 HPAs, o fenantreno se destaca como um poluente tóxico, recalcitrante, persistente e bioacumulativo. Sua presença no meio ambiente afeta negativamente a estrutura e a função dos ecossistemas, causando anomalias em animais marinhos e problemas de saúde. Além disso, sua persistência e hidrofobicidade contribuem para impactos ambientais significativos e econômicos também (ANDERSSON; ACHTEN, 2015; KEITH., 2014).

Tais características e impactos negativos tornam essenciais estratégias de remediação, tratamento e recuperação dos ecossistemas atingidos por estes compostos altamente tóxicos. A biorremediação, por sua vez, envolve a utilização de micro-organismos, como bactérias, fungos e algas, para degradar os hidrocarbonetos presentes no petróleo, transformando-os em produtos menos tóxicos e mais facilmente biodegradáveis (WANG et al., 2019). Eles utilizam esses hidrocarbonetos como fonte de carbono e os metabolizam em produtos finais como CO<sub>2</sub> e água (KUMARI et al., 2018).

A busca por fontes de bactérias com potencial para degradar compostos de petróleo tem se expandido para além das fontes tradicionais, como efluentes de refinarias e indústrias petroquímicas. Estudos recentes apontam para a diversificação dessas fontes, incluindo ambientes naturais e diversos locais industriais. As Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) representam uma inovação promissora no âmbito de ser um local com potencial de ser fonte de bactérias degradadoras de compostos de petróleo. Ao contrário da tradicional abordagem que se baseia no isolamento ou consórcios de bactérias encontradas no ambiente marinho ou terrestre, a utilização das ETEs explora uma gama mais ampla de fontes, incluindo efluentes de várias indústrias que, em seus processos internos, geram efluentes ricos em hidrocarbonetos e outros derivados do petróleo, expondo as bactérias da lagoa a estes compostos. Segundo Wang et al. (2019), este enfoque diversificado pode ampliar significativamente o número de micro-organismos capazes de metabolizar compostos de hidrocarbonetos presentes nos efluentes, resultando em uma maior eficiência de biodegradação.

A biorremediação representa uma abordagem ecológica e eficaz para a recuperação de áreas contaminadas por derramamentos de petróleo pode ser adaptada para diferentes tipos de ecossistemas e condições ambientais, tornando-a uma opção flexível, sustentável por utilizar micro-organismos e custo-benefício tornando uma ferramenta valiosa contra a poluição ambiental (KALIA et al., 2022).

Dentro do âmbito da biorremediação, as bactérias aeróbias facultativas degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Nocardia* entre outras, são os necrófagos mais potentes para a biorremediação do fenantreno um dos HPAs devido à sua rápida adaptabilidade, vitalidade, diversidade e capacidade de formar intermediários metabólicos menos tóxicos sendo um abordagem que oferece vantagens significativas em relação aos métodos convencionais e menos intrusiva para o meio ambiente (JOYE et al., 2016).

Este estudo tem como objetivo demonstrar a biodegradação do fenantreno, um dos 16 HPAs prioritário da EPA por conta das suas características, utilizando uma cepa bacteriana isolada de uma Estação de Tratamento de Efluentes Industriais, destacando o potencial da técnica de biorremediação, utilizando micro-organismo. Tal abordagem não apenas otimiza custos, mas também aumenta a acessibilidade à remoção do fenantreno do meio ambiente, proporcionando uma solução eficiente para a recuperação de ecossistemas, como zonas costeiras e manguezais, que são frequentemente afetados por derramamentos de petróleo.

## **2 OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo geral

Cultivar uma cepa bacteriana a partir de microbioma aberto para fins de aplicação em biorremediação de fenantreno.

### 2.2 Objetivos específicos

- i. Isolar e enriquecer cepa bacteriana capaz de crescer na presença do fenantreno,
- ii. Caracterizar morfológicamente a cepa isolada proveniente da Estação de Tratamento de Efluentes,
- iii. Avaliar o desempenho da degradação de fenantreno pela cepa isolada,
- iv. Descrever via metabólica aeróbia de degradação do fenantreno.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ACIDENTES, CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS DOS DERRAMAMENTOS DE ÓLEO NOS ECOSISTEMAS

Com o rápido desenvolvimento da economia e o aumento da população global, houve o aumento acentuado do uso de combustíveis fósseis, principalmente o petróleo, que continua como o principal recurso não-renovável explorado para atender a humanidade. Esta tem sido a realidade para lidar com a crescente demanda energética mundial, com aplicações do óleo bruto em diversas atividades que vão desde a geração de energia e combustíveis até produção de bens de consumo essenciais (CUI et al., 2020). Mesmo com a popularização de fontes renováveis, visando diminuir impactos ambientais, o petróleo segue como matéria-prima única e essencial para a vida humana, sendo explorada de forma intensa e com estimativas de ser a fonte de energia dominante até pelo menos 2050 anos (BROCKWAY et al., 2019).

O uso e a exploração do petróleo promovem impactos ambientais consideráveis ao meio ambiente por diversos motivos. Sua exploração é cercada de riscos desde a prospecção e perfuração de poços petrolíferos até o transporte para as instalações de processamento, principalmente com a descoberta frequente de novas reservas, onde suas localizações e características tornam a exploração mais complexa e arriscada, necessitando de melhores tecnologias e cuidados para prevenir potenciais acidentes (AFOLABI; YUSUF et al., 2018). Observa-se que todas as etapas de produção da indústria petrolífera, desde da perfuração ao refino, causam grandes impacto ao meio ambiente, produzindo danos ambientais de dimensões catastróficas e com consequências sérias para estes ecossistemas, além dos danos já causados pela queima dos combustíveis fósseis, contribuindo para a intensificação do aquecimento global e do efeito estufa por conta da poluição atmosférica (JOHNSTON; LIM; ROH, 2019).

Um dos principais contribuintes para a poluição e contaminação de ecossistemas por fontes petroquímicas são os derramamentos de óleo bruto, seja em solo ou mais frequentemente, em ambientes aquáticos, degradando os ecossistemas costeiros e fluviais implicando em um grande desafio ambiental que ameaça a biodiversidade aquática e a qualidade de vida das comunidades do entorno (DONG et al., 2022). Acidentes podem ocorrer de diversas formas, com uma frequência maior em ambientes marinhos e costeiros por conta da exploração *offshore*, que é a mais realizada atualmente, já que os campos localizados em águas profundas possuem enormes volumes de óleo para serem explorados (DOU et al., 2022).

As principais causas de derramamentos são vazamentos e acidentes ocorridos com embarcações de transporte que, por conta do aumento da demanda mundial deste tipo de transporte, se tornaram mais frequentes, além dos desastres que podem acontecer devido a rompimento de poços de perfuração, vazamentos em oleodutos e em plataformas de exploração que, apesar de serem eventos raros, despejam grandes volumes de óleo no ambiente (CHEN et al., 2019).

Vazamentos de petróleo em poços podem acontecer devido a problemas nas perfurações, sendo causados principalmente por erros de projeto e de operação, além de condições adversas como a alta pressão em grandes profundidades que, além de contribuir para ocorrência de vazamentos, dificulta a contenção do óleo em caso de acidente. As correntes submarinas e as movimentações dos oceanos também aumentam a propagação de acidentes para áreas distantes do ponto gerador, além disso, oleodutos que transportam petróleo podem romper devido a corrosão, desgaste ou danos externos proporcionando graves acidentes ambientais (IBRAHIM et al., 2022).

Os derramamentos de petróleo nos transportes constituem cerca de 13% do número de ocorrências de poluição por óleo bruto nos oceanos em todo o mundo em comparação com todos os desastres relacionados ao setor petrolífero, já que 90% do transporte global do petróleo é feito por petroleiros *offshore* (ZHANG et al., 2015). Os derramamentos de óleo de navios-tanque, em especial, são uma das poluições mais perigosas dentre a poluição marinha. Os derrames de petróleo durante o transporte marítimo não só ameaçam a vida dos membros da tripulação, mas também resultam em enormes perdas económicas e danos aos recursos, juntamente com sérios impactos negativos no ambiente ecológico marinho e nos ecossistemas dos países costeiros (CHEN et al., 2023).

Mesmo com novas tecnologias e protocolos de proteção ao meio ambiente para evitar desastres, acidentes continuam a ocorrer. Um acidente em especial com embarcações de transporte ocorrido foi o derrame do petroleiro chinês Sanchi, por conta de uma colisão em 2018 com o navio de carga no mar da China Oriental, estando carregado com 111,3 mil toneladas de condensado de gás natural, uma mistura líquida de hidrocarbonetos leves, e por volta de 1000 toneladas de combustível marítimo, um composto mais pesado e viscoso com maior teor de enxofre que os combustíveis tradicionais (CHEN; YANG; WU, 2019). Os danos causados por este acidente no meio marinho foram além daqueles relacionados à presença de componentes derivados do petróleo no local afetado, mas se estenderam a queima do combustível e do condensado presentes a bordo, o que gerou hidrocarbonetos aromáticos, por conta da queima

incompleta destes materiais além de emissões de dióxido e monóxido de carbono, contaminando ainda mais o ambiente com compostos carcinogênicos e persistentes (LI et al., 2018).

O óleo derramado forma manchas espessas que prejudicam a vida marinha, sufocando aves, peixes e outros animais aquáticos, além de contaminar praias e locais de reprodução destes animais. Em relação aos impactos ambientais, a quantidade de petróleo derramado é apenas um dos fatores contribuintes para o tamanho e extensão dos danos gerados, sendo outros fatores como local do desastre, condições climáticas e proximidade com zonas habitáveis mais preocupantes. Devido ao poder de transporte do óleo por meio das correntes marítimas, sua deposição em plantas, animais e no próprio ambiente, além de outros fatores, podem ser incluídos ou desconsiderados, dependendo da natureza do desastre, para avaliar a gravidade e os danos ambientais (CHEN et al., 2018).

Algumas áreas têm maior capacidade de absorção de petróleo do que outras e, dessa forma, mesmo um pequeno derrame numa área sensível (muitas vezes zonas costeiras como estuários) podem sofrer grandes impactos ambientais. O derrame de petróleo, uma vez ocorrido no mar, espalha-se e é levado à deriva com o vento e as correntes oceânicas, contaminando as praias e danificando o ambiente das zonas turísticas à beira-mar, resultando numa poluição marinha generalizada e até em um impacto irreversível no ambiente ecológico marinho e na vida marinha (SIMECEK-BEATTY; LEHR, 2017).

As zonas costeiras são extremamente sensíveis aos derramamentos de petróleo e ao seu acúmulo no ambiente, provocando grandes desequilíbrios, como o ocorrido nos estados do Nordeste brasileiro e em estados do Sudeste, no período de agosto de 2019 a janeiro de 2020, contaminando mais de 3 mil km do litoral e gerando saldo de mais de 5 mil toneladas de resíduo de óleo bruto coletadas, porém com danos a longo prazo existentes por conta do desastre de origem desconhecida (DE ALMEIDA et al., 2021).

Durante o período de 2014 a 2019, estima-se que uma área superior a 1,5 milhões de quilômetros quadrados tenha sido impactada por poluição provenientes de óleos brutos e derivados nos oceanos. Aproximadamente 94% do óleo detectado nesse contexto foi atribuído a atividades antrópicas, sendo originado principalmente de vazamentos e descartes de óleo decorrentes das operações de exploração de petróleo e gás no ambiente marinho, incluindo transporte, manuseio e vazamentos acidentais, sendo muitos desses derramamentos de origem desconhecida, o que dificulta o rastreamento das fontes geradoras (DONG et al., 2022).

Anualmente, em todo o mundo, estima-se que cerca de mais de 600 milhões de toneladas de petróleo e derivados, como combustíveis e lubrificantes, entrem em contato com o mar, tendo como origem as mais diversas fontes (OKERE; SHENG, 2023). Porém, os maiores vazamentos

de óleo que se originaram de naufrágio, colisão de superpetroleiros ou explosões de plataformas foram os mais catastróficos para o ambiente marinho, como o ocorrido em abril de 2010 no Golfo do México, Estados Unidos, onde houve a explosão da plataforma *Deepwater Horizon*, operada pela multinacional *British Petroleum*, poluindo grande área do oceano com mais de 500.000 m<sup>3</sup> de óleo (BEYER et al., 2016)

Tabela 1: Detalhamento dos principais derramamentos de petróleo dos últimos 60 anos

<b>Evento</b>	<b>Ano/Local</b>	<b>Volume (m<sup>3</sup>)</b>	<b>Tipo de óleo</b>	<b>Danos ambientais</b>	<b>Método e forma de remediação</b>	<b>Referências</b>
Superpetroleiro Exxon Valdez	1989, (Alaska, EUA)	40.900	Óleo pesado	Entre 100.000 e 250.000 aves marinhas mortas	Remoção mecânica do óleo e uso de surfactantes e solventes químicos; Bioestimulação com fertilizantes	(SHORT; JACEK MASELKO, 2023); (DE ALMEIDA et al., 2021)
Deepwater Horizon (BP)	2010, Golfo do México, EUA	780.000	Óleo leve	Mortes de fauna marinha, danos a ecossistemas marinhos	Uso de dispersantes químicos, contenção mecânica, queima controlada de óleo	(STEWART et al., 2021); (DE ALMEIDA et al., 2021)
Ixtoc I	1979-1980, Golfo do México, México	454.000	Óleo bruto	Contaminação de manguezais, mortes de peixes, danos à pesca e turismo	Uso de dispersantes químicos, contenção mecânica, queima controlada de óleo	(DE ALMEIDA et al., 2021)
Amoco Cadiz	1978, França	223.000	Óleo bruto	Danos severos a vida marinha e ecossistemas costeiros	Limpeza manual das praias, uso de solventes e surfactantes químicos	(DE ALMEIDA et al., 2021)
Prestige	2002, Galícia, Espanha	81.052	Óleo cru	Danos a ecossistemas costeiros, perda de biodiversidade	Limpeza manual das praias, uso de dispersantes químicos, contenção mecânica	(PÉREZ-DEL-OLMO; JUAN ANTONIO RAGA; ANETA KOSTADINOVA, 2022); (DE ALMEIDA et al., 2021)
Petroleiro Sanchi	2018, Mar da china oriental	160.000	Óleo condensado	Danos a recifes de corais, aves marinhas e peixes, além de contaminação	Uso de barreiras flutuantes, limpeza mecânica e dispersantes químicos	(XING; ZHU, 2022); (DE ALMEIDA et al., 2021)

Petroleiro Erika	1999, França	20.000	Óleo pesado	atingir os 10m de profundidade Grandes danos aos ecossistemas costeiros, a pesca, maricultura e turismo	Remoção manual do óleo	(DE ALMEIDA et al., 2021)
Guerra do Golfo	1991, Golfo Pérsico (Kwuit)	1.500.000	Óleo cru	Morte de mais de 30 milhões de aves marinhas. Além de peixes e crustáceos	Remoção manual, uso de barreiras, queima controlada e dispersantes químicos	(DE ALMEIDA et al., 2021)
Plataforma Piper Alpha	1988, Mar do norte (Escócia)	670.000	Óleo cru	O incêndio gerou uma grande poluição atmosférica e morte de animais marinhos próximos a costa escocesa	Uso de limpeza mecânica, barreiras de contenção e skimmers de óleo	(ROBERTO et al., 2023); (DE ALMEIDA et al., 2021)
Petroleiro Odyssey	1988, Canadá	132.000	Óleo cru	Degradação da população local de krill, afetando a cadeia alimentar por anos	Não houve ações de limpeza imediatas, pois o vazamento não atingiu a costa	(OGUNBIYI et al., 2023); (DE ALMEIDA et al., 2021)
Torrey Canyon	1967, Reino Unido	137.000	Óleo cru	Centenas de quilômetros da costa foram contaminados	Bombeamento do óleo utilizando caminhões de esgoto e posterior descarte em uma pedreira abandonada	(OGUNBIYI et al., 2023)

Petroleiro Haven	1991, Itália	144.000	Óleo bruto pesado	Contaminação de 110 km do litoral; morte de 43% da população total de peixes	Remoção manual do óleo	(OGUNBIYI et al., 2023); (DE ALMEIDA et al., 2021)
Petroleiro chileno Vicuña	2004, Brasil	191.000	Óleo combustível e metanol	Manguezais e litoral afetado com grande quantidade de animais mortos e danos à pesca e ao turismo	Uso de barreiras físicas e bombeamento da água contaminada	(OLIVEIRA, 2024); (DE ALMEIDA et al., 2021)
Origem desconhecida	2019, Brasil	Sem evidências	Óleo cru	Mais de 3.000 Km da costa brasileira contaminados. Danos à fauna, turismo e pesca	Remoção manual do óleo (Aprox. 4.000 toneladas de dejetos removidos)	(LESSA et al., 2021); (DE ALMEIDA et al., 2021)

---

Fonte: Autora (2024)

A contaminação do solo e dos ecossistemas aquáticos por hidrocarbonetos de petróleo é um sério problema global. Os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) originados dos destilados de petróleo bruto na forma de diesel, gasolina, óleo lubrificante e outros HPAs típicos receberam muita atenção globalmente como contaminantes, uma vez que são altamente tóxicos, mutagênicos e cancerígenos por natureza. A toxicidade dos HPAs aumenta com o aumento do peso molecular. Alcanos cíclicos, chamados de ciclanos, além do baixo peso molecular, são mais tóxicos para os organismos aquáticos do que hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de mesmo peso molecular. Num ambiente terrestre, os hidrocarbonetos aromáticos são mais tóxicos que os compostos alifáticos. Mesmo os compostos aromáticos mais baixos, moléculas com 1 ou 2 anéis aromáticos, são extremamente tóxicos (KUPPUSAMY et al., 2017).

### 3.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

De acordo com as suposições atuais, a idade da Terra é estimada em 4,5 bilhões de anos (ŁAWNICZAK et al., 2020). Durante a maior parte desse tempo, as formas de vida da Terra estavam representadas na forma de organismos simples e unicelulares. Uma mudança fundamental ocorreu durante o período Cambriano (aproximadamente há 545 milhões de anos), que é frequentemente referida como a 'explosão Cambriana' devido à magnitude das mudanças ocorridas (ŁAWNICZAK et al., 2020). Durante o período de 20 a 25 milhões de anos subsequentes, organismos complexos e multicelulares começaram a emergir e a aparecer em grande escala.

Embora este fenômeno seja significativo em vários aspectos, também resultou no inevitável aumento da geração de biomassa e na formação de seus depósitos em sedimentos. Este episódio é o ponto de partida, e a partir deste momento que estão reunidas as condições para a formação de hidrocarbonetos. O consenso atual sobre a origem dos hidrocarbonetos do petróleo é fundamentado na seguinte premissa: a matéria orgânica fossilizada é retida na rocha geradora (querogênio) e passa por várias fases de transformação (WIDDEL; RABUS, 2001).

Quimicamente, os substratos consistem na mistura de compostos orgânicos de alto peso molecular gerados pela degradação de substâncias poliméricas naturais encontradas na biomassa residual. Com base em sua origem e no potencial de formação de hidrocarbonetos de petróleo, o querogênio é categorizado em quatro tipos. A maturação térmica do querogênio abrange: (i) diagênese - uma fase breve de degradação biológica, (ii) catagênese - degradação

geotérmica e craqueamento, e (iii) metagênese - decomposição adicional que resulta principalmente na produção de metano.

A acumulação de produtos gasosos resulta na migração de hidrocarbonetos do petróleo bruto maturado da rocha geradora para a rocha reservatória. Esse processo é restrito pela camada impermeável de rocha, e a acumulação resultante de hidrocarbonetos possibilita a formação dos reservatórios de petróleo. Devido à alta porosidade (0–40%, dependendo do tipo de rocha, com tamanho de poro típico de cerca de 100 µm), a rocha reservatória é caracterizada pela capacidade notável de armazenar líquidos (CORNELISSEN et al., 2005). Embora a saturação da rocha reservatório com hidrocarbonetos líquidos seja influenciada pela concentração inicial, ela não pode atingir 100% devido à presença de água residual nos poros.

O petróleo é composto principalmente de carbono (82%), hidrogênio (12%), nitrogênio (4%), oxigênio (1%), compostos de enxofre (0,5%) e íons metálicos (0,5%) além de outros elementos, (SILVA et al., 2021). Devido à sua estrutura química, o petróleo é uma matéria-prima complexa, cuja composição pode chegar a mais de 40 mil substâncias de comportamentos e características variadas (QIAN; WANG., 2019). Os principais compostos presentes no petróleo são os hidrocarbonetos, moléculas compostas por carbono e hidrogênio, que podem ser divididos em alcanos ou parafinas, alcenos e alcinos, sendo estes caracterizados por grandes moléculas abertas, hidrocarbonetos cíclicos e hidrocarbonetos aromáticos e derivados como o grupo BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) além dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e a fração pesada sendo representada pelos asfaltenos (ZHENG et al., 2020).

Os HPAs derivados da combustão incompleta da matéria orgânica, como combustíveis para meios de transporte, emissões de usinas geradoras de energia, mineração de carvão e outras fontes antropogênicas, além de estar presente em pequenas quantidades no óleo bruto. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são poluentes orgânicos produzidos em maior quantidade por atividades antropogênicas associadas à industrialização e urbanização, e também por meio de atividades naturais (QIAO et al., 2018).

HPAs são um grupo de compostos orgânicos perigosos e nocivos, sendo compostos por dois ou mais anéis benzênicos ligados em arranjos lineares e angulares de *cluster*, que são os padrões formados pela combinação de anéis de cada composto. Os HPAs encontrados no meio ambiente são principalmente de origem pirogênica, petrogênica e biológica (HĄC-WYDRO; POŁEĆ; BRONIATOWSKI, 2019), são hidrofóbicos e lipofílicos e, portanto, não são solúveis em água, além de serem de difícil degradação (KRONENBERG et al., 2017). Segundo Lee (2010). Estes compostos compreendem mais de 200 substâncias orgânicas contendo dois ou

mais anéis aromáticos fundidos, sendo sua estrutura composta por múltiplos anéis aromáticos, com um par de átomos de carbono compartilhados entre eles (SAHOO et al., 2020).

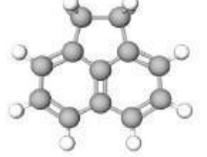
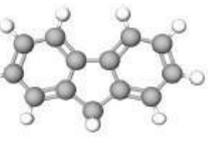
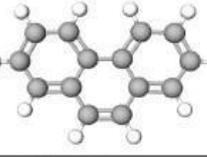
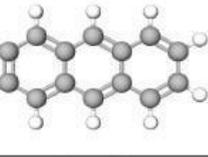
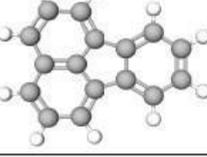
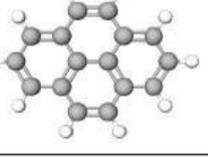
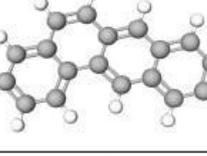
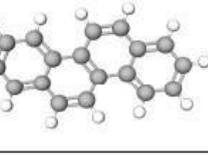
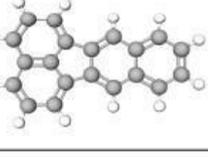
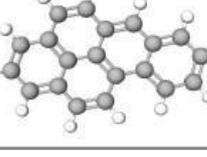
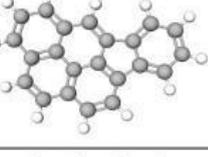
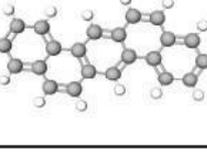
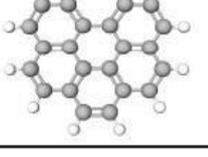
De acordo com o número de anéis aromáticos, eles podem ser classificados como compostos leves (2–3 anéis) ou pesados (4–6 anéis) (SAMPAIO et al., 2021). Muitas indústrias utilizam os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como matéria-prima para a fabricação de diversos bens e produtos de consumo como polímeros. Prevê-se que o consumo de HPAs aumente de 85 milhões de barris em 2016 para 106,6 milhões de barris no final de 2030, para atender as demandas de mercado global (IGUNNU; CHEN., 2014).

Os HPAs consistem em um conjunto de vários poluentes onipresentes e recalcitrantes no meio ambiente e pertencem à classe dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) (ABDEL-SHAFY; MANSOUR., 2016; WAGNER; BARKER., 2019; NET et al., 2015; PREMNATH et al., 2021), os quais foram declarados poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) em 1983 com base em suas maiores concentrações, maior exposição, natureza recalcitrante e toxicidade (MOJIRI et al., 2019).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) categorizou os HPAs em quatro grupos, com base na capacidade carcinogênica de cada componente. Como pode ser visto no quadro 1, o grupo 1 é formado pelos compostos cancerígenos para humanos, o grupo 2A dos que são provavelmente cancerígenos para humanos, o grupo 2B daqueles possivelmente cancerígenos para humanos e o grupo 3 formado pelos não classificáveis como cancerígeno. Para humanos (IARC, 1983). O benzo(a)pireno é considerado o HPA mais cancerígeno do grupo e geralmente usados como marcador de exposição para avaliações de risco (LEE., 2010).

De acordo com a composição, os HPAs podem se distinguir pela baixa pressão de vapor e baixa solubilidade em água devido a sua estrutura com vários núcleos aromáticos com duplas ligações conjugadas. Contudo os HPAs são solúveis em solventes de baixa polaridade como diclorometano, n-hexano, benzeno e acetona, pontos de ebulição e alto ponto de fusão, além de grande estabilidade, sendo classificados como compostos de baixa reatividade (LEE, 2010). Com o aumento de peso molecular, os HPAs tendem a diminuir a solubilidade em água e aumentar a lipofilicidade assim como o ponto de ebulição, tornando-os produtos químicos mais recalcitrantes, se acumulando na natureza em diversas matrizes sólidas, aquosas e gasosas (MALLAH et al., 2022). O Quadro 1 apresenta as propriedades físico-químicos dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos prioritários da US Environmental Protection Agency.

