

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROORGANISMOS COMO FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS NA
DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO EM SOLOS CONTAMINADOS**

Alexia Sayuri Ferreira de Andrade

Jaboticabal, SP

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**MICROORGANISMOS COMO FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS NA
DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO EM SOLOS CONTAMINADOS**

ALEXIA SAYURI FERREIRA DE ANDRADE

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal, SP

2º Semestre/2025

A553m

Andrade, Alexia Sayuri Ferreira de

Microrganismos como ferramentas biotecnológicas na degradação de derivados de petróleo em solos contaminados / Alexia Sayuri Ferreira de Andrade. -- Jaboticabal, 2025

72 p. : il., tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza

1. Biorremediação. 2. Biodegradação. 3. Contaminantes Orgânicos. 4. Contaminação do Solo. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS JABOTICABAL



NOME COMPLETO DO AUTOR
ALEXIA SAYURI FERREIRA DE ANDRADE

TÍTULO DO TRABALHO ACADÊMICO
Microrganismos como ferramentas biotecnológicas na degradação de derivados de petróleo em solos contaminados

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

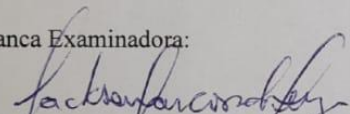
Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

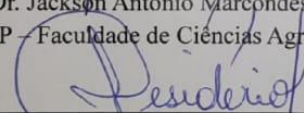
Área de Concentração: Microbiologia Agropecuária

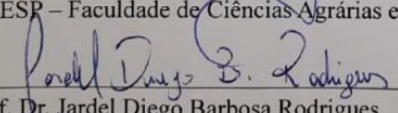
Data da defesa: 08/12/2025

(X) Aprovado
() Reprovado

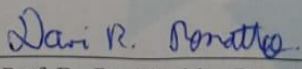
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal


Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal


Prof. Dr. Jardel Diego Barbosa Rodrigues
PhD no Programa de Pós-Graduação em Agronomia Genética e Melhoramento de Plantas

Aprovado em Reunião Departamental em: 12/12/2025


Prof. Dr. Davi Rodrigo Rossatto
Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

À minha avó Lurdes, por ser meu maior exemplo de força. Mesmo não estando mais entre nós, sei que tudo o que sou e conquistei hoje é graças a você, que, dentro das suas possibilidades, nunca mediu esforços para me proporcionar tudo o que estava ao seu alcance, deixando como legado valores que moldaram minha vida e me acompanharão para sempre.

À minha mãe Vivane, que, mesmo de longe e mesmo diante de todas as adversidades da vida, sempre se manteve presente, dando-me forças para continuar, me apoiando e sendo um colo nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos Lorenzo, Arthur e Larissa, e à minha sobrinha Sophia, por tornarem essa caminhada mais leve e por me proporcionarem momentos de imensa felicidade.

Ao Victor, que ao longo de todos esses anos esteve ao meu lado, incentivando, apoiando, aconselhando e me ensinando a enxergar o mundo por outras perspectivas. Aprendi e, continuo aprendendo, tanto com você. Compartilhar a vida contigo tem sido maravilhoso. Obrigada por todo o amor, companheirismo e por todas as alegrias que você trouxe para os meus dias.

À família do Victor, que se tornou a minha segunda família e que me acolheu com tanto carinho durante todos esses anos. Sou profundamente grata por todo o apoio, compreensão e incentivo que recebi de vocês. Cada gesto, palavra e demonstração de afeto fizeram diferença nessa caminhada.

À minha tia Josi e ao meu primo Júlio, por se mostrarem sempre dispostos a me ajudar, me ouvir e me aconselhar.

À minha amiga de longa data, Amyris, por estar sempre me apoiando, confiando no meu potencial e se mostrando disposta a me ouvir e me dar conselhos. Sou muito grata pela sua amizade.

Às minhas amigas de graduação Pollyanna, Martha, Liliane, Giovanna, Júlia e Maria Fernanda, obrigada por todos os momentos alegres e divertidos que vivemos juntas. Tudo foi mais leve graças a vocês, e sou imensamente grata por terem feito parte dessa etapa.

Ao meu orientador, professor Jackson, que sempre esteve ao meu lado, disposto a me ajudar, me ouvir e me orientar de forma tranquila e respeitosa. Agradeço por confiar em mim e por todo o apoio oferecido durante os projetos desenvolvidos no laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, pelo apoio, colaboração e pelos momentos divertidos que passamos juntos. Um agradecimento especial ao técnico Gustavo, que sempre que foi preciso, esteve de prontidão para me ajudar.

Ao químico João Pedro, do NDCom do IQ da Unesp de Araraquara, pelo suporte com as análises de CG/EM.

Agradeço ao João Almeida pela prontidão e colaboração nas etapas de bioinformática do meu trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP, pelo fomento à pesquisa, que viabilizou a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte dessa jornada e contribuíram com o meu trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Petróleo e seus derivados	4
3.1.1 Composição química e estrutura molecular	6
3.1.2 Hidrocarbonetos e moléculas-alvo	6
3.1.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	7
3.1.4 Hidrocarbonetos Monocíclicos Aromáticos	9
3.1.5 Classificação da gravidade API.....	10
3.1.6 Refino e derivados do petróleo	11
3.2 Aspectos ambientais e desafios associados	13
3.3 Bioprospecção microbiana de hidrocarbonetos	14
3.4 Biorremediação	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Área de estudo	18
4.1.1 Laboratório de Genética Aplicada	18
4.2 Origem dos solos	18
4.3 Origem do óleo residual derivado de petróleo (ORP)	20
4.4 Montagem da Coluna de Winogradsky (CW)	20
4.5 Isolamento e Manutenção de microrganismos a partir da CW	21
4.6 Caracterização morfológica e classificação de Gram dos isolados bacterianos	22
4.7 Extração de DNA genômico das bactérias e amplificação parcial do gene 16S rRNA.	23
4.8 Extração de DNA genômico do isolado fúngico e amplificação parcial do gene ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)	24
4.9 Sequenciamento e análise dos amplicons 16S rRNA bacterianos e ITS1/4 fúngico	25
4.10 Avaliação de toxicidade do isolado fúngico	26
4.11 Origem, isolamento e manutenção dos Consórcios Bacterianos (CB)	27
4.12 Bioensaios para avaliar a capacidade degradadora de hidrocarbonetos.	27

4.12.1 Isolados bacterianos.....	27
4.12.2 CBs.....	28
4.13 Análise química dos componentes de ORP e seus derivados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Propriedades químicas do solo e Colunas de Winogradsky	29
5.2 Caracterização fenotípica de isolados da CW	30
5.3 Identidade taxonômica dos isolados bacterianos.....	33
5.4 Bioensaios para avaliar a capacidade degradadora de hidrocarbonetos ...	34
5.5 Análise química dos componentes de ORP e degradação do ORP a partir dos CBs	38
5.6 Identidade do isolado fúngico	41
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

7H₂O	Heptahidratado
16s rRNA	Subunidade menor do RNA ribossomal
BTEXs	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
C	Carbono
C₁₀H₈	Naftaleno
C₂H₆	Etano
C₃H₈	Propano
C₆H₆	Benzeno
Ca	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CB	Consórcio Bacteriano
CB-D	Consórcio bacteriano com diesel
CB-ORP	Consórcio bacteriano com óleo residual derivado de petróleo
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
CH₄	Metano
CO₂	Dióxido de Carbono
CW'S	Colunas de Winogradsky
D	Diesel
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FeSO₄	Sulfato de Ferroso
H	Hidrogênio
H₂	Di-Hidrogênio
H₂O	Água
HMA	Hidrocarboneto Monocíclico Aromático
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
ITS	Espaçador Transcrito Interno
K₂HPO₄	Fosfato Dipotássico
KCl	Cloreto de Potássio
KH₂HPO₄	Fosfato Monopotássico
M.O	Matéria Orgânica
MgSO₄	Sulfato de Magnésio

NaNO₃	Nitrato de Sódio
N	Nitrogênio
NH₃	Amônia
NPK	Nitrogênio, Fósforo e Potássio
O	Oxigênio
ORP	Óleo Residual Derivado de Petróleo
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
Ph	Potencial hidrogeniônico
PO₄³⁻	Fosfato
Q	Querosene
RNA	Ácido Ribonucléico
S	Enxofre
SO₄³⁻	Sulfato
TSB	Tripic Soy Broth

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	8
Figura 2 - Estrutura molecular de alguns tipos de BTEXs	9
Figura 3 - Esquema do processo de destilação fracionada do petróleo bruto	12
Figura 4 - Localização do Departamento de Biologia - FCAV/UNESP.....	18
Figura 5 - Localização da coleta do solo de cana-de-açúcar em Bebedouro - SP ..	19
Figura 6 - Localização da coleta do solo de alho em Pitangueiras - SP.....	19
Figura 7 - Unidade (tanque de 2000 litros) para armazenamento e separação de óleo usado pela empresa Nonino®, que atua no maquinário agrícola, da qual serão coletadas amostras (sedimento, água e resíduo oleoso). (A) Reservatório interno; (B) Vista externa; (C) G Grelha de escoamento para reservatório; (D) Detalhe do ponto de captação de resíduos; (E) Detalhe do ponto de escoamento de água após decantação; (F) Tambores para armazenamento do ORP (Autor: Souza, JAM)	20
Figura 8 - Colunas de Winogradsky montadas a partir dos solos sob cultivo agrícola	21
Figura 9 - Isolados das CWs crescidos em meio de cultivo sólido TSB	30
Figura 10 - <i>Heatmap</i> da diversidade morfológica de isolados bacterianos por Coluna de Winogradsky	33
Figura 11 - Perfil de crescimento de consórcios bacterianos em meio de cultivo contendo diferentes derivados de petróleo como única fonte de carbono	35
Figura 12 - Isolado bacteriano CW-3.2 desafiado em diferentes fontes de carbono	36
Figura 13 - Perfil de cultivos dos diferentes consórcios bacterianos adquiridos na presença de ORP (CB-ORP) ou na presença de ORP+Diesel (CB-D), desafiados com ORP, Diesel (D) e Querosene (Q), independentemente, como única fonte de carbono.....	37
Figura 14 - Cromatograma total de íons representando o perfil químico de ORP, obtido por CG/EM	39
Figura 15 - Cromatogramas CG/EM comparando o perfil de compostos de ORP cru antes e após biodegradação pela ação de diferentes consórcios bacterianos (CBs), enriquecido ou não com diesel (D) ou querosene (Q).....	40
Figura 16 - Árvore filogenética baseada em sequências <i>ITS1-ITS4</i> mostrando a relação entre espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e nosso isolado - destacado em vermelho	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais constituintes do petróleo e suas proporções.....	6
Tabela 2 - Classificação dos tipos de petróleo segundo o grau API e seu valor comercial.	11
Tabela 3 - Análise química dos solos alho (A) e cana (C).	30
Tabela 4 - Aspectos morfológicos das colônias dos diferentes isolados bacterianos das Coluna de Winogradsky.	31
Tabela 5 - Similaridades entre as sequências do gene <i>16S rRNA</i> , dos isolados bacterianos baseados no GenBank (<i>BLASTn</i>).	34
Tabela 6 - Áreas cromatográficas obtidas por CG-EM para tolueno e xileno. A diminuição da área em relação à amostra crua (ORP) reflete o consumo dos compostos durante os bioensaios de degradação bacteriana.....	40
Tabela 7 - Detecção e quantificação das aflatoxinas produzidas pelo isolado fúngico <i>A. flavus</i> -similar.....	42

RESUMO

A biorremediação surge como alternativa efetiva e competitiva para tratamento de ambientes contaminados com diferentes produtos xenobióticos, dentre os quais destacam-se o petróleo como óleo bruto e, também seus derivados. A biorremediação procura apresentar técnicas ecológicas e economicamente sustentáveis para remediar ambientes poluídos por meio da aplicação de organismos vivos, particularmente microrganismos, que realizam a biotransformação do composto contaminante dominante em produtos que não oferecem riscos à saúde humana, animal e ambiental. Esse trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar bactérias com potencial na biodegradação de derivados de petróleo, com foco na atividade dos isolados desafiados em diferentes fontes de carbono, como o óleo residual oriundo de um tanque de descarte de uma empresa de maquinário agrícola, diesel e querosene. Para o isolamento dos microrganismos, foram montadas diferentes colunas de Winogradsky para selecionar os organismos mais bem adaptados a diferentes condições em que o contaminante foi adicionado: Coluna 1: Solo alho, sendo 1 quilograma de solo e adição de 5% (p/v) de ORP; Coluna 2: Solo alho, sendo 1 quilograma de solo enriquecido com NPK (nitrogênio, fósforo e potássio – 4:14:8) à 10% (p/p) e adição de 5% (p/v) de ORP; Coluna 3: Solo cana, sendo 1 quilograma de solo e adição de 5% (p/v) de ORP; Coluna 4: Solo cana, sendo 1 quilograma de solo, enriquecido com NPK (4:14:8) à 10% (p/p) e adição de 5% (p/v) de ORP; e Coluna 5: Solo cana, sendo 1 quilograma de solo enriquecido com NPK (4:14:8) à 10% (p/p) e ORP em excesso. Embora apresentassem pouca variação visual entre si, as diferenças químicas observadas entre os solos das diferentes CW influenciaram na seleção da comunidade bacteriana estabelecida em cada uma delas. A diversidade das condições das CWs montadas refletiu nos diferentes padrões morfológicos dos isolados bacterianos, refletindo variações na coloração, forma, elevação, tipo de borda e padrão de Gram. As bactérias gram-negativas foram predominantes (~ 80%), consistente com ambientes ricos em M.O disponível e variações nas tensões de oxigênio. Alguns dos isolados bacterianos identificados tiveram assinatura taxonômica com táxons que englobam *Providencia vermicola* (EcoRem2 e EcoRem3), *Bacillus tropicus* (EcoRem4) e uma linhagem próxima de *Pseudomonas aeruginosa* (EcoRem1) representam grupos conhecidos por sua versatilidade metabólica. A identificação de um isolado fúngico como *Aspergillus flavus*-similar, de significativa importância em biorremediação, corroborada por análise filogenética e elevada identidade genética, revelou a presença de fungo toxigênico na CW-5. Dentre os 15 consórcios bacterianos isolados, os consórcios CB-R2 e CB-R6 mostraram-se mais eficientes na redução dos picos cromatográficos de derivados do petróleo, particularmente quando enriquecidos com querosene, indicando maior biodegradação simultânea de tolueno e xileno. Estes resultados comprovam a eficiência das CWs em selecionar e escrutinar microrganismos de interesse biotecnológico. Esses microrganismos isolados, têm potencial de serem adaptados a ferramentas aplicadas nas técnicas de biorremediação.

Palavras-chave: Biorremediação; biodegradação; contaminantes orgânicos; solos poluição.