Quadro 1: Propriedades físico-químicos dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos prioritários da US Environmental Protection Agency

	<p><b>Naftaleno (Naf)</b></p> <p>n° de anéis: 2            Massa molar (g/mol): 128,17            Sol. em água (mg/L): 31            Fórmula: C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>            Grupo 2B</p>		<p><b>Acenafileno (Ací)</b></p> <p>n° de anéis: 3            Massa molar (g/mol): 152,19            Sol. em água (mg/L): 16,1            Fórmula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>            Grupo 3</p>
	<p><b>Acenafteno (AcF)</b></p> <p>n° de anéis: 3            Massa molar (g/mol): 154,21            Sol. em água (mg/L): 3,8            Fórmula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>            Grupo 3</p>		<p><b>Fluoreno (Flu)</b></p> <p>n° de anéis: 3            Massa molar (g/mol): 166,20            Sol. em água (mg/L): 1,9            Fórmula: C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>            Grupo 3</p>
	<p><b>Fenantreno (Fen)</b></p> <p>n° de anéis: 3            Massa molar (g/mol): 178,20            Sol. em água (mg/L): 1,1            Fórmula: C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>            Grupo 3</p>		<p><b>Antraceno (Ant)</b></p> <p>n° de anéis: 3            Massa molar (g/mol): 178,20            Sol. em água (mg/L): 0,045            Fórmula: C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>            Grupo 3</p>
	<p><b>Fluoranteno (Flt)</b></p> <p>n° de anéis: 4            Massa molar (g/mol): 202,25            Sol. em água (mg/L): 0,26            Fórmula: C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>            Grupo 3</p>		<p><b>Pireno (Pir)</b></p> <p>n° de anéis: 4            Massa molar (g/mol): 202,25            Sol. em água (mg/L): 0,132            Fórmula: C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>            Grupo 3</p>
	<p><b>Benzo[a]antraceno (BaA)</b></p> <p>n° de anéis: 4            Massa molar (g/mol): 228,30            Sol. em água (mg/L): 0,011            Fórmula: C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>            Grupo 2B</p>		<p><b>Criseno (Cri)</b></p> <p>n° de anéis: 4            Massa molar (g/mol): 228,30            Sol. em água (mg/L): sem dados*            Fórmula: C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>            Grupo 2B</p>
	<p><b>Benzo[b]fluoranteno (BbF)</b></p> <p>n° de anéis: 5            Massa molar (g/mol): 252,32            Sol. em água (mg/L): 0,0015            Fórmula: C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>            Grupo 2B</p>		<p><b>Benzo[k]fluoranteno (BkF)</b></p> <p>n° de anéis: 5            Massa molar (g/mol): 252,32            Sol. em água (mg/L): 0,0008            Fórmula: C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>            Grupo 2B</p>
	<p><b>Benzo[a]pireno (BaP)</b></p> <p>n° de anéis: 5            Massa molar (g/mol): 252,31            Sol. em água (mg/L): 0,0038            Fórmula: C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>            Grupo 1</p>		<p><b>Indeno[123cd]pireno (IP)</b></p> <p>n° de anéis: 5            Massa molar (g/mol): 278,35            Sol. em água (mg/L): 0,062            Fórmula: C<sub>21</sub>H<sub>12</sub>            Grupo 2B</p>
	<p><b>Dibenz[ah]antraceno</b></p> <p>n° de anéis: 6            Massa molar (g/mol): 276,33            Sol. em água (mg/L): 0,0006            Fórmula: C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>            Grupo 2A</p>		<p><b>Benzo[ghi]perileno</b></p> <p>n° de anéis: 6            Massa molar (g/mol): 276,33            Sol. em água (mg/L): 0,00026            Fórmula: C<sub>22</sub>H<sub>12</sub>            Grupo 3</p>

Fonte: Autora (2024)

Entre mais de cem HPAs conhecidos, dezesseis foram classificados como poluentes ambientais prioritários pela US EPA. Embora no ambiente existem centenas de HPAs, o fenantreno com três anéis de benzeno fundidos, por ser um dos HPAs mais abundantes detectados em locais contaminados sendo conhecido como um composto recalcitrante,

fotossensibilizador da pele humana e um alérgico leve e um produto primário que é utilizado pelas indústrias. O fenantreno é considerado como um dos hidrocarbonetos mais amplos como intermediário de pesticidas, plásticos e resinas fazendo dele um dos HPAs mais comumente detectados entre 16 HPAs listados pela US EPA (GU et al., 2018). A EPA recomenda a determinação e quantificação dos compostos: Naftaleno (Naf), Acenafteno (AcF), Acenaftileno (Aci), Fluoreno (Flu), Antraceno (Ant), Fenantreno (Fen), Fluoranteno (Flt), Pireno (Pir), Benzo[a]antraceno (BaA), Criseno (Cri), Benzo[a]pireno (BaP), Benzo[k]fluoranteno (BkF), Benzo[b]fluoranteno (BbF), dibenzo [a,h]antraceno (DbA), Benzo[g,h,i]perileno (BP) e Indeno[1,2,3-c,d]pireno (IP), sendo estes prioritários e devem ser rotineiramente monitorados (JANBANDHU; FULEKAR, 2011).

### 3.3 TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos podem ser de origem pirogênica, petrogênica ou biogênica, com diversas características físico-químicas (LAWAL, 2017). Apresentam efeitos adversos aos seres humanos, possuem toxicidade elevada, são potentes agentes cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e desreguladores endócrinos. A contaminação se dá pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados, inalação, absorção cutânea, pulmões e trato gastrointestinal, causando grandes riscos para a saúde humana e de outros seres que são expostos a eles (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2018).

Compostos com diferentes massas moleculares apresentam efeitos diferenciados sobre o sistema biológico. Compostos de baixa massa molecular, com dois ou três anéis aromáticos, apresentam alta toxicidade para organismos aquáticos. Todavia, compostos com quatro anéis aromáticos ou mais, são considerados persistentes no meio ambiente e de difícil degradação (GUZZELLA et al., 2011). A toxicidade dos HPAs está relacionada com a estrutura do composto, alguns compostos possuem uma região côncava, conhecida como região de baía, formada pelas ramificações na sequência de anéis benzênicos como mostrado na Figura 2 Demonstração da região côncava de baía formada em uma molécula de HPA. Compostos que possuem essa região são considerados carcinogênicos mais potentes, pois tal organização dos átomos de carbono fornece um alto grau de reatividade bioquímica (LEE, 2010).

Figura 1: Demonstração da região côncava de baía formada em uma molécula de HPA



Fonte: Luo et al., 2012

A toxicidade dos HPAs é amplamente atribuída à presença de compostos como o benzeno, naftaleno e fenantreno, entre outros, que são conhecidos por serem tóxicos e cancerígenos. A exposição a essas substâncias pode ocorrer por meio da inalação de vapores, ingestão de alimentos contaminados, ou contato direto com solos e águas contaminadas (GAO et al., 2018).

Os efeitos tóxicos dos HPAs variam desde irritações agudas até efeitos crônicos, como danos ao sistema respiratório, hepático e renal. Além disso, alguns HPAs têm sido associados a distúrbios reprodutivos e neurotóxicos, com casos mais graves ocorrendo por conta da exposição prolongada a altas concentrações de HPAs, promovendo o desenvolvimento de câncer, particularmente de pulmão, fígado e pele (LAFFON; PÁSARO; VALDIGLESIAS, 2016).

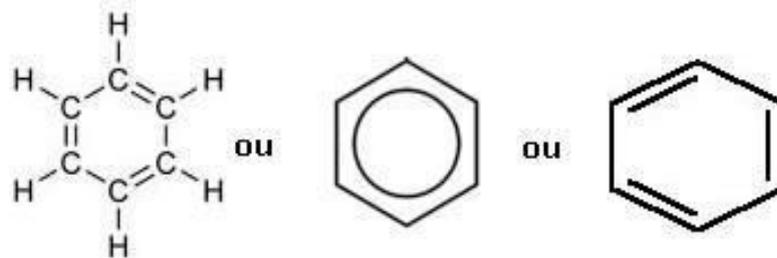
A exposição aos contaminantes pode gerar diversos efeitos nocivos ao sistema respiratório, tais como redução das funções pulmonares, agravamento de problemas respiratórios como asma (OSSAI et al., 2019). Estes problemas de saúde incluem como câncer e mutações, defeitos congênitos, diminuição da contagem de glóbulos brancos em humanos, abortos espontâneos, infertilidade e esterilidade. Além destes efeitos físicos, o stress económico devido à destruição dos meios de subsistência dos residentes resulta em problemas de saúde psicológica (BRIGGS; BRIGGS, 2018).

No meio ambiente, os HPAs podem persistir por longos períodos, acumulando-se em sedimentos, solos e corpos d'água. Isso não apenas representa uma ameaça direta à fauna e flora aquáticas, mas também pode resultar na bioacumulação dessas substâncias ao longo da cadeia alimentar, afetando organismos superiores, incluindo os seres humanos e, embora conhecidos por serem praticamente insolúveis em água, os HPAs apresentam-se largamente dissolvidos em ambientes de imenso volume de água, como rios e oceanos, sendo transportados para diversas localidades e danificando ecossistemas sem grandes limitações (IMAM et al., 2022).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos, como o benzeno, tolueno e xilenos, são conhecidos por serem altamente tóxicos aos seres vivos, inclusive para vários microorganismos, no qual podem agir dissolvendo a membrana celular desses organismos, sendo também mutagênicos e carcinogênicos, porém, são facilmente biodegradados em baixas concentrações. Já os HPAs, possuindo múltiplos anéis aromáticos em sua estrutura, têm interações complexas e menor reatividade, explicando sua persistência e potencial de bioacumulação (ABDEL-RAZEK et al., 2020).

Um dos principais pontos que contribuem para a estabilidade das moléculas de HPAs e sua baixa reatividade, são as estruturas de ressonância entre as ligações químicas nos anéis aromáticos (BROWN; COCKROFT, 2013). A Figura 3 apresenta uma representação do anel aromático do benzeno, mostrando as estruturas de ressonância.

Figura 2: Representação do anel aromático do benzeno, mostrando as estruturas de ressonância



Fonte: Hidrocarbonetos Aromáticos e sua Nomenclatura. Aromáticos (2024).

Como visto acima, as ligações simples e duplas se alternam entre as estruturas por conta da movimentação dos elétrons das ligações duplas ao redor do anel. Esta movimentação aumenta a estabilidade da estrutura e fortalece as ligações entre os átomos de carbono, tornando a molécula plana, mais estável e com menor reatividade (AIHARA, 1992). Tal fenômeno é responsável pela maior dificuldade de degradação destes compostos, já que uma menor reatividade resulta em taxas de transformação mais lentas, tornando-os compostos persistentes e de metabolismo mais lento por seres vivos (AIHARA, 1977).

A toxicidade dos HPAs no ambiente marinho manifesta-se de diversas formas. Em níveis elevados, essas substâncias podem causar deformidades em larvas juvenis de organismos marinhos, comprometendo o recrutamento de novas gerações (HONDA; SUZUKI, 2020). Além disso, os HPAs podem afetar a reprodução, causando danos ao sistema reprodutivo de peixes e invertebrados marinhos, dificultando a manutenção da população destes animais. Outro

aspecto crítico é a capacidade dos HPAs de se acumularem nos tecidos dos organismos, resultando na bioacumulação ao longo da cadeia alimentar. Os predadores de topo de cadeia alimentar, como aves marinhas e mamíferos marinhos, podem ser especialmente vulneráveis, pois concentrações significativas de HPAs se acumulam em seus corpos devido à ingestão de presas contaminadas, além do próprio ser humano que, ao ingerir tais alimentos, são expostos ao risco provocado por esses compostos (BARBOSA et al., 2023).

Um dos exemplos de ocorrência relacionada aos derramamentos, e suas consequências imediatas, é a presença de manchas de óleo no oceano. A mancha de petróleo pode impedir a fotossíntese do fitoplâncton marinho ou as trocas ar-mar, reduzindo o teor de oxigênio dissolvido na água, e resultando ainda em enormes alterações no teor de oxigênio, na temperatura de outros elementos no mar que podem matar o fitoplâncton, e prejudicar a base da isca na água (JAFARINEJAD, 2017). O óleo à deriva pode bloquear o sistema respiratório de animais marinhos e ficar preso nas penas das aves marinhas, resultando na sua morte (KOSTKA et al., 2011). Os aromáticos gerados podem deformar peixes eclodidos e acumular substâncias cancerígenas em peixes ou mariscos, comprometendo o seu valor econômico e impactando a saúde humana (KIM et al., 2013). O derramamento de óleo sedimentável pode cobrir os sedimentos, danificando o ambiente ecológico demersal e impedindo o crescimento e a reprodução normais dos organismos bentônicos (REDDY et al., 2011).

As meias-vidas dos HPAs nos organismos são relativamente curtas e são consideradas metabolizadas ou excretadas rapidamente (HONDA; SUZUKI, 2020). No entanto, mesmo com este contexto, concentrações detectáveis de HPAs são relatadas em muitos estudos. Assim, este fenômeno sugere que a exposição contínua e a contaminação por HPAs estão a ocorrer em todo o mundo de forma a impactar prejudicialmente todas as formas de vida.

Os HPAs podem persistir na água por um período muito longo devido à sua baixa sensibilidade à luz solar no ambiente aquático, diminuindo sua oxidação e posterior degradação natural, atribuída à hidrofobicidade e aos efeitos de diluição induzidos pela turbulência provocada pelo movimento natural dos corpos d'água. Já no solo e em sedimentos, verificou-se que a taxa de deposição de HPAs acelera devido à sua maior hidrofobicidade e baixa solubilidade aquosa. Estes compostos são fortemente adsorvidos nas partículas do solo e, portanto, o ecossistema do solo torna-se um sumidouro definitivo, porém com taxa de acumulação muito baixa devido à sua persistência (KUPPUSAMY et al., 2017).

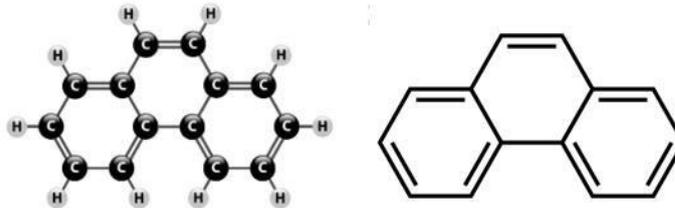
Os HPAs no ambiente aquático são oriundos de quatro fontes: (i) derivados de combustíveis (petrogênicos), (ii) derivados de processo de combustão incompleta (pirogênicos), (iii) gerados pelo metabolismo orgânico (biogênicos) e (iv) gerados pelo

processo de transformação em sedimentos (diagenéticos), sendo ambas as fontes petrogênicas e pirogênicas diretamente ligadas aos combustíveis fósseis, desde sua extração até suas aplicações, sendo portanto amplamente disseminados por atividades antropogênicas no meio ambiente (HYLLAND, 2006).

### 3.3.1 Toxicidade e características do fenantreno

Dentro do grupo de compostos que compõem os HPAs, o fenantreno é um hidrocarboneto composto por três anéis benzênicos fundidos através de uma ligação carbono-carbono como apresentado na Figura 4 apresenta a estrutura molecular do fenantreno, sua fórmula molecular é  $C_{14}H_{10}$ , densidade  $1,18 \text{ g/cm}^3$ , ponto de fusão  $489,15 \text{ K}$  ( $216 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e ponto de ebulição ( $340 \text{ }^\circ\text{C}$ ), solubilidade em água  $1,15 \text{ mg/L}$ , praticamente insolúvel em água, mas solúvel em álcool, metanol, diclorometano, hexano, acetona entre outros. (WANG et al., 2009).

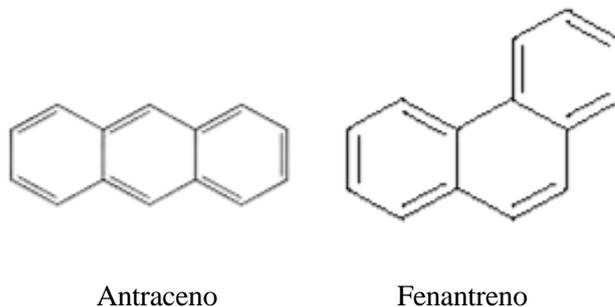
Figura 3: Estrutura molecular do fenantreno



Fonte: Hidrocarbonetos Aromáticos e sua Nomenclatura Aromáticos (2024)

É o hidrocarboneto aromático não linear mais simples e é derivado de duas palavras, “fenil” e “antraceno”, que são derivadas das palavras latinas “phenos” e “anthrax”, que indicam “benzeno” e “carvão”, respectivamente (CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2020). Existe como sólido cristalino incolor com odor levemente aromático e é o principal constituinte do carvão e do alcatrão de carvão (5%), sendo um isômero do antraceno, mas é mais estável em comparação com ele (GUTMAN; STANKOVIC, 2007). Ele é um aromático de especial interesse e tem ganhado atenção significativa devido aos seus impactos ambientais negativos (WAIGI et al., 2015). A Figura 5 apresenta as estruturas moleculares do fenantreno e do antraceno.

Figura 4: Estruturas moleculares do fenantreno e do antraceno



Fonte: Hidrocarbonetos Aromáticos e sua Nomenclatura Aromáticos (2024).

O fenantreno, embora amplamente utilizado em processos industriais e encontrado em diversas fontes naturais, pode desencadear sérios danos ao meio ambiente quando liberado de maneira inadequada (WU et al., 2013).

É uma substância de grande preocupação ambiental e de saúde pública devido às suas propriedades recalcitrantes, bioacumulativas e tóxicas para organismos vivos e ecossistemas (SHI et al., 2005; KWEON et al., 2011; HAJISAMOH, 2013). Seus efeitos adversos nos sedimentos incluem a redução da abundância e diversidade de invertebrados bentônicos, crescimento anômalo e diversas alterações fisiológicas e comportamentais (LIU et al., 2015). Em mamíferos, o fenantreno pode se acumular através da inalação, ingestão ou contato dérmico, impactando processos vitais como reprodução, desenvolvimento e imunidade (ABDEL-SHAFY E MANSOUR, 2016).

Ele é produzido como subproduto da queima incompleta de materiais orgânicos, sendo um componente comum da fumaça de cigarros, escapamentos de veículos e processos industriais como a queima de carvão e madeira, por exemplo (KWOFIE; GUPTA, 2021). Sua presença no ambiente é, portanto, consequência direta das atividades antrópicas, sejam por conta da exploração de fontes de combustíveis ou pela queima de compostos derivados de petróleo, e, por ser um HPA de baixo peso molecular e com uma estrutura relativamente pequena, sendo praticamente insolúvel em água, contribui para seu transporte e dissolução no meio, aumentando seu poder de contaminação (WAIGI et al., 2015).

Exposições agudas ao fenantreno, especialmente em contextos ocupacionais, podem provocar uma série de sintomas, incluindo náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, cefaleias, confusão, sudorese profusa, febre, taquicardia, taquipnéia e agitação (GIL, 2000). A exposição dérmica aguda pode causar irritação leve e, em indivíduos sensíveis, dermatite (HUDSON-HANLEY et al., 2021). Embora não se acredite que o fenantreno seja carcinogênico para humanos, estudos demonstraram que ele pode induzir tumores em ratos de laboratório e outros animais (GIL, 2000).

A ingestão de fenantreno, embora não seja uma via comum de exposição, pode resultar em efeitos semelhantes aos observados após a inalação aguda, com complicações adicionais como dor abdominal (GIL, 2000). Portanto, a presença e persistência do fenantreno no ambiente representam um risco significativo para a saúde dos ecossistemas e dos seres humanos, sublinhando a importância de monitorar e mitigar sua presença em áreas contaminadas.

### 3.4 PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO

A poluição ambiental está causando impactos severos no meio ambiente, por conta disso houve um avanço significativo na área de biorremediação com o objetivo de recuperar ambientes poluídos de forma sustentável. A palavra “biorremediação” refere-se ao processo biológico de degradação de contaminantes no meio ambiente, empregando a capacidade metabólica dos micro-organismos para decompor uma ampla gama de substâncias orgânicas (SISINTHY; GUNDLAPALLY, 2020).

Esse processo já ocorre há décadas, mas avanços recentes levaram a maior eficiência e estabelecimento da técnica. Muitos processos de tratamento físico e químico são utilizados como estratégias de remediação de HPAs. As estratégias físicas empregadas na recuperação de hidrocarbonetos policíclicos em ambientes aquáticos envolvem o uso de barreiras, *skimmers* e adsorventes (ASGHAR et al., 2016; OSSAI et al., 2019). As barreiras, particularmente quando os derramamentos ocorrem em meio aquoso, são consideradas um bloqueio físico eficaz para conter o fluxo do óleo derramado (JANKAITE; VASAREVIČIUS, 2005). As lanças desempenham papel crucial como a primeira resposta a derramamentos de óleo, prevenindo a propagação do óleo em meio à turbulência da água (IBRAHIM; ANG; WANG, 2009).

Existem três tipos principais de barreiras frequentemente utilizadas para a remediação de HPAs em solução aquosa, incluindo barreiras resistentes ao fogo, barreiras de cortina e barreiras de cerca (OSSAI et al., 2019). Em conjunto com essas barreiras, *skimmers* são empregados para remediar o óleo vazado da solução aquosa sem alterar as propriedades do petróleo bruto (ASGHAR et al., 2016). *Skimmers* de açude, oleofílicos e de sucção são tipos comuns de *skimmers*, sendo a escolha dependente do tipo e espessura do óleo derramado (HAMMOUD, 2001). Todos os *skimmers* são fabricados a partir de materiais que possuem propriedades oleofílicas (OSSAI et al., 2019).

Outra técnica física de remediação de compostos de HPAs é a sorção, que faz uso de absorventes sólidos com porosidade e alta área superficial específica para ligar moléculas da fase gasosa ou líquida em sua superfície (BANDURA et al., 2017). Os absorventes

desempenham papel crucial na transformação do óleo líquido em uma forma semissólida, concluindo o processo de remediação após a remoção dos derramamentos de óleo. Esses adsorventes podem ser de natureza sintética, industrial, inorgânica ou orgânica (NAM et al., 2018).

Já as estratégias quimicamente empregadas para remediação de HPAs é a utilização de técnicas como dispersantes, extração por solvente, encapsulamento e oxidação química (ASGHAR et al., 2016; OSSAI et al., 2019). Quando o derramamento de HP ocorre na água, os poluentes naturalmente se dispersam, dependendo da viscosidade dos HPAs (ZHUANG et al., 2015). Dispersantes são utilizados para HPAs mais viscosos, com componentes hidrofílicos e oleofílicos para melhorar a dispersão do óleo (LESSARD; DEMARCO, 2000; RODRIGUEZ-FREIRE et al., 2016). Os solventes desempenham papel vital na extração por solvente, isolando contaminantes HPAs e concentrando-os em líquido não aquoso (RAHSEPAR et al., 2016). O encapsulamento físico separa e contém poluentes, mas pode não ser duradouro e é desaconselhado em locais profundos (CHEN et al., 2015).

A oxidação química, uma abordagem de curto prazo, transforma irreversivelmente HPAs em H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> utilizando oxidantes orgânicos, sendo frequentemente usada para descontaminar áreas de acumulação elevada (CHEN et al., 2015). Diversos oxidantes como peróxido de hidrogênio, reagentes de Fenton, permanganato de potássio e sódio, e ozônio são comuns (RODRIGUEZ-FREIRE et al., 2016). A eficácia depende do conhecimento da região contaminada, reatividade do solo, textura e permeabilidade do solo (WANG et al., 2018). Apesar de apresentar vantagens como reabilitação *in-situ* rápida, oxidação completa e danos mínimos, a remediação química apresenta desafios, incluindo custos elevados, inflamabilidade de dispersantes, potenciais impactos na saúde humana e no meio ambiente marinho, perda de oxidantes e emissões secundárias (SMITHA et al., 2017).

Embora existam desafios associados à degradação bacteriana de poluentes, a maioria dos micro-organismos que ocorrem naturalmente podem lidar com eles de forma eficaz, pelo que o crescimento e o metabolismo são apoiados em ambientes poluídos se o ambiente circundante for propício (JAISWAL; VERMA, 2016). Além disso, em muitas circunstâncias, os procedimentos convencionais não removem totalmente as substâncias contaminadas, mas antes transferem-nas de um habitat ou forma para outro. Nesta técnica, resíduos orgânicos perigosos, como xenobióticos, são convertidos em produtos inofensivos, como dióxido de carbono e água (GOSAI et al., 2022).

Os resíduos industriais contendo poluentes tóxicos têm contribuído em grande medida para esta desastrosa poluição ambiental. A biorremediação emergiu como técnica promissora

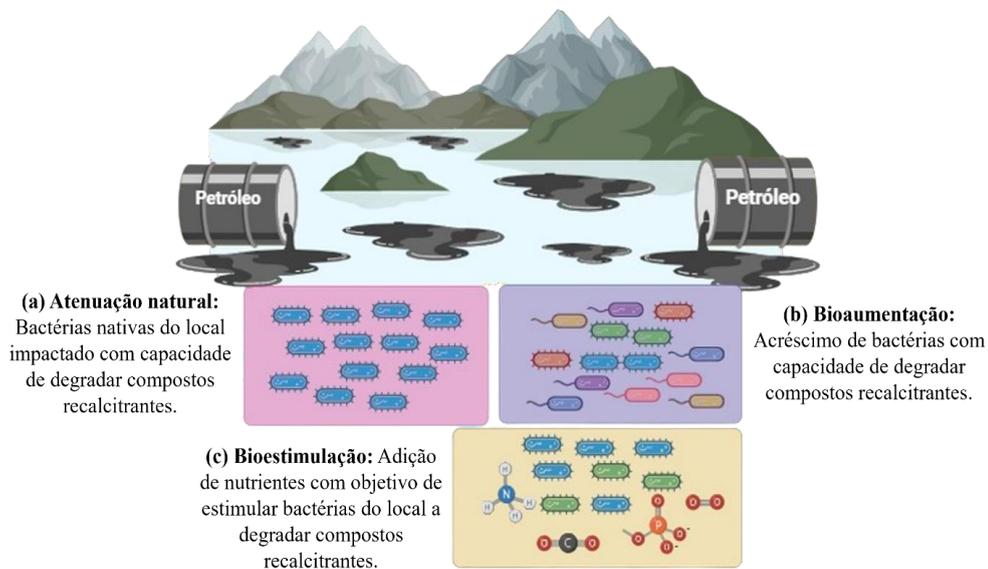
para restaurar locais contaminados com HPAs. Ao contrário dos processos físicos e químicos, os métodos de biorremediação envolvem custos relativamente mais baixos, menor gasto de energia e uma maior probabilidade de resultados ambientalmente seguros (AGRAWAL; SHAHI, 2017).

A biorremediação pode empregar micro-organismos e seus produtos – geralmente enzimas – por meio de suas diversas ações catabólicas na mineralização de hidrocarbonetos complexos como os HPAs. Os hidrocarbonetos complexos são metabolizados em formas menos tóxicas em condições aeróbias (dióxido de carbono e água como produtos finais) e anaeróbias (principal produto final CO<sub>2</sub>) (SAKSHI; HARITASH, 2020). Tanto os HPAs de baixo peso molecular quanto os de alto peso molecular podem ser degradados biologicamente. As vantagens mais significativas da biorremediação sobre a remediação química ou física envolvem a preocupação ao meio ambiente, gerando menos impacto ao local e a relação custo-benefício.

Os processos de remediação biológica convertem substâncias complexas, como metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros compostos tóxicos, em compostos não tóxicos ou menos tóxicos. Em comparação com outras técnicas de remediação, os processos de biorremediação oferecem muitas vantagens: (i) A remediação conduzida biologicamente remove elementos perigosos dos meios poluídos em vez de simplesmente transferi-los, (ii) É notavelmente menos prejudicial ao meio ambiente do que os vários métodos baseados em escavação, e (iii) Por meio de processos de biorremediação, o tratamento de locais com a presença de resíduos perigosos e persistentes pode ser significativamente mais barato do que qualquer método convencional (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2019).

Existem basicamente dois tipos de tecnologias de biorremediação no qual são amplamente empregados na limpeza de poluentes recalcitrantes, como hidrocarbonetos aromáticos *ex-situ* e *in-situ* (BROWN et al., 2017). A técnica *in-situ*, é quando a biorremediação ocorre no local contaminado, sem a transferência de materiais poluídos para outro local, e *ex-situ*, onde o material poluído é removido e degradado em instalações fora do local do incidente após a escavação e solo poluído é transportado para outro local para tratamento (ASGHAR et al., 2016). Quanto aos tipos de biorremediação, existem três principais processos: Atenuação natural, Bioestimulação e Bioaugmentação (EDWARDS; KJELLERUP, 2013). A Figura 6 apresenta características dos tipos de biorremediação.

Figura 5: Características dos tipos de biorremediação



Fonte: Autora (2024)

### 3.4.1 Atenuação natural

Atenuação natural degrada os contaminantes e reduz seu nível de concentração de maneira não invasiva (sem intervenção humana) (BALA et al., 2022). É um processo de biodegradação que consiste na fragmentação de compostos orgânicos que depende apenas do metabolismo de micro-organismos nativos aeróbios ou anaeróbios para destruir contaminantes perigosos e recalcitrantes, sem usar nenhum estágio artificial como a inserção de novos micro-organismos ou nutrientes no local para aumentar a atividade de biodegradação (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018). Esse processo possui menor custo pois não há - acréscimo de insumos, materiais ou equipamentos para realização incremento dos micro-organismos no local (BALA et al., 2022). No entanto, o monitoramento contínuo é necessário para que a biorremediação seja contínua e estável, mantendo uma boa eficiência de degradação.

Considerando que os micro-organismos nativos são altamente eficazes na degradação de poluentes de difícil degradação, porque podem estar adaptados às condições do local, e que existe uma relação micro-organismo/hidrocarboneto estabelecida no curso da evolução, a capacidade de degradação de hidrocarbonetos é comum entre os consórcios bacterianos já que mesmo sem viverem naturalmente em um ambiente com a presença natural de contaminantes, possuem a capacidade de secretar enzimas para transformar tais compostos complexos em outros cujo o metabolismo é mais fácil (KUMAR; SHAHI; SINGH, 2018). Antes de

implementar a biorremediação utilizando o processo de atenuação natural, é crucial realizar uma avaliação de risco para assegurar que o tempo necessário para concluir o processo seja inferior ao tempo natural de degradação do composto no meio ambiente para alcançar níveis mais seguros de exposição humana e animal.

### **3.4.2 Bioestimulação**

A bioestimulação é uma técnica de remediação altamente eficiente, econômica e ecológica por natureza. A bioestimulação refere-se à adição de nutrientes como fósforo, nitrogênio, oxigênio e doadores de elétrons, a locais gravemente poluídos para estimular as bactérias existentes a degradar os contaminantes tóxicos (GOSWAMI et al., 2018).

A suplementação de nutrientes otimiza o potencial de degradação dos compostos tóxicos pelos micro-organismos presentes, acelerando a taxa de descontaminação (DOMÍNGUEZ et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2020; ABID et al., 2014).

Estudos na literatura estabeleceram a bioestimulação como uma ferramenta crucial para a degradação de hidrocarbonetos, especialmente produtos petrolíferos e seus derivados (ABID et al., 2014). Em termos mais específicos, áreas contaminadas por petróleo com população bacteriana menos eficiente e metabolicamente empobrecida podem ser notavelmente remediadas pela adição de nutrientes do processo de bioestimulação (TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2010; DELILLE; COULON; PELLETIER, 2004). Isso ocorre principalmente devido à fácil disponibilidade da fonte de carbono (C), um dos nutrientes essenciais exigidos pelos micro-organismos indígenas para suas atividades metabólicas, proveniente dos contaminantes do petróleo.

### **3.4.3 Bioaugmentação**

A bioaugmentação ocorre pelo acréscimo de micro-organismos isolados ou em consórcios que possuem a capacidade de degradação do contaminante, em áreas impactadas por resíduos, visando acelerar a remoção de compostos indesejados (CARDOSO, 2012). Este procedimento é frequentemente empregado em ambientes contaminados por óleo como estratégia alternativa para a biorremediação. A lógica subjacente a essa abordagem reside na ampliação do grau ou taxa de degradação de poluentes complexos, por meio da introdução de micro-organismos especializados na decomposição desses poluentes (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020; LEAHY; COLWELL, 1990).

Ao melhorar a microbiota do local contaminado, não apenas se impulsiona a eliminação mais eficiente dos poluentes, mas também amplia a capacidade genética desse ambiente. Portanto, o processo de bioaugmentação contribui para o aumento do *pool* genético e, conseqüentemente, para a diversidade genética da área-alvo. Em essência, o bioaumento representa um incremento na diversidade genética, o qual pode ser alcançado mediante a ampliação da diversidade bacteriana (DEJONGHE et al., 2001).

Há um debate sobre qual das duas técnicas, bioaugmentação e bioestimulação, é a melhor estratégia para biorremediação. Aparentemente, as circunstâncias prevalecentes no local influenciam significativamente a escolha da técnica a ser aplicada descobriram que a seletividade e a especialização das bactérias adicionadas definem principalmente a eficácia da biorremediação, e não a carga de nutrientes (HAMDI et al. 2007).

Bento et al. (2005) compararam a biorremediação do óleo diesel por atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação. Concluíram que a melhor abordagem para a biorremediação do óleo diesel era a bioaugmentação realizada pela inoculação de bactérias pré-selecionadas de um local contaminado. Aparentemente, as bactérias indígenas (pré-selecionadas para bioaugmentação) têm maior probabilidade de sobreviver e se propagar quando reintroduzidos no local, em comparação com cepas transitórias ou estranhas a tal habitat (BENTO et al. 2005; THOMPSON et al. 2005).

A bioaugmentação pode melhorar o efeito geral do tratamento ao introduzir cepas específicas no sistema de reação biológica, de modo a atingir os objetivos de aumentar significativamente a eficiência de remoção de poluentes e recuperar a atividade da comunidade (WU et al., 2018; JI et al., 2020). *Acinetobacter tandoii* LJ-5. foi utilizado para tratar águas residuais contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os biossurfactantes produzidos por *Acinetobacter* podem aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos por solubilização e/ou emulsificação ou alterar as propriedades da superfície celular de outros micro-organismos (LI et al., 2018).

Assim, o *Acinetobacter tandoii* LJ-5 poderia simultaneamente melhorar a biodisponibilidade do fenantreno e ativar as funções de outros candidatos degradantes do fenantreno (LI et al., 2018). A bioaugmentação é recomendada principalmente para locais onde o número de micro-organismos autóctones que permitem a degradação dos contaminantes é insuficiente e/ou aqueles em que as populações nativas não possuem as vias catabólicas necessárias para metabolizar os poluentes (FORSYTH et al., 1995, GENTRY et al., 2004, MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2010). A bioaugmentação depende do aumento do

potencial metabólico das comunidades dos micro-organismos do solo para a degradação de poluentes.

O sucesso do bioaumentação está cada vez mais ligado à incorporação eficaz da estirpe inoculada no ambiente hospedeiro, cujo sucesso é influenciado por questões que vão desde a seleção da estirpe e a estratégia de introdução até à capacidade da estirpe de sobreviver no ambiente até onde é introduzido (HERRERO et al., 2014; THOMPSON et al., 2005). A seleção de uma cepa adequada é essencial para o sucesso do bioaumentação. A(s) cepa(s) selecionada(s) deve(m) ser capaz(s) de resistir às condições ambientais que lhes são impostas dentro de um processo de tratamento, incluindo; temperatura, pH, oxigênio dissolvido, disponibilidade de nutrientes, toxicidade e pressões microbianas (BITTON, 2011).

A compreensão das condições dentro do processo de tratamento, o bioaumentação provavelmente falhará devido à fraca sobrevivência do inóculo e/ou à competição de populações de micro-organismos indígenas (STEPHENSON, 1992). Essa técnica vem provando ser um método valioso para melhorar o desempenho no tratamento e resolver problemas práticos em estações de tratamento de efluentes industriais (HERRERO; STUCKEY, 2015; ZHANG et al., 2017).

No processo de aprimoramento da redução dos poluentes tóxicos específicos, a escolha criteriosa de uma cepa com características excelentes, aliada à utilização adequada da adição de substrato para estimular o processo metabólico, são abordagens viáveis e eficazes (HUANG et al, 2019). A bioaumentação faz parte das tecnologias ambientalmente sustentáveis empregadas na remoção de contaminantes orgânicos dos ecossistemas. Esta é uma abordagem persuasiva da biorremediação, fundamentada na introdução deliberada de bactérias com capacidades catalíticas desejadas em ambientes específicos, como solo, lodo ativado, sedimentos, água, entre outros (NZILA et al., 2016).

### 3.5 MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

O petróleo é uma das matérias-primas mais importante para a produção de combustíveis petrolíferos (por exemplo, gasolina e querosene) e produtos de reagentes químicos (por exemplo, produtos farmacêuticos, solventes, fertilizantes e plásticos) (AECKERSBERG; BAK; WIDDEL, 1991). Devido à crescente demanda global por petróleo, cada vez mais atividades como exploração, extração, refino e transporte de petróleo têm sido realizadas. Ao mesmo tempo, cerca de metade destes produtos petrolíferos são transportados em todo o mundo por via

marítima (PRICE; SOWERS, 2004). Consequentemente, tem havido um aumento nos acidentes envolvendo derramamento ou vazamento de petróleo em todo o mundo, incluindo incidentes em poços de petróleo, oleodutos, plataformas de perfuração e navios-tanque de transporte (KERAMEA et al., 2021).

Durante as últimas décadas, os especialistas concentraram-se na remediação de ambientes contaminados com substâncias perigosas, como resultado de uma maior consciencialização sobre os possíveis impactos prejudiciais da poluição na saúde humana e no ambiente circundante.

A biodegradação de diversos contaminantes recalcitrantes de locais impactados com HPAs utilizando micro-organismos como bactérias, fungos, leveduras e algas, ganhou recentemente enorme interesse em todo o mundo devido à sua eficiência, respeito pelo ambiente, baixo custo e sustentabilidade (THACHARODI et al., 2023). Quanto à prevalência da capacidade de degradar hidrocarbonetos, estudos focados na atividade catabólica de várias populações bacterianas fornecem respostas positivas (SYDOW et al., 2016; LAWNICZAK; MARECIK, 2019). Foi estabelecido que os degradadores de hidrocarbonetos estão sempre presentes numa determinada população, independentemente de o seu habitat ter sido exposto a contaminações antropogénicas ou não. Esta regra geral em ecologia microbiana: “Tudo está em toda parte, mas o ambiente seleciona” já foi afirmada em 1934 pelo microbiologista holandês Martinus Wilhelm Beijerinck no início do século XX (O’MALLEY, 2008).

A biorremediação de n-alcanos é relativamente fácil (exceto fração volátil C5 – C9), seguida por compostos aromáticos básicos, ou seja, xileno-isoalcanos, tolueno e benzeno, enquanto aromáticos e cicloalcanos se degradam mais lentamente (BENYAHIA et al., 2005; MARGESIN et al., 2018). As diferenças na invulnerabilidade dos HPAs à degradação microbiana podem ser categorizadas da seguinte forma: alcanos lineares > alcanos ramificados > pequenos aromáticos > alcanos cíclicos (AHMED et al., 2018). No entanto, certos compostos, ou seja, HPAs de maior peso molecular, não se degradam ou são muito mais recalcitrantes (SZULC et al., 2014).

A classe de micro-organismos ativamente envolvidos na degradação de poluentes orgânicos de locais contaminados. Sabe-se que várias espécies bacterianas degradam os HPAs. A maioria deles, representando eficiência de biodegradação, é isolada de solo ou sedimentos contaminados. A descarga de resíduos petroquímicos de longo prazo abriga bactérias capazes de degradar consideravelmente os HPAs (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

As bactérias presentes em locais impactados evoluíram ao longo dos anos para degradar ativamente os poluentes orgânicos e obter energia de locais contaminados. Sua capacidade de remediar ambientes impactados causados pelo derramamento de petróleo tem sido usada como ferramenta biotecnológica para biorremediação da poluição ambiental. A degradação do naftaleno e do fenantreno tem recebido mais atenção, entre várias bactérias conhecidas por degradarem os HPAs (REJINIEMON et al., 2022).

Os micro-organismos hidrocarbonoclásticos são os principais agentes degradadores dos hidrocarbonetos aromáticos compostos provenientes do petróleo, devido às suas capacidades metabólicas associadas, inúmeros micro-organismos (principalmente bactérias e fungos) são capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, utilizando-os como única fonte de carbono para metabolismo e energia. As bactérias são os agentes degradadores do petróleo mais ativos; elas funcionam como degradadores primários de uma ampla gama de constituintes alvo presentes no solo, na água e no lodo (BROOIJMANS; PASTINK; SIEZEN, 2009).

Hidrocarbonetos aromáticos, incluindo benzeno, tolueno, xileno, naftaleno e fenantreno, apresentam capacidade de degradação tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias. Aerobiamente, a degradação desses compostos geralmente inicia-se com a formação de catecol ou um composto estruturalmente relacionado, que serve como intermediário. O catecol resultante pode ser então degradado, gerando compostos que podem ser incorporados no ciclo do ácido cítrico, culminando na completa mineralização desses compostos em CO<sub>2</sub>. (CAO; NAGARAJAN; LOH, 2009).

Catecol dioxigenases é uma classe de enzimas bacterianas contendo ferro, são exemplos de enzimas envolvidas na degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos. Estas enzimas catalisam a adição de átomos de oxigênio molecular ao 1,2-dihidroxibenzeno (catecol) e seus derivados, resultando na clivagem do anel aromático. Sabe-se que uma ampla variedade de micro-organismos utiliza enzimas como as catecol dioxigenases para a degradação de compostos aromáticos (TAO et al., 2006).

Apesar de a degradação do petróleo em condições aeróbicas ocorrer mais rapidamente do que em condições anaeróbicas, é importante notar que a degradação anaeróbica também é essencial para o processo de biorremediação porque em vários casos as condições ambientais podem incluir limitações da disponibilidade de oxigênio, como nos manguezais, aquíferos e digestores de lodo (SANTOS et al., 2011). No metabolismo anaeróbio, geralmente, os compostos aromáticos são convertidos em benzoil-CoA, que é alvo da ação da benzoil-CoA redutase (HOSODA et al., 2005). Dependendo das condições ambientais, diferentes aceitadores terminais de elétrons podem ser utilizados, como nitrato, sulfato, magnésio e Fe

(III); geralmente, as vias de degradação convergem para benzoil-CoA (EVANS; FERNLEY; GRIFFITHS, 1965).

Micro-organismos com habilidade para degradar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estão amplamente distribuídos em diversos ambientes, inclusive em áreas intocadas, representando até 0,1% da microbiota (MARGESIN et al., 2003; GHAZALI et al., 2004; CALVO et al., 2009; UAD et al., 2010; SOUZA et al., 2014; SHEN et al., 2015; VARJANI et al., 2015; LAMICHHANE; BAL KRISHNA; SARUKKALIGE, 2016). Entretanto, em ecossistemas contaminados por petróleo, os organismos degradadores de hidrocarbonetos podem dominar a comunidade microbiana (LEAHY; COLWELL, 1990; GREENWOOD et al., 2009; VARJANI; UPASANI, 2016).

Bactérias pertencentes a vários gêneros têm sido relatados como hidrocarbonoclásticos, exibindo potencial para degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos petrogênicos; muitos desses organismos foram isolados do solo ou de ambientes aquáticos. A biodegradação do fenantreno foi extensivamente investigada. Os micro-organismos identificados capazes de utilizar fenantreno como único substrato são principalmente *Pseudomonas* spp (TAO et al., 2006) e espécies *Nocardioides* (IWABUCHI et al., 1998; SAITO; IWABUCHI; HARAYAMA, 2000). Além disso, espécies de *Sphingomonas* (PINYAKONG et al., 2003a; XIA et al, 2005 ) também podem degradar o fenantreno. Populações microbianas de vários gêneros foram detectadas em solo e água contaminados com petróleo, o que sugere a capacidade dos organismos de usar compostos de hidrocarbonetos como substrato para a sobrevivência (GAŁĄZKA; GAŁĄZKA, 2015; GHAZALI et al., 2004).

Bactérias isoladas de água salobra capazes de degradação de hidrocarbonetos incluíam *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Norcadia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Vibrio* (GHAZALI et al., 2004). Descobriu-se também que bactérias degradam o petróleo bruto de um curso d'água poluído e incluíam *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* spp., *Alcaligenes* sp., *Acinetobacter lwoffii*, *Flavobacterium* sp., *Micrococcus roseus* e *Corynebacterium* sp. (GHOSAL et al., 2016). Os gêneros degradadores de hidrocarbonetos mais importantes em ambientes de solo incluem *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* e *Variovora* (GIUNTA et al., 2019; GUPTA; KUMAR; PAL, 2017;

GKOREZIS et al., 2016). Porém o mais citado na literatura é o gênero *Bacillus* sp. por ser encontrado na maioria dos ambientes impactados por petróleo bruto.

O gênero *Bacillus*, pertencente à família Bacillaceae, abrange 293 espécies/subespécies, essa categoria é notável por compreender um grupo de bactérias formadoras de endósporos em forma de bastonete, Gram-positivas, que podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas (PATEL; GUPTA, 2020). Os membros do gênero *Bacillus* são onipresentes e foram isolados de diversas fontes, como solo, lodo de esgoto (DEMHARTER; HENSEL, 1989), sedimentos oceânicos (RÜGER; FRITZE; SPRÖER, 2000) e água salina (SMIBERT et al., 1994). Eles demonstram notável capacidade de crescimento rápido em altas densidades e de tolerar condições ambientais adversas.

O gênero *Bacillus* engloba tanto espécies não patogênicas (de vida livre) quanto patogênicas (parasitas). Exemplos de espécies não patogênicas incluem *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilus*, que estão intimamente relacionadas entre si. Cepas patogênicas notáveis são *Bacillus anthracis*, causador do antraz em seres humanos, e *Bacillus cereus*, associada a intoxicação alimentar (CLAUS et al., 1986).

Espécies do gênero *Bacillus* são considerados potenciais agentes biorremediadores capazes de degradar diversos compostos tóxicos (ARORA et al., 2016; SINGH et al., 2016; XIAO et al., 2017). Estudos prévios também documentaram a degradação de vários compostos xenobiótico, recalitrantes e metais pesados pelos membros do gênero *Bacillus* (BIROLI et al., 2016; UPADHYAY et al., 2017; ARORA et al., 2018; DÍEZ-MÉNDEZ et al., 2019). Wang et al. (2019) relataram a eficiente biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Bacillus subtilis* BL-27. Viesser et al. (2020) isolaram novas cepas de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus subtilis* capazes de degradar petróleo na rizosfera de *Panicum aquaticum*, utilizando hidrocarbonetos de petróleo como única fonte de carbono e energia.

### 3.6 CULTIVO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE HPAs EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

O setor petroquímico não se diferencia de outras indústrias químicas no que diz respeito ao descarte de efluentes e rejeitos industriais, e, por muitos anos, substâncias nocivas líquidas, sólidas e gasosas foram e estão sendo lançadas pelo homem ao meio ambiente de forma descontrolada, sem nenhuma forma de tratamento ou processamento (MAACHA; BOUZEERNA. CHETTIBI, 2005). Os efluentes e rejeitos gerados pela indústria petroquímica representam uma preocupação ambiental significativa devido aos seus impactos adversos no

ecossistema e na saúde humana. Esses resíduos, muitas vezes contaminados por substâncias tóxicas, resultantes de processos de produção e podendo ter efeitos devastadores se não forem adequadamente tratados, exigindo o desenvolvimento de estratégias de remediação desses efluentes (JAIN et al., 2022).

A composição complexa dos efluentes petroquímicos inclui hidrocarbonetos, metais pesados e compostos orgânicos persistentes, que podem infiltrar no solo, contaminar os corpos d'água e afetar os ecossistemas aquáticos (UZOEKWE; OGHOSANINE, 2011). A liberação descontrolada desses poluentes contribui para a degradação da qualidade da água, prejudicando a flora e fauna locais e, em última instância, prejudicando a saúde humana quando a água contaminada é consumida (VARJANI, 2017).

Os efluentes gerados pelo processamento de petróleo são geralmente derivados do refino do óleo e da fabricação de produtos de alto valor agregado, sendo compostos por resíduos de óleo, graxas, além de uma grande variedade de compostos orgânicos tóxicos (EL-NAAS; ALHAIJA; AL-ZUHAIR, 2014). Tal processo também consome uma imensa quantidade de água que, por sua vez, gera um imenso volume de águas residuais, se transformando em uma perigosa fonte de poluição ambiental (SINGH; SHIKHA, 2018).

Em estações de tratamento de efluentes, os micro-organismos presentes naturalmente desempenham papel fundamental na degradação e remoção de resíduos orgânicos poluentes e tóxicos ao meio ambiente, sendo utilizados atualmente em tratamentos complementares para degradação em efluentes ricos em óleos, gorduras e compostos orgânicos de lenta decomposição nas condições naturais do ambiente encontradas (SILVA-BEDOYA et al., 2016). O tratamento biológico de águas residuárias, sejam efluentes industriais ou residenciais, constitui importante e próspera indústria global, sendo essencial para o desenvolvimento industrial sustentável, já que apresentam remoção eficientes de poluentes, derivadas do aumento de populações de micro-organismos nestes ambientes (WANG et al., 2018).

A ETE Multifábrica, localizada em Jaboatão dos Guararapes e inaugurada em 1980, desempenha um papel crucial no manejo ambiental da região, proporcionando tratamento eficaz para diversos tipos de efluentes industriais de uma área densamente industrializada (MEDEIROS, 2014). O complexo industrial ao redor da ETE Multifábrica inclui desde pequenas fábricas até grandes plantas de produção, abrangendo setores como produção de embalagens plásticas, têxtil, alimentos e metalurgia, apresentando desafios significativos em termos de gestão ambiental no que diz respeito ao tratamento de efluentes industriais, já que cada indústria lança grupos particulares de poluentes resultados de seus processos (ARAÚJO, 2024). Contudo,

a ETE Multifábrica destaca-se por sua capacidade de processar uma ampla gama de efluentes, adaptando-se às especificidades de cada tipo de indústria, onde, por conta das matérias-primas usadas pelas indústrias, acabam possuindo uma grande fração de derivados de petróleo em sua composição, condicionando os micro-organismos à degradar tais compostos e criando condições e propriedades semelhantes às encontradas em efluentes de processamento de petróleo (DA SILVA, 2024).

A capacidade da ETE Multifábrica de cultivar micro-organismos com potencial para a biorremediação de compostos recalcitrantes oferece uma solução ecologicamente sustentável e eficaz para a remoção de poluentes. Ao isolar cepas bacterianas específicas do lodo da estação, é possível desenvolver técnicas de biorremediação, promovendo a recuperação de ambientes impactados por derramamentos de petróleo e outros contaminantes industriais (ATYA KAPLEY; THIERRY DE BAÈRE; PUROHIT, 2007). Este processo não apenas melhora a qualidade ambiental, mas também representa uma abordagem mais segura e sustentável em comparação com os métodos tradicionais de tratamento físico ou químico além de ser uma alternativa de local para a obtenção de micro-organismos de interesse para biorremediação em comparação aos efluentes petroquímicos por conta da maior disponibilidade e facilidade de acesso (SINGHA; PANDEY, 2021).

Um dos principais benefícios dos micro-organismos nas estações de tratamento de efluentes é sua capacidade natural de degradar poluentes orgânicos simples e complexos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Esses micro-organismos atuam como agentes decompositores, transformando resíduos industriais, produtos químicos e matéria orgânica em compostos mais simples e menos tóxicos. Esse processo é crucial para reduzir a carga poluente dos efluentes, garantindo que a água liberada de volta ao meio ambiente seja mais limpa e segura (WEI et al., 2019).