ABSTRACT

Bioremediation emerges as an effective and competitive alternative for the treatment of environments contaminated with different xenobiotic products, among which crude oil and its derivatives stand out. It seeks to provide ecologically and economically sustainable techniques to remediate polluted environments through the application of living organisms, particularly microorganisms, that carry out the biotransformation of the dominant contaminant into products that pose no risks to human, animal, or environmental health. This study aimed to isolate, characterize, and evaluate bacteria with potential for the biodegradation of petroleum derivatives, focusing on the activity of isolates challenged with different carbon sources, such as residual oil from the disposal tank of an agricultural machinery company, diesel, and kerosene. For microorganism isolation, different Winogradsky columns were assembled to select organisms best adapted to the various conditions in which the contaminant was added: Column 1: garlic soil, consisting of 1 kilogram of soil with the addition of 5% (w/v) ORP; Column 2: garlic soil, consisting of 1 kilogram of soil enriched with 10% (w/w) NPK (nitrogen, phosphorus, and potassium) 4:14:8 and 5% (w/v) ORP; Column 3: sugarcane soil, consisting of 1 kilogram of soil with the addition of 5% (w/v) ORP; Column 4: sugarcane soil, consisting of 1 kilogram of soil enriched with 10% (w/w) NPK (4:14:8) and 5% (w/v) ORP; and Column 5: sugarcane soil, consisting of 1 kilogram of soil enriched with 10% (w/w) NPK (4:14:8) and excess ORP. Although the columns exhibited little visual variation, the chemical differences observed among the soils of the different CWs influenced the selection of the bacterial community established in each one. The diversity of conditions in the assembled CWs reflected in the distinct morphological patterns of the bacterial isolates, showing variations in coloration, shape, elevation, colony margins, and Gram staining profile, with Gram-negative bacteria being predominant (~80%), consistent with environments rich in available organic matter and variations in oxygen tension. Some of the identified bacterial isolates displayed taxonomic signatures related to taxa such as *Providencia vermicola* (EcoRem2 and EcoRem3), *Bacillus tropicus* (EcoRem4), and a lineage closely related to *Pseudomonas aeruginosa* (EcoRem1), representing groups known for their metabolic versatility. The identification of a fungal isolate as *Aspergillus flavus*-like, of significant importance in bioremediation, corroborated by phylogenetic analysis and high genetic identity, revealed the presence of a toxigenic fungus in CW-5. Among the 15 isolated bacterial consortia, CB-R2 and CB-R6 proved to be the most efficient in reducing chromatographic peaks of petroleum derivatives, particularly when enriched with kerosene, indicating greater simultaneous biodegradation of toluene and xylene. These results confirm the efficiency of the CWs in selecting and screening microorganisms of biotechnological interest, and the microorganisms isolated here have the potential to be adapted for application in bioremediation techniques.

Keywords: Bioremediation; biodegradation; organic contaminants; soil contamination

1. INTRODUÇÃO

A poluição dos solos por derivados de petróleo tem se tornado um problema ambiental de grande escala nos últimos anos (GIELNIK et al., 2019; SONG et al., 2019). A contaminação dos recursos hídricos e do solo é uma consequência direta dos derramamentos de petróleo bruto, que ocorrem globalmente em todas as fases de sua cadeia produtiva, incluindo processamento, armazenamento e utilização (KONUR, 2021).

Dada a significativa influência de seus compostos alifáticos, aromáticos e heterocíclicos sobre os organismos vivos, a poluição de ecossistemas por substâncias orgânicas persistentes, notadamente os hidrocarbonetos derivados do petróleo bruto, constitui uma preocupação ambiental de grande relevância (FENG et al., 2021; MICHAEL-IGOLIMA et al., 2022). Dentre esses componentes, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são notáveis por sua persistência no meio. Esta característica é atribuída a suas propriedades físico-químicas intrínsecas, como baixa solubilidade, elevado peso molecular e a estabilidade conferida pela fusão de dois ou mais anéis aromáticos (PATEL et al., 2020; BARATHI et al., 2023). Adicionalmente, a capacidade de bioacumulação desses compostos está intrinsecamente ligada a uma série de efeitos adversos à saúde, abrangendo toxicidade celular (citotóxicos), potencial carcinogênico, mutagenicidade e teratogenicidade (TIAN et al., 2021; MULLA et al., 2023).

A contaminação do solo por hidrocarbonetos gera múltiplos impactos e de longo prazo. Os efeitos físicos incluem alterações na estrutura do solo, redução da porosidade e aumento da compactação. No âmbito químico, observam-se mudanças no pH e na disponibilidade de nutrientes, fatores cruciais para o crescimento e produtividade vegetal. As consequências biológicas envolvem a diminuição da atividade, diversidade e composição microbiana, o que, por sua vez, compromete a fertilidade e a produtividade do solo. Em última análise, a redução do rendimento das culturas causada por essa contaminação acarreta um impacto econômico significativo para o setor agrícola (MOHANTA et al., 2024).

Diante da urgência de recuperação ambiental, diversas técnicas podem ser empregadas no tratamento de solos contaminados por petróleo. No entanto, os métodos físico-químicos impõem desafios devido ao seu alto custo e à geração de poluentes secundários (WANG et al., 2021; MEKONNEN et al., 2024; MOKRANI et al., 2024). Em comparação, os processos biológicos, que utilizam fungos, bactérias e plantas, destacam-se por serem mais sustentáveis e por não gerarem subprodutos tóxicos (SHAH e SHAH, 2020). Embora a biorremediação seja bastante promissora para solos contaminados por petróleo devido ao seu custo relativamente baixo e à sua natureza ambientalmente segura, essa abordagem ainda não é utilizada com a frequência ideal (FENG et al., 2021; VASILYEVA et al., 2022).

O potencial de degradação e transformação de hidrocarbonetos em metabólitos menos tóxicos, inerente aos microrganismos e ao seu arsenal enzimático, constitui o princípio fundamental dos processos de biorremediação. Esta é uma abordagem prática e econômica para solucionar uma ampla variedade de problemas de contaminação. Alguns gêneros já descritos na literatura, possuem um alto potencial na biodegradação de derivados de petróleo, como *Alcanivorax* (SCHNEIKER et al., 2006), *Marinobacter* (GRIMALD et al., 2012), *Pseudomonas* (WALD et al., 2015), *Bacillus* (LIMA et al., 2019) e *Rhodococcus* (MO et al., 2022). A metodologia em questão pode ser aplicada por meio de processos *in situ*, que consiste na introdução de microrganismos diretamente no local poluído, ou *ex situ*, que requer o transporte do solo contaminado para uma unidade de tratamento específica (MOHANTA et al., 2024). Além disso, a biorremediação pode ser ainda mais eficaz com a utilização de consórcios microbianos (FENG et al., 2021; CHETTRI et al., 2024). A degradação completa dos diversos compostos presentes no petróleo bruto raramente é alcançada por uma única espécie bacteriana. Dessa forma, a otimização da biorremediação em ambientes contaminados é obtida por meio da aplicação de consórcios microbianos, que promovem um efeito sinérgico essencial para a eficácia do processo (WU et al., 2016; KOUR et al., 2021).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi obter recursos biológicos na forma de isolados bacterianos e consórcios bacterianos com habilidade na biorremediação de ambientes contaminados com derivados de petróleo, na forma de óleo residual industrial na área agrícola.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo consistiu no isolamento, caracterização e seleção de microrganismos e de consórcios bacterianos capazes de biotransformar e biodegradar óleo cru e seus derivados, sendo isolados de solos tratados com resíduos de óleo (borra) de um tanque de armazenamento industrial.

2.2 Específicos

Os objetivos específicos consistiram em:

- 1) Bioprospecção e isolamento de bactérias e consórcios bacterianos com metabolismo degradador de óleo pesado e seus derivados, a partir de solos tratados com resíduo de óleo lubrificante industrial;
- 2) Otimização do cultivo dos isolados na presença de óleo lubrificante residual industrial, óleo diesel e querosene;
- 3) Determinação do potencial de bioconversão com vistas na biorremediação;
- 4) Análise química dos compostos biodegradados no caldo de cultura, por cromatografia gasosa;
- 5) Caracterização molecular das bactérias isoladas da coluna de Winogradsky por meio do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Petróleo e seus derivados

A palavra petróleo tem origem no latim *petroleum*, composto por *petra* (pedra) e *oleum* (óleo), expressão que pode ser traduzida como “óleo proveniente da pedra”. É um líquido natural, oleoso e inflamável, composto majoritariamente por hidrocarbonetos, além de pequenas quantidades de nitrogênio, oxigênio, enxofre e metais como níquel e vanádio (RAMIREZ-CORREDORES, 2017; LI et al., 2021; WANG et al., 2021). Sua coloração varia do incolor ao preto, e sua densidade é menor que a da água.

Do ponto de vista geológico, a origem do petróleo é explicada por duas principais teorias: a biogênica e a abiogênica, cada uma com implicações químicas distintas (VOLKOVA et al., 2021).

A teoria biogênica propõe que o petróleo se originou a partir da decomposição de matéria orgânica vegetal e animal. Durante o processo de fossilização, compostos como lipídios, proteínas e carboidratos sofrem transformações térmicas em condições sedimentares, dando origem ao querogênio, materiais precursores ricos em hidrocarbonetos complexos. A partir desses querogênios, ocorre o craqueamento térmico, promovendo a formação de hidrocarbonetos mais leves, como alcanos, por exemplo, CH₄ (metano), C₂H₆ (etano), C₃H₈ (propano) e aromáticos C₆H₆ (benzeno), C₁₀H₈ (naftaleno) e compostos asfálticos. Tais moléculas apresentam propriedades químicas típicas de hidrocarbonetos saturados ou aromáticos, com ligações estáveis C-C e C-H e cadeias de carbono de variados tamanhos (HÖÖK et al., 2010).

Já a teoria abiogênica sugere que o petróleo se formou por processos inorgânicos, através de reações químicas envolvendo compostos de baixo peso molecular, como a síntese de Fischer–Tropsch, na qual CO₂ (dióxido de carbono) e H₂ (di-hidrogênio) reagem sob altas pressões e temperaturas. Nessa perspectiva, o metano (CH₄) seria gerado pela redução do CO₂, enquanto hidrocarbonetos de cadeia maior poderiam resultar de processos de polimerização ou ciclização

(PROSKUROWSKI et al., 2008). Assim, a formação de compostos como alcanos, cicloalcanos e aromáticos poderia ocorrer independentemente da presença de matéria orgânica, em condições geológicas extremas, produzindo moléculas com estabilidade e propriedades químicas semelhantes às encontradas no petróleo natural (KUTCHEROV e KRAYUSHKIN, 2010).

Das duas hipóteses, a teoria biogênica é amplamente aceita pela comunidade científica, sustentada por evidências geoquímicas e isotópicas que associam o petróleo à decomposição de matéria orgânica acumulada em ambientes aquáticos sob baixa oxigenação e ação das bactérias. Ao longo de milhões de anos, os restos de organismos foram soterrados por camadas sucessivas de sedimentos, sofrendo compactação e aquecimento, o que desencadeou reações químicas que culminaram na formação do petróleo. Esse processo ocorre a temperaturas entre 49 °C e 177 °C, correspondendo a profundidades de aproximadamente 1.500 a 6.400 metros. Quando a matéria orgânica é submetida a temperaturas acima desse limite, tende a se converter em gás natural ou, sob condições ainda mais extremas, em grafita (BRANCO, 2014).

A partir desses processos, forma-se uma mistura complexa de compostos orgânicos, os hidrocarbonetos, que constituem a base molecular do petróleo e definem suas propriedades químicas e energéticas. Esse recurso natural, de importância crucial, cujo aproveitamento exerceu profunda influência sobre o desenvolvimento socioeconômico global, sendo considerado um elemento vital de sustentação da sociedade moderna e da economia mundial (VASSILIOU, 2018) e é atualmente a principal fonte de energia do mundo.

Compreender o petróleo desde sua formação geológica até seus efeitos ambientais é, portanto, fundamental para o avanço rumo a uma transição energética sustentável.

Para que isso seja possível, os pesquisadores ao longo dos anos foram analisando frações do petróleo a fim de reduzir a complexidade do petróleo bruto (BISSADA et al., 2016; VOZKA, 2019 COVAS et al., 2020).

3.1.1 Composição química e estrutura molecular

Apesar da diversidade de tipos de petróleo existentes no mundo, a proporção dos elementos constituintes (C, H, S, N, O e metais) é relativamente constante, variando mais quanto à estrutura e ao tamanho das moléculas do que em relação aos elementos que as compõem (SPEIGHT, 2006).

Tabela 1 - Principais constituintes do petróleo e suas proporções.

Elemento	Teor em massa (%)
Carbono	82
Hidrogênio	12
Nitrogênio	4
Oxigênio	1
Sais	0,5
Metais (Fe, Cu etc.)	0,5

Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

3.1.2 Hidrocarbonetos e moléculas-alvo

Os hidrocarbonetos, um dos principais constituintes do petróleo, são compostos formados exclusivamente por carbono e hidrogênio e podem ser agrupados em três classes principais:

1. Alifáticos (ou acíclicos): alcanos, alcenos e alcinos, geralmente lineares ou ramificados, predominantes nas frações mais leves, como gases e gasolina.
2. Alicíclicos: compostos por cadeias fechadas saturadas, como cicloalcanos, comuns nas frações médias e pesadas.
3. Aromáticos: estruturas cíclicas conjugadas (ex.: benzeno, tolueno, naftaleno), com alta estabilidade química e amplamente empregados como precursores industriais e combustíveis de alto desempenho.

Além desses grupos, o petróleo contém heterocompostos (moléculas contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio) e metais traço, como níquel e vanádio, que interferem na estabilidade térmica e nas etapas de refino. Essa diversidade molecular é

responsável pelas variações de densidade, viscosidade e rendimento energético, servindo de base para sua classificação físico-química.

Entre as três classes principais, os hidrocarbonetos aromáticos destacam-se por sua relevância ambiental, toxicológica e industrial, o que justifica uma análise mais detalhada dos seus subgrupos estudados neste trabalho.

3.1.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) compreendem um grupo diversificado de mais de uma centena de compostos orgânicos, caracterizados pela presença de dois ou mais anéis benzênicos fundidos ou condensados em distintas conformações estruturais. Ocorrem naturalmente no carvão, no petróleo bruto e na gasolina também são gerados durante a combustão incompleta ou a pirólise de matéria orgânica (CETESB, 2022). Eles podem ser classificados de acordo com o número de anéis aromáticos condensados como HPAs leves (2-3 anéis) ou pesados (4-6 anéis), sendo estes últimos mais estáveis e tóxicos do que os leves (PURCARO et al., 2013). Alguns exemplos de HPAs são: benzo(α)pireno, benzo(α)antraceno, benzo(β)fluoretano, antraceno, perileno, naftaleno e acenafteno (CETESB, 2022).

Esses compostos são formados, predominantemente, durante processos de combustão incompleta de matéria orgânica. A presença de HPAs no ambiente decorre de diversas fontes naturais e antrópicas, podendo alcançar a atmosfera por meio de emissões vulcânicas, incêndios florestais, queima de carvão e gases de escapamento veiculares, bem como atingir os corpos hídricos através de efluentes provenientes de estações de tratamento de esgoto e descargas industriais (ATSDR et al., 1995).