Por conta da diversidade de componentes presentes em efluentes de indústrias de diversos setores, várias espécies de micro-organismos já foram detectadas efetuando a degradação de substâncias de alto poder de poluição e persistência no ambiente, como hidrocarbonetos aromáticos em geral, sendo os principais contaminantes presentes em efluentes do setor petrolífero (THANGARAJ; KAPLEY; PUROHIT, 2007). Os micro-organismos aeróbios e anaeróbios presentes nas estações de tratamento são capazes de converter esses hidrocarbonetos em compostos mais simples e menos tóxicos por meio de processos metabólicos específicos, utilizando uma grande variedade de compostos orgânicos presentes no meio como fontes de carbono e doadores de elétrons para a produção de energia para as células (SHOKROLLAHZADEH et al., 2008). Bactérias como *Pseudomonas sp* e *Bacillus sp*, por

exemplo, demonstram habilidades notáveis na degradação de hidrocarbonetos complexos encontrados no petróleo. Esses micro-organismos, quando isolados de estações de tratamento de efluentes, podem ser cultivados e aplicados em sistemas especializados para acelerar a quebra de compostos petrolíferos (KUYUKINA; KRIVORUCHKO; IVSHINA, 2020).

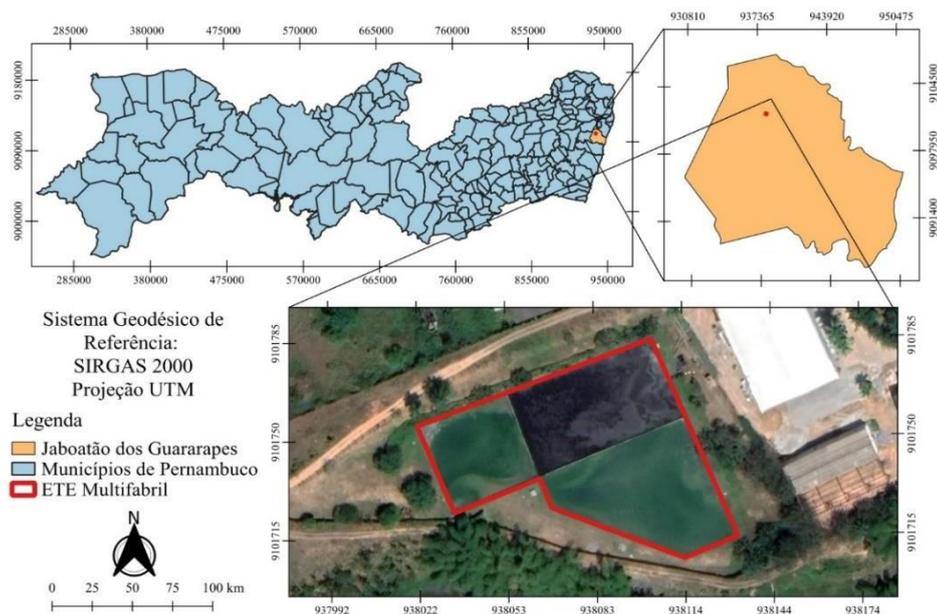
As estações de tratamento de efluentes industriais tornam-se potenciais soluções para prevenir a contaminação com hidrocarbonetos ou remediar acidentes que possam ocorrer no setor. Diversos micro-organismos, especialmente bactérias aeróbias ou anaeróbias, podem ser isolados de estações de tratamento com o objetivo de degradar componentes pré-selecionados de acordo com seu metabolismo. A biodegradação de compostos de petróleo por micro-organismos envolve uma variedade de mecanismos metabólicos adaptativos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO LODO EM ESTUDO

A Estação de Tratamento de Efluentes Multifabril - ETE Multifabril está localizada nas coordenadas geográficas 8°10'58.2 "S e 35°02'60.7" W, operada conjuntamente pela COMPESA e BRK Ambiental, com o início das operações na década de 1980 no bairro de Santo Aleixo, município de Jaboatão dos Guararapes, dentro do Complexo Industrial Multifabril, a Figura 6 apresenta a localização da ETE Multifabril e do completo industrial, no município de Jaboatão dos Guararapes. A ETE faz parte do complexo industrial de Jaboatão que abrange 15 segmentos, incluindo indústria alimentícia, metalurgia, usinagem, refrigeração, papelaria, marcenaria, produtos gráficos, tintas e solventes, produtos galvanizados, polímeros, entre outros. Além disso, o esgoto doméstico das indústrias também é integrado à rede coletora, tornando o efluente que chega à ETE complexo e diversificado.

Figura 6: Localização da ETE Multifabril e do complexo industrial, no município de Jaboatão dos Guararapes



Autor: Autora (2024)

Ela é equipada com uma unidade de pré-tratamento físico e três unidades de tratamento biológico. O pré-tratamento consiste em uma grade de barras, seguida por uma calha Parshall com medidor de vazão ultrassônico acoplado. O tratamento biológico é composto por três

lagoas que operam em série como apresentado na Figura 8 Lagoas da Estação de Tratamento de Efluentes e o ponto de coleta do inóculo da lagoa 1. Inicialmente, as lagoas foram projetadas para operar com duas lagoas facultativas em série, visando a remoção de matéria orgânica, seguidas por uma lagoa de maturação para eliminar a matéria orgânica residual, coliformes totais e termotolerantes. No entanto, devido à recepção de efluentes com alto teor de matéria orgânica, sólidos suspensos, óleos e graxas, além de outros resíduos, aumentou de forma considerável a carga orgânica do sistema e por conta disso a primeira lagoa é caracterizada como anaeróbia, segunda lagoa microaerada e terceira lagoa facultativa.

Figura 7: Lagoas da Estação de Tratamento de Efluentes e o ponto de coleta do inóculo



Autor: Pereira (2024)

#### 4.2 DESENVOLVIMENTO DA ESTRATÉGIA DE COLETA DE AMOSTRA

A coleta de 1 litro do inóculo na lagoa 1 foi realizada utilizando um braço de coleta de aço inoxidável com 3,0 metros de comprimento, permitindo a amostragem a uma profundidade de 2 metros. O uso do braço de coleta foi necessário devido às restrições de acesso à lagoa, resultantes da alta vazão de matéria orgânica presente na lagoa 1. Esta abordagem foi adotada com o objetivo de coletar biomassa na região mais próxima à entrada do afluente do sistema de tratamento, onde se esperava uma maior carga orgânica e concentração elevada de compostos

tóxicos. Após a coleta do lodo da lagoa em estudo, o material foi armazenado sob refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 6 meses antes de ser utilizado, sem a necessidade de qualquer pré-tratamento adicional, exceto pela elutriação de 50 mL deste mesmo lodo para realizar o isolamento bacteriano.

#### 4.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA LAGOA

Em relação às características físico-químicas do lodo em análise, foram empregadas as informações e dados obtidos no relatório final de atividades da estudante bolsista MAI/DAI Naianny Thaís Monteiro, onde foram descritos dados sobre a lagoa 1 em estudo.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos da Lagoa 1

Variáveis	Valor
pH	6,91
Oxigênio dissolvido ( $\text{mgO}_2/\text{L}$ )	0,04
Condutividade elétrica ( $\text{mS}/\text{cm}$ )	0,47
Potencial redox (mV)	-285,2
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	35,8

Fonte: Monteiro (2022)

Observou-se um leve decréscimo no pH nessa lagoa, sugerindo a possibilidade de que os processos metabólicos ocorridos nesse ambiente estejam consumindo componentes responsáveis pela alcalinidade do meio. Os dados de potencial redox e oxigênio dissolvido indicam que a lagoa 1 atua como um reator anaeróbico, conforme evidenciado pelo valor próximo a  $-300\text{ mV}$ , característico de reatores anaeróbios (NGUYEN et al., 2018). Além disso, a quase inexistência de oxigênio dissolvido da lagoa 1 apoia essa interpretação.

#### 4.4 MÉTODO DE ISOLAMENTO BACTERIANO

O isolamento bacteriano foi realizado no laboratório de saneamento ambiental - LSA, localizado na Universidade Federal de Pernambuco – Recife. O procedimento de preparo da amostra de lodo incluiu três repetições de elutriação com água corrente (para retirada das impurezas) e centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos.

Para o isolamento bacteriano, foi preparado um meio de cultura Zobell adaptado, com pH 7. O meio original baseia-se na utilização de água do mar, contendo naturalmente seus sais

minerais, no entanto, para este estudo, uma versão adaptada do meio foi empregada, utilizando-se sais minerais conforme descrito na Tabela 3, com suas concentrações específicas determinadas.

Tabela 3: Concentrações do meio marinho 2216 adaptado para utilização no processo de isolamento bacteriano do inóculo da lagoa

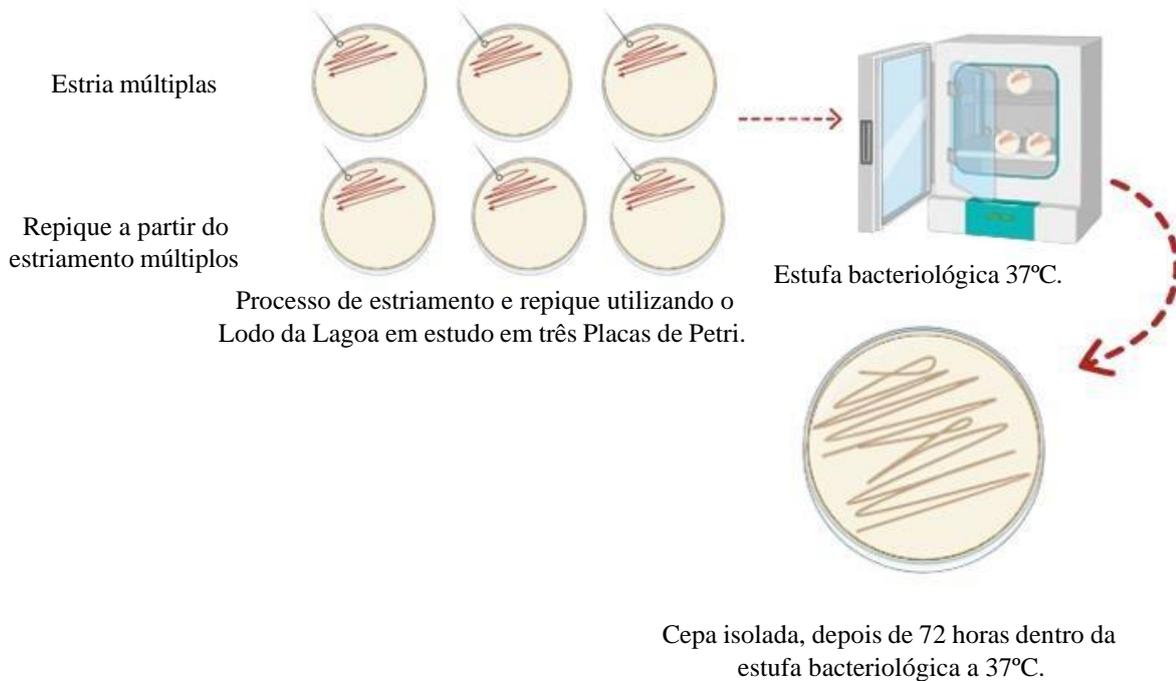
<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Peptona	5,0
Extrato de levedura	1,0
Citrato de ferro	0,1
Cloreto de sódio	19,45
Cloreto de magnésio	8,8
Sulfato de sódio	3,24
Cloreto de cálcio	1,8
Cloreto de potássio	0,55
Bicarbonato de sódio	0,16
Brometo de potássio	0,08
Cloreto de estrôncio	0,034
Ácido bórico	0,022
Silicato de sódio	0,004
Fluoreto de sódio	0,0024
Nitrato de amônio	0,0016
Fosfato de sódio monobásico	0,008
Ágar	15
Água destilada	1000 mL

Fonte: ZoBell e Johnson (1948)

Para o processo de plaqueamento, foram empregadas placas de petri com dimensões de 100x15mm, juntamente com alças descartáveis estéril de 10 µl. O procedimento de plaqueamento foi conduzido dentro de uma cabine de fluxo laminar (Pachane modelo Pa410 Eco, Classe II tipo A1). O procedimento de início do plaqueamento consistiu no estriamento de 10 µl do Lodo da Lagoa em estudo em placas de petri com o ágar presente nas placas que foi preparado com o meio adaptado, deixando essas placas dentro de uma estufa de cultura bacteriológica (SolidSteel) a 37°C por 72h horas. Na sequência, três novas placas foram repicadas a partir das placas iniciais e novamente deixadas em estufa bacteriológica por 72h a 37°C uma vez que era notada apenas uma única cepa bacteriana com morfologia única como apresentado na Figura 9 Procedimento do plaqueamento e isolamento microbiano, e então a cepa isolada foi submetida aos procedimentos de identificação presuntiva: coloração pelo

método de Gram com a finalidade de distinguir a bactéria em dois grupos Gram-positiva ou Gram-negativo.

Figura 8: Procedimento de plaqueamento e isolamento microbiano



Fonte: Autora (2024)

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA - COLORAÇÃO DE GRAM

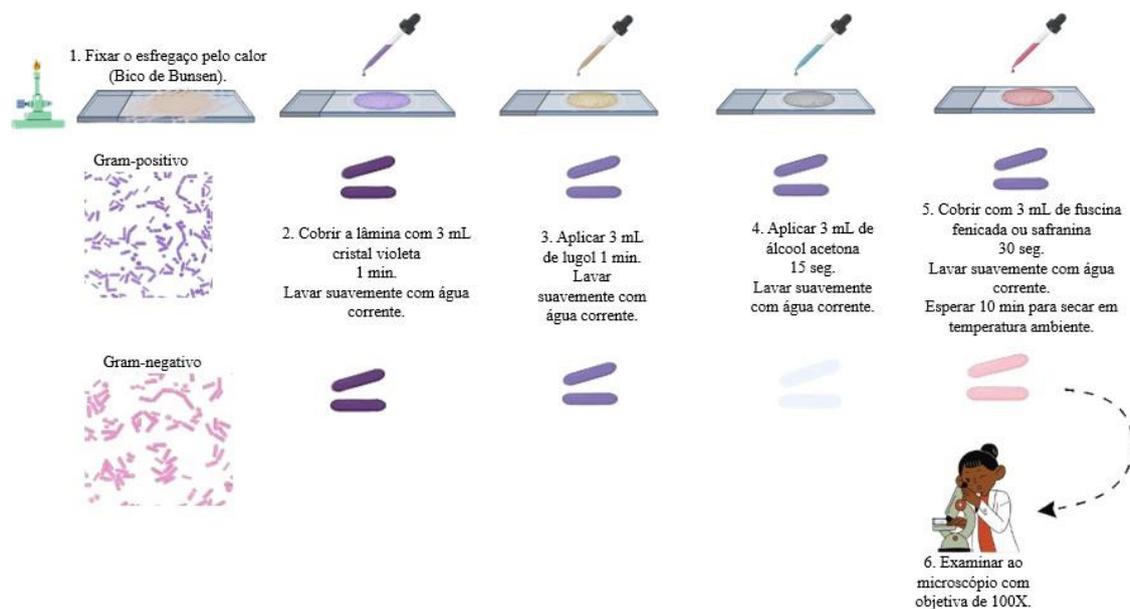
A caracterização microscópica da bactéria foi realizada por meio do Kit Conjunto Coloração de Gram - 4 X 500 mL – Renylab, possibilitando sua visualização sob microscopia óptica.

No processo metodológico, um esfregaço foi preparado na placa de petri contendo a cepa isolada e transferido para uma lâmina de vidro. O esfregaço foi realizado utilizando uma alça descartável estéril de 1µL, garantindo a coleta adequada da cepa isolada. Em seguida, o esfregaço foi fixado pelo calor, utilizando-se o bico de bunsen, para assegurar a adesão da bactéria à lâmina. No entanto, é crucial evitar a exposição prolongada da lâmina ao calor do bico de bunsen, uma vez que a alta temperatura pode afetar a estrutura da bactéria e comprometer os resultados. Todo esse procedimento foi conduzido em cabine de fluxo laminar.

Após o preparo das lâminas já fora da cabine de fluxo laminar, a coloração de Gram foi iniciada com a aplicação de 3 mL de cristal violeta sobre as lâminas. Em seguida, a lâmina foi superficialmente lavada com água corrente e, posteriormente, coberta com 3 mL de lugol,

deixando agir por 1 minuto. Após nova lavagem com água corrente, a lâmina foi coberta com 3 mL de álcool acetona, deixando agir por 15 segundos. Após nova lavagem com água corrente, a lâmina foi coberta com 3 mL de fucsina fenicada ou safranina, deixando agir por 30 segundos. Finalmente, a lâmina foi novamente lavada com água corrente e deixada secar por 10 minutos em temperatura ambiente. Para a análise final, a lâmina foi examinada em um microscópio binocular da Olympus modelo BX41TF, utilizando uma gota de óleo de imersão na lâmina e a objetiva de 100X como descrito na Figura 10 que apresenta etapas da técnica de coloração de gram.

Figura 9: Etapas da técnica de Coloração de Gram



Fonte: Autora (2024)

#### 4.6 MÉTODO DE ENRIQUECIMENTO

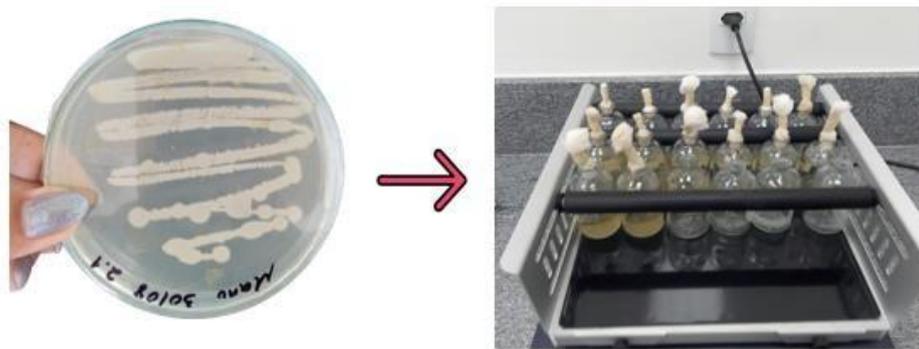
Foram empregados os seguintes compostos: Metanol (grau HPLC), adquirido da Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA, fenantreno ( $C_{14}H_{10}$ , peso molecular 178,23 g/mol, CAS # 85-01-8) com pureza de 98%, também fornecido pela Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA, Hexano (padrão analítico) fornecido pela Química Moderna, Richard Bublitz, Vieira, Jaragua do Sul, SC, BR, e Acetona, também fornecida pela Química Moderna, Richard Bublitz, Vieira, Jaragua do Sul, SC, BR.

Após o isolamento, o enriquecimento bacteriano foi conduzido utilizando 14 frascos de vidro com volume de 100 mL, contendo 25 mL de meio marinho adaptado conforme ZoBell e Johnson (1948) com pH 7. Este meio não inclui peptona, extrato de levedura ou ágar diferente

do meio ATCC 2216 citado na etapa de isolamento que tem esses compostos com a finalidade de crescimento das bactérias através de fontes de carbono. Em cada frasco, foi adicionado 500 µL de fenantreno. O fenantreno cristalizado da marca Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA onde foi pesado em uma balança analítica da marca Bel Engineering, resultando em 0,1258g, e dissolvido em 10 mL de metanol da marca Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA em um béquer de vidro de 25 mL. Este procedimento foi realizado dentro de uma capela de exaustão utilizando uma pipeta automática de 1 mL, observando-se que 10 mL de metanol foram suficientes para dissolver a quantidade de fenantreno pesado.

Dois quadrantes de 5 cm x 5 cm da cepa isolada foi inserido em cada um dos 14 frascos de vidro de 100 mL, os quais foram vedados com algodão hidrofóbico, e mantidos sob agitação em uma incubadora horizontal A0 – 370 da Gehaka) a 200 rpm a 30°C por um período de 7 dias com objetivo de crescimento de células bacterianas, como apresentado na Figura 11 enriquecimento microbiano proveniente da cepa isolada.

Figura 10: Enriquecimento microbiano proveniente da cepa isolada



Fonte: Autora (2024)

#### 4.7 MONTAGEM DE REATORES BIOLÓGICO AERÓBIO

A biomassa enriquecida, presente nos 14 frascos de vidro de 100 mL, foi completamente transferida para um béquer de vidro de 500 mL para garantir a uniformidade da biomassa. Essa medida é necessária devido à possibilidade de crescimento desigual das bactérias em diferentes frascos, o que resultaria em variações na quantidade de biomassa. Posteriormente, 50 mL dessa biomassa foram transferidos para 7 tubos falcon de 50 mL, onde foram concentrados por meio de centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente, repetindo o processo por três vezes. O pellet resultante foi então lavado com solução salina de NaCl (0,9%) para remover o fenantreno utilizado no método de enriquecimento.

Para os testes de degradação do fenantreno, foram preparados 3 Erlenmeyers de 1L como reatores aeróbio biológico. Cada Erlenmeyer continha 396 mL de meio de cultura adaptado conforme descrito por ZoBell e Johnson (1948) com pH 7, sem a adição de ágar, extrato de levedura ou peptona, conforme especificado na Tabela 4. Aos Erlenmeyers foram adicionados 45 mL do inóculo enriquecido, previamente concentrado e lavado com solução salina de NaCl (0,9%) para remoção do fenantreno utilizado no método de enriquecimento. Além disso, foi adicionado 100 mg/L de fenantreno, proveniente de uma solução estoque de 5000 mg/L, resultando em um volume final de 450 mL do meio reacional por fim foram vedados com algodão hidrofóbico e deixados em uma incubadora shaker de bancada com agitação orbital (Nova Instrument) a 160 rpm na temperatura em 30°C. A incubação ocorreu sem interrupções.

Tabela 4: Concentrações do meio líquido 2216 adaptado para utilização na montagem dos reatores.

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Citrato de ferro	0,1
Cloreto de sódio	19,45
Cloreto de magnésio	8,8
Sulfato de sódio	3,24
Cloreto de cálcio	1,8
Cloreto de potássio	0,55
Bicarbonato de sódio	0,16
Brometo de potássio	0,08
Cloreto de estrôncio	0,034
Ácido bórico	0,022
Silicato de sódio	0,004
Fluoreto de sódio	0,0024
Nitrato de amônio	0,0016
Fosfato de sódio monobásico	0,008
Fenantreno	100 mg/L
Água destilada	1000 mL

Fonte: ZoBell e Johnson (1948)

Durante o experimento, foram retiradas alíquotas de 10 mL e 5 mL em intervalos regulares de tempo: 0, 3, 7, 14, 20, 25 e 30 dias. Essas alíquotas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta automática de 5 mL, dentro de uma capela de exaustão utilizando-se o bico de bunsen para evitar contaminação, e armazenadas em tubos de ensaio de vidro de 10 mL. As amostras de 10mL foram mantidas a -20°C na geladeira para análises subsequentes de degradação do fenantreno.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO

Para determinar o crescimento bacteriano na presença de fenantreno foi utilizada a alíquota de 5 mL. A alíquota foi transferida para um tubo falcon de 50 mL e diluída na proporção de 1:4 com água destilada. A mistura foi agitada por 2 minutos em um agitador vortex para homogeneização. O crescimento bacteriano foi medido utilizando um espectrofotômetro da marca Manufactureal Merck KGaA, D-64293 Darmstadt Germany – Spectroquant Prove 300. Para a leitura, foi utilizada uma cubeta de quartzo de 10 mm da marca Kasvi, com um volume de 3,5 mL, a um comprimento de onda de 660 nm. Os 4 mL restantes da amostra foram armazenados a -20°C na geladeira, para o caso de necessidade de amostras adicionais.

#### 4.9 MONITORAMENTO DA DEGRADAÇÃO DO FENANTRENO

As análises cromatográficas para o monitoramento da degradação do fenantreno foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da Shimadzu, modelo LC20AT, configurado com sistema de bombas quaternárias, degaseificador da fase móvel, sistema de injeção automática de amostras, compartimento termostaticado para a coluna analítica, detector de arranjo de diodos (DAD) e detector de índice de refração (RID). Foi empregada uma coluna C18 (LiChrospher® 100 RP-18 endcapped, 5 µm, LiChroCART® 250-4) para separação dos componentes. A fase móvel é composta por acetonitrila (20%) e água (80%), sendo injetado um volume de 20 µL da amostra, a temperatura foi de 30°C.

#### 4.10 PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO FENANTRENO

Devido à complexidade do processo de extração do fenantreno, foi necessária uma adaptação da metodologia para sua quantificação, seguindo a abordagem descrita por Samanta et al. (1999). Esta adaptação envolveu a técnica de extração líquido-líquido, na qual foram eliminadas duas etapas do método original. A primeira etapa dispensada foi o ajuste do pH para cerca de 2 com HCl 2-N, uma vez que essa etapa não se mostrou relevante para a extração eficiente do fenantreno. A segunda etapa eliminada foi a adição de cloreto de sódio para absorver a água presente no meio líquido. Foi observado que a presença de água no meio não interferiu no processo de extração do fenantreno, uma vez que este é insolúvel em água. Dessa forma, a adição de cloreto de sódio mostrou-se desnecessária. A separação da fase líquida

(orgânica) e aquosa pôde ser facilmente visualizada a olho nu, pois o fenantreno se concentra na fase orgânica, enquanto a fase aquosa contém apenas água utilizada na preparação do meio marinho ATCC 2216.

Das alíquotas de 10 mL retiradas periodicamente para avaliação da degradação do fenantreno, 1 mL de cada uma foi reservado para a realização da extração líquido-líquido, conforme método adaptado de Samanta et al. (1999). Inicialmente, a amostra de 10 mL retirada dos reatores ao longo do experimento, com duração de 30 dias, foi submetida à centrifugação para homogeneizar a amostra. Em seguida, utilizando uma pipeta automática de 5 mL, foi retirado 1 mL da amostra e os 9 mL restantes voltaram para a geladeira -20°C para caso precise utilizar futuramente e após isso o 1 mL retirado como citado anteriormente foi transferido para um tubo de ensaio de vidro de 10 mL. Neste tubo de ensaio de vidro de 10 mL, foram adicionados hexano e acetona na proporção de 4:1, pois o fenantreno é insolúvel em água e requer um solvente adequado para a solubilização. Este procedimento foi realizado em triplicata. As amostras foram então agitadas em um vórtex por 2 minutos e centrifugadas a 5000 rpm por 4 minutos a uma temperatura ambiente.