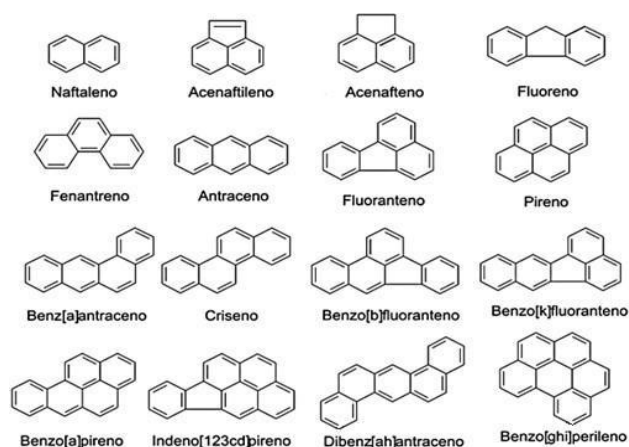
Os HPAs podem provocar estresse nas comunidades microbianas do solo, resultando na redução da atividade e do crescimento de bactérias ecologicamente relevantes, como as fixadoras de nitrogênio, desestabilizando o ecossistema presente no local (LINDGREN et al., 2014).

Para elucidar a distribuição molecular dos HPAs e de outros aromáticos presentes no petróleo, estudos como o de Coutinho et al., (2022) empregam

metodologias integradas que combinam destilação fracionada, cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massas (EM). Após o fracionamento do petróleo em intervalos de ebulição bem definidos, cada corte é submetido à CG, técnica na qual os analitos são volatilizados e transportados por uma fase móvel gasosa através de uma coluna capilar revestida com uma fase estacionária de alta eficiência. A separação ocorre por diferenças nos coeficientes de partição e nas interações intermoleculares entre cada composto e a fase estacionária, resultando em tempos de retenção distintos, mesmo para HPAs estruturalmente semelhantes. Em seguida, os compostos eluídos são ionizados na fonte da espectrometria de massas, tipicamente por ionização por impacto eletrônico, que promove padrões reprodutíveis de fragmentação molecular. Esses íons são então separados segundo sua razão massa/carga (m/z) e detectados, permitindo tanto a identificação estrutural quanto a quantificação dos HPAs presentes. Para frações pesadas, ricas em HPAs de maior massa e elevada complexidade, recorre-se à espectrometria de massas de ultra-alta resolução, capaz de discriminar compostos isobáricos e determinar fórmulas moleculares exatas, ampliando significativamente a capacidade de caracterização petroleômica e complementando as limitações da CG convencional (LIU et al., 2023).

Assim, adotar estratégias sustentáveis para a biodegradação desses hidrocarbonetos torna-se fundamental para mitigar os efeitos deletérios associados à sua presença no solo.

Figura 1 - Estruturas químicas de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.

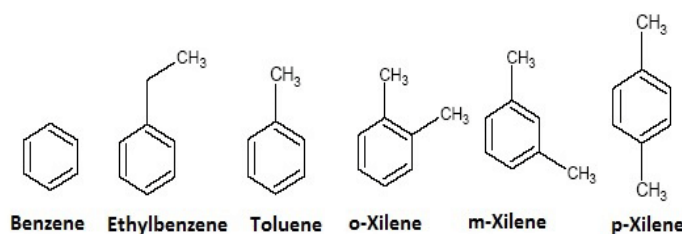


Fonte: Retirado de Yan (2004)

3.1.4 Hidrocarbonetos Monocíclicos Aromáticos

Hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (HMAs) são compostos orgânicos presentes no petróleo que possuem um único anel aromático, que é um anel de seis carbonos com elétrons pi deslocalizados, conferindo estabilidade à molécula. podendo ter ramificações saturadas ou insaturadas ligadas a ele. Os HMAs mais abundantes são benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, os chamados BTEXs (CABRERA-PEREZ et al., 2016).

Figura 2 - Estrutura molecular de alguns tipos de BTEXs.



Fonte: Retirado de Do Nascimento (2017)

Os BTEX apresentam elevada volatilidade e moderada solubilidade aquosa, propriedades físico-químicas que decorrem de suas baixas massas molares e da estrutura aromática mononuclear, resultando em pressões de vapor relativamente altas e coeficientes de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) que favorecem mobilidade entre fases (ATSDR, 2004).

Em comparação com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os BTEX tendem a ser menos hidrofóbicos e menos persistentes, sendo normalmente mais biodisponíveis e mais rapidamente atenuados por processos microbianos e perdas físicas, ou seja, na volatilização ou diluição, embora a taxa de atenuação depende fortemente das condições locais com oxigênio e nutrientes (MARGESIN et al., 2003).

Essa combinação de volatilidade e solubilidade explica por que os BTEX se movimentam com facilidade através do perfil edáfico e frequentemente atingem águas

subterrâneas, tornando-se marcadores sensíveis de contaminação recente por derivados de petróleo e vazamentos de combustíveis (CHEN et al., 2022).

No contexto de solos contaminados por BTEX, a caracterização analítica desses compostos é fundamental para compreender tanto sua dinâmica ambiental quanto a eficiência de processos biológicos de degradação. Estudos recentes destacam que métodos baseados CG/EM constituem a principal abordagem para quantificar BTEX em matrizes de solo devido à sua alta sensibilidade, seletividade e capacidade de diferenciar isômeros estruturalmente semelhantes, como os diferentes xilenos. Entretanto, a complexidade físico-química do solo, caracterizada por elevada heterogeneidade, presença de matéria orgânica e forte adsorção de compostos aromáticos, exige etapas rigorosas de pré-tratamento da amostra, envolvendo técnicas como *headspace*, microextração em fase sólida ou extração assistida por solventes. Tais procedimentos são essenciais para liberar BTEX retidos na matriz sólida e garantir quantificação precisa, sobretudo em estudos que monitoram a atividade de bactérias degradadoras, nos quais os teores residuais desses compostos servem como indicador da eficiência da biodegradação. Dessa forma, a integração entre métodos de extração adequados e CG/EM torna-se indispensável para avaliar a atenuação natural ou estimulada de BTEX no solo e para elucidar a resposta microbiológica diante da presença desses hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (VARONA-TORRES et al., 2018).

3.1.5 Classificação da gravidade API

O petróleo é classificado em leve, médio e pesado com base em duas propriedades inter-relacionadas, o grau API (*American Petroleum Institute*) e a viscosidade, que juntas indicam a facilidade de extração, transporte e refino do óleo bruto. O grau API é medido pela seguinte fórmula:

$$^{\circ}\text{API} = \frac{141,5}{\text{DENSIDADE RELATIVA A } 60^{\circ}\text{F}} - 131,5$$

Essa escala é inversa à densidade, valores maiores de °API indicam maior “leveza” do óleo, ou seja, menor densidade, fluidez mais elevada e em geral, menor teor de compostos pesados (MOHAMMAD e KHORRAMI, 2023).

Costuma-se adotar as seguintes faixas aproximadas segundo a gravidade API:

Tabela 2 - Classificação dos tipos de petróleo segundo o grau API e seu valor comercial.

Tipo de petróleo	°API	Valor comercial
Petróleo leve	°API > ≈ 31,1 °API	Maior valor comercial, mais fácil de refinar
Petróleo médio	°API entre ≈ 22,3 ° e ≈ 31,1 °API	Valor intermediário
Petróleo pesado	°API < ≈ 22,3 °API	Menor valor, mais difícil e mais caro de refinar

Fonte: Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural, e Biocombustíveis

Conforme o grau API diminui, o óleo apresenta maior densidade e viscosidade, maior conteúdo de frações pesadas (resinas, asfaltenos, metais e heteroátomos) e menor proporção de hidrocarbonetos leves que originam combustíveis como gasolina e diesel. Essa classificação é amplamente usada na indústria como indicador prático da qualidade do óleo bruto e dos desafios técnico-econômicos de seu refino.

3.1.6 Refino e derivados do petróleo

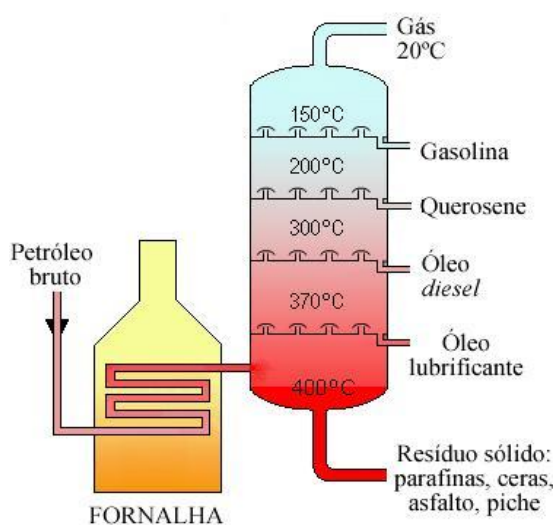
O refino do petróleo é o conjunto de processos industriais responsáveis por transformar o óleo bruto em derivados comercializáveis. A principal etapa é a destilação fracionada, na qual o petróleo é aquecido e separado conforme os diferentes pontos de ebulição de suas frações.

As frações mais leves, gases, gasolina e querosene, são coletadas nas zonas superiores da coluna, enquanto as frações mais pesadas, óleo diesel, lubrificantes e asfalto, permanecem nas regiões inferiores. Processos subsequentes, como craqueamento catalítico, reformação e hidrotratamento, são aplicados para quebrar moléculas maiores, remover impurezas e ajustar o teor de hidrocarbonetos desejados (COUTINHO et al., 2022).

O querosene é constituído principalmente por hidrocarbonetos de 10 a 16 átomos de carbono por molécula, predominantemente alcanos e cicloalcanos, com menores proporções de aromáticos (BRITANNICA, 2024). Já o diesel contém entre 50 e 60% de alcanos, 20 a 30% de cicloalcanos (naftenos) e 7 a 30% de aromáticos, o que influencia propriedades como número de cetano e eficiência de combustão (IVANOVA et al., 2024).

Comparativamente, o diesel apresenta uma faixa de carbonos maior (C_{12} - C_{20}) e maior massa molecular média que o querosene (C_9 - C_{16}), o que se reflete em maior densidade e poder lubrificante (IEA-AMF, 2024). Essa distinção entre frações destiladas é essencial para compreender o rendimento energético e a aplicação industrial de cada derivado.

Figura 3 - Esquema do processo de destilação fracionada do petróleo bruto.



Fonte: <http://www.mundoeducacao.com/quimica/refino-petroleo.htm>

3.2 Aspectos ambientais e desafios associados

Apesar de sua relevância econômica, o petróleo está associado a graves impactos ambientais. O processo de extração, transporte e refino provoca emissões atmosféricas de compostos poluentes, contaminação de solos e águas, além da liberação de gases de efeito estufa.

Durante o refino, a queima incompleta e o descarte inadequado de resíduos geram poluição atmosférica e riscos à saúde pública. Compostos como os HPAs são altamente tóxicos e persistentes, acumulando-se em organismos vivos e ecossistemas (TEIXEIRA et al., 2024).

Embora o petróleo seja um recurso estratégico, seus impactos na agropecuária são profundamente insidiosos e duradouros. Hidrocarbonetos derivados de derramamentos comprometem a produtividade vegetal por meio de fitotoxicidade, redução de biomassa e disfunções fisiológicas nas plantas (DA SILVA CORREA et al., 2022)

A contaminação por hidrocarbonetos interfere em processos biogeoquímicos essenciais, por exemplo, mostram que a nitrificação é severamente inibida, o que pode comprometer a ciclagem de nitrogênio no solo agrícola (URAKAWA et al., 2019). Muitos desses compostos se degradam muito lentamente, o que agrava a persistência da contaminação e dificulta a recuperação ecológica (BALSEIRO-ROMERO et al., 2018). Os impactos socioambientais são notáveis, onde comunidades rurais que dependem da terra para sua subsistência podem sofrer redução da fertilidade do solo, exposição crônica a poluentes e desigualdade ambiental (ELLOS e BACOSA, 2025).

Diante disso, pesquisas recentes buscam aprimorar o refino e desenvolver tecnologias limpas, como processos de biorremediação e tratamento de efluentes, capazes de mitigar os impactos ambientais da cadeia do petróleo

3.3 Bioprospecção microbiana de hidrocarbonetos

A degradação microbiana dos hidrocarbonetos (HCs) é um processo bioquímico sequencial e complexo, cuja via metabólica primária é determinada pela disponibilidade de oxigênio no ambiente. Em condições aeróbicas, a degradação é metabolicamente mais vantajosa e, conseqüentemente, mais rápida. O ataque inicial aos HCs é mediado por enzimas oxigenases, que catalisam a introdução de átomos de oxigênio na molécula do substrato, iniciando a quebra (PEIXOTO et al., 2011).

Para os alcanos (hidrocarbonetos alifáticos), enzimas-chave como as alcano hidroxilases (e.g., AlkB, P, AlmA) convertem o alcano em um álcool, que é subsequentemente oxidado a um ácido carboxílico. Este último é processado pela β -oxidação, gerando acetil-CoA que é então canalizado para o ciclo do ácido cítrico para mineralização (PEIXOTO et al., 2011; MAPELLI et al., 2017).

Análises metagenômicas tem destacado a relevância das Enzimas P (como CYP53, CYP116, CYP102, CYP645 e CYP52) e de estruturas celulares como o peroxissomo na oxidação, hidroxilação e epoxidação de HCs, destacando a complexidade enzimática envolvida, especialmente em consórcios bactéria-fungo (LIU et al., 2022; ATAKPA et al., 2022).

A degradação de hidrocarbonetos aromáticos é iniciada por dioxigenases, que promovem a oxidação do anel aromático, resultando na formação de catecol ou análogos. O catecol é então submetido à clivagem por catecol dioxigenases, e os produtos são integrados às vias metabólicas centrais (PEIXOTO et al., 2011).

Em ambientes com limitação de oxigênio, a degradação anaeróbica torna-se o mecanismo dominante, sendo essencial em sedimentos, aquíferos e lodos (PEIXOTO et al., 2011). Embora mais lenta, esta via é crucial para a remediação *in situ*. A ativação do HCs ocorre tipicamente pela adição de fumarato ao carbono secundário, catalisada por alquil-succinato sintases (MAPELLI et al., 2017)

3.4 Biorremediação

A biorremediação é uma ferramenta biotecnológica na qual são utilizados microrganismos (bactérias e/ou fungos) ou plantas que possuem a capacidade de degradar bioquimicamente substâncias contaminantes, seja para a limpeza ou descontaminação de ambientes afetados por poluentes, com o propósito de restaurar o equilíbrio ecológico do local.

Estes poluentes ambientais podem ser classificados em inorgânicos, orgânicos ou biológicos. Os poluentes orgânicos incluem os resíduos domésticos, agrícolas e os industriais e estes podem ser prejudiciais à saúde dos seres humanos, dos animais (SIDDQUA et al., 2022) e dos microrganismos do solo (AHMED e SINGH, 2025).

Os primeiros estudos na área foram após o primeiro grande derramamento de petróleo que se deu no ano de 1989, no Alasca, pelo navio petroleiro Exxon Valdez, derramando mais de 35 mil toneladas de petróleo no mar (WOLFE et al., 1994).

Nas últimas décadas, a intensificação das atividades industriais nos setores petrolíferos, agrícola, farmacêutico e têxtil tem impulsionado a geração de uma ampla gama de novos produtos, como polímeros, agrotóxicos, fármacos e corantes sintéticos. Muitos desses compostos demandam ou originam substâncias químicas incomuns aos organismos vivos, denominados xenobióticos. Em relação aos resíduos de petróleo, essas substâncias podem apresentar um elevado grau de toxicidade, provocando danos potencialmente irreversíveis à saúde humana e aos ecossistemas. (PURCARO et al., 2013; DOMINGO e NADAL, 2015; RENGARAJAN et al., 2015; SAMPAIO et al., 2021). Seus produtos de degradação são frequentemente persistentes e bioacumulativos, podendo induzir efeitos mutagênicos e alterar a dinâmica ecológica das comunidades biológicas, promovendo a eliminação seletiva de espécies e a modificação de estruturas tróficas funcionais.

As práticas de remediação ambiental podem ser com a utilização de microrganismos autóctones ou introduzidos (nativos ou organismos geneticamente modificados). Dotados de potencial para a biodegradação de compostos xenobióticos, esses organismos são capazes de converter tais substâncias em produtos de degradação menos recalcitrantes que a molécula inicial ou, em estágios mais

avançados, promover a mineralização completa do xenobiótico, originando compostos simples, como dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O), amônia (NH_3), sulfato (SO_4^{2-}) e fosfato (PO_4^{3-}) (SILVA et al., 2016).

As estratégias de biorremediação podem ser diferenciadas conforme o ambiente em que são aplicadas, sendo agrupadas em modalidades *in situ* e *ex situ*. A biorremediação *in situ* envolve o tratamento do xenobiótico diretamente no local afetado, abrangendo abordagens como biorremediação passiva, bioestimulação e bioaugmentação. Por sua vez, a biorremediação *ex situ* requer a remoção do material contaminado e seu encaminhamento a unidades específicas de tratamento, como biorreatores, biopilhas ou sistemas de compostagem.

A biorremediação é aplicada de duas formas:

In situ:

- a) De maneira passiva, ou seja, pelos próprios microrganismos presentes no local, no qual estes vão descontaminando o local passivamente. Devido à dependência dos processos naturais, ela é lenta, o que faz com que haja uma necessidade da aplicação de um conjunto de técnicas.
- b) Pela bioestimulação, na qual são adicionados nutrientes no ambiente contaminado, a fim de aumentar o crescimento da população dos microrganismos daquele local, sendo assim, acelerando naturalmente o processo da biodegradação.
- c) Por bioaugmentação, que consiste na introdução de microrganismos exógenos para complementar a microbiota nativa e acelerar a biodegradação, reduzindo o tempo de adaptação microbiana. Contudo, sua aplicação requer cautela, pois a inserção de espécies exógenas pode gerar impactos ambientais desconhecidos. Esse método costuma ser mais eficaz.

Ex situ:

- a) Utilizando-se biorreatores, que são sistemas fechados nos quais o solo contaminado é combinado com água, resultando na formação de uma suspensão sólida. A formação da suspensão no interior do biorreator favorece a maior disponibilidade dos contaminantes aos micro-organismos

degradadores. Além disso, o ambiente do biorreator é ajustado de modo a otimizar as condições necessárias para maximizar o crescimento microbiano.

- b) Por biopilhas, que é a disposição do material contaminado em montes. Para aplicar essa técnica, o solo é escavado e disposto em biopilhas, onde recebe nutrientes e aeração, visando estimular a microbiota nativa e intensificar a biodegradação dos contaminantes.
- c) Com compostagem, que consiste na utilização de microrganismos termofílicos aeróbios em pilhas especialmente estruturadas para promover a degradação dos contaminantes. Nesses sistemas, os microrganismos convertem a matéria orgânica em compostos mais simples e assimiláveis. Além de favorecer a decomposição, essa técnica diminui o volume de resíduos enviados a aterros sanitários e amplia as possibilidades de reaproveitamento do material tratado.

Diante disso, a biorremediação é a forma mais econômica e sustentável para degradar poluentes no meio ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

4.1.1 Laboratório de Genética Aplicada

Os experimentos de laboratório foram realizados no Laboratório de Genética Aplicada (LGA) vinculado ao LGBBA (Departamento de Biologia, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal).

O Departamento de Biologia está localizado nas coordenadas geográficas 21°14'37.41"S e 48°17'54.84"W.

Figura 4 - Localização do Departamento de Biologia - FCAV/UNESP.



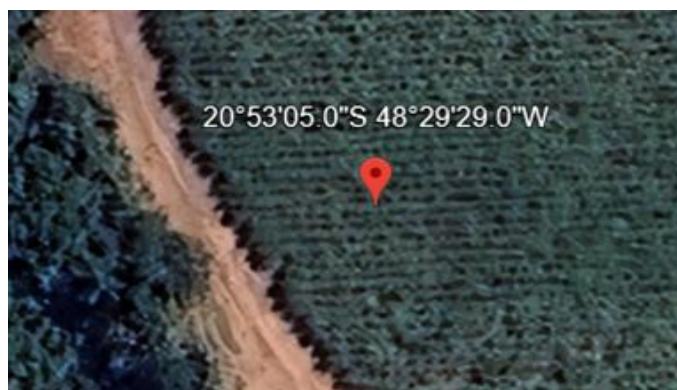
Fonte: Google Earth

4.2 Origem dos solos

As amostras de solo utilizadas no preparo das colunas de Winogradsky foram obtidas em áreas agrícolas localizadas no estado de São Paulo, Brasil. O solo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi coletado em quatro pontos distintos na região de Bebedouro (20°53'05"S 48°29'29"W). Da mesma forma, o solo proveniente de cultivo de alho (*Allium sativum*) foi obtido em quatro pontos da região agrícola de

Pitangueiras (20°59'25"S 48°14'07"W). Em ambos os casos, a coleta foi realizada em profundidade de 0 a 20 cm.

Figura 5 - Localização da coleta do solo de cana-de-açúcar em Bebedouro – SP.



Fonte: Google Earth

Figura 6 - Localização da coleta do solo de alho em Pitangueiras – SP.



Fonte: Google Earth

Para a montagem das colunas, foi elaborado um *pool* de amostras, composto de forma equitativa pelos solos oriundos dos diferentes pontos de coleta, garantindo uma representação homogênea de cada área agrícola.

A análise físico-química dos solos empregados na construção das colunas de Winogradsky envolveu a avaliação do pH, do teor de matéria orgânica (M.O) e da concentração de diferentes macro e microelementos. Essas análises foram

conduzidas pela empresa Athenas Consultoria Agrícola, localizada em Jaboticabal, no interior de São Paulo, e os resultados obtidos serviram de base para a interpretação desenvolvida ao longo deste estudo.

4.3 Origem do óleo residual derivado de petróleo (ORP)

O resíduo utilizado foi concedido pela empresa Nonino® Indústria e Comércio de Implementos Agrícolas Ltda. A coleta foi realizada em tanques de armazenamento de óleo residual de maquinário agrícola (Figura 7) e armazenado em galões plásticos de 5 L cada um. Após isso, foi separado a parte oleosa da aquosa e o ORP foi armazenado em recipiente de vidro e autoclavado para uso nos experimentos laboratoriais.

Figura 7 - Unidade (tanque de 2000 litros) para armazenamento e separação de óleo usado pela empresa Nonino®, que atua no maquinário agrícola, da qual serão coletadas amostras (sedimento, água e resíduo oleoso). (A) Reservatório interno; (B) Vista externa; (C) G Grelha de escoamento para reservatório; (D) Detalhe do ponto de captação de resíduos; (E) Detalhe do ponto de escoamento de água após decantação; (F) Tambores para armazenamento do ORP (Autor: Souza, JAM).



4.4 Montagem da Coluna de Winogradsky (CW)

Foram montadas cinco colunas com os solos das culturas mencionadas anteriormente (cana-de açúcar e alho). Sendo:

Coluna 1: Solo alho, sendo 1 quilograma de solo e adição de 5% (p/v) de ORP;
Coluna 2: Solo alho, sendo 1 quilograma de solo enriquecido com NPK (nitrogênio, fósforo e potássio – 4:14:8) à 10% (p/p) e adição de 5% (p/v) de ORP.
Coluna 3: Solo cana, sendo 1 quilograma de solo e adição de 5% (p/v) de ORP;
Coluna 4: Solo cana, sendo 1 quilograma de solo, enriquecido com NPK (4:14:8) à 10% (p/p) e adição de 5% (p/v) de ORP;
Coluna 5: Solo cana, sendo 1 quilograma de solo enriquecido com NPK (4:14:8) à 10% (p/p) e ORP em excesso.

As colunas tiveram o posicionamento de folha de papel alumínio na parte inferior das provetas para simulação de fase escura da coluna (zona anaeróbica) e tendo como superfície livre a parte superior (zona aeróbica) (Figura 8). O experimento foi mantido nestas condições em temperatura ambiente pelo período de 40 dias.

Figura 8 - Colunas de Winogradsky montadas a partir dos solos sob cultivo agrícola.



Fonte: Autora (2022)

Nota: CW-1: solo alho 5%, CW-2: solo alho/ NPK/ 5%, CW-3: solo cana 5%, CW-4: solo cana/ NPK/ 5 % e CW-5: solo cana/ NPK/ 10%.

4.5 Isolamento e Manutenção de microrganismos a partir da CW

Os isolados bacterianos foram obtidos por meio de homogeneização e diluição seriada de 1 g de amostra de solo de cada CW em solução salina [NaCl 0,1% (p/v)]. Diluições de 10^5 - 10^8 e foram distribuídas em meio sólido de cultivo TSB (*Trypticasein Soy Broth*) [composto por (g/L): K_2HPO_4 (0,6 g); $MgSO_4$ (0,2 g); NaCl (0,1 g); Extrato de Levedura (1,0); Glicose (10,0 g) e Ágar (9,0 g); pH 6,9], acrescido de cicloheximida 50 μ L/mL e incubadas por cerca de 72 h à 27°C. Colônias distintas foram obtidas e cultivadas em meio TSB líquido por 48 h a 27°C, 120 rpm, e estocadas em ultrafreezer a -80°C, na presença de glicerol [40% (v/v)].

Na superfície da CW-A observou-se o crescimento de um fungo filamentosos, o qual foi isolado para estudos posteriores. Este foi coletado com uma alça de platina e plaqueado em placa de Petri contendo meio de cultivo TSB acrescido de ORP à 5%. Alíquotas deste isolado fúngico foram estocadas em ultrafreezer a -80°C, na presença de glicerol [40% (v/v)].

4.6 Caracterização morfológica e classificação de Gram dos isolados bacterianos.

Após serem cultivados em meio TSB [composto por (g/L): K_2HPO_4 (0,6 g); $MgSO_4$ (0,2 g); NaCl (0,1 g); Extrato de Levedura (1,0); Glicose (10,0 g) e Ágar (9,0 g); pH 6,9] sólido a 27°C, por cerca de 72 h, os isolados foram caracterizados fenotipicamente de acordo com a forma (circular, irregular, fusiforme, filamentosos), coloração da colônia (branca e amarela), borda (inteira, ondulada, lobulada, filamentosos e espiral) e elevação (plana, elevada, convexa, crateriforme e papilada).

A classificação das bactérias em Gram-positivas ou Gram-negativas foi realizada por meio da técnica de coloração de Gram (adaptada de Hucker, 1921). Para o procedimento, utilizaram-se lâminas de microscopia, bico de Bunsen, alça de platina, solução de cristal violeta (10 g de corante diluídos em 200 mL de etanol), solução de lugol (2 g de iodo e 4 g de iodeto de potássio em 300 mL de água ultrapura), solução de fucsina básica (2,5 g em 1000 mL de etanol), solução alcoólica (250 mL de etanol e 250 mL de acetona) e água destilada.

O processo se deu em condições assépticas em fluxo laminar, com a preparação do esfregaço bacteriano em lâmina e posterior fixação pelo calor, com o

uso de um bico de Bunsen. Em seguida, aplicou-se cristal violeta por 10 minutos, seguido da adição da solução de lugol por 5 minutos. Após enxágue com água corrente, realizou-se a etapa de descoloração com a solução alcoólica e, por fim, a aplicação da fucsina. O excesso do corante foi retirado por nova lavagem em água.

A diferenciação das bactérias ocorreu a partir da coloração visualizada no microscópio óptico. As Gram-positivas permaneceram em tons violeta ou azulados, em função da espessa camada de peptidoglicano que retém o cristal violeta, enquanto as Gram-negativas assumiram coloração rosada, decorrente da parede celular mais delgada e da presença de membrana externa, que dificulta a fixação do corante primário e evidencia a fucsina na etapa final.

4.7 Extração de DNA genômico das bactérias e amplificação parcial do gene *16S rRNA*.

O protocolo utilizado foi baseado nos métodos descritos por Marmur (1961), com adaptações. Células foram lizadas na presença de lisozima (20 mg/ml) e RNase (50 µg/ml) com dodecil sulfato de sódio (SDS) 25% (p/v) e acetato de sódio 3 M pH 5,2. A extração orgânica foi realizada com 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) (v/v). As amostras foram submetidas à centrifugação a $20.817 \times g$, a 4 °C, por 15 minutos, em centrífuga modelo Eppendorf 5804 R. O DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado. O sedimento foi lavado com 1,0 ml de etanol 70% gelado. O DNA foi quantificado em Nanodrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific - Uniscience) e avaliado quanto a integridade por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml).

Os DNAs genômicos extraídos dos isolados tiveram os 1,5 kb do gene *16S rRNA* amplificados por PCR para a identificação do gênero a que pertencem. Foram aplicados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) universais fD1 e rD1 (WEISBURG et al., 1991), segundo a seguinte reação: 40,0 ng DNA molde; 7,5 pmol de cada primer universal; 1,75 mM MgCl₂; 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos (dNTPs); 2,0 µl de Tampão 10X; 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação foi: 94°C/5 min; 35 ciclos a 94°C/30 s,

56°C/40 s, 72°C/90 s; 72°C/7 min, realizados em um termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.). A concentração foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific - Uniscience) O tamanho e pureza dos amplicons gerados foram verificados por eletroforese [Agarose 0,8% (p/v)].