Utilizando uma pipeta de Pasteur de vidro, 1 mL da fase orgânica contendo fenantreno, hexano e acetona na proporção de 4:1, foi transferido para outro tubo de ensaio de vidro de 10 mL. Este procedimento foi repetido três vezes para cada triplicata, garantindo a máxima recuperação do fenantreno para a posterior determinação.

Por fim, os tubos de ensaio contendo a fase orgânica foram identificados e deixados abertos em um estande de polipropileno na capela de exaustão por 96 horas em temperatura ambiente para permitir a evaporação do hexano e acetona, que são solventes voláteis, ao longo de um período de 4 dias. Após esse período, 2 mL de metanol foram adicionados aos tubos de ensaio de vidro com auxílio de uma pipeta automática de 5 mL para ressuspender o fenantreno adsorvido nas paredes dos tubos de ensaio de vidro. A solução resultante foi então submetida à agitação em vórtex por mais 2 minutos e filtrada utilizando um filtro de celulose regenerada com porosidade de 0,22 µm, da marca analítica. A amostra filtrada foi transferida para vials de vidro de 1,5 mL da marca Duran Wheaton Kimble e identificado para posteriormente ser injetada no CLAE (Shimadzu, modelo LC20AT) para análise quantitativa do fenantreno.

#### 4.11 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO 16S

As células obtidas através de cultura em meio líquido marinho ATCC 2216, adaptado conforme protocolo descrito por ZoBell e Johnson (1948) e suplementado com 500µl de

fenantreno amostras que foram obtidas da etapa de enriquecimento bacteriano, foram submetidas à análise de sequenciamento 16S. Para isso, dois quadrantes de 5cm x 5cm contendo a cepa isolada, previamente cultivada em placa de petri, foram transferidos para 14 frascos de vidro com volume de 100mL. Cada frasco continha 25 mL do meio líquido mencionado e foi vedado com algodão hidrofóbico. Os frascos foram mantidos sob agitação horizontal em um agitador da marca Gehaka modelo A0-370, por um período de 7 dias, a uma velocidade de 180 rpm e temperatura constante de 37°C, sem exposição à luz, com o propósito de estimular o crescimento das células bacterianas.

Para a extração do DNA, realizou-se uma concentração das células presentes na etapa de enriquecimento. Para este fim, 50 mL da amostra foram centrifugados em um tubo Falcon de 50mL a 10.000 x g por 25 minutos utilizando uma centrífuga da marca Hermle modelo Z 206 A. Após este processo, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em 250 µL de água deionizada para posterior utilização na extração do DNA.

A extração do DNA total foi conduzida em amostras do pellet concentrado utilizando o kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Posteriormente, a amostra foi quantificada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) que permitiu estimar a concentração do DNA extraído e determinar as razões de absorbância 260.280-1 e 260.230-1.

A razão de aproximadamente 1.8 da razão 260.280-1 foi considerada indicativa de pureza para a amostra de DNA, cuja concentração foi medida em 321.1 ng/µl, com um volume final de 50 µl. O DNA extraído foi então armazenado a -80°C em um tubo eppendorf de plástico de 1,5mL dentro de uma caixa de isopor contendo 1kg de gelo seco e posteriormente a amostra foi enviada para sequenciamento genômico de DNA na empresa NGS Soluções Genômicas, Piracicaba/São Paulo, Brasil), utilizando a plataforma MiSeq Illumina usando metabarcoding aplicado a região hipervariável V3 e V4 do gene 16S rRNA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, serão apresentados os resultados e discussão desta pesquisa. Os resultados estão segmentados da seguinte forma: amostra isolada do lodo da lagoa 1 da Estação de Tratamento de Efluentes, isolamento e caracterização morfológica da cepa isolada, reatores biológicos aeróbios, sequenciamento genômico 16S da cepa isolada, biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, descrição da rota metabólica para degradação bacteriana aeróbia do fenantreno e potencial de Estação de Tratamento de Efluentes como fonte de bactérias degradadoras de compostos oriundos do petróleo.

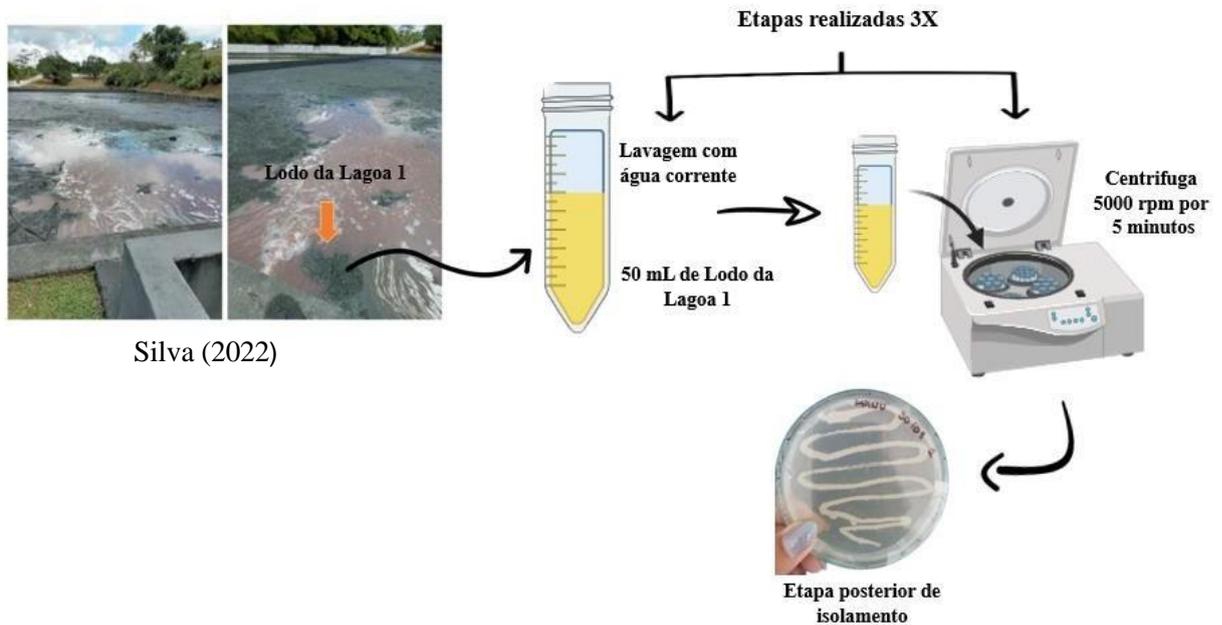
### 5.1 AMOSTRA ISOLADA DO LODO DA LAGOA 1

A Estação de Tratamento de Efluentes Multifábrica está situada em uma localização estratégica, permitindo a recepção de efluentes provenientes de 15 diferentes indústrias, bem como do efluente doméstico originado dos escritórios associados a essas indústrias. Entre essas indústrias, destacam-se aquelas envolvidas na fabricação de tintas, policloreto de vinila (PVC), papel, iogurtes, ferragens, lavanderias e metalurgia.

A lagoa 1 da ETE é notavelmente caracterizada por apresentar uma camada espessa de matéria orgânica e resíduos compostos por óleos e graxas cobrindo praticamente toda a sua superfície. Essa condição resulta em tamponamento parcial e na formação de zonas mortas, prejudicando a troca de calor e gases entre a zona limnética e o ambiente externo.

Devido às características singulares observadas na lagoa 1, esta foi selecionada como o foco principal de investigação neste estudo. Inicialmente, o lodo contido em um tubo Falcon de 50 mL foi submetido a elutriação com água corrente, visando a remoção de impurezas presentes. Posteriormente, foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos. Essas etapas foram repetidas três vezes para garantir a eficiência do processo. Em seguida, procedeu-se ao isolamento de uma cepa bacteriana a partir do lodo coletado na lagoa 1, conforme esquematizado na Figura 12 superfície da lagoa 1 apresentando espessa camada de matéria orgânica, com o objetivo de isolar uma bactéria capaz de degradar o fenantreno.

Figura 11: Superfície da lagoa 1 apresentando espessa camada de matéria orgânica



Referência: Autora (2024)

## 5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA CEPA ISOLADA

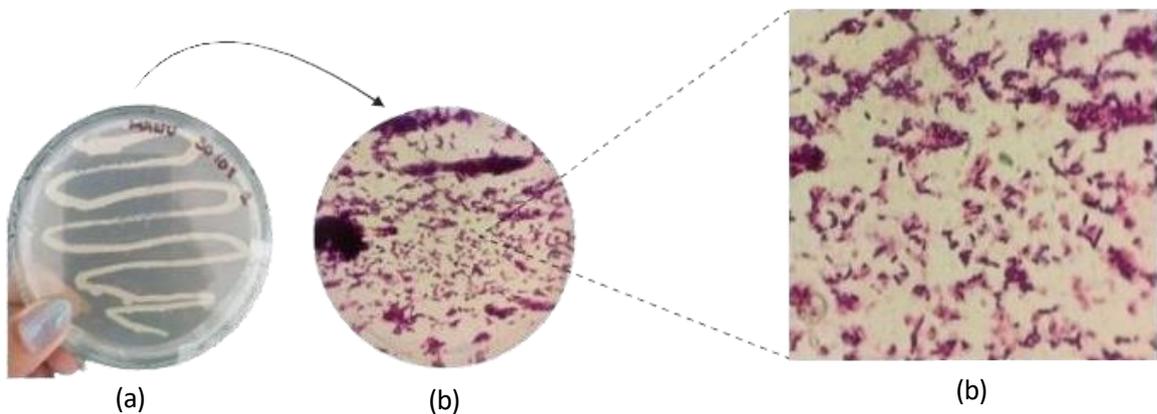
A cepa bacteriana isolada da lagoa 1 foi submetida à caracterização da colônia (análise macroscópica) e morfologia celular (análise microscópica) por meio da técnica de coloração de Gram, utilizando o Kit Conjunto Coloração de Gram - 4 X 500 mL – Renylab. A Figura 13 apresenta a cepa isolada – análise macroscópica (a) e morfologia celular- análise microscópica (b), que foi identificada como Gram-positiva e em forma de bacilo.

As bactérias Gram-positivas são aquelas que retêm o corante cristal violeta durante a coloração de Gram, resultando em uma coloração roxa ao microscópio óptico. Essa propriedade decorre da espessura da parede celular, predominantemente composta por peptidoglicano, formando uma camada densa em torno da membrana citoplasmática (LIBENSON; MCILROY, 1955).

Após a coloração de Gram, essas bactérias são geralmente observadas como cocos (células esféricas) ou bacilos (células em forma de bastonete), como é o caso da bactéria isolada neste estudo sob o microscópio. Exemplos comuns de bactérias Gram-positivas incluem os gêneros *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Clostridium sp* e *Bacillus sp* (MANAFI; KNEIFEL, 1990).

Adicionalmente, observou-se a ausência de crescimento de outras bactérias com morfologia distinta na placa de petri. Não foram registradas alterações de cor além do branco, característico da coloração da bactéria crescida na placa. Esses achados corroboram com o isolamento de uma única cepa bacteriana.

Figura 12: Cepa isolada - análise macroscópica (a) e Morfologia celular - análise microscópica (b)



Fonte: Autora (2024)

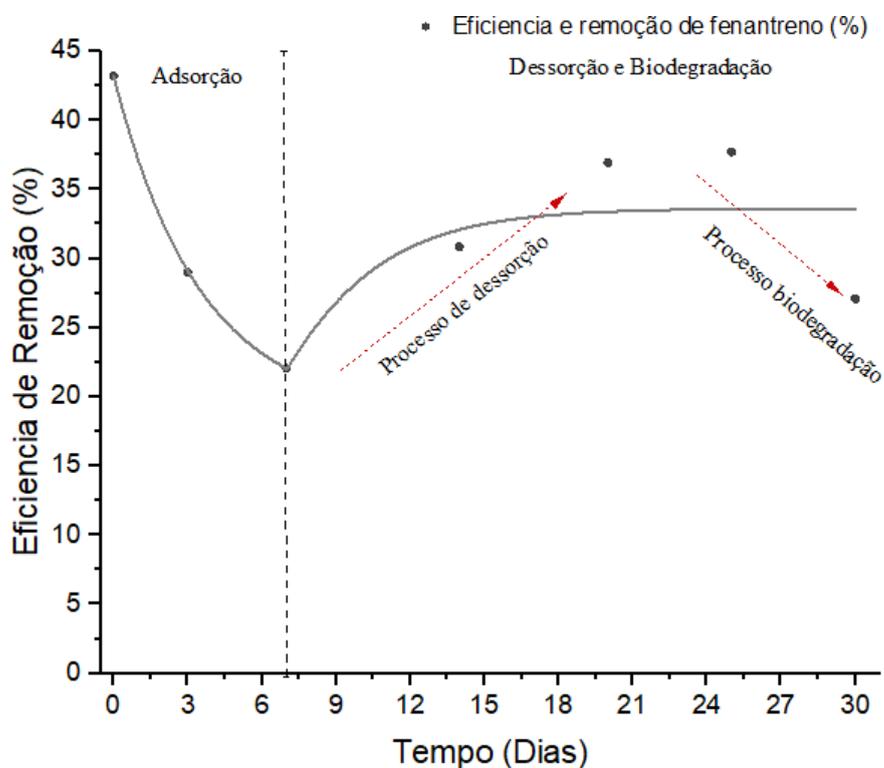
### 5.3 REATORES BIOLÓGICOS AERÓBIOS

O tempo total de cada análise no Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é de 8,5 minutos, empregando uma fase móvel composta por acetonitrila (20%) e água (80%). O pico correspondente ao fenantreno é detectado em aproximadamente 7,5 minutos de retenção. As concentrações de fenantreno foram determinadas utilizando um comprimento de onda de 24nm, o qual demonstrou uma resposta nítida.

Apesar da concentração teórica adicionado aos reatores ser de 100 mg/L de fenantreno, a concentração inicial mensurada em CLAE foi de  $43,2 \pm 4,5$  mg/L, havendo assim uma perda de 56,8 mg/L ao longo da preparação da amostra. Logo no início do experimento, aproximadamente no 7º dia, verificou-se que 49,4% do fenantreno foi adsorvido no sistema, tornando-se indisponível para a degradação bacteriana. Esse fenômeno pode ser atribuído às etapas prolongadas necessárias para a extração do fenantreno, que requeriam uma espera de 4

dias para a evaporação do solvente, deixando apenas o fenantreno a ser suspenso na sequência. Esse procedimento prolongado provavelmente favoreceu a perda do fenantreno, corroborando sua aderência ao tubo de ensaio de vidro. Posteriormente a esse período notou-se o processo de dessorção do fenantreno alcançando a concentração de 36,88 mg/L no final do experimento a eficiência de remoção encontrada foi de 26,7% nos 30 dias. Como pode ser observado na Figura 14 apresenta o perfil de eficiência de remoção do fenantreno.

Figura 13: Perfil de eficiência de remoção do fenantreno



Fonte: Autora (2024)

A análise dos resultados obtidos a partir da observação da bactéria isolada revelou que, a partir do sétimo dia, iniciou-se o processo de dessorção. Esse evento foi acompanhado por uma estabilização na concentração bacteriana ao longo de um período de 30 dias, durante o qual ocorreu o processo de biodegradação. Notavelmente, a bactéria isolada demonstrou uma capacidade de degradação de 26,7% do contaminante em questão, o fenantreno, ao longo desses 30 dias.

A observação de uma perda de 56,8 mg/L de fenantreno disponível no meio, representando uma perda significativa pode ter sido atribuída por conta da adsorção do composto ao vidro, onde o fenantreno, assim com outros HPAs, é propenso a interagir com

superfícies sólidas como o vidro, que foi utilizado ao longo do experimento e principalmente durante o período de incubação.

Esse fenômeno reduz a biodisponibilidade do composto e torna o processo de biodegradação mais lento. Diversos estudos documentaram perdas de massa devido à forte afinidade dos HPAs com superfícies de vidro durante o estabelecimento do equilíbrio (CARMO et al., 2000; ACKERMAN; HURTUBISE, 2000; POERSCHMANN et al., 2000). colocar nas referências.

A metodologia experimental também fez o uso de um agitador horizontal (shaker) e de um meio líquido rico em sais e íons onde, segundo Quian, Posch e Schmidt (2011), são dois dos fatores que mais contribuem para as perdas no ambiente laboratorial, já que o sistema foi constantemente agitado no período de 30 dias de incubação, aumentando significativamente a área de contato do meio líquido com o vidro, onde ocorre a transferência. Já a presença de sais do meio marinho utilizado aumenta a polaridade da solução, diminuindo ainda mais a solubilidade do fenantreno na solução que já é baixa, favorecendo assim a adsorção em vidro e diminuição na concentração.

O composto alvo também possui afinidade com materiais orgânicos, sofrendo adsorção no meio onde está presente, diminuindo assim sua biodisponibilidade para sofrer degradação por meio das bactérias (WEISSENFELS; KLEWER; LANGHOFF, 1992). Por ser um composto hidrofóbico, sua capacidade de adsorção está diretamente ligada à matéria orgânica do meio e à presença de sedimentos, onde ele possui grande afinidade com partículas sólidas (EL-NAHHAL; SAFI et al., 2004).

O fenantreno também é adsorvido no solo ou no substrato que está em contato com o meio onde ele se encontra. Solos ricos em matéria orgânica possuem maior capacidade de retenção da substância, onde solos argilosos possuem este comportamento, caracterizando assim uma adsorção física (ZHAO et al., 2022). A sorção de HPAs como o fenantreno no solo é um processo chave para determinar o transporte e propagação destas substâncias no meio e os impactos que podem causar, já que, por conta da sua baixa volatilidade, resultado do alto ponto de ebulição característicos de HPAs, o transporte atmosférico é mínimo (SOARES et al., 2013).

Os sedimentos possuem ótimas características que favorecem a captura de HPAs como a grande área de contato e a presença de material orgânico (YANG; ZHENG, 2010). Ele entra na lista de compostos com fácil adsorção por meio de *biochar*, um material rico em carbono derivado da pirólise da biomassa, sendo facilmente capturado do meio, onde a posterior dessorção é uma fase crítica para o sucesso da biodegradação intracelular (TAO et al., 2024).

O fenantreno é uma substância de grande interesse devido à sua difícil biodegradação, alto grau de toxicidade e potencial acumulativo, diminuindo a acessibilidade ao composto no meio. É, portanto, considerado recalcitrante, sendo fortemente adsorvido pelo solo e por sedimentos, tornando a dessorção difícil para posterior ação dos agentes que degradam o composto (POSADA-BAQUERO; ORTEGA-CALVO, 2011).

#### 5.4 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO 16S DA CEPA ISOLADA

O sequenciamento das regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene 16S rRNA foi conduzido para a identificação da cepa isolada, classificada no gênero *Bacillus sp.* As leituras resultantes do sequenciamento foram processadas e o genoma foi montado usando Shovill 1.1.0, um pipeline especializado em montagem de genomas de procariotos. Este processo permitiu a identificação precisa da espécie *Bacillus cereus*.

*Bacillus cereus* ocupa uma ampla gama de habitats, que vai do ambiente terrestre ao aquático sendo um gênero capaz de viver em ambientes inóspitos, provavelmente devido à diversidade metabólica que lhes confere uma adaptação ecológica a diferentes ambientes e uma forte capacidade de sobrevivência dos esporos que lhes permite resistir melhor às condições hostis e dispersar-se melhor (LALLOO et al., 2007). A sua estrutura populacional e diversidade filogenética em ambientes de água doce e terrestres têm sido extensivamente investigadas nos últimos anos comprovando a sua capacidade de biorremediação de petróleo (resíduos hidrocarbonetos) (HAMAMURA et al., 2006; HARITASH; KAUSHIK, 2009).

Bactérias do gênero *Bacillus sp.*, em particular, têm sido consistentemente identificadas em ambientes aquáticos contaminados por hidrocarbonetos e são reconhecidas por suas notáveis propriedades biorremediadoras (GHOSAL et al., 2016; HAMAMURA et al., 2006).

#### 5.5 BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os resultados do experimento revelaram que a bactéria isolada facultativa dessa lagoa foi capaz de remover uma quantidade considerável do fenantreno em 30 dias. O fenantreno, um hidrocarboneto presente no óleo bruto, é conhecido por sua toxicidade para a fauna e sua persistência na flora. Este achado está em concordância com estudos anteriores na literatura, que demonstram o potencial de várias bactérias para remoção de uma ampla gama de hidrocarbonetos, incluindo o fenantreno.

Doddamani; Ninnekar (2000) relataram a capacidade de *Bacillus sp* de degradar fenantreno em meio salino mineral, alcançando uma taxa de degradação de 75% em 48 horas. Por sua vez, Purnomo, Rizqi e Rafi (2020) observaram *Bacillus subtilis* degradando 47,91% de hexadecano, um hidrocarboneto linear de cadeia longa, em um período de 14 dias, em meio marinho ASTM D1141-98. Surendra, Mahalingam e Velan (2017) investigaram *Bacillus pumilus* MVSV3 em meio mineral de sal (MMS), e relataram uma degradação de 59,36% de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos). Oyetibo et al. (2017) estudaram *Bacillus subtilis* em meio mineral salino (MMS), alcançando uma taxa de degradação de 85% de fenantreno em 28 dias. Kong et al. (2022) investigaram *Bacillus sp.* como degradadora de benzo(a)antraceno, pireno e benzo(a)pireno em um meio salino. Os resultados mostraram taxas de degradação de 20,6%, 12,83% e 17,49%, respectivamente. Em um estudo realizado por Swaathy et al. (2014), *Bacillus licheniformis* (MTCC 5514) demonstrou uma taxa de degradação superior a 95% de antraceno em um meio marinho após 22 dias de incubação. Por fim, Zhang et al. (2022) investigaram *Bacillus* M1 em meio salino mineral (MSM), relatando taxas de degradação de benzo(a)pireno e pireno de 50% e 65%, respectivamente, em 5 dias.

Foi comprovado que *Bacillus sp* possui capacidade de biorremediação para diferentes tipos de resíduos, como petróleo e seus derivados como hidrocarbonetos aromáticos onde possa vir a ser encontrado em águas residuais de aquicultura, águas residuais industriais e estações de tratamento de efluentes (BORAH; YADAV, 2017; LALLOO et al., 2007 ; LIN et al., 2007; OGBONNA; NROR; EZINWO, 2019; YANG et al., 2017). Segundo Nemutanzhela et al., (2014); Ramlucken et al., (2020); Roets-Dlamini et al., (2022) as principais vantagens do uso de *Bacillus sp* é a sua capacidade inerente de produzir esporos, o que aumenta a taxa de sobrevivência dos micro-organismos em condições adversas.

Além disso, *Bacillus sp* apresenta vantagem sobre outros tipos de micro-organismos, como os fungos, pois apresentam rápida taxa de crescimento, ampla distribuição, facilidade de cultivo e toleram uma ampla gama de condições fisiológicas que lhes permitem desempenhar suas funções de biorremediação (DANILOVA; SHARIPOVA, 2020; HLORDZI et al., 2020; NEMUTANZHELA et al., 2014; ROETS-DLAMINI et al., 2022). Até o momento, outros autores demonstraram a utilização de outros micro-organismos que possuem boa capacidade de biodegradação, porém, *Bacillus sp* demonstrou sua versatilidade na decomposição de uma vasta gama de compostos sendo um gênero comumente encontrado em sedimentos e áreas contaminadas por petróleo, proporcionando importantes dados para futuros desenvolvimentos e aplicações da biorremediação e de recuperação ambiental.

A utilização da degradação bacteriana aeróbia de hidrocarbonetos tem se mostrado uma abordagem tecnicamente viável na biorremediação de locais impactados por esses compostos, entretanto, é importante considerar que as bactérias anaeróbias podem biodegradar os HPAs em condições anóxicas onde geralmente apresentam uma taxa de degradação mais lenta e menor eficiência quando comparados aos processos aeróbios (HUNKELER et al., 1995). Por essa razão, essa técnica é mais adequada para locais com acesso limitado ao ar ou onde a aeração não pode ser facilmente implementada (REINHARD et al., 1996). Os processos de degradação anaeróbia podem ocorrer *in situ* ou *ex situ* (SINGH et al., 2017).

Compreendendo que as bactérias aeróbias demonstram uma capacidade degradativa mais eficiente em períodos reduzidos em comparação com as bactérias anaeróbias, que, embora possam alcançar níveis similares de degradação, demandam um tempo substancialmente maior para tal feito.

#### 5.6 DESCRIÇÃO DA ROTA METABÓLICA PARA A DEGRADAÇÃO BACTERIANA AERÓBIA DO FENANTRENO

A bactéria isolada neste estudo foi identificada como *Bacillus cereus* e conforme a revisão da literatura demonstrou esse gênero *Bacillus sp* sendo capaz de degradar o fenantreno por meio de duas vias metabólicas distintas, uma da qual é dependente de oxigênio (aeróbia) e a outra independente de oxigênio (anaeróbia). A degradação aeróbia que é a dependente de oxigênio, é predominantemente mediada por enzimas oxigenases, na qual, inicialmente, ocorre a hidroxilação, geralmente catalisada pela enzima dioxigenase multicomponente (ou anel-hidroxilação dioxigenase-RHD), resultando na formação de cis-dihidrodiol (ALBAIGÉS, 1983; CERNIGLIA, 1993; SAITO et al., 1999; JUHASZ; NAIDU, 2000; BONGIORNI; PUSCEDDU; DANOVARO, 2005; GHOSAL et al., 2016). Em seguida, a enzima cis-di-hidrodiol desidrogenase rearomatiza o anel aromático, gerando intermediários dihidroxilados, que são oxidados para formar catecol, o principal intermediário da degradação de hidrocarbonetos aromáticos aeróbicos (SHAHSAVARI et al., 2019).