4.8 Extração de DNA genômico do isolado fúngico e amplificação parcial do gene *ITS (Internal Transcribed Spacer)*.

Para a extração de DNA do isolado fúngico foi utilizando o kit FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals), foram adicionados 500 mg de filamentos fúngico a um tubo Lysing Matrix E, juntamente com 978 µL de tampão fosfato de sódio e 122 µL de tampão MT. Em seguida, o tubo foi colocado no equipamento FastPrep, sendo processado por 40 segundos a uma velocidade de 6,0 m/s. Após essa etapa, o material foi centrifugado a 14.000 x g por um período de 10 minutos para a sedimentação dos detritos. O sobrenadante obtido foi transferido para um tubo de microcentrífuga limpo de 2 mL, ao qual foram adicionados 250 µL de PPS, realizando-se a homogeneização por dez inversões. Essa mistura foi então centrifugada a 14.000 x g por 5 minutos para a precipitação das proteínas. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL, ao qual foi adicionado 1 mL da Solução de Ligação. O tubo foi invertido por dois minutos e mantido em um suporte por três minutos. Após esse tempo, 500 µL do sobrenadante foram descartados. Para a etapa de ligação do DNA, foram transferidos até 600 µL da solução para o tubo Spin Filter, que foi centrifugado a 14.000 x g por 1 minuto, esvaziando-se o tubo coletor em seguida. Este processo foi repetido sempre que o volume excedeu 600 µL. A etapa de lavagem consistiu na adição de 500 µL da solução SEWS-M previamente preparada ao Spin Filter, seguida de centrifugação a 14.000 x g por 1 minuto e descarte do conteúdo do tubo coletor. O filtro foi novamente centrifugado a 14.000 x g por 2 minutos sendo então deixado ao ar por 5 minutos em temperatura ambiente, para completa secagem do mesmo. Por fim, para a eluição do DNA, foram adicionados de 100 µL da solução de Eluição DES ao Spin Filter, que foi centrifugado a 14.000 x g por 1 minuto. O DNA obtido no tubo coletor ficou pronto para uso. A integridade foi verificada por

eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

O DNA genômico extraído foi utilizado para produzir o amplicon *ITS1/ITS4* por PCR para a identificação do gênero a que o fungo pertence. Foram aplicados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) *ITS1* e *ITS4* (WHITE et al., 1990), segundo a seguinte reação: 40,0 ng DNA molde; 10 pmol de cada primer universal; 1,75 mM MgCl₂; 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos (dNTPs); 2,0 µl de Tampão 10X; 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen), em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação foi: 94°C/5 min; 35 ciclos a 94°C/40 s, 55°C/30 s, 72°C/45 s; 72°C/10 min, realizados em um termociclador T100™ Thermal Cycler (BioRad) O tamanho e pureza dos amplicons gerados foram verificados por eletroforese [Agarose 0,8% (p/v)].

4.9 Sequenciamento e análise dos amplicons *16S rRNA* bacterianos e *ITS1/4* fúngico.

O produto das PCRs foi purificado utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & Purification Combo (Invitrogen). Para análise dos amplicons *16s rRNA*, o material foi levado para sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), localizado na UNESP/FCAV. As sequências obtidas foram montadas em contigs referentes ao gene *16S rRNA*, editadas no software BioEdit e, posteriormente, submetidas à análise de similaridade utilizando a ferramenta BLASTn (nucleotide BLAST), disponível no site do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A busca foi realizada no banco de dados do GenBank. Para o isolado fúngico, o mesmo foi enviado para sequenciamento no Laboratório Multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala e Expressão Gênica (LMSeq – UNESP/FCAV). O sequenciamento dos amplicons foi realizado utilizando a tecnologia de eletroforese capilar no aparelho SeqStudio™ Analyzer (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo Big Dye terminator v3.1. Com os dados gerados pelo sequenciamento, procedeu-se à montagem da sequência consenso da região *ITS1-ITS4* do isolado. Para isso, utilizou-se o programa UGENE v52.1, empregando o CAP3

para promover a sobreposição e união das leituras em um contig único. As sequências foram submetidas a trimming de qualidade, removendo bases iniciais e terminais com Phred score ≤ 20 , valor que corresponde a uma probabilidade de erro superior a 1% na leitura. Além disso, procedeu-se à curadoria manual visando maximizar a cobertura e a coerência entre as leituras. A identificação taxonômica inicial foi buscada por meio de BLASTn (BLAST v2.16.0+) contra os bancos de dados do NCBI, com indicações de alta identidade com *Aspergillus flavus*. Porém, para uma análise mais refinada, utilizou-se o banco UNITE, especializado e voltado ao gerenciamento e curadoria de sequências para identificação molecular de fungos e outros eucariotos. A partir desse banco, foram extraídas todas as sequências relacionadas ao gênero *Aspergillus*, as quais foram posteriormente filtradas com CD-HIT v4.8.1 para remoção de sequências idênticas redundantes (-c 1.0), evitando inflar o conjunto de referência. Para confirmação filogenética, selecionaram-se representantes de diferentes grupos taxonômicos do banco curado e construiu-se uma árvore de máxima verossimilhança com IQ-TREE v2.0.7. Como grupo externo, foram incluídas sequências de *Penicillium digitatum* (RV 06 - KP691033; LGMF1507 - KY978834; LIPP-Pd-2016 - KY558584) e *Neurospora crassa* (HT-ITV31 - KF040479; I1-3 - MH507014; S107 - MF076601). O alinhamento múltiplo foi realizado através do MAFFT v7.526, utilizando os parâmetros --genafpair (alinhamento local com penalidade de gaps mais flexível. Indicado quando há grandes inserções/deleções internas) e --maxiterate 1000 (refinamento iterativo do alinhamento até 1000 ciclos). O alinhamento resultante foi trimado com trimAL v1.5.rev0, para reduzir ruídos (colunas com poucos dados), sem comprometer a cobertura informativa (-gt 0.6). O modelo evolutivo foi selecionado automaticamente pelo ModelFinder com base no critério de informação de Akaike (AIC), resultando na escolha do TIM2e+G4. A robustez dos nós foi avaliada por 1.000 réplicas de bootstrap (-b 1000), parâmetro que indica a frequência com que um agrupamento é recuperado em amostragens repetidas do alinhamento.

4.10 Avaliação de toxicidade do isolado fúngico

A fim de avaliar a produção de micotoxinas, a saber, aflatoxinas do tipo B1, B2, G1 e G2, o isolado fúngico foi enviado em duplicata, cultivado em meio de cultivo TSB, ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

4.11 Origem, isolamento e manutenção dos Consórcios Bacterianos (CB)

Os consórcios foram obtidos através de cultivo em meio de cultivo mineral salino (ROBERT et al., 1989), pH 6,8, contendo (g/L): NaNO₃ (4.0); K₂HPO₄ (1.0); KH₂PO₄ (0.5); MgSO₄ x 7H₂O (0.5); KCl (0.1); FeSO₄ x 7H₂O (0.01); CaCl₂ (0.01) e 0,05 ml/l de uma solução dos seguintes elementos traços: B (0.026%), Cu (0.05%), Mn (0.05%), Mo (0.006 %) e Zn (0.07%), com a adição de 0,5 g de solo de cada fase, clara e escura das CW, em 15 ml do meio de cultivo, acrescido de 200 µL de ciclohexamida e 1,0 ml de ORP e 250 µL de óleo diesel. Foram mantidos por um período de 10 dias em incubadora shaker modelo Forma Scientific, Orbital Shaker à 150 rpm, à 27°C. Após os 10 dias, foram feitos repiques dos consórcios, acrescentando 500 µL do CB antigo, em 15 ml de meio de cultivo mineral salino. Posteriormente o processo de repique se repetiu mais duas vezes, por períodos de 15 dias, com as mesmas condições mencionadas anteriormente.

4.12 Bioensaios para avaliar a capacidade degradadora de hidrocarbonetos.

4.12.1 Isolados bacterianos

A partir do estoque dos isolados puros, foram selecionados um isolado aleatório de cada coluna e realizados tratamentos com o mesmo meio líquido acrescido de diferentes fontes de carbono (ORP, acrescido ou não por óleo diesel ou querosene). Após o inóculo do isolado, foi distribuído uma camada contendo 0,1% ORP ou misturas distintas em meio de cultura sólida. O aparecimento de colônias nas placas foi um indicador da utilização dos respectivos compostos.

4.12.2 CBs

A origem dos consórcios bacterianos seguiu o procedimento descrito no item 4.8. A partir destes, foram conduzidos bioensaios com a adição de diesel e querosene, aplicados àqueles que demonstraram maior capacidade de multiplicação frente às diferentes fontes de carbono testadas (diesel ou querosene). Os ensaios foram realizados em meio mineral descrito por Robert (1989), ajustado para pH 6,8, contendo (g/L): NaNO_3 (4,0); K_2HPO_4 (1,0); KH_2PO_4 (0,5); $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); KCl (0,1); $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); CaCl_2 (0,01), além de 0,05 mL/L de uma solução de elementos traço composta por B (0,026%), Cu (0,05%), Mn (0,05%), Mo (0,006%) e Zn (0,07%) em incubadora shaker modelo Forma Scientific, Orbital Shaker à 150 rpm, à 27°C. O meio também foi suplementado com 0,5% de ORP e 0,5% de diesel ou querosene. Os mesmos foram plaqueados em meio de cultivo sólido TSB, juntamente com o seu respectivo composto, sendo ele o resíduo, diesel ou querosene, por um período de oito dias e analisados a cada 24 horas. A medição do seu crescimento foi por meio de paquímetro. Além disto, foi avaliado a capacidade dos consórcios quanto à formação de biofilme

4.13 Análise química dos componentes de ORP e seus derivados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).

Para os ensaios de biodegradação de ORP, acrescido ou não de diesel e querosene, avaliou-se a presença e quantificação dos hidrocarbonetos após atividade biológica por meio de CG/EM. Tanto o ORP, como os derivados após bioensaio, foram quantificados a partir dos cromatogramas de íons reconstruídos obtidos por CG/EM. Esta análise foi realizada pelo laboratório NDCOM (Instituto de Química, Unesp de Araraquara), utilizando um cromatógrafo Shimadzu, modelo GCMS-QP2020, com injeção em modo head space, utilizando a volumetria de 250 μL . As condições de programação da coluna SH-Rtx-5MS foram: 45 graus/minuto, rampa de 25 graus/minuto até 180 graus, mantidos por 2,8 minutos; injetor à 200 graus, split de 1:50; fluxo na coluna de 1,00 mL/minuto; fase estacionária de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano, com uma camada de baixa polaridade; diâmetro interno (ID) de 0,25 mm; espessura do filme de 0,25 mm. Head space com temperatura de incubação

de 90 graus, com tempo de incubação de 10 minutos. MS em modo SIM, íons escaneados m/z 91, 92 e 106.

5. RESULTADOS

5.1 Propriedades químicas do solo e Colunas de Winogradsky

Com base na tabela 3, notamos que o solo de cultura agrícola de alho (tipo A) possui condições químicas mais favoráveis ao cultivo agrícola do que o solo cultivado com cana-de-açúcar (tipo C). Solos do tipo C mostraram-se moderadamente ácidos, enquanto os solos do tipo A mostraram-se ligeiramente alcalinos ou na faixa ideal. Solos do tipo A mostram-se favoráveis ao cultivo de diversas variedades de culturas agrícolas, pois possui pH mais adequado, maiores quantidades de CaCl_2 , matéria orgânica (M.O), fósforo (P), cálcio (Ca) e possui sua CTC mais elevada. Estas condições seguramente afetaram a abundância e diversidade dos microrganismos selecionados nas respectivas CW. O maior teor de M.O no solo contribui para maior fertilização do solo, para a formação da CTC e para a disponibilidade de nutrientes para as plantas. Por isso, é recomendado que sejam adotadas práticas de manejo que visem a manutenção ou o aumento da quantidade de M.O no solo. Já o cálcio é um dos macronutrientes essenciais para as plantas, juntamente com o nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e enxofre. Ele desempenha um papel importante na formação da parede celular das células vegetais, na regulação do pH do solo e na melhoria da estrutura do solo. Além disso, o cálcio é um dos principais componentes do calcário, que é um material corretivo utilizado para neutralizar a acidez do solo. A aplicação de calcário aumenta a disponibilidade de cálcio no solo e pode melhorar a disponibilidade de outros nutrientes, como o fósforo (RONQUIM, 2010).

Quanto às CW, não foram observadas diferenças significativas quanto ao aspecto visual delas, exceto à coluna com encharcamento (A) que, após o período de quatro dias, evidenciou através da percepção sensorial uma elevada volatilização de gases.

Tabela 3 - Análise química dos solos alho (A) e cana (C).

Solos	pH CaCl ₂	M.O g/dm ³	P mg/dm ³	Ca mmolc/dm ³	CTC
A1	6,0	25	79	37	72,5
A2	5,9	28	103	47	82,7
A3	6,5	24	111	49	77,1
A4	6,4	27	108	55	87,1
C1	5,2	19	17	19	51,8
C2	5,2	17	11	17	47,9
C3	5,0	16	10	16	47,4
C4	5,1	16	11	17	49,8

Fonte: Autora (2022)

5.2 Caracterização fenotípica de isolados da CW

Dentre os isolados bacterianos de cada CW, foram observadas diferenças morfológicas significativas dentre eles e as respectivas CW. Estes diferentes aspectos evidenciam a presença de diferentes grupos bacterianos com ampla diversidade (Figura 9).

Figura 9 - Isolados das CWs crescidos em meio de cultivo sólido TSB



Fonte: Autora (2022)

A tabela 4 mostra os aspectos morfológicos das culturas em placa de Petri dos isolados bacterianos das diferentes CW, ilustrando a diversidade seletiva das bactérias. O padrão predominante dos isolados bacterianos, quanto a coloração de Gram, foi de gram-negativas. Gram negativas corresponderam a aproximadamente 80% dos isolados, com predominância nas CW 2, 3, 4 e 5. A cor predominante foi branca nas colônias cultivadas de isolados de todas as CW, embora verificou-se a ocorrência de colônias vermelhas em 3.2, 3.7 e 3.9. A principal forma de colônia observada foi circular, com algumas irregulares e até uma filamentosa (3.2), uma fusiforme (4.2) e uma puntiforme (4.6). Observou-se o predomínio de colônias planas e convexas quanto à elevação das colônias, com algumas poucas de aspecto elevado na CW5. Quanto à borda das colônias, a maioria foi de aspecto inteira, com algumas onduladas ou lobadas.

A CW2 apresentou a maior variação de colônias, presença de Gram-positiva (2.3) e colônias irregulares, onduladas e lobadas, comparada às outras CW. Porém, a maior diversidade visual foi observada em CW3 quanto aos aspectos colônias vermelhas (3.2, 3.7, 3.9), filamentosas, convexas e planares. A CW4 apresentou elevada proporção de Gram-positivas, correspondendo a seis de dez isolados, e formas variadas como fusiforme (4.2), puntiforme (4.6). A CW5 destaca-se pela presença de colônias elevadas e lobadas (5.2, 5.5) e formas irregulares e convexas.

Tabela 4 - Aspectos morfológicos das colônias dos diferentes isolados bacterianos das Coluna de Winogradsky.