A degradação do fenantreno se inicia com a captura de oxigênio por meio da enzima fenantreno dioxigenase, transformando o composto em cis -3,4- dihidroxi -3,4- dihidrofenantreno que, por meio da ação de uma desidrogenase, é transformado em 3,4 – dihidroxifenantreno. O composto é então transformado em ácido-1-hidroxi-2-naftoico por uma desidrogenase, seguindo posteriormente a rota e sendo transformado em outros compostos na sequência como o 1,2-dihidronaftaleno, ácido salicílico e finalmente catecol. A etapa subsequente depende da posição do grupo hidroxila (OH) nos intermediários dihidroxilados. Se

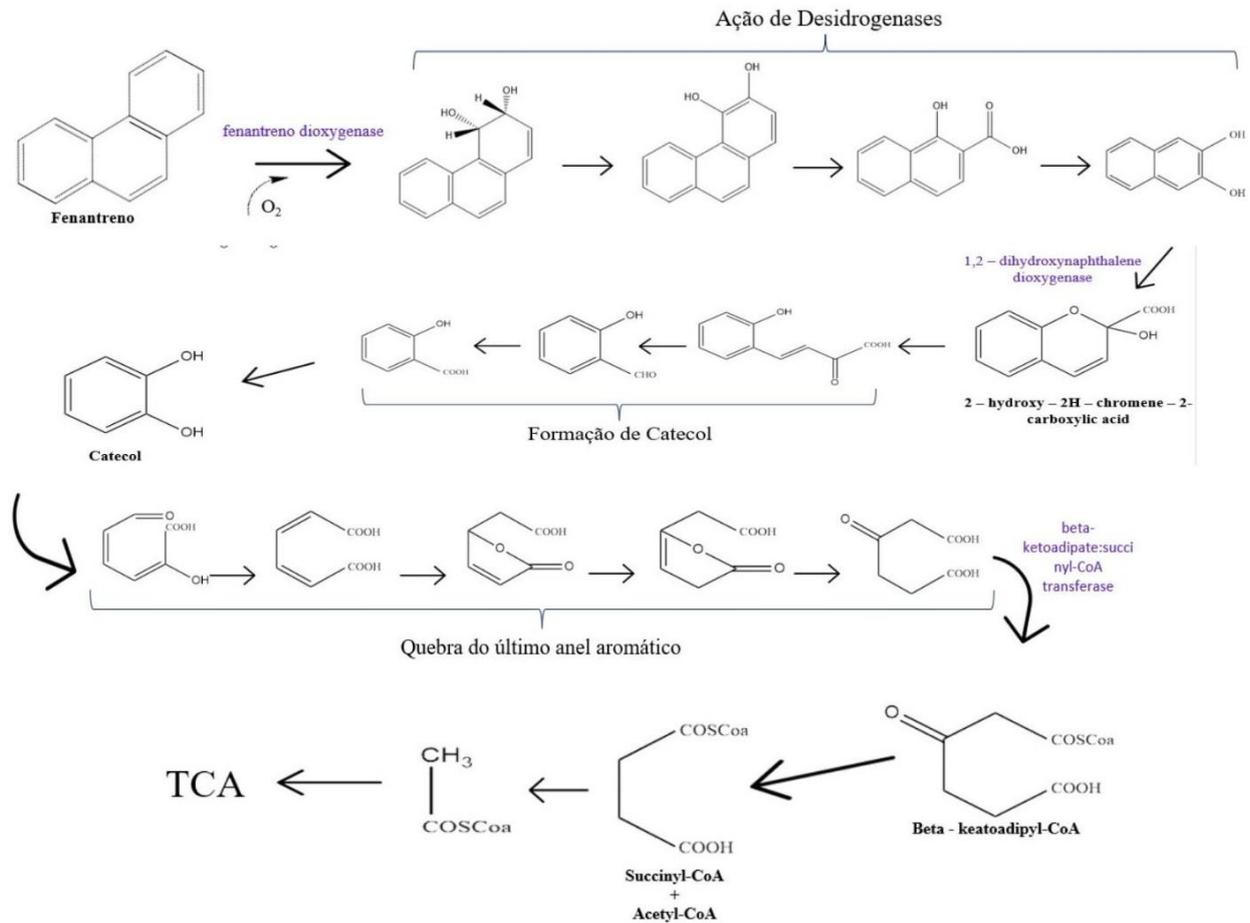
o grupo OH estiver na posição *-orto*, a dioxigenase de clivagem intradiol atuará entre os dois grupos OH, resultando na produção de ácido cis-mucônico (JUHASZ; NAIDU, 2000).

Se o intermediário estiver na posição *-meta*, a clivagem ocorre pela dioxigenase de clivagem extradiol, formando semialdeído 2-hidroxi-mucônico (CERNIGLIA, 1993; SHAHSAVARI et al., 2015; GHOSAL et al., 2016). A principal diferença entre os intermediários está na posição entre os radicais que, na posição *orto*, estão mais próximos, tornando o componente mais instável. Ao contrário da posição *meta*, onde os radicais, estando mais distantes, sofrem menos repulsão elétrica, tornando a estrutura mais estável. Esse processo ocorre sucessivamente nos anéis aromáticos, transformando cada anel de maneira semelhante (ATLAS, 1998).

É possível observar na Figura 15 que apresenta a via metabólica da degradação de fenantreno aeróbia que, após a produção do semialdeído-2-hidroxi-mucônico, a enzima catecol 1,2 dioxigenase age formando o ácido cis,cis-mucônico. A enzima cis,cis-muconato lactonase gera a muconolactona que, com a ação da muconolactona isomerase que desloca a ligação dupla para próximo do átomo de oxigênio, possibilitando a ação posterior da beta-cetoadipato-enol-lactona hidrolase, produzindo ácido beta-cetoadípico. Finalmente, uma enzima do tipo transferase transformou o subproduto em beta-ceatoadipil-CoA que é quebrado em um aglomerado formado por Succinil-CoA e acetil-CoA por meio da beta-ceatoadipil-CoA tiolase.

Finalmente, a transformação de todos os anéis da molécula de HPA resulta na produção de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, que podem ser incorporados no metabolismo central bacteriano para posterior síntese de constituintes celulares e obtenção de energia (HABE; OMORI, 2003). O acetil-Coa formado é metabolizado via ciclo de Krebs após longas transformações e etapas necessárias para transformar substâncias de difícil degradação em fontes de carbono úteis para o metabolismo microbiano, gerando dióxido de carbono e água ao final do ciclo.

Figura 14: Via metabólica da degradação de fenantreno aeróbia



Fonte: Autora (2024). Adaptado de Hidalgo et al. (2020)

Segundo Jacques et al., (2007) outras bactérias aeróbias além do gênero *Bacillus* tem maquinaria enzimática capaz de degradar fenantreno utilizando a mesma rota metabólica, bactérias essas que são: *Pseudomonas*, *Achromabcter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Sphingomonas* e *Novosphingobium*.

## 5.7 POTENCIAL DE ETES COMO FONTE DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE COMPOSTOS ORIUNDOS DO PETRÓLEO

Estações de Tratamento de Efluentes possuem potencial biotecnológico elevado, pois suas lagoas de tratamento abrigam uma diversidade de micro-organismos, que estão frequentemente em contato com compostos diversos, incluindo derivados do petróleo. Esses micro-organismos têm a capacidade de biossintetizar compostos que são descartados nesses

ambientes (MENEZES et al., 2019). Eles apresentam mecanismos adaptativos, como a produção de enzimas muitas vezes essenciais para sua sobrevivência. Isso confere a eles a habilidade de degradar compostos recalcitrantes, como os HPAs (TATTA et al., 2022).

Os efluentes de refinarias de petróleo são amplamente usados em trabalhos que avaliam o potencial de bactérias e outros micro-organismos como Archaea e fungos para degradar compostos de petróleo como benzeno, tolueno e aromáticos, por conta da persistência de tais compostos no ambiente (MAZZEO et al., 2010). Os estudos conduzidos em estações de tratamento de efluentes provenientes de indústrias petrolíferas têm revelado a presença de uma variedade de gêneros e espécies bacterianas com notável capacidade para degradar hidrocarbonetos. Este fenômeno é atribuído à exposição desses micro-organismos aos resíduos industriais, os quais passam a ser utilizados como fonte de carbono em seus processos metabólicos (SAMANTARAY; MOHAPATRA; MISHRA, 2014).

O uso de ETEs que recebem resíduos industriais em geral podem fornecer micro-organismos com capacidade de biorremediação de hidrocarbonetos, como observado nos resultados como o *Bacillus cereus* bactéria isolada do lodo da ETE que teve a capacidade de crescer em contato ao fenantreno um composto proveniente do petróleo bruto. A utilização de ETE como fonte de micro-organismos degradadores de compostos de petróleo é uma ferramenta importante para promover a biorremediação de forma eficiente e promissora, dada a escassez de relatos detalhados sobre seu uso na literatura.

Estes micro-organismos desenvolvem mecanismos que lhes permitem viver neste tipo de ambiente e ainda degradar os resíduos ali presentes (MENDES-SILVA et al., 2020). O uso destes compostos como fenantreno utilizado fonte de carbono reflete o papel importante destas comunidades microbianas, apresentando o seu potencial para biorremediação (OLIART – ROS; SÁNCHEZ-OTERO; MANRESA-PRESAS, 2016).

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a capacidade da cepa bacteriana *Bacillus cereus*, isolada do lodo de uma Estação de Tratamento de Efluentes Industriais, de crescer em reatores biológicos aeróbios contendo fenantreno, um composto derivado do petróleo. Esta cepa mostrou potencial significativo para biorremediar áreas impactadas por derramamentos de óleo bruto, sugerindo a aplicabilidade desta técnica não apenas para o composto estudado, mas também para outros compostos recalcitrantes encontrados em tais eventos.

Além disso, o estudo destacou o potencial das estações de tratamento de efluentes industriais como fontes ricas de micro-organismos para isolamento bacteriano e subsequente uso na biorremediação de áreas impactadas por compostos recalcitrantes, como os hidrocarbonetos aromáticos em geral. O fenantreno, em particular, por conta de ser composto recalcitrante e tóxico, cuja absorção pelo ambiente dificulta sua degradação microbiana.

A via metabólica aeróbia proposta para explicar as etapas do metabolismo do fenantreno visou demonstrar os possíveis caminhos de degradação, evidenciando que *Bacillus cereus*, apesar de ser oriunda de uma lagoa anaeróbia, é uma bactéria facultativa capaz de realizar a biodegradação em condições aeróbias, liberando produtos menos tóxicos para o meio ambiente.

Em retrospecto, o estudo ressalta o potencial do isolamento de uma bactéria capaz de remover e crescer em contato com o fenantreno, tendo o objetivo primário de recuperar ambientes marinhos e manguezais impactados por derramamentos de petróleo. Este potencial também se aplica a outras substâncias recalcitrantes que podem servir como fonte de carbono para as bactérias isoladas ou consórcios bacterianos, proporcionando uma solução mais ecologicamente amigável em comparação com os tratamentos físicos ou químicos tradicionais.

A relevância deste trabalho é sublinhada pela necessidade crescente de métodos sustentáveis e eficientes para a remediação de áreas contaminadas por derramamentos de petróleo. O uso de micro-organismos provenientes de estações de tratamento de efluentes industriais representa uma abordagem inovadora e promissora, contribuindo para a redução dos impactos ambientais associados a tais eventos e promovendo a recuperação ecológica de maneira mais eficiente e sustentável.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK, A. S.; EL-SHEIKH, H. H.; SULEIMAN, W. B.; TAHA, T. H.; MOHAMED, M. K. Bioelimination of phenanthrene using degrading bacteria isolated from petroleum soil: safe approach. *DESALINATION AND WATER TREATMENT*, v. 181, p. 131–140, 2020.
- ABDEL-SHAIFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 25, n. 1, p. 107–123, mar. 2016.
- ABID, A.; ZAAFOURI, K.; AYDI, A.; MANAI, I.; TRABESLI, A. B. H.; MESSAOUD, C.; HAMDI, M. Feasibility of a Bioremediation Process Using Bioestimulation with INorganic Nutrient NPK for Hydrocarbon Contaminated Soil in Tunisia. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, vol. 5, 2014.
- ACKERMAN, A. H.; HURTUBISE, R. J. The effects of adsorption of solutes on glassware and teflon in the calculation of partition coefficients for solid-phase microextraction with IPS paper. *Talanta*, v. 52, n. 5, p. 853–861, 16 ago. 2000.
- AECKERSBERG, F.; BAK, F.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology*, v. 156, n. 1, p. 5–14, jul. 1991.
- AFOLABI, R. O.; YUSUF, E. O. Nanotechnology and global energy demand: challenges and prospects for a paradigm shift in the oil and gas industry. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, v. 9, n. 2, p. 1423–1441, 24 ago. 2018.
- AGRAWAL, N.; SHAHI, S. K. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (pyrene) using novel fungal strain *Corioloropsis byrsina* strain APC5. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 122, p. 69–81, ago. 2017.
- AHMED, O. E.; EL NADY, M. M.; MAHMOUD, S. A. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons of organic richness in seawater from some coastal area around Alexandria city, Egypt. *Petroleum science and technology*, v. 36, n. 9-10, p. 682–687, 23 fev. 2018.
- AHN, Y.; LIU, F.; FENNELL, D. E.; HÄGGBLÖM, M. M. Biostimulation and bioaugmentation to enhance dechlorination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in contaminated sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 66, n. 2, p. 271–281, nov. 2008.
- AIHARA, J. Resonance energies of benzenoid hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, v. 99, n. 7, p. 2048–2053, mar. 1977.
- AIHARA, J. Why Aromatic Compounds Are Stable. *Scientific American*, v. 266, n. 3, p. 62–69, 1992.
- ALBAIGÉS, J. *Chemistry and Analysis of Hydrocarbons in the Environment*. [s.l.] CRC Press, 1983.
- ANDERSSON, J. T.; ACHTEN, C. Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycyclic Aromatic Compounds*, v. 35, n. 2-4, p. 330–354, 15 mar. 2015.

ARAÚJO, N. C. Análise da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade de efluentes da estação de tratamento de esgoto multifabril mediante sistema-teste *Allium cepa* L. Repositório UFPE, 2024.

ARORA, P. K.; SRIVASTAVA, A.; GARG, S. K.; SINGH, V. P. Recent advances in degradation of chloronitrophenols. *Bioresource Technology*, v. 250, p. 902–909, fev. 2018.

ASGHAR, H. N.; RAFIQUE, H. M.; ZAHIR, Z. A.; KHAN, M. Y.; AKHTAR, M. J.; NAVEED, M.; SALEEM, M. Petroleum Hydrocarbons-Contaminated Soils: Remediation Approaches. *Soil Science: Agricultural and Environmental Perspectives*, p. 105–129, 2016.

ATLAS, Ronald M. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Pearson Education India, 1998.

ATYA KAPLEY; THIERRY DE BAÈRE; PUROHIT, H. J. Eubacterial diversity of activated biomass from a common effluent treatment plant. *Research in Microbiology*, v. 158, n. 6, p. 494–500, 1 jul. 2007.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation: An Eco-friendly Sustainable Technology for Environmental Management. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*, p. 19–39, 30 jun. 2019.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 11, 16 set. 2016.

BALA, S.; GARG, D.; THIRUMALESH, B. V.; SHARMA, M.; SRIDHAR, K.; INBARAJ, B. S.; TRIPATHI, M. Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment. *Toxics*, v. 10, n. 8, p. 484, 19 ago. 2022.

BALESTEROS, M. R.; DE SÁ, L. R. V.; PEREIRA, P. M.; SILVA, M.; OLIVEIRA, M. A. L.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Monitoring of atrazine biodegradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310 through the simultaneous analysis of atrazine and its derivatives by HPLC. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 32, n. 1, p. 23–33, jan. 2014.

BANDURA, L.; WOSZUK, A.; KOŁODYŃSKA, D.; FRANUS, W. Application of Mineral Sorbents for Removal of Petroleum Substances: A Review. *Minerals*, v. 7, n. 3, p. 37, 8 mar. 2017.

BARBOSA, F.; ROCHA, B. A.; SOUZA, M. C. O.; BOCATO, M. Z.; AZEVEDO, L. F.; ADEYEMI, J. A.; SANTANA, A.; CAMPIGLIA, A. D. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Updated aspects of their determination, kinetics in the human body, and toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 26, n. 1, p. 28–65, 2 jan. 2023.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 9, p. 1049–1055, jun. 2005.

BENYAHIA, F.; ABDULKARIM, M.; ZEKRI, A.; CHAALAL, O.; HASANAIN, H. Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soils. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 83, n. 4, p. 364–370, jul. 2005.

BEYER, J.; TRANNUM, H. C.; BAKKE, T.; HODSON, P. V.; COLLIER, T. K. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. *Marine Pollution Bulletin*, v. 110, n. 1, p. 28–51, set. 2016.

BHATTACHARYA, S.; ANGAYARKANNI, J.; DAS, A.; PALANISWAMY, M. Mycoremediation of Benzo [a] pyrene by *Pleurotus ostreatus* isolated from Wayanad district in Kerala, India. *Int J Pharm Bio Sci*, v. 2, n. 2, p. 84-93, 2012.

BIROLLI, W. G.; BORGES, E. M.; NITSCHKE, M.; ROMÃO, L. P. C.; PORTO, A. L. M. Biodegradation Pathway of the Pyrethroid Pesticide Esfenvalerate by Bacteria from Different Biomes. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 227, n. 8, 16 jul. 2016.

BITTON, G. *Wastewater Microbiology*. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.

BONGIORNI, L.; PUSCEDDU, A.; DANOVARO, R. Enzymatic activities of epiphytic and benthic thraustochytrids involved in organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 41, p. 299–305, 2005.

BORAH, D.; YADAV, R. N. S. Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 26, n. 1, p. 181–188, mar. 2017.

BOTELLO, A. V.; SOTO, L. A.; PONCE-VÉLEZ, G.; VILLANUEVA, S. F. Baseline for PAHs and metals in NW Gulf of Mexico related to the Deepwater Horizon oil spill. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 156, p. 124-133, apr. 2015.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 2, p. 382–398, 1 abr. 2010.

BROCK, T. C.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003., 2003.

BROCKWAY, P. E.; OWEN, A.; BRAND-CORREA, L. I.; HARDT, L. Estimation of global final-stage energy-return-on-investment for fossil fuels with comparison to renewable energy sources. *Nature Energy*, v. 4, n. 7, p. 612–621, jul. 2019.

BRODERICK, Joan B. Catechol dioxygenases. *Essays in biochemistry*, v. 34, p. 11-11, 1999.

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.

BROWN, D. M.; OKORO, S.; VAN GILS, J.; VAN SPANNING, R.; BONTE, M.; HUTCHINGS, T.; LINDEN, O.; EGBUCHE, U.; BRUUN, K. B.; SMITH, J. W. N. Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils. *Science of The Total Environment*, v. 596-597, p. 284–292, out. 2017.

BROWN, J. J.; COCKROFT, S. L. Aromatic reactivity revealed: beyond resonance theory and frontier orbitals. *Chemical Science*, v. 4, n. 4, p. 1772, 2013.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of The Total Environment*, v. 407, n. 12, p. 3634–3640, jun. 2009.

CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 85, p. 207-228, 2009.

CARDOSO, M. G. Universidade federal de santa maria, centro de tecnologia programa de pós-graduação em engenharia de processos. Bioaugmentação em reatores anaeróbio e aeróbio e uso de reator nitrificante para redução da carga orgânica e nitrogenada. [s.l: s.n.], 2012.

CASAS, N.; PARELLA, T.; VICENT, T.; CAMINAL, G.; SARRÀ, M. Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere*, v. 75, n. 10, p. 1344–1349, jun. 2009.

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

CHEN, J.; CHEN, H.; SHI, J.; YAN, T.; GU, M.; HUANG, X. Factor diagnosis and governance strategies of ship oil spill accidents based on formal concept analysis. *Marine Pollution Bulletin*, v. 196, p. 115606, 1 nov. 2023.

CHEN, J.; XHANG, W.; LIA, S.; ZHANG, F.; ZHU, Y.; HUANG, X. Identifying critical factors of oil spill in the tanker shipping industry worldwide. *Journal of Cleaner Production*, v. 180, p. 1–10, abr. 2018.

CHEN, L.; YANG, J.; WU, L. Modeling the Dispersion of Dissolved Natural Gas Condensates From the Sanchi Incident. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, v. 124, n. 11, p. 8439–8454, nov. 2019.

CHEN, M.; XU, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 6, Part 1, p. 745–755, 1 nov. 2015.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W.; SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, v. 2, p. 1105, 1986.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, n. 6, p. 1403–1411, 2007.

COMBI, T.; PINTADO-HERRERA, M. G.; LARA-MARTÍN, P. A.; LOPES-ROCHA, M.; MISEROCCHI, S.; LANGONE, L.; GUERRA, R. Historical sedimentary deposition and flux of PAHs, PCBs and DDTs in sediment cores from the western Adriatic Sea. *Chemosphere*, v. 241, p. 125029, fev. 2020.

CORNELISSEN, G.; GUSTAFSSON, O.; BUCHELI, D, T.; JONKER, Q, T, M.; KOELMNS, A, A.; NOORT, M, C, P. Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environmental Science & Technology*, v. 39, n. 18, p. 6881–6895, 15 set. 2005.

CUI, J.; HUANG, L.; WANG, W.; XU, P.; ZANAROLI, G.; TANG, H. Maximization of the petroleum biodegradation using a synthetic bacterial consortium based on minimal value algorithm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 150, p. 104964, mai. 2020.

DA SILVA, M. R. F. Isolamento e identificação de bactérias com potencial de biodegradação de microplásticos oriundos das ações antrópicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas CB, UFPE. Qalificação de Doutorado, 2024.

DACCÒ, C.; GIROMETTA, C.; ASEMOLLOYE, M. D.; CARPANI, G.; PICCO, A. M.; TOSI, S. Key fungal degradation patterns, enzymes and their applications for the removal of aliphatic hydrocarbons in polluted soils: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 147, p. 104866, 1 fev. 2020.

DAI, C.; HAN, Y.; DUAN, Y.; LAI, X.; FU, R.; LIU, S.; LEONG, K. H.; TU, Y.; ZHOU, L. Review on the contamination and remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal soil and sediments. *Environmental Research*, v. 205, p. 112423, abr. 2022.

DANILOVA, L.; SHARIPOVA, M. The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, ago. 2020.

DAS, A.; SHIVAKUMAR, S.; BHATTACHARYA, S.; SHAKYA, S.; SWATHI, S. S. Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamaris* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. *3 Biotech*, v. 6, n. 2, 10 jun. 2016.

DASTGHEIB, S. M. M.; AMOOZEGAR, M. A.; KHAJEH, K.; VENTOSA, A. A halotolerant *Alcanivorax* sp. strain with potential application in saline soil remediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 1, p. 305–312, 14 dez. 2010.

DAT, N.; CHANG, M. B. Review of characteristics of PAHs in atmosphere, antropogenic sources and control technologies. *Science of The Total Environment*, vol. 609, p. 682-693, dec. 2017.

DE ALMEIDA, F. F.; FREITAS, D.; MOTTERAN, F.; FERNANDES, B. S.; GAVAZZA, S. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated mangroves: Understanding the historical and key parameter profiles. *Marine Pollution Bulletin*, v. 169, p. 112553, 1 ago. 2021.

DEJONGHE, W.; BOON, N.; SEGHERS, D.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environmental Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 649–657, out. 2001.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils. *Cold Regions Science and Technology*, v. 40, n. 1-2, p. 61–70, nov. 2004.

DEMHARTER, W.; HENSEL, R. *Bacillus thermocloaceae* sp. nov., a New Thermophilic Species from Sewage Sludge. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 11, n. 3, p. 272–276, maio 1989.

DEVOS, O.; COMBET, E.; TASSEL, P.; PATUREL, L. EXHAUST EMISSIONS OF PAHs OF PASSENGER CARS. *Polycyclic Aromatic Compounds*, v. 26, n. 1, p. 69–78, jan. 2006.

DHAKA, A.; CHATTOPADHYAY, P. A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills. *Journal of Environmental Management*, v. 288, p. 112428, jun. 2021.

DÍEZ-MÉNDEZ, A.; GARCÍA-FRAILE, P.; SOLANO, F.; RIVAS, R.; The ant *Lasius niger* is a new source of bacterial enzymes with biotechnological potential for bleaching dye. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 23 out. 2019.

DING, J.; CHEN, B.; ZHU, L. Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in aqueous solution. *Chinese Science Bulletin*, v. 58, n. 6, p. 613–621, 15 ago. 2012.

DODDAMANI, H. P.; NINNEKAR, H. Z. Biodegradation of Phenanthrene by a *Bacillus* Species. *Current Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 11–14, 29 jul. 2000.

DOMÍNGUEZ, A.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, n. 4, p. 405–409, jun. 2005.

DONALD, C. E.; SØRHUS, E.; PERRICHON, P.; NAKKEN, C. L.; GOKSØYR, A.; JØRGENSEN, K. B.; MAYER, P.; DA SILVA, D. A. M.; MEIER, S. Co-Exposure of Phenanthrene and the cyp-Inducer 3-Methylchrysene Leads to Altered Biotransformation and Increased Toxicity in Fish Egg and Larvae. *Environmental Science & Technology*, v. 57, n. 30, p. 11022–11031, 19 jul. 2023.

DONG, J.; ASIF, Z.; SHI, Y.; ZHU, Y.; CHEN, Z. Climate Change Impacts on Coastal and Offshore Petroleum Infrastructure and the Associated Oil Spill Risk: A Review. *Journal of Marine Science and Engineering*, v. 10, n. 7, p. 849, 22 jun. 2022.