COLUNA	GRAM	COR	FORMA	ELEVAÇÃO	BORDA
CW- 1.1	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW-1.2	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW-1.3	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW-1.4	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW-1.5	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW-1.6	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW-1.7	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW-1.8	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW-1.9	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW- 1.10	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW- 2.1	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 2.2	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW- 2.3	Positiva	Branca	Circular	Plana	Ondulada

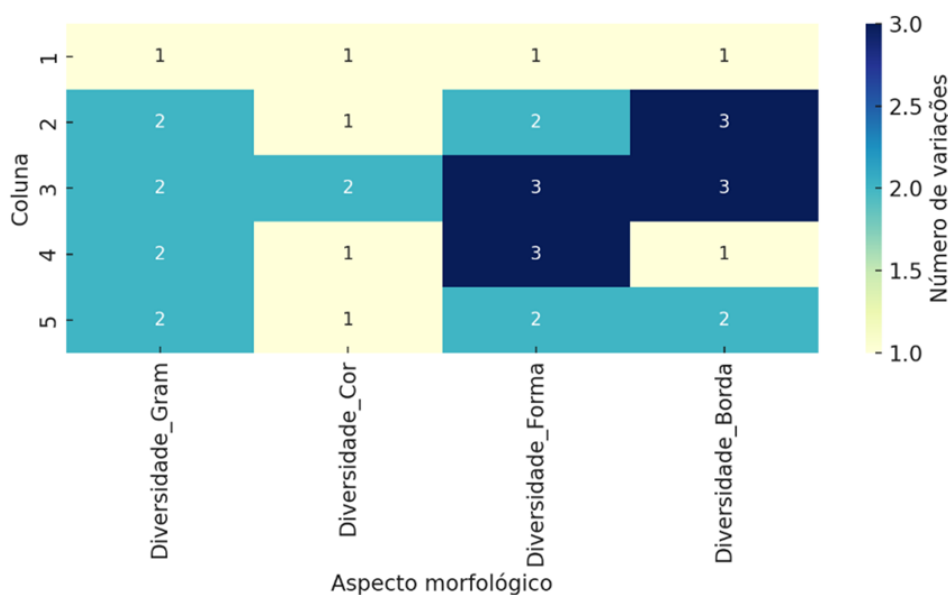
CW- 2.4	Negativa	Branca	Irregular	Plana	Ondulada
CW- 2.5	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW- 2.6	Negativa	Branca	Irregular	Plana	Lobada
CW- 2.7	Negativa	Branca	Irregular	Plana	Lobada
CW- 2.8	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 2.9	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 2.10	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 3.1	Negativa	Branca	Irregular	Plana	Ondulada
CW- 3.2	Negativa	Vermelha	Filamentosa	Plana	Lobada
CW- 3.3	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW- 3.4	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 3.5	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 3.6	Negativa	Branca	Circular	Plana	Inteira
CW- 3.7	Negativa	Vermelha	Circular	Convexa	Inteira
CW- 3.8	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 3.9	Negativa	Vermelha	Circular	Convexa	Inteira
CW- 3.10	Positiva	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 4.1	Positiva	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 4.2	Positiva	Branca	Fusiforme	Plana	Inteira
CW- 4.3	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 4.4	Positiva	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 4.5	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 4.6	Negativa	Branca	Puntiforme	Plana	Inteira
CW- 4.7	Positiva	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 4.8	Positiva	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 4.9	Positiva	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 4.10	Positiva	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 5.1	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 5.2	Negativa	Branca	Irregular	Elevada	Lobada
CW- 5.3	Negativa	Branca	Circular	Elevada	Inteira
CW- 5.4	Positiva	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 5.5	Negativa	Branca	Circular	Elevada	Inteira
CW- 5.6	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 5.7	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 5.8	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 5.9	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira
CW- 5.10	Negativa	Branca	Circular	Convexa	Inteira

Fonte: Autora (2022)

A figura 10 permite ilustrar a diversidade morfológica bacteriana em cada CW. As CW 1 e 2 apresentaram baixa diversidade com predominância de colônias Gram negativas, brancas e circulares, típicas de ambientes com condições estáveis e pouca competição. As CW 3 e 4 mostraram maior diversidade morfológica geral, refletindo maior variação em forma, coloração e tipo de Gram, sugerindo ambientes microbianos

mais complexos e metabolicamente diversificados. Finalmente, a CW 5 mostrou heterogeneidade intermediária, com ocorrência de Gram positivos e variação na borda das colônias, indicando uma fase de transição ecológica no gradiente da CW provavelmente pelo encharcamento do ORP.

Figura 10 - Heatmap da diversidade morfológica de isolados bacterianos por Coluna de Winogradsky.



Fonte: Autora (2025)

5.3 Identidade taxonômica dos isolados bacterianos

Com base na diversidade fenotípica das formas de colônias apresentadas nas respectivas CW, foram escolhidos cinco diferentes isolados bacterianos para terem sua assinatura taxonômica obtidas através do sequenciamento parcial do amplicon *16S rRNA* (Tabela 4).

Para nomear os nossos cinco isolados provenientes das CW's, utilizamos a nomenclatura EcoRem a fim de padronizá-los. Os valores mais altos de similaridade foram alcançados para os isolados EcoRem3 (99,22%) e EcoRem4 (97,33%), correspondendo a alta identidade respectivamente com *Providencia vermicola* e *Bacillus tropicus*, respectivamente. Para EcoRem2, o nível de identidade é limítrofe

entre gênero e espécie, mas com possibilidade de identificação taxonômica como *Providencia vermicola*. Para EcoRem1, apesar do nível de identidade ter sido relativamente baixo, pode-se ainda associar este isolado a uma espécie pertencente ao gênero *Pseudomonas*, cuja assinatura correspondeu próximo de *Pseudomonas aeruginosa*. Finalmente, EcoRem5 apresentou o nível mais baixo de similaridade taxômica (73,86%) podendo corresponder a um táxon diferente, possivelmente novo, filogeneticamente relacionado a *Serratia myotis*.

Tabela 5 - Similaridades entre as sequências do gene *16S rRNA*, dos isolados bacterianos baseados no GenBank (BLASTn).

Isolado			
Nome	Referência (Tabela 2)	Linhagem	Identidade
EcoRem1	1.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	88,36%
EcoRem2	2.1	<i>Providencia vermicola</i>	90,48%
EcoRem3	3.5	<i>Providencia vermicola</i>	99,22%
EcoRem4	4.9	<i>Bacillus tropicus</i>	97,33%
EcoRem5	5.8	<i>Serratia myotis</i>	73,86%

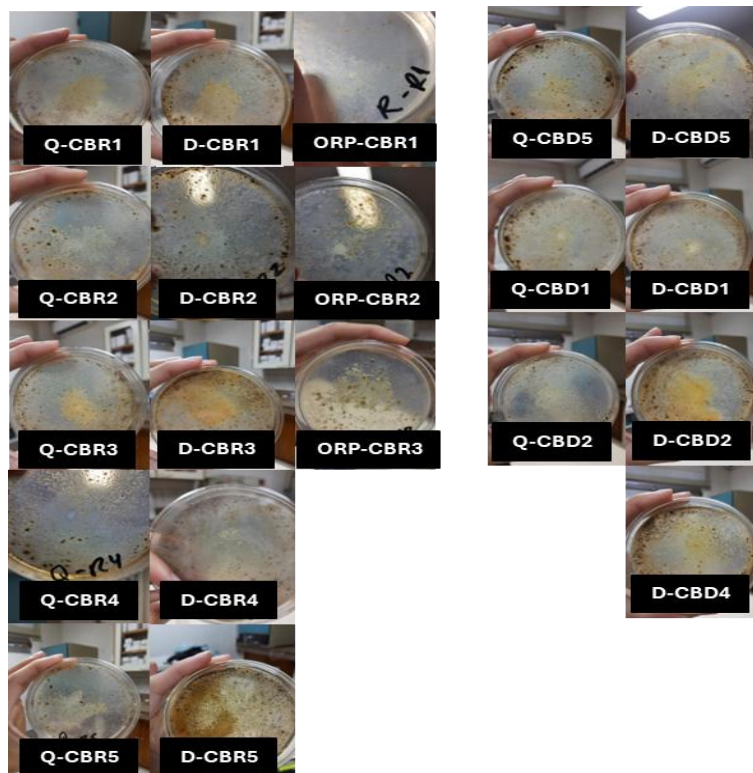
Fonte: Autora (2023)

5.4 Bioensaios para avaliar a capacidade degradadora de hidrocarbonetos

Os bioensaios para revelar a capacidade biodegradadora, ou seja, o consumo de derivados de petróleo como única fonte de carbono foram realizados particularmente para os consórcios bacterianos (CB). Consórcios adquiridos na presença de ORP (CB-ORP) ou na presença de ORP+Diesel (CB-D) foram desafiados

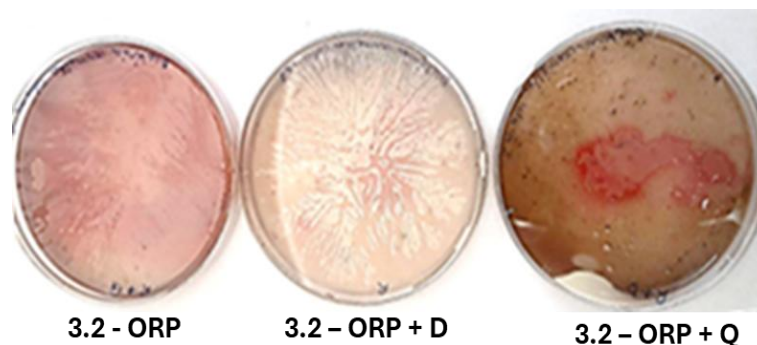
com ORP, Diesel (D) e Querosene (Q) independentemente (Figura 11). O comportamento de apenas um isolado bacteriano (3.2) está ilustrado na Figura 12, na presença dos derivados de petróleo. O foco, contudo, foram nos CBs.

Figura 11 - Perfil de crescimento de consórcios bacterianos em meio de cultivo contendo diferentes derivados de petróleo como única fonte de carbono.



Fonte: Autora (2022)

Figura 12 - Isolado bacteriano CW-3.2 desafiado em diferentes fontes de carbono.



Fonte: Autora (2022)

A Figura 13 mostra uma análise comparativa dos consórcios bacterianos de origem distinta cultivados em diferentes fontes de carbono (ORP; D; Q).

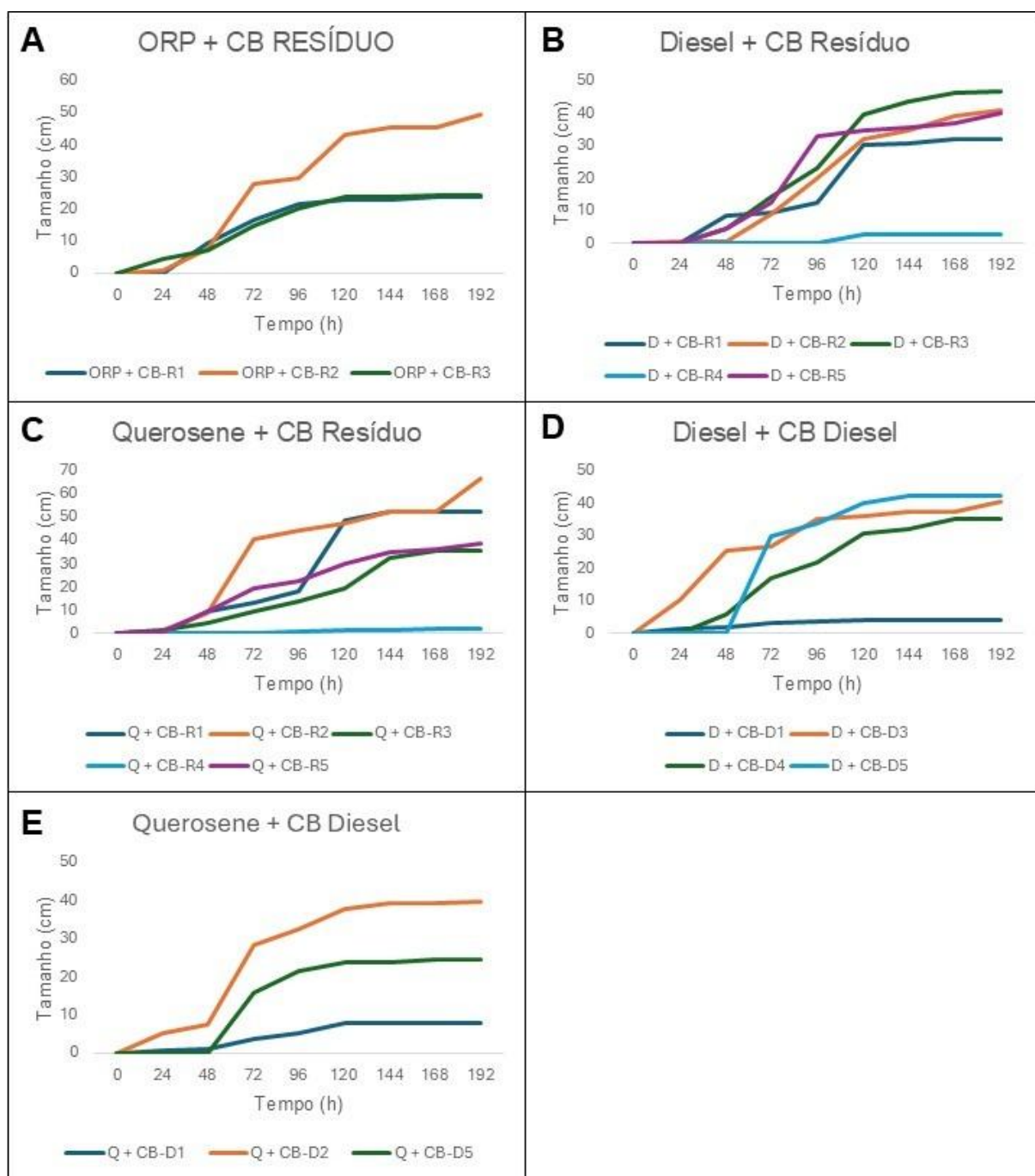
O CB-R2 destaca-se pelo melhor desempenho quando cultivado em ORP, atingindo cerca de 5,0 centímetros ao final do período experimental (192hs), denotando maior adaptabilidade ao resíduo original. Por outro lado, os CB-R1 e CB-R3 foram bastante similares e apresentaram um crescimento mais discreto (~2,0 centímetros) (Figura 13A).

Quando cultivados em Diesel como única fonte de carbono, vários consórcios apresentaram um crescimento expressivo (4,0-5,0 centímetros), com destaque para os CB-R1, CB-R2 e CB-R3 (Figura 13B). Os CB-D5, CB-D2 e CB-D4, também em Diesel, apresentaram crescimento similar estabilizando em 3,5-4,0 centímetros (Figura 13D). Nesta mesma condição, CB-D1 foi o que apresentou o mais fraco desempenho.

Quando a única fonte de carbono foi Querosene, observou-se mais uma vez o destaque do desempenho do CB-R2, contabilizando cerca de 65 unidades. Os CB-R5 e CB-R3, isolados de ORP, apresentaram desempenho similar e intermediário (3,0-4,0 centímetros). O CB-R4 destacou-se por não apresentar adaptabilidade quando apenas Querosene estava disponível como fonte de carbono, não sendo verificado o seu desenvolvimento (Figura 13C). Para os CBs isolados em Diesel e desafiados com Querosene, como única fonte de carbono, CB-D2 foi o que se destacou apresentando o melhor desempenho (~4,0 centímetros), seguido por CB-D5 com crescimento intermediário e CB-D1 com a pior performance (Figura 13E).

Assim, os resultados mostram que CB-R2 foi o que apresentou o mais alto e melhor desempenho com expressivo crescimento em ORP, Diesel e Querosene. Os CB-D5, CB-D2 e CB-D4 também se destacaram por desempenho moderado a alto, tanto em diesel como querosene.

Figura 13 - Perfil de cultivos dos diferentes consórcios bacterianos adquiridos na presença de ORP (CB-ORP) ou na presença de ORP+Diesel (CB-D), desafiados com ORP, Diesel (D) e Querosene (Q), independentemente, como única fonte de carbono.



5.5 Análise química dos componentes de ORP e degradação do ORP a partir dos CBs

A análise química dos componentes de ORP permitiu a identificação de mais de 90 compostos (Figura 14). A análise química dos componentes de ORP, representada no cromatograma total de íons (Figura 14), evidenciou um perfil complexo, com mais de 90 picos distintos correspondentes a diferentes compostos orgânicos. Dentre estes, cerca de 81 foram identificados como hidrocarbonetos alifáticos, majoritariamente entre 5 e 18 min de tempo de retenção, enquanto aproximadamente 10 picos, localizados principalmente entre 10 e 22 min, corresponderam a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Entre os HPAs detectados, destacaram-se o benzeno (tempo de retenção ~ 6,4 min), tolueno (~ 7,0 min), xilenos (~ 8,5 min), mesitileno (~ 10,3 min), o-cimeno (~ 11,4 min), indano (1-metil-) (~ 14,4 min) e naftaleno (~ 17,4 min), todos compatíveis com compostos voláteis e aromáticos comumente encontrados em resíduos petroquímicos. Tal composição está em concordância com a natureza típica do petróleo, no qual os compostos alifáticos representam aproximadamente 80% (p/v) e os aromáticos cerca de 15% (p/v).

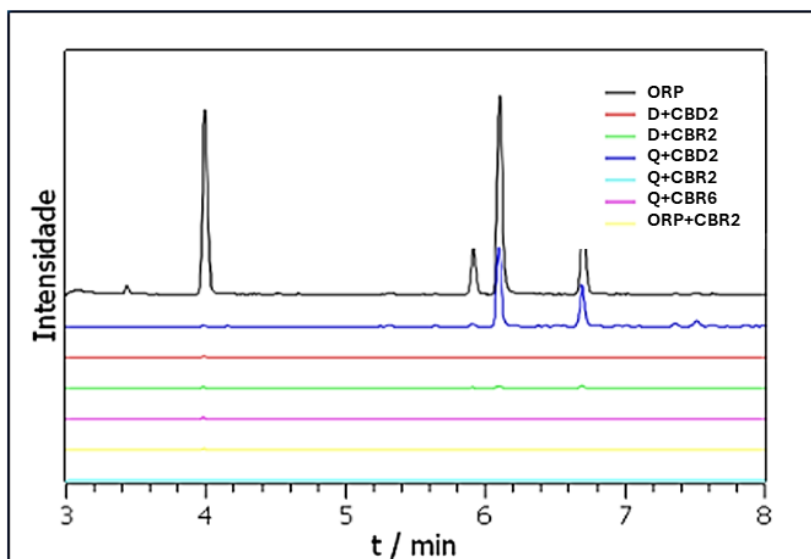
tolueno. CB-D2 na presença de diesel apresentou atuação eficiente e melhor daquela observada quando enriquecido com querosene.

Tabela 6 - Áreas cromatográficas obtidas por CG/EM para tolueno e xileno. A diminuição da área em relação à amostra crua (ORP) reflete o consumo dos compostos durante os bioensaios de degradação bacteriana.

Amostra	Área /Massa			
	t = 4min (tolueno)	t = 5,9min (xileno)	t = 6,1min (xileno)	t = 6,7min (xileno)
R (Cru)	44927,125	9457,490	44552,631	16759,109
D+D2	509,434	108,490	275,943	96,698
D+R2	570,754	408,019	1018,868	1115,566
Q+D2	617,924	1466,981	35341,981	19051,887
Q+R2	363,207	25,943	103,773	150,943
Q+VERM	415,094	99,057	165,094	82,547
R+R2	632,075	160,377	278,302	129,717

Fonte: Autora (2024)

Figura 15 - Cromatogramas CG/EM comparando o perfil de compostos de ORP cru antes e após biodegradação pela ação de diferentes consórcios bacterianos (CBs), enriquecido ou não com diesel (D) ou querosene (Q).



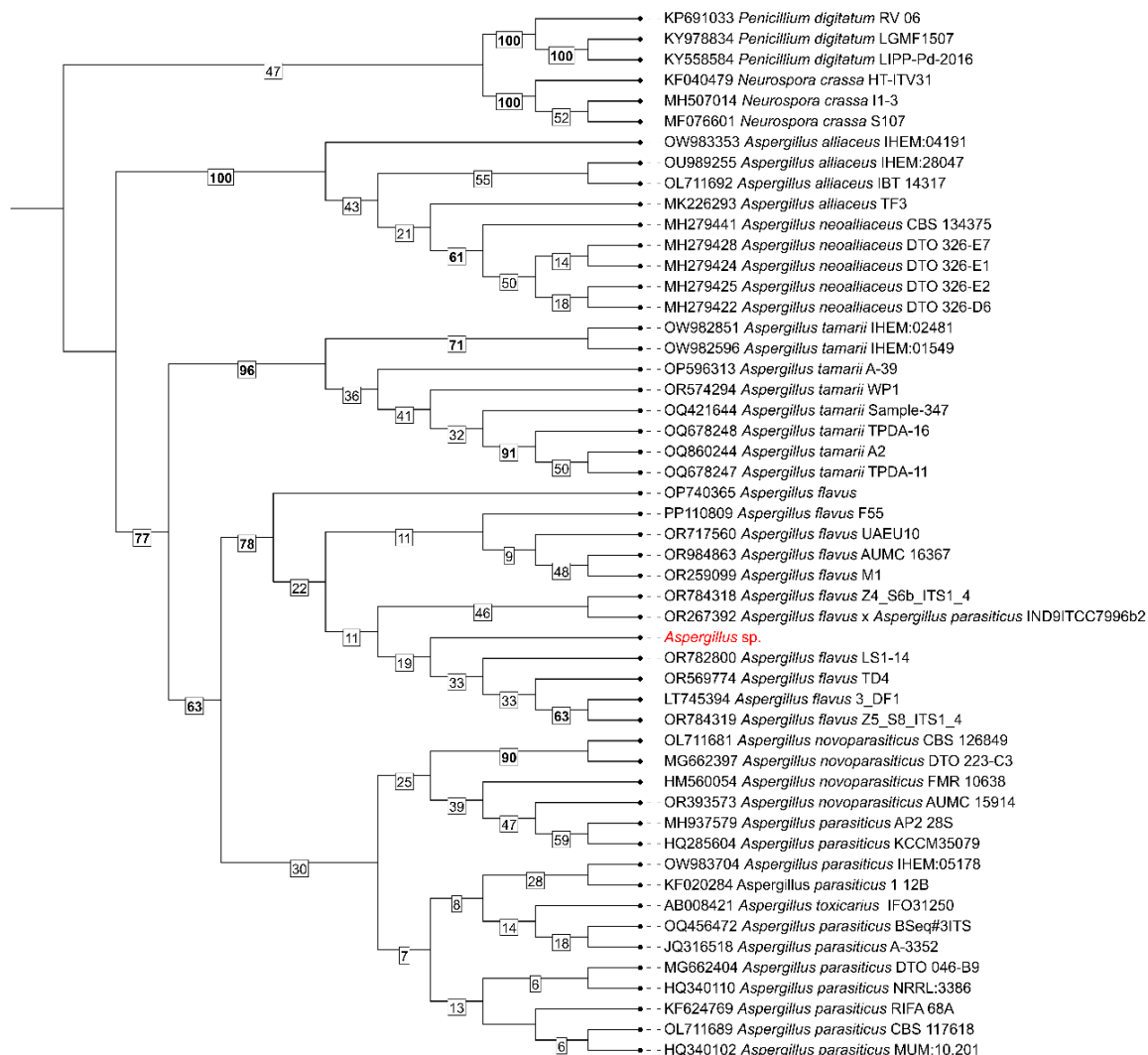
Fonte: Autora (2024)

5.6 Identidade do isolado fúngico

A análise com o banco curado UNITE, obtido após a filtragem de sequências redundantes, reforçou a identificação do isolado, que apresentou correspondências consistentes com 100% de identidade com *Aspergillus flavus*. Essa evidência foi corroborada pela inferência filogenética, na qual o isolado se agrupou dentro do clado de *A. flavus*, com suporte de *bootstrap* considerável (78) (Figura 16). Assim, em conjunto os resultados apontam para a identificação do isolado como *A. flavus*. Contudo, não se pode descartar a necessidade de marcadores adicionais para uma distinção definitiva, embora a atribuição à *section Flavi* já possa ser considerada confiável.

Considerando a similaridade deste isolado com *A. flavus*, procedeu-se a detecção de aflatoxinas que poderiam ser produzidas pelo mesmo. Os resultados indicaram que este isolado é produtor das aflatoxinas B1 e B2, mas não das aflatoxinas G1 e G2 (Tabela 7).

Figura 16 - Árvore filogenética baseada em sequências *ITS1-ITS4* mostrando a relação entre espécies do gênero *Aspergillus* e nosso isolado destacado em vermelho.



Fonte: Autora (2025)

Tabela 7 - Detecção e quantificação das aflatoxinas produzidas pelo isolado fúngico *A. flavus*-similar.

AFLATOXINAS	Resultado (mg/kg=ppm)		
	Placa 1	Placa 2	Média
Aflatoxina B1	182,58	169,81	176,19
Aflatoxina B2	1,32	1,03	1,17
Aflatoxina G1	não detectado	não detectado	não detectado

Aflatoxina G2	não determinado	não determinado	não determinado
----------------------	-----------------	--------------------	--------------------

Limite de detecção de aflatoxinas = 1,7µg/kg = ppb

Fonte: Instituto de Tecnologia de Alimentos

A detecção e quantificação da aflatoxina G2 não puderam ser realizadas devido à presença de picos de interferentes na amostra, os quais comprometeram os parâmetros analíticos do método utilizado. Contudo, considerando tratar-se da espécie *Aspergillus flavus* e a ausência de aflatoxina G1, não se espera a produção de aflatoxina G2 por essa cepa.

6. DISCUSSÃO

As diferenças químicas observadas entre os solos das diferentes CW influenciaram na seleção da comunidade bacteriana estabelecida em cada uma delas. As CW simulam gradientes verticais de compostos, luz e oxigênio que favorecem diferentes grupos fisiológicos de bactérias (ANDERSON e HAIRSTON, 1999; ESTEBAN, HYSA e BARTOW-MCKENNEY, 2015). Assim, uma variação ecológica foi alcançada pelas condições de montagem estabelecidas. O solo oriundo do cultivo agrícola de alho parece ser mais favorável ao desenvolvimento microbiano devido às características como: pH ligeiramente alcalino, ou próximo ao ideal; maiores teores de cálcio, fósforo e matéria orgânica (M.O); maior capacidade de troca catiônica (CTC). Contudo, solos cultivados com cana-de-açúcar sustentaram uma maior diversidade, ou complexidade microbiana, provavelmente metabolicamente mais complexa, particularmente a CW-3.

Visualmente, as diferentes CW apresentaram pouca variação visual entre si, com exceção da CW-5 montada com encharcamento (ORP em excesso) que apresentou intensa volatilização de gases desde os primeiros dias de incubação. Isto foi indicativo de uma maior atividade anaeróbia ou fermentativa, sugerindo rápida mineralização da M.O disponível, conversão dos hidrocarbonetos em excesso e estabelecimento de comunidades voláteis, como metanogênicas, na camada mais inferior da CW (ALBERS, KRAMSHØJ e RINAN, 2018; RANDAZZO, VENTURI e TASSI, 2024).

A diversidade das condições das CWs montadas refletiu nos diferentes padrões morfológicos dos isolados bacterianos, refletindo variações na coloração, forma, elevação, tipo de borda e padrão de Gram. As bactérias gram-negativas foram predominantes (~ 80%), consistente com ambientes ricos em M.O disponível e variações nas tensões de oxigênio. O predomínio de gram-negativas indica maior abundância de bactérias heterotróficas típicas de ambientes úmidos e ricos em M.O solúvel. Estas condições são favoráveis a grupos bacterianos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Enterobacteriaceae* e outros γ -proteobactérias (FENCHEL e FINLAY, 2008; JIAO et al., 2021).

A identificação de um isolado fúngico como *Aspergillus flavus*, corroborada por análise filogenética e elevada identidade genética, revelou a presença de fungo toxigênico na CW-5, especialmente em ambientes ricos em matéria orgânica ou hidrocarbonetos. A presença deste fungo relevante do ponto de vista de saúde pública e ambiental reforça o potencial das CWs em promover o crescimento de organismos com metabolismo secundário potencialmente perigosos (KLICH, 2007). Embora, *A. flavus* seja capaz de metabolizar diferentes classes de hidrocarbonetos presentes em petróleo e seus derivados, recomendam-se linhagens não toxigênicas ou espécies alternativas para aplicações na biorremediação (MARUTHI et al., 2013).

A CW-1 com mais baixa diversidade morfológica pode estar dominada por um menor número de grupos bacterianos e, portanto, menor diversidade funcional cultivável. A CW-2 destacou-se pela diversidade de morfologias, incluindo colônias onduladas e lobadas, enquanto a CW-3 foi a que apresentou maior heterogeneidade visual geral, incluindo colônias vermelhas e formas filamentosas, sugerindo maior diversidade metabólica e possível seleção de microrganismos pigmentados associados à fotossíntese bacteriana ou estresse oxidativo.

A CW-4 apresentou maior proporção de Gram-positivas, o que pode indicar a predominância de espécies resistentes à baixa disponibilidade de nutrientes ou a condições mais estáveis na microcoluna, tais como *Bacillus* e *Actinobacteria*. Já a CW-5 mostrou um perfil intermediário, com colônias elevadas e bordas lobadas, sugerindo um ambiente em transição, possivelmente influenciado pelo encharcamento e presença de compostos de petróleo (ORP). Esses padrões mostram que as CW cumpriram seu papel ecológico de estabelecer gradientes ambientais e permitir o desenvolvimento de comunidades metabolicamente complementares (ESTEBAN, HYSA e BARTOW-MCKENNEY, 2015).

Embora parcial, o sequenciamento do gene *16S rRNA* permitiu identificar diferentes táxons bacterianos nas diferentes CW. Todos os táxons identificados têm potencial na biodegradação de compostos orgânicos, incluindo derivados de petróleo. Os isolados identificados como *Providencia vermicola* (EcoRem2 e EcoRem3), *Bacillus tropicus* (EcoRem4) e uma linhagem próxima de *Pseudomonas aeruginosa* (EcoRem1) representam grupos conhecidos por sua versatilidade metabólica.