DOU, L.; WEN, Z.; WANG, J.; WANG, Z.; HE, Z.; LIU, X.; ZHANG, N. Analysis of the world oil and gas exploration situation in 2021. *Petroleum Exploration and Development*, v. 49, n. 5, p. 1195–1209, out. 2022.

DURAN, R.; CRAVO-LAUREAU, C. Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 40, n. 6, p. 814–830, 12 ago. 2016.

EDUCAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA. Conheça melhor a metodologia que usa o gene 16S rRNA para estudos metagenômicos. Disponível em: < <https://edu.taugc.com/blog/metagenomica-gene-16s-rna/> >. Acesso em: 30 mai. 2024.

EDWARDS, S. J.; KJELLERUP, B. V. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 23, p. 9909–9921, 23 out. 2013.

EL-BESTAWY, E.; HUSSEIN, H.; BAGHDADI, H. H.; EL-SAKA, M. F. Comparison between biological and chemical treatment of wastewater containing nitrogen and phosphorus. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 32, n. 5, p. 195–203, maio 2005.

EL-NAAS, M. H.; ALHAIJA, M. A.; AL-ZUHAIR, S.; Evaluation of three-step process for the treatment of petroleum refinery wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 2, p. 56–62, mar. 2014.

EL-NAHHAL, Y.; SAFI, J. Adsorption of phenanthrene on organoclays from distilled and saline water. v. 269, n. 2, p. 265–273, 15 jan. 2004.

EVANS, W.; FERNLEY, H.; GRIFFITHS, E. OXIDATIVE METABOLISM OF PHENANTHRENE AND ANTHRACENE BY SOIL PSEUDOMONADS. THE RING-FISSION MECHANISM. *Biochemical Journal*, v. 95, n. 3, p. 819–831, 1 jun. 1965.

FERREIRA, B. M. P.; BONFIM, C. V.; RAPOSO, I. P. A.; QUINAMO, T. S.; CAMPOS, L. H. R. Socio-environmental disasters and their impacts: socioeconomic consequences of the oil spill in the northeast region of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 94, n. suppl 2, 2022.

FISCHER SCIENTIFIC INC., T. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3. 7 User's Manual. Thermo Fisher Scientific. [S.l: s.n.], 2008.

FORSYTH, J. V.; BLEAM, R.; NEIL, W. Biorremediation: A systematic, tiered approach. *Hazardous and Industrial Waste Proceedings, 27h Mid-Atlantic Conference*. p. 194-202, 1995.

GALAŻKA, A.; GALAŻKA, R. Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *Dactylis glomerata* as the bioremediation plant. *Polish Journal of Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 1, 2015.

GAO, W.; YIN, X.; MI, T.; ZHANG, Y.; LIN, F.; HAN, B.; ZHAO, X.; LUAN, X.; CUI, Z.; ZHENG, L. Microbial diversity and ecotoxicity of sediments 3 years after the Jiaozhou Bay oil spill. *AMB Express*, v. 8, n. 1, 9 maio 2018.

GARCÍA-SÁNCHEZ, M.; KOŠNÁŘ, Z.; MERCL, F.; ARANDA, E.; TLUSTOŠ, P. A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 147, p. 165–174, jan. 2018.

GENTRY, T.; RENSING, C.; PEPPER, I. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 5, p. 447–494, set. 2004.

GERMIDA, J. J.; FRICK, C. M.; FARRELL, R. E. Phytoremediation of oil-contaminated soils. *Developments in Soil Science Volume 28*, p. 169-186, Part 2, 2002.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 54, n. 1, p. 61–67, jul. 2004.

GHOSAL, D.; GHOSH, S.; DUTTA, T. K.; AHN, Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Frontiers in microbiology*, p. 1369, 2016.

GIL, M. A. L. POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON LEVELS AND MUTAGENICITY OF INHALABLE PARTICULATE MATTER IN SANTIAGO, CHILE. *Inhalation Toxicology*, v. 12, n. 12, p. 1173–1183, jan. 2000.

GIUNTA, M.; BOSCO, D. L.; LEONARDI, G.; SCOPELLITI, F. Estimation of gas and dust emissions in construction sites of a motorway project. *Sustainability*, v. 11, n. 24, p. 7218, 2019.

GKOREZIS, P.; VAN HAMME, J.; BOTTOS, E.; THUIS, S.; BALSEIRO-ROMERO, M.; MONTERROSO, C.; KIDD, P. S.; RINEAU, F.; WEYENS, N.; SILLEN, W.; VANGRONSVELD, J. Draft Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* Strain GB2, a

Hydrocarbon-Degrading and Plant Growth-Promoting Soil Bacterium. Genome Announcements, v. 4, n. 3, p. e00608-16, 23 jun. 2016.

GOSAI, H. B.; PANSERIYA, H. Z.; PATEL, P. G.; PATEL, A. C.; SHANKAR, A.; VARJANI, S.; DAVE, B. P. Exploring bacterial communities through metagenomics during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated sediments. *Science of The Total Environment*, v. 842, p. 156794, 10 out. 2022.

GOSWAMI, M.; CHAKRABORTY, P.; MUKHERJEE, K.; MITRA, G.; BHATTACHARYYA, P.; DEY, S.; TRIBEDI, P. Bioaugmentation and Bioestimulation: A potential strategy for environmental remediation. *Journal of Microbiology & Experimentation*, vol. 6, 2018.

GREENWOOD, P. F.; WIBROW, S.; GEORGE, S. J.; TIBBETT, M. Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. *Organic Geochemistry*, v. 40, n. 3, p. 293–300, 1 mar. 2009.

GU, M.; SUI, Q.; FAROOG, U.; ZHANG, X.; QIU, Z.; LYU, S. Degradation of phenanthrene in sulfate radical based oxidative environment by nZVI-PDA functionalized rGO catalyst. *Chemical Engineering Journal*, v. 354, p. 541–552, 15 dez. 2018.

GUPTA, G.; KUMAR, V.; PAL, A. K. Microbial Degradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Emphasis on Pyrene. *Polycyclic Aromatic Compounds*, v. 39, n. 2, p. 124–138, 7 mar. 2017.

GUTMAN, I.; STANKOVIĆ, S. Why is phenanthrene more stable than anthracene? *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, v. 26, n. 2, p. 111–114, 15 dez. 2007.

GUZZELLA, L.; POMA, G.; PAOLIS, A.; ROSCIOLI, C.; VIVIANO, G. “Organic persistent toxic substances in soils, waters and sediments along an altitudinal gradient at Mt. Sagarmatha, Himalayas, Nepal.” *Environmental Pollution* 159(10):2552–2564, 2011.

HABE, H.; OMORI, T. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 67, n. 2, p. 225–243, jan. 2003.

HAÇ-WYDRO, K.; POŁEĆ, K.; BRONIATOWSKI, M. The impact of selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on the morphology, stability and relaxation of ternary lipid monolayers imitating soil bacteria membrane. *Journal of Molecular Liquids*, v. 276, p. 409–416, 15 fev. 2019.

HAJISAMOH, A.; Pollution Levels of 16 Priority PAHs in the Major Rivers of Southern Thailand. *Research and Reviews: Journal of Chemistry*. fev. 2013.

HAMAMURA, N.; OLSON, S. H.; WARD, D. M.; INSKEEP, W. P. Dinâmica populacional microbiana associada à biodegradação do petróleo bruto em diversos solos. *Microbiologia aplicada e ambiental*, v. 72, n. 9, pág. 6316-6324, 2006.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 39, n. 8, p. 1926–1935, ago. 2007.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, v. 169, n. 1-3, p. 1-15, 2009.

HAZEN, T. C.; PRINCE, R. C.; MAHMOUDI, N. Marine Oil Biodegradation. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 5, p. 2121–2129, 11 fev. 2016.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; RÖLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 173–182, mar. 2006.

HERNANDEZ-VERGARA, M.; PEREZ-ROSTRO, C. Sustainable Aquaculture Techniques. [s.l.] BoD – Books on Demand, 2014.

HERRERO, M.; STUCKEY, D. C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, v. 140, p. 119–128, dez. 2015.

HIDALGO, K. J.; SIERRA-GARCIA, I. N.; DELLAGNEZZE, B. M.; OLIVEIRA, V. M. Metagenomic Insights Into the Mechanisms for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Oil Supply Chain. *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, 2020.

HLORDZI, V.; KUEBUTORNYE, F. K. A.; AFRIYIE, G.; ABARIKE, E. D.; LU, Y.; CHI, S.; ANOKYEWAA, M. A. The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, v. 18, p. 100503, 1 nov. 2020.

HONDA, M.; SUZUKI, N. Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Aquatic Animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 4, p. 1363, 20 fev. 2020.

HOSODA, Akifumi et al. Development of a PCR method for the detection and quantification of benzoyl-CoA reductase genes and its application to monitored natural attenuation. **Biodegradation**, v. 16, p. 591-601, 2005.

HOU, N.; ZHANG, N.; JIA, T.; SUN, Y.; DAI, Y.; WANG, Q.; LI, D.; LUO, Z.; LI, C. Biodegradation of phenanthrene by biodemulsifier-producing strain *Achromobacter* sp. LH-1 and the study on its metabolisms and fermentation kinetics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 163, p. 205-214, 2018.

HOWSAM, M.; JONES, K. C. Sources of PAHs in the Environment. *The Handbook of Environmental Chemistry*, p. 137–174, 1998.

HUANG, Y.; WANG, Y.; FENG, H.; WANG, J.; YANG, X.; WANG, Z. Genome-guided identification and characterization of bacteria for simultaneous degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and resistance to hexavalent chromium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 138, p. 78-86, 2019.

HUDSON-HANLEY, B.; SMIT, E.; BRANSCUM, A.; HYSTAD, P.; KILE, M. L. trends in urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the non-smoking U.S. population, NHANES 2001-2014. *Chemosphere*, vol. 276, ago. 2021.

HUNKELER, D.; HÖHENER, P.; HÄNER, A.; BREGNARD, T.; ZEYER, J. Quantification of hydrocarbon mineralization in a diesel fuel contaminated aquifer treated by in situ bioremediation. *Groundwater Quality: Remediation and Protection*, vol. 225, 1995.

HYLLAND, K. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Ecotoxicology in Marine Ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 69, n. 1-2, p. 109–123, jan. 2006.

IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: polynuclear aromatic compounds, part 1, chemical, environmental and experimental data. 1983. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1073515>>.

IBRAHIM, H.; KARACALI, O.; SHUMAKOV, I.; AL HINAALI, S.; SHIZAWI, W. Do We Really Perforate Per the Design? Key Elements of Safer and High-Productivity Well Perforating. SPE Conference at Oman Petroleum & Energy Show, Muscat, Oman, mar. 2022

IBRAHIM, S.; ANG, H. M.; WANG, S. Removal of emulsified food and mineral oils from wastewater using surfactant modified barley straw. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 23, p. 5744–5749, dez. 2009.

ICHOR, T. et al. Biodegradation of total petroleum hydrocarbon by aerobic heterotrophic bacteria isolated from crude oil contaminated brackish waters of bodo creek. *J Bioremed Biodeg*, v. 5, n. 5, p. 1-6, 2014.

IGUNNU, E. T.; CHEN, G. Z. Produced water treatment technologies. *International Journal of Low-Carbon Technologies*, v. 9, n. 3, p. 157–177, 4 jul. 2014.

IMAM, A.; SUMAN, S. K.; KANAUIA, P. K.; RAY, A. Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review. *Bioresource Technology*, v. 343, p. 126121, jan. 2022.

IWABUCHI, T.; INOMATA-YAMAUCHI, Y.; KATSUTA, A.; HARAYAMA, S. Isolation and characterization of marine Nocardioles capable of growing and degrading phenanthrene at 42 C. *Journal of Marine Biotechnology*, v. 6, p. 86-90, 1998.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, v. 37, n. 4, p. 1192–1201, ago. 2007.

JAFARINEJAD, S. A Comprehensive Study on the Application of Reverse Osmosis (RO) Technology for the Petroleum Industry Wastewater Treatment. *Journal of Water and Environmental Nanotechnology*, v. 2, n. 4, p. 243–264, 10 jan. 2017.

JAIN, M.; KHAN, S. A.; SHARMA, K.; JADHAO, P. R.; PANT, K. K.; ZIORA, Z. M.; BLASKOVICH, M. A. T. Current perspective of innovative strategies for bioremediation of organic pollutants from wastewater. *Bioresource Technology*, v. 344, p. 126305, jan. 2022.

JAISWAL, D. K.; VERMA, J. P. The Significance of Plant-Associated Microbial Rhizosphere for the Degradation of Xenobiotic Compounds. Springer eBooks, p. 307–316, 1 jan. 2016.

JAMAL, M. T. Enrichment of Potential Halophilic *Marinobacter* Consortium for Mineralization of Petroleum Hydrocarbons and Also as Oil Reservoir Indicator in Red Sea, Saudi Arabia. *Polycyclic Aromatic Compounds*, p. 1–12, 3 mar. 2020.

JANBANDHU, A.; FULEKAR, M. H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 187, n. 1-3, p. 333–340, mar. 2011.

JANKAITE, A.; VASAREVIČIUS, S. Remediation technologies for soils contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, v. 13, n. 2, p. 109–113, 30 jun. 2005.

JI, H.; LIU, W.; SOL, F.; HUANG, T.; CHEN, L.; LIU, S.; QI, J.; XIE, C.; ZHAO, D. Sorption of dispersed petroleum hydrocarbons by activated charcoals: Effects of oil dispersants. *Environmental Pollution*, v. 256, p. 113416, jan. 2020.

JOHNSON, Olufemi Adebayo; AFFAM, Augustine Chioma. Petroleum sludge treatment and disposal: A review. *Environmental Engineering Research*, v. 24, n. 2, p. 191–201, 2019.

JOHNSTON, J. E.; LIM, E.; ROH, H. Impact of upstream oil extraction and environmental public health: A review of the evidence. *Science of The Total Environment*, v. 657, p. 187–199, mar. 2019.

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 45, n. 1-2, p. 57–88, jan. 2000.

KALIA, A.; SHARMA, S.; SEMOR, N.; BABELE, P. K.; SAGAR, S.; BHATIA, R. K.; WAIA, A. Recent advancements in hydrocarbon bioremediation and future challenges: a review. *3 Biotech*, v. 12, n. 6, 23 maio 2022.

KEITH, L. H. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds*, v. 35, n. 2-4, p. 147–160, 8 dez. 2014.

KELLY, Donovan P.; ARDLEY, Julie K.; WOOD, Ann P. Cultivation of methylotrophs. In: *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Isolation and Cultivation*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 197-229.

KERAMEA, P. et al. Oil Spill Modeling: A Critical Review on Current Trends, Perspectives, and Challenges. *Journal of Marine Science and Engineering*, v. 9, n. 2, p. 181, 1 fev. 2021.

KIM, Jeong-Dong; LEE, Choul-Gyun. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by bacterium-fungus co-cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 12, p. 410-416, 2007.

KIM, K.; JAHAN, S. A.; KABIR, E.; BROWN, R. J. C. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international*, v. 60, p. 71–80, 2013.

KITAMURA, S.; SUZUKI, T.; SANO, S.; KOHTA, R.; JINNO, N.; SUGIHARA, K.; YOSHIHARA, S.; FUJIMOTO, N.; WATANABE, H.; OHTA, S. Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Sciences*, v. 84, n. 2, p. 249–259, 19 jan. 2005.

KONG, X.; DONG, R.; KING, T.; CHEN, F.; LI, H. Biodegradation Potential of *Bacillus* sp. PAH-2 on PAHs for Oil-Contaminated Seawater. *Molecules*, v. 27, n. 3, p. 687, 21 jan. 2022.

KOSTKA, J. E.; PRAKASH, O.; OVERHOLT, W. A.; GREEN, S. J.; FREYER, G.; CANION, A.; DELGARDIO, J.; NORTON, N.; HAZEN, T. C.; HUETTEL, M. Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 22, p. 7962–7974, 23 set. 2011.

KOZAK, K.; RUMAN, M.; KOSEK, K.; KARASIŃSKI, STACHNIK, Ł.; POLKOWSKA, Z. Impact of Volcanic Eruptions on the Occurrence of PAHs Compounds in the Aquatic Ecosystem of the Southern Part of West Spitsbergen (Hornsund Fjord, Svalbard). *Water*, v. 9, n. 1, p. 42–42, 10 jan. 2017.

KRONENBERG, M.; TRABLY, E.; BERNET, N.; PATUREAU, D. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Using microbial bioelectrochemical systems to overcome an impasse. *Environmental Pollution*, v. 231, p. 509–523, dez. 2017.

KUMAR, V.; SHAHI, S. K.; SINGH, S. Bioremediation: An Eco-sustainable Approach for Restoration of Contaminated Sites. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*, p. 115–136, 2018.

KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; VENKATESWARLU, K.; LEE, Y. B.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, v. 168, p. 944–968, fev. 2017.

KUYUKINA, M. S.; KRIVORUCHKO, A. V.; IVSHINA, I. B. Advanced Bioreactor Treatments of Hydrocarbon-Containing Wastewater. *Applied Sciences*, v. 10, n. 3, p. 831, 24 jan. 2020.

KWEON, O.; KIM, S.; HOLLAND, R. D.; CHEN, H.; KIM, D.; GAO, Y.; YU, L.; BAEK, S.; BAEK, D.; AHN, H.; CERNIGLIA, C. E. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolic Network in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 17, p. 4326–4337, set. 2011.

KWOFIE, M. A.; GUPTA, M. Phenanthrene: A Versatile Molecule; A Review. *Plant Archives*, v. 21, n. no 1, 19 abr. 2021.

L. PAIKHOMBA SINGHA; PANDEY, P. Rhizosphere assisted bioengineering approaches for the mitigation of petroleum hydrocarbons contamination in soil. v. 41, n. 5, p. 749–766, 24 fev. 2021.

LAFFON, B.; PÁ SARO, E.; VALDIGLESIAS, V. Effects of exposure to oil spills on human health: Updated review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 19, n. 3–4, p. 105–128, 18 maio 2016.

LALLOO, R.; RAMCHURAN, S.; RAMDUTH, D.; GÖRGENS, J.; GARDINER, N. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 5, p. 1471–1479, 25 abr. 2007.

LAMICHHANE, S.; BAL KRISHNA, K. C.; SARUKKALIGE, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: A review. *Chemosphere*, v. 148, p. 336–353, abr. 2016.

LAWAL, A. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environmental Science*, v. 3, n. 1, 14 jul. 2017.

ŁAWNICZAK, Ł.; MARECIK, R. Comparison of metalworking fluids biodegradation efficiency by autochthonous and environmental communities. *Journal of Environmental Management*, v. 232, p. 625–635, fev. 2019.

- ŁAWNICZAK, Ł.; WOŹNIAK-KARCZEWSKA, M.; LOIBNER, A. P.; HEIPIEPER, H. J.; CHRZANOWSKI, Ł. Microbial Degradation of Hydrocarbons—Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules*, v. 25, n. 4, p. 856, 14 fev. 2020.
- LAWTON, J. H.; JONES, C. G. Linking Species and Ecosystems: Organisms as Ecosystem Engineers. *Linking Species & Ecosystems*, p. 141–150, 1995.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 3, p. 305–315, set. 1990.
- LEE, B. Sources, Distribution and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Particulate Matter. [s.l.] IntechOpen, 2010.
- LEE, S.; KOO, B.; LEE, S.; KIM, M.; CHOI, D.; HONG, E.; JEUNG, E.; CHOI, I. Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, n. 5, p. 417–423, 6 out. 2004.
- LESSARD, R. R.; DEMARCO, G. The Significance of Oil Spills Dispersants. *Spills Science & Technology Bulletin*, v. 6, p. 59 - 68, 2000.
- Li, C. H., Zhou, H. W., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. 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, J.; LUO, C.; ZHANG, D.; SONG, M.; CAI, X.; JIANG, L.; ZHANG, G. Autochthonous Bioaugmentation-Modified Bacterial Diversity of Phenanthrene Degraders in PAH-Contaminated Wastewater as Revealed by DNA-Stable Isotope Probing. *Environmental science & technology*, v. 52, n. 5, p. 2934–2944, 29 jan. 2018.
- LI, J.; PENG, W.; YIN, X.; WANG, X.; LIU, Z.; LIU, Q.; DENG, Z.; LIN, S.; LIANG, R. Identification of an efficient phenanthrene-degrading *Pseudarthrobacter* sp. LISW and characterization of its metabolites and catabolic pathway. *Journal of Hazardous Materials*, v. 465, p. 133138, 5 mar. 2024.
- LI, Y.; YUB, H.; WANG, Z.; LI, Y.; QUINGGING, P.; MENG, S.; YANG, Y. Q.; LU, W.; GUO, K. The forecasting and analysis of oil spill drift trajectory during the Sanchi collision accident, East China Sea. *Ocean Engineering*, v. 187, p. 106231, 1 set. 2019.
- LIBENSON, L.; MCILROY, A. P. On the Mechanism of the Gram Stain. *Journal of Infectious Diseases*, v. 97, n. 1, p. 22–26, 1 jul. 1955.
- LIN, Y.; LEE, W.; HOU, H. PAH emissions and energy efficiency of palm-biodiesel blends fueled on diesel generator. *Atmospheric Environment*, v. 40, n. 21, p. 3930–3940, 1 jul. 2007.
- LIN, Y.; LI, Y.; AMESHO, K. T. T.; CHOU, F.; CHENG, P. Characterization and quantification of PM 2.5 emissions and PAHs concentration in PM 2.5 from the exhausts of diesel vehicles with various accumulated mileages. *Science of the Total Environment*, vol. 660, p. 188-198, apr. 2019.
- LIU, Y. et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, 16 set. 2015.
- LUO, J.; XU, X.; MAO, R.; MIAO, Q. Curved Polycyclic Aromatic Molecules That Are  $\pi$ -Isoelectronic to Hexabenzocoronene. *Journal of the American Chemical Society*, v. 134, n. 33, p. 13796–13803, 8 ago. 2012.

MAACHIA, L.; BOUZERNA, N.; CHETTIBI, H. Assessment of the petrochemical industry pollution on the Skikda bay, Algeria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 2, n. 3-4, p. 463–468, 1 dez. 2005.

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 & environmental engineering*, v. 44, n. 13, p. 1315–1326, 20 out. 2009.

MALLAH, M. A.; CHANGXING, L.; MALLAH, M. A.; NOREEN, S.; LIU, Y.; SAEED, M.; XI, H.; AHMED, B.; FENG, F.; MIRJAT, A. A.; WANG, W.; JABAR, A.; NAVEED, M.; LI, J.; ZHANG, Q. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overview. *Chemosphere*, v. 296, p. 133948, 1 jun. 2022.

MANAFI, M.; KNEIFEL, W. Rapid methods for differentiating Gram-positive from Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 69, n. 6, p. 822–827, dez. 1990.

MARGESIN, R.; LABBÉ, D.; SCHINNER, F.; GREER, C. W.; WHYTE, L. G. Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3085–3092, jun. 2003.

MASAKORALA, K.; YAO, J.; CAI, M.; CHANDANKERE, R.; YUAN, H.; CHEN, H. Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Pseudomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 263, p. 493-500, dec. 2013.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of The Total Environment*, v. 408, n. 20, p. 4334–4340, set. 2010.

MECKENSTOCK, R. U.; BOLL, M.; MOUTTAKI, H.; KOELSCHBACH, J. S.; TAROUCO, P. C.; WEYRAUCH, P.; DONG, X.; HIMMELBERG, A. M. Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 1-3, p. 92–118, 2016.

MEDEIROS, L. Plano Municipal de Saneament Básico no Município de Jaboatão dos Guararapes/PE. *Coordenação da Prefeitura Municipal de Jaboatão dos Guararapes*, abr. 2014.

MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, v. 37, n. 8, p. 1362–1375, nov. 2011.

MEMIĆ, M.; VRTAČNIK, M.; BOH, B.; POHLEVEN, F.; MAHMUTOVIĆ, O. Biodegradation of PAHs by Ligninolytic Fungi *Hypoxylon Fragiforme* and *Coniophora Puteana*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, p. 1–8, 27 nov. 2017.

MENDES-SILVA, T. C. D.; ANDRADE, R. F. S.; OOTANI, M. A.; MENDES, P. V. D.; DE SÁ, A. Q. C.; DA SILVA, M. R. F.; SOUZA, K. S.; CORREIA, M. T. S.; DA SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. B. M. Biotechnological Potential of Carotenoids Produced by Extremophilic Microorganisms and Application Prospects for the Cosmetics Industry. *Advances in Microbiology*, v. 10, n. 08, p. 397–410, 2020.

MENEZES, O. M.; CASTRO, R. S.; SILVA, G. B. J.; TEIXEIRA, P. G.; SILVA, M. A. M. Análise estatística da caracterização gravimétrica de resíduos sólidos domiciliares: estudo de caso do município de Juiz de Fora, Minas Gerais. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 24, n. 2, p. 271–282, abr. 2019.

MEYER, D. D. Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias. *Ufrgs.br*, 2011.

MOJIRI, A.; ZHOU, J. L.; OHASHI, A.; OZAKI, N.; KINDAICHI, T. Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of The Total Environment*, v. 696, p. 133971, dez. 2019.

MOKHTARZADEH, Z.; KESHAVARZI, B.; MOORE, F.; MARSAN, F. A.; PADOAN, E. Potentially toxic elements in the Middle East oldest oil refinery zone soils: source apportionment, speciation, bioaccessibility and human health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 32, p. 40573–40591, 15 jul. 2020.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, v. 165, n. 5, p. 363–375, jul. 2010.

NAM, C.; LI, H.; ZHANG, G.; LUTZ, L. R.; NAZARI, B.; COLBY, R. H.; CHUNG, T. C. M. Practical Oil Spill Recovery by a Combination of Polyolefin Absorbent and Mechanical Skimmer. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 6, n. 9, p. 12036–12045, 24 jul. 2018.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 995, Phenanthrene. set. 2020. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenanthrene>>. Acesso em 29 abr. 2024.

NET, S.; EL-OSMANI, R.; PRYGIEL, E.; RABODONIRINA, S.; DUMOULIN, D.; OUDDANE, B. Overview of persistent organic pollution (PAHs, Me-PAHs and PCBs) in freshwater sediments from Northern France. *Journal of Geochemical Exploration*, v. 148, p. 181–188, jan. 2015.

NGUYEN, D.; KHANAL, S. K. A little breath of fresh air into an anaerobic system: How microaeration facilitates anaerobic digestion process. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 7, p. 1971–1983, 15 nov. 2018.

NZILA, A.; AL-THUKAIR, A. A.; SANKARA, A.; RAZZAK, S. A. Characterization of aerobic oil and grease-degrading bacteria in wastewater. v. 38, n. 6, p. 661–670, 18 jul. 2016.

OGBONNA, D. N.; NROR, R. R.; EZINWO, F. E. Bioremediation Efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* with the Nutrient Amendment on Crude Oil Polluted the Soil. *Microbiology Research Journal International*, p. 1–13, 20 nov. 2019.

OKERE, C. J.; SHENG, J. J. Review on clean hydrogen generation from petroleum reservoirs: Fundamentals, mechanisms, and field applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30 jun. 2023.

OLIART-ROS, R. M.; SÁNCHEZ-OTERO, M. G.; MANRESA-PRESAS, Á. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, v. 11, n. 1, p. 79, 31 ago. 2016.

- O'MALLEY. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*. Journals and Books, vol. 39, p. 314-325, set. 2008.
- OSSAI, I. C.; AHMED, A.; HASSAN, A.; HAMID, F. S. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*, v. 17, p. 100526, 2019.
- OTTE, M.; GAGNON, J.; COMEAU, Y.; MATTE, N.; GREER, C. W.; SMASON, R. Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, n. 6, p. 926–932, 1 fev. 1994.
- OYETIBO, G. O.; CHIEN, M.; IKEDA-OHTSUBO, W.; SUZUKI, H.; OBAYORI, O. S.; ADEBUSOYE, S. A.; ILORI, M. O.; AMUND, O. O.; ENDO, G. Biodegradation of crude oil and phenanthrene by heavy metal resistant *Bacillus subtilis* isolated from a multi-polluted industrial wastewater creek. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 120, p. 143–151, maio 2017.
- PARTIPHAN, P.; PREETHAM, E.; MACHUCA, L. L.; RAHMAN, P. K. S. M.; MURUGAN, K.; RAJASEKAR, A. Biosurfactant and Degradative Enzymes Mediated Crude Oil Degradation by Bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 2017.
- PATEL, A. B.; SHAIKH, S.; JAIN, K. R.; DESAI, C.; MADAMWAR, D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 5 nov. 2020.
- PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 1, 2020.
- PENA, P. G. L.; NORTHCROSS, A. L.; de LIMA, M. A. G.; RÊGO, R. C. F. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 36, n. 2, 2020.
- PINYAKONG, O.; HABE, H.; YOSHIDA, T.; NOJIRI, H.; OMORI, T. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 301, n. 2, p. 350–357, fev. 2003.
- POERSCHMANN, J.; GÓRECKI, T.; KOPINKE, F. Sorption of Very Hydrophobic Organic Compounds onto Poly(dimethylsiloxane) and Dissolved Humic Organic Matter. 1. Adsorption or Partitioning of VHOC on PDMS-Coated Solid-Phase Microextraction Fibers A Never-Ending Story? v. 34, n. 17, p. 3824–3830, 4 ago. 2000.
- POGORZELEC, M.; PIEKARSKA, K. Application of semipermeable membrane devices for long-term monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons at various stages of drinking water treatment. *Science of The Total Environment*, v. 631–632, p. 1431–1439, 1 ago. 2018.
- POINTING, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, n. 1-2, p. 20–33, 1 out. 2001.

POSADA-BAQUERO, R.; ORTEGA-CALVO, J. Recalcitrance of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil contributes to background pollution. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), v. 159, n. 12, p. 3692–3699, 1 dez. 2011.

PRAKASH, V.; SINGH, S. Effect of combustion variables on PAHs emission from incineration of cellulose waste filters from acrylic industry. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 163, n. 1-4, p. 591–598, 8 abr. 2009.

PREMNATH, N.; MOHANRASU, K.; RAO, R. G. R.; DINESH, G. H.; PRAKASH, G. S.; ANANTHI, V.; PONNUCHAMY, K.; MUTHUSAMY, G.; ARUN, A. A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons - Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere*, v. 280, p. 130608, out. 2021.

PRICE, P. B.; SOWERS, T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 13, p. 4631–4636, 30 mar. 2004.

PURNOMO, A. S.; RIZQI, H. D.; RAFI, L. H. Culture of Bacterium *Bacillus subtilis* as Degradation Agent for Sea Water Remediation Contaminated by Petroleum. 2020. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Culture-of-Bacterium-Bacillus-subtilis-as-Agent-for-Purnomo-Rizqi/00b9fea6ba47ef8f8152e49847ab1a176f979c04>>. Acesso em: 4 jul. 2024.

QIAN, K.; WANG, F. C. Compositional Analysis of Heavy Petroleum Distillates by Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography, Field Ionization and High-resolution Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 30, n. 12, p. 2785–2794, 18 nov. 2019.

QIAN, Y.; POSCH, T.; SCHMIDT, T. C. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on glass surfaces. *Chemosphere*, v. 82, n. 6, p. 859–865, fev. 2011.

QIAO, M.; BAI, I.; CAO, W.; HUO, Y.; ZHAO, X.; LIU, D.; LI, Z. Impact of secondary effluent from wastewater treatment plants on urban rivers: Polycyclic aromatic hydrocarbons and derivatives. *Chemosphere*, v. 211, p. 185–191, 1 nov. 2018.

RAHSEPAR, S.; SMIT, M. P. J.; MURK, A. J.; RIJNAARTS, H. H. M.; LANGENHOFF, A. A. M. Chemical dispersants: Oil biodegradation friend or foe? *Marine Pollution Bulletin*, v. 108, n. 1-2, p. 113–119, jul. 2016.

RAMLUCKEN, U.; ROETS, Y.; RAMCHURAN, O.; MOONSAMY, G.; VAN RENSBURG, C.J.; THANTSHA, M.S.; LALLOO, R. Isolation, selection and evaluation of *Bacillus* spp. as potential multi-mode probiotics for poultry. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 66, n. 4, p. 228–238, 2020.

REDDY, C. M.; AREY, J. S.; SEEWALD, J. S.; SYLVA, S. P.; LEMKAU, K. L.; NELSON, R. K.; CARMICHAEL, C. A.; MCINTYRE, C. P.; FENWICK, J.; VENTURA, G. T.; VAN MOOY, B. A. S.; CAMILLI, R. Composition and fate of gas and oil released to the water column during the Deepwater Horizon oil spill. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 50, p. 20229–20234, 18 jul. 2011.

REDMAN, A. D.; PARKERTON, T. F. Guidance for improving comparability and relevance of oil toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, v. 98, n. 1-2, p. 156–170, set. 2015.

- REINHARD, M.; SHANG, S.; KITANIDIS, P. K.; ORWIN, E.; HOPKINS, G. D.; LEBRON, C. A. In Situ BTEX Biotransformation under Enhanced Nitrate- and Sulfate-Reducing Conditions. v. 31, n. 1, p. 28–36, 30 dez. 1996.
- REJINIEMON, T. S.; LEKSHMI, R.; ALODAINI, H. A.; HATAMLEH, A. A.; SATHYA, R.; KUPPUSAMY, P.; AL-DOSARY, M. A.; KALAIYARASI, M. Biodegradation of naphthalene by biocatalysts isolated from the contaminated environment under optimal conditions. *Chemosphere*, v. 305, p. 135274–135274, 1 out. 2022.
- RIGAS, F.; PAPADOPOULOU, K.; PHILIPPOUSSIS, A.; PAPADOPOULOU, M.; CHATZIPAVLIDIS, J. Bioremediation of Lindane Contaminated Soil by *Pleurotus ostreatus* in Non Sterile Conditions Using Multilevel Factorial Design. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 197, n. 1-4, p. 121–129, 16 jul. 2008.
- ROCHA, A. C.; PALMA, C. Source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil sediments: Application of different methods. *Science of The Total Environment*, v. 652, p. 1077–1089, fev. 2019.
- RODRIGUEZ-FREIRE, L.; ABAD-FERNÁNDEZ, N.; SIERRA-ALVAREZ, R.; HOPPE-JONES, C.; PENG, H.; GIESY, J. P.; SNYDER, S.; KESWANI, M. Sonochemical degradation of perfluorinated chemicals in aqueous film-forming foams. v. 317, p. 275–283, 1 nov. 2016.
- ROETS-DLAMINI, Y.; LALLOO, R.; MOONSAMY, G.; KUMARI, S.; NASR, M.; RAMCHURAN, S.; BUX, F. Development of *Bacillus* spp. consortium for one-step “Aerobic Nitrification-Denitrification” in a fluidized-bed reactor. *Bioresource Technology Reports*, v. 17, p. 100922, fev. 2022.
- RÜGER, H. J.; FRITZE, D.; C SPRÖER. New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, n. 3, p. 1305–1313, 1 mai. 2000
- SAHOO, B. M.; KUMAR, B. V. V. R.; BANIK, B. K.; BORAH, P. Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs): Structures, Synthesis and their Biological Profile. *Current Organic Synthesis*, v. 17, n. 8, p. 625–640, ago. 2020
- SAITO, A.; IWABUCHI, T.; HARAYAMA, S. A Novel Phenanthrene Dioxygenase from *Nocardioides* sp. Strain KP7: Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 8, p. 2134–2141, 15 abr. 2000.
- SAITO, M.; ISHII, N.; OGURA, S.; MAEMURA, S.; SUZUKI, H. Development and Water Tank Tests of Sugi Bark Sorbent (SBS). *Spill Science & Technology Bulletin*, v. 8, n. 5, p. 475–482, 1 jan. 1999.
- SAKSHI; HARITASH, A. K. A comprehensive review of metabolic and genomic aspects of PAH-degradation. *Archives of Microbiology*, v. 202, n. 8, p. 2033–2058, 6 jun. 2020.
- SAMANTA, S.; CHAKRABORTI, A. K.; JAIN, R. K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 1, p. 98–107, 1 dez. 1999.
- SAMANTARAY, D.; MOHAPATRA, S.; MISHRA, B. Microbial Bioremediation of Industrial Effluents. p. 325–339, 1 jan. 2014.

SAMPAIO, G. R.; GUIZELLINI, G. M.; DA SILVA, S. A.; DE ALMEIDA, A. P.; PINAFFI-LANGLEY, ROGERO, M. M.; CAMARGO, A. C.; TORRES, E. A. F. S. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods: Biological Effects, Legislation, Occurrence, Analytical Methods, and Strategies to Reduce Their Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 11, p. 6010, 1, jan. 2021.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, v. 94, n. 3, p. 441- 446, 1975.

SANGWAN, S.; DUKARE, A. Microbe-Mediated Bioremediation: An Eco-friendly Sustainable Approach for Environmental Clean-Up. *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects*, p. 145–163, 2018.

SANTAELLA, S. T.; SILVA JÚNIOR, F. C. G.; GADELHA, D. A. C.; COSTA, K. O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R. C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. *Engenharia Sanitaria E Ambiental*, v. 14, n. 1, p. 139–148, 1 mar. 2009.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E. S.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 216, n. 1-4, p. 329–350, 13 jul. 2010.

SHAHSAVARI, E.; ADETUTU, E. M.; TAHA, M.; BALL, A. S. Rhizoremediation of phenanthrene and pyrene contaminated soil using wheat. *Journal of Environmental Management*, v. 155, p. 171–176, maio 2015.

SHAHSAVARI, E.; SCHWARZ, A.; ABURTO-MEDINA, A.; BALL, A. S. Biological Degradation of Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs) in Soil: a Current Perspective. *Current Pollution Reports*, v. 5, n. 3, p. 84–92, 26 jun. 2019.

SHEN, T.; PI, Y.; BAO, M.; XU, N.; LI, Y.; LU, J. Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 17, n. 12, p. 2022–2033, 2015.

SHEN, Y.; SHENG, Y.; LI, J.; ZHU, J.; SHI, S.; ZHAN, X. The role of temperature in phenanthrene transfer and accumulation in crop leaves. *Environmental Pollution*, v. 258, p. 113827, 1 mar. 2020.

SHI, Z.; TAO, S.; PAN, B.; FAN, W.; HE, C. X.; ZUO, Q.; WU, S. P.; LI, B. G.; CAO, J.; LIU, W. X.; XU, F. L.; WANG, X. J.; SHEN, W. R.; WONG, P. K. Contamination of rivers in Tianjin, China by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Pollution*, v. 134, n. 1, p. 97–111, 1 mar. 2005.

SHOKROLLAHZADEH, S.; AZIZMOHSENI, F.; GOLMOHAMMAD, F.; SHOKOUHI, H.; KHADEMHAIGHAT, F. Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 14, p. 6127–6133, set. 2008.

SILVA, D. C. P.; MELO, C. S.; OLIVEIRA, A. B.; DOS SANTOS, N. M. M.; PINTO, L. C. Derramamento de Óleo no Mar e Implicações Tóxicas da Exposição aos Compostos Químicos do Petróleo. *Revista Contexto & Saúde*, v. 21, n. 44, p. 332–344, 29 dez. 2021.

SILVA-BEDOYA, L. M.; SÁNCHEZ-PINZÓN, M. S.; CADAVID-RESTREPO, G. E.; MORENO-HERRERA, C. X. Bacterial community analysis of an industrial wastewater treatment plant in Colombia with screening for lipid-degrading microorganisms. *Microbiological Research*, v. 192, p. 313–325, nov. 2016.

SIMECEK-BEATTY, D.; LEHR, W. J. Extended oil spill spreading with Langmuir circulation. *Marine Pollution Bulletin*, v. 122, n. 1-2, p. 226–235, set. 2017.

SINGH, N.; GUPTA, S.; MARWA, N.; PANDEY, V.; VERMA, P. C.; RATHAUR, S.; SINGH, N. Arsenic mediated modifications in *Bacillus aryabhattai* and their biotechnological applications for arsenic bioremediation. *Chemosphere*, v. 164, p. 524–534, dez. 2016.

SINGH, P.; JAIN, R.; SRIVASTAVA, N.; BORTHAKUR, A.; PAL, D. B.; SINGH, R.; MADHAV, S.; SRIVASTAVA, P.; TIWARY, D.; MISHRA, P. K. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 47, n. 3, p. 155–201, fev. 2017.

SINGH, S.; SHIKHA. Treatment and Recycling of Wastewater from Oil Refinery/Petroleum Industry. *Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future*, p. 303–332, 13 out. 2018.

SISINTHY, S.; GUNDLAPALLY, S. R. *Mitsuaria chitinivorans* sp. nov. a potential candidate for bioremediation: emended description of the genera *Mitsuaria*, *Roseateles* and *Pelomonas*. *Archives of Microbiology*, v. 202, n. 7, p. 1839–1848, 23 mai. 2020.

SMIBERT, R. M.; KRIEG, N. R.; GERHARDT, P.; MURRAY, R. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 607-654, 1994.

SMITHA, M. S.; SINGH, S.; SINGH, R. Microbial biotransformation: a process for chemical alterations. *J Bacteriol Mycol Open Access*, v. 4, n. 2, p. 85, 2017.

SOUZA, A. R.; ZAGO, M.; EIDELMAN, D. H.; HAMID, Q.; BAGLOLE, C. J. Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Attenuation of Subchronic Cigarette Smoke-induced Pulmonary Neutrophilia Is Associated with Retention of Nuclear RelB and Suppression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). *Toxicological Sciences*, v. 140, n. 1, p. 204–223, 20 abr. 2014.

STEPHENSON, D.; STEPHENSON, T. Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, v. 10, n. 4, p. 549–559, jan. 1992.

SURENDRA, S. V.; MAHALINGAM, B. L.; VELAN, M. Degradation of monoaromatics by *Bacillus pumilus* MVSV3. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 60, n. 0, 2017.

SYDOW, M.; OWSIANIAK, M.; SZCZEPANIAK, Z.; FRAMSKI, G.; SMETS, B. F.; ŁAWNICZAK, Ł.; LISIECKI, P.; SZULC, A.; CYPLIK, P.; CHRZANOWSKI, Ł. Evaluating robustness of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from contaminated soil. *New Biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 852–859, 1 dez. 2016.

SZULC, A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; ŁAWNICZAK, Ł.; CYPLIK-PIOTROWSKA, A.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, Ł. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil:

Feasibility during field studies. *Journal of Environmental Management*, v. 132, p. 121–128, 1 jan. 2014.

TAO, X.; LU, G.; DANG, Z.; YI, X.; YANG, C. Isolation of phenanthrene-degrading bacteria and characterization of phenanthrene metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 5, p. 647–654, 10 out. 2006.

TATTA, R. E.; IMCHEN, M.; MOOPANTAKATH, J.; KUMAVATH, R. Bioprospecting of microbial enzymes: current trends in industry and healthcare. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p. 1-23, 2022.

TEKERE, M.; READ, J. S.; MATTIASSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected sub-tropical white rot fungi. *Journal of Biotechnology*, v. 115, n. 4, p. 367–377, fev. 2005.

THACHARODI, A.; HASSAN, S.; SINGH, T.; MANDAL, R.; CHINNADURAI, J.; KHAN, H. A.; HUSSAIN, M. A.; BRINDHADEVI, K.; PUGAZHENDHI, A. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: An updated microbiological review. *Chemosphere*, v. 328, p. 138498–138498, 1 jul. 2023.

THANGARAJ, K.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H. J.; Characterization of diverse *Acinetobacter* isolates for utilization of multiple aromatic compounds. *Bioresource Technology*, vol. 99, p. 2488-2494, mai. 2008.

THOMPSON, I. P.; VAN DER GAST, C. J.; CIRIC, L.; SINGER, A. C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 7, p. 909–915, jul. 2005.

TIŠMA, M.; SUDAR, M.; VASIC-RACKI, D.; ZELIC, B. Mathematical model for *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 33, n. 6, p. 749–758, 1 dez. 2009.

TURNER, N. R.; PARKERTON, T. F.; RENEGAR, D. A. Toxicity of two representative petroleum hydrocarbons, toluene and phenanthrene, to five Atlantic coral species. *Marine Pollution Bulletin*, v. 169, p. 112560, 1 ago. 2021.

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*, v. 22, n. 2, p. 231–241, 3 ago. 2010.

UAD, I.; SILVA-CASTRO, G. A.; POZO, C.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; CALVO, C. Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000 m of depth (Prestige wreck). v. 64, n. 6, p. 511–518, 1 set. 2010.

UPADHYAY, N.; VISHWAKARMA, K.; SINGH, J.; MISHRA, M.; KUMAR, V.; RANI, R.; MISHRA, R. K.; CHAUHAN, D. K.; TRIPATHI, D. K.; SHARMA, S. Tolerance and reduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. MNU16 isolated from contaminated coal mining soil. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 778, 2017.

US EPA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Jan. 2008. Disponível em <<https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/pahs.pdf>>. Acesso em: 03 mai. 2024.

UZOEKWE, S.; OGHOSANINE, F. The Effect of Refinery and Petrochemical Effluent on Water Quality of Ubeji Creek Warri, Southern Nigeria. *Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management*, v. 4, n. 2, 1 set. 2011.

VARJANI, S. J.; RANA, D. P.; JAIN, A. K.; BATEJA, S.; UPASANI, V. N. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 103, p. 116–124, set. 2015.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, v. 222, p. 195–201, dez. 2016.

Vázquez JA, González MP, Murado MA (2004) Um novo meio marinho: uso de diferentes peptonas de peixes e estudo comparativo do crescimento de espécies selecionadas de bactérias marinhas. *Enzima Microbiana Technol* 35(5):385–392.

VIESSER, J. A.; SUGAI-GUERIOS, M. H.; MALUCELLI, L. C.; PINCERATI, M. R.; KARP, S. G.; MARANHO, L. T. Petroleum-Tolerant Rhizospheric Bacteria: Isolation, Characterization and Bioremediation Potential. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 6 fev. 2020.

WAGNER, A. M.; BARKER, A. J. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from legacy spills at an Alaskan Arctic site underlain by permafrost. *Cold Regions Science and Technology*, v. 158, p. 154–165, fev. 2019.

WAIGI, M. G.; KANG, F.; GOIKAVI, C.; LING, Q.; GAO, Y. Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 104, p. 333–349, 1 out. 2015.

WANG, C.; LIU, X.; GUO, J.; LV, Y.; LI, Y. Biodegradation of marine oil spill residues using aboriginal bacterial consortium based on Penglai 19 - 3 oil spill accident, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 159, p. 20-27, 2018.

WANG, C.; SUN, H.; LI, J.; LI, Y.; ZHANG, Q. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. *Chemosphere*, v. 77, n. 6, p. 733–738, out. 2009.

WANG, D.; LIN, J.; LIN, J.; WANG, W.; LI, S. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by *Bacillus subtilis* BL-27, a Strain with Weak Hydrophobicity. *Molecules*, v. 24, n. 17, p. 3021, 1 jan. 2019.

WEI, W.; ZHANG, Y.; HUANG, Q.; NI, B. Polyethylene terephthalate microplastics affect hydrogen production from alkaline anaerobic fermentation of waste activated sludge through altering viability and activity of anaerobic microorganisms. *Water Research*, v. 163, p. 114881, out. 2019.

WEISSENFELS, W. D.; KLEWER, H.-J.; LANGHOFF, J. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 5, 1 fev. 1992.

WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 259–276, jun. 2001.

- WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 259–276, jun. 2001.
- WILLIAMSON, J. R. Assembly of the 30S ribosomal subunit. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 38, n. 4, p. 397–403, 25 ago. 2006.
- WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, n. 2, p. 174–209, 26 jun. 2008.
- WU, H.; SHEN, J.; JIANG, X.; LIU, X.; SUN, X.; LI, J.; HAN, W.; MU, Y.; WANG, L. Bioaugmentation potential of a newly isolated strain *Sphingomonas* sp. NJUST37 for the treatment of wastewater containing highly toxic and recalcitrant tricyclazole. *Bioresource Technology*, vol. 264, p. 98-105, 2019
- WU, S.; XU, X.; ZHAO, S.; SHEN, F.; CHEN, J. Evaluation of phenanthrene toxicity on earthworm (*Eisenia fetida*): An ecotoxicoproteomics approach. *Chemosphere*, v. 93, n. 6, p. 963–971, 1 out. 2013.
- XIA, Y.; RAO, G.; LV, Z.; LIU, J.; YE, Y.; DUAN, X. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodegradation*, v. 16, n. 5, p. 393–402, out. 2005.
- XIAO, W.; YE, X.; YANG, X.; ZHU, Z.; SUN, C.; ZHANG, Q.; PING, X. Isolation and characterization of chromium(VI)-reducing *Bacillus* sp. FY1 and *Arthrobacter* sp. WZ2 and their bioremediation potential. *Bioremediation Journal*, v. 21, n. 2, p. 100–108, 21 fev. 2017.
- YANG, G.; ZHENG, X. Studies on the sorption behaviors of phenanthrene on marine sediments. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 29, n. 10, p. 2169–2176, 1 jun. 2010.
- YANG, Y.; XIE, L.; TAO, X.; HU, K.; HUANG, S. Municipal wastewater treatment by the bioaugmentation of *Bacillus* sp. K5 within a sequencing batch reactor. *PLOS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0178837–e0178837, 8 jun. 2017.
- YIN, C.; XIONG, W.; QIU, H.; PENG, W.; DENG, Z.; LIN, S.; LIANG, R. Characterization of the Phenanthrene-Degrading *Sphingobium yanoikuyae* SJTF8 in Heavy Metal Co-Existing Liquid Medium and Analysis of Its Metabolic Pathway. *Microorganisms*, v. 8, n. 6, 23 jun. 2020.
- YU, X.; LV, K.; GUAN, S.; ZHANG, X.; SUN, L. Long-term exposure to phenanthrene at environmental-level induces intestinal dysbiosis and disrupted hepatic lipid metabolism in mice. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, v. 268, n. Pt B, p. 115738, 1 jan. 2021.
- ZHANG, H.; YIN, X.; ZHOU, H.; WANG, J.; HAN, L. Weathering Characteristics of Crude Oils from Dalian Oil Spill Accident, China. *Aquatic Procedia*, v. 3, p. 238–244, mar. 2015.
- ZHANG, Q. Q.; YANG, G. F.; ZHANG, L.; ZHANG, Z. Z.; TIAN, G. M.; JIN, R. C. Bioaugmentation as a useful strategy for performance enhancement in biological wastewater treatment undergoing different stresses: Application and mechanisms. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 47, n. 19, p. 1877–1899, 2 out. 2017.
- ZHANG, X.; WANG, X.; LI, Y.; NING, G.; ZHANG, Q.; ZHANG, X.; ZHENG, W.; YANG, Z. Differences in adsorption, transmembrane transport and degradation of pyrene and benzo[a]pyrene by *Bacillus* sp. strain M1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 248, p. 114328, 15 dez. 2022.

ZHAO, N.; JU, F.; SONG, Q.; PAN, H.; LING, H. A simple empirical model for phenanthrene adsorption on soil clay minerals. *Journal of Hazardous Materials*, v. 429, p. 127849, 5 maio 2022.

ZHENG, F.; SHI, Q.; VALLVERDU, G. S.; GIUSTI, P.; BOUYSSIERE, B. Fractionation and Characterization of Petroleum Asphaltene: Focus on Metalopetroleomics. *Processes*, v. 8, n. 11, p. 1504, 20 nov. 2020

ZHUANG, X.; PI, Y.; BAO, M.; LI, Y.; ZHENG, X. The physical–biological processes of petroleum hydrocarbons in seawater/sediments after an oil spill. *RSC Advances*, v. 5, n. 120, p. 98990–98998, 2015.

ZOBELL, C. E.; JOHNSON, F. H. The Influence of Hydrostatic Pressure on the Growth and Viability of Terrestrial and Marine Bacteria. *Journal of Bacteriology*, vol. 57, p. 179-189, nov. 1948.