Pseudomonas e *Providencia* frequentemente participam de rotas aeróbias de degradação de hidrocarbonetos (KUMAR e DE, 2024), enquanto *Bacillus* é reconhecido por produzir biossurfactantes que facilitam a emulsificação de compostos hidrofóbicos (ANJUM et al., 2016).

O isolado EcoRem5 apresentou baixo grau de similaridade com espécies conhecidas, sugerindo a possibilidade de ser um táxon novo ou pouco caracterizado, relacionado a *Serratia myotis*. A detecção de possíveis espécies novas em CW reforça o potencial desse sistema como ferramenta para acesso a biodiversidade microbiana pouco explorada.

Os bioensaios realizados com os consórcios bacterianos apresentaram diferentes níveis de eficiência na utilização de ORP, Diesel e Querosene como únicas fontes de carbono, quando combinadas. De modo geral, os consórcios originários de ORP (CB-R) foram mais eficientes com destaque para CB-R2, o qual apresentou desempenho superior ou significativo em todas as fontes de carbono testadas. Estes dados refletem uma elevada plasticidade metabólica e rápida adaptação às diferentes cadeias e complexidade dos hidrocarbonetos apresentadas pela CB-R2. Adicionalmente, CB-R2 deve apresentar, concomitante, presença de enzimas como mono- e di-oxigenases (ESMAEEL e ALFATLAWI, 2022).

A inefetividade ou ausência de crescimento de CB-R4 em querosene indica limitação metabólica para substratos mais voláteis ou de cadeia menor. Embora tivessem menor desempenho em querosene, quando comparados com os consórcios CB-R, consórcios tipo CB-D foram efetivos, particularmente CB-D2 e CB-D5. A diferenciação entre os desempenhos dos CBs isolados evidencia a origem e o nicho ecológico de cada um deles, associado ao tipo de hidrocarboneto degradado, reforçando o conceito de especialização ecológica por pressão seletiva (DOMINGOS, 2024).

O composto ORP confirmou predominância de hidrocarbonetos alifáticos, com menor presença, embora significativa, de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (como tolueno, xileno e mesitileno) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (como naftaleno). Todos estes compostos têm relevância associada à toxicidade ambiental

e são indicadores importantes de estratégias de biorremediação (TYAGI e CHAUDHARY, 2022; HOSEINI et al., 2023).

Os consórcios CB-R2 e CB-R6 mostraram-se mais eficientes na redução dos picos cromatográficos de ORP, particularmente quando enriquecidos com querosene, indicando maior biodegradação simultânea de tolueno e xileno. Isto sugere um maior potencial de atividade catabólica sobre compostos monoaromáticos. A capacidade de consumir tanto compostos alifáticos quanto aromáticos sugere rotas degradativas integradas, o que reforça o potencial biotecnológico desses consórcios.

7. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, conclui-se que este estudo demonstrou, de forma integrada, a eficácia da abordagem adotada na seleção de microrganismos com potencial para a biodegradação de derivados de petróleo. A montagem das colunas de Winogradsky permitiu observar a formação de comunidades microbianas distintas, com predominância de bactérias gram-negativas e morfologias seletivamente favorecidas pela presença de ORP, como as colônias vermelhas e filamentosas da CW-3, indicando adaptação metabólica a compostos hidrofóbicos.

Os bioensaios evidenciaram que tanto os isolados quanto os consórcios foram capazes de utilizar ORP, diesel e querosene como fontes de carbono, sendo os consórcios CB-ORP e CB-D os que apresentaram maior desempenho, especialmente pela formação de biofilme e pela manutenção do crescimento em misturas complexas. A análise por CG/EM reforçou esses achados ao demonstrar redução nas áreas de tolueno e xileno após a atividade microbiana, confirmando a efetividade da biodegradação observada nos ensaios.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados abrem perspectivas para etapas subsequentes, que incluem a validação em condições *ex situ* e a caracterização detalhada dos consórcios mais eficientes (CB-R2 e CB-R6), possibilitando o avanço no entendimento dos determinantes ecológicos e funcionais associados à biorremediação.

8. REFERÊNCIAS

ALBERS, C. N.; KRAMSHØJ, M.; RINNAN, R. **Rapid mineralization of biogenic volatile organic compounds in temperate and Arctic soils.** *Biogeosciences*, v. 15, n. 11, p. 3591-3601, 2018.

ANDERSON, D. C.; HAIRSTON, R. V. **Models for Teaching Nutrient Cycling & Succession in an Ecosystem: Here is a microcosm model for teaching chemical transformation and microbial succession in the biology classroom.** *American biology Teacher*, v. 61, p. 453-460, 1999.

ATAKPA, E. O.; ZHOU, H.; JIANG, L.; MA, Y.; LIANG, Y.; LI, Y.; ZHANG, D.; ZHANG, C. **Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of fungi and biosurfactant-producing bacteria.** *Chemosphere*, v. 290, p. 133337, 2022.

ATSDR – **Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** *Toxicological Profile for Xylenes.* Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2004. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/interaction-profiles/about/benzene-toluene-ethylbenzene-and-xylenes>

ATSDR – **Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).* Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1995. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>

AHMED, Salim; SINGH, Durgeshwer. **Isolation, Screening, and Biodegradation of Crude Oil by Indigenous Bacteria Isolated from Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil.** *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 236, n. 12, p. 772, 2025.

ANJUM, F.; GAUTAM, G.; EDGARD, G.; NEGI S. **Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry.** *Bioresource technology*, v. 213, p. 262-269, 2016.

BALSEIRO-ROMERO, M.; MONTERROSO, C.; CASARES, J. J. **Environmental fate of petroleum hydrocarbons in soil: review of multiphase transport, mass transfer, and natural attenuation processes.** *Pedosphere*, v. 28, n. 6, p. 833-847, 2018.

BARATHI, S. J. G.; RATHINASAMY, G.; SABAPATHI, N.; ARULJOTHI, KN.; LEE, J.; KANDASAMY, S. **Recent trends in polycyclic aromatic hydrocarbons pollution distribution and counteracting bio-remediation strategies**. *Chemosphere*, v. 337, p. 139396, 2023.

BISSADA, KKA.; TAN, J.; SZYMCZYK, E.; DARNELL, E.; MEI, M. **Group-type characterization of crude oil and bitumen. Part I: Enhanced separation and quantification of saturates, aromatics, resins and asphaltenes (SARA)**. *Organic geochemistry*, v. 95, p. 21-28, 2016.

BRANCO, P. M. **Petróleo**. *Serviço Geológico do Brasil*, São Paulo, 18 de Ago de 2014. Disponível em: <https://www.sgb.gov.br/petroleo>. Acesso em: 01 dez. 2025.

BRITANNICA. **Kerosene: chemical composition and properties**. *Encyclopaedia Britannica*, 2024. Acesso em: 12 de set., 2025. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/kerosene>

CABRERA-PEREZ, D. ; TARABORRELI, D. ; SANDER, R. ; POZZER, A. **Global atmospheric budget of simple monocyclic aromatic compounds**. *Atmospheric Chemistry and Physics*, v. 16, n. 11, p. 6931-6947, 2016.

CETESB, 2022. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Ficha de Informação Toxicológica**. São Paulo, 2022. Acesso em: 27 de ago., de 2025. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/24/2020/11/HPAs-Hidrocarbonetos-Polici%CC%81clicos-Aroma%CC%81ticos.pdf>

CHEN, X.; ZHANG, S.; YI, L.; LIU, Z.; YE, X.; YU, B.; SHI, S.; LU, X. **Evaluation of Biodegradation of BTEX in the Subsurface of a Petrochemical Site near the Yangtze River, China**. *International journal of environmental research and public health*, v. 19, n. 24, p. 16449, 2022.

CHETTRI, D.; VERMA, A. K.; VERMA, A. K. **Bioaugmentation: an approach to biological treatment of pollutants**. *Biodegradation*, v. 35, n. 2, p. 117-135, 2024.

COUTINHO, D. M.; FRANCA, D.; VANINI, G.; GOMES, A. O.; AZEVEDO, D. A. **Understanding the molecular composition of petroleum and its distillation cuts**. *Fuel*, v. 311, p. 122594, 2022.

COVAS, T. R.; FREITAS, C. S.; TOSE, L. V.; VALENCIA-DAVILLA, J. A.; DOS SANTOS ROCHA, Y.; RANGEL, M. D.; SILVA, R. C.; VAZ, B. G. **Fractionation of polar compounds from crude oils by hetero-medium pressure liquid chromatography (H-MPLC) and molecular characterization by ultrahigh-resolution mass spectrometry.** *Fuel*, v. 267, p. 117289, 2020.

DA SILVA CORREA, H.; BLUM, C. T.; GALVÃO, F.; MARANHO, L. T. **Effects of oil contamination on plant growth and development: a review.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, n. 29, p. 43501-43515, 2022.

DO NASCIMENTO, R. F. (Ed.). **Advances in chromatographic analysis.** *Avid Science*, 2017.

DOMINGO, J. L.; NADAL, M. **Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the scientific literature.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 86, p. 144-153, 2015.

DOMINGOS, A. C. A. **Avaliação da dinâmica microbiana em resposta à contaminação por hidrocarbonetos do petróleo e seu potencial no biomonitoramento de ambientes marinhos.** *Repositório Institucional Pantheon*, 2024.

ELLOS, D. M.; BACOSA, H. P. **A review of the multifaceted impact and implications of oil spills and marine disasters in Asia.** *Discover Oceans*, v. 2, n. 1, p. 41, 2025.

ESMAEEL, J. R.; ALFATLAWI, M. A. A. **Monoxygenase and dioxygenases by bacterial specific enzymes network.** *International Journal of Health Sciences*, n. 1, p. 10215-10222, 2022.

ESTEBAN, D. J.; HYSA, B.; BARTOW-MCKENNEY, C. **Temporal and spatial distribution of the microbial community of Winogradsky columns.** *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. e0134588, 2015.

FENCHEL, T.; FINLAY, B. **Oxygen and the spatial structure of microbial communities.** *Biological Reviews*, v. 83, n. 4, p. 553-569, 2008.

FENG, L.; JIANG, X.; HUANG, Y.; WEN, D.; FU, T.; FU, R. **Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid.** *Environmental Pollution*, v. 273, p. 116476, 2021.

GIELNIK, An.; PECHAUD, Y.; HUGUENOT, D.; CÉBRON, A.; RIOM, J. M.; GUIBAUD, G.; ESPOSITO, G.; HULLEBUSCH, E. D. V. **Effect of digestate application on microbial respiration and bacterial communities diversity during bioremediation of weathered petroleum hydrocarbons contaminated soils.** *Science of the total environment*, v. 670, p. 271-281, 2019.

GRIMAUD, R.; GHIGLIONE, J-F.; CAGNON, C.; LAUGA, B.; VAYSSE, P-J.; RODRIGUEZ-BLANCO, A.; MANGENOT, S.; CRUVEILLER, S.; BARBE, V.; DURAN, R.; WU, L-F.; TALLA, E.; BONIN, P.; MICHOTEY, V. **Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds.** *ASM Journals., Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 13., 2012.

HÖÖK, M.; BARDI, U.; FENG, L.; PANG, X. **Development of oil formation theories and their importance for peak oil.** *Marine and petroleum geology*, v. 27, n. 9, p. 1995-2004, 2010.

HOSEINI, M.; SAMAEI, M. R.; SHAHESMAELLI, A.; MARTÍNEZ, S. S.; AMIRI, H. **Using biomonitoring as a complementary approach in BTEX exposure assessment in the general population and occupational settings: a systematic review and meta-analysis.** *Reviews on Environmental Health*, v. 38, n. 3, p. 493-510, 2023.

HUCKER, G. J. **A new modification and application of the Gram stain.** *Journal of Bacteriology*, v. 6, n. 4, p. 395–397, 1921. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.6.4.395-397.1921>.

IEA-AMF. **Diesel and gasoline composition and properties.** *International Energy Agency*, 2024. Acesso em: 14 de set., de 2025. Disponível em: https://www.iea-amf.org/content/fuel_information/diesel_gasoline

IVANOVA, L. V.; KOSHELEV, V. N.; BUROV, E. A. **Influence of the hydrocarbon composition of diesel fuels on their performance characteristics.** *Petroleum Chemistry*, v. 54, n. 6, p. 466-472, 2014.

JIAO, S.; PENG, Z.; QI, J.; GAO, J.; WEI, G. **Linking bacterial-fungal relationships to microbial diversity and soil nutrient cycling.** *Msystems*, v. 6, n. 2, p. 10.1128/msystems.01052-20, 2021.

KLICH, M. A. ***Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin.** *Molecular plant pathology*, v. 8, n. 6, p. 713-722, 2007.

KONUR, O. **Biodiesel and petrodiesel fuels: science, technology, health, and the environment.** *Biodiesel Fuels*. CRC Press, 2021. p. 3-36.

KOUR, D.; KAUR, T.; DEVI, R.; YADAV, A.; SINGH, M.; JOSHI, D.; SINGH, J.; SUYAL, D. C.; KUMAR, A.; RAJPUT, V. D.; YADAV, A. N.; SINGH, K.; SINGH, J.; SAYYED, R. Z.; ARORA, N. K.; SAXENA, A. K. **Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: present status and future challenges.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 20, p. 24917-24939, 2021.

KUMAR, R.; DE, M. **Enhanced Bioremediation of Commercial Diesel Contamination by Mixed Culture of Newly Isolated *Providencia vermicola* IITG20 and *Pseudomonas aeruginosa* IITG21 from Local Refinery Waste.** *International Journal of Environmental Research*, v. 18, n. 4, p. 62, 2024.

KUTCHEROV, V. G.; KRAYUSHKIN, V. A. **Deep-seated abiogenic origin of petroleum: From geological assessment to physical theory.** *Reviews of geophysics*, v. 48, n. 1, 2010.

LI, J.; XU, Y.; SONG, Q.; YANG, J.; XIE, L.; YU, S.; ZHENG, L. **Polycyclic aromatic hydrocarbon and n-alkane pollution characteristics and structural and functional perturbations to the microbial community: a case-study of historically petroleum-contaminated soil.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 9, p. 10589-10602, 2021.

LINDGREN, J. F.; HASSELLÖV, I.-M.; DAHLLÖF, I. **PAH effects on meio-and microbial benthic communities strongly depend on bioavailability.** *Aquatic Toxicology*, v. 146, p. 230-238, 2014.

LIU, J.; WANG, L.; CHEN, F.; HU, W.; DONG, C.; WANG, Y.; HAN, Y. **Molecular characterization of hydrocarbons in petroleum by ultrahigh-resolution mass spectrometry.** *Energies*, v. 16, n. 11, p. 4296, 2023.

LIU, X.; HE, L.; ZHANG, X.; KONG, D.; CHEN, Z.; LIN, J.; WANG, C. **Bioremediation of petroleum-contaminated saline soil by *Acinetobacter baumannii* and *Talaromyces* sp. and functional potential analysis using metagenomic sequencing.** *Environmental Pollution*, v. 311, p. 119970, 2022.

MAPELLI, F.; SCOMA, A.; MICHOU, G.; AULENTA, F.; BOON, N.; BORIN, S.; KALOGERAKIS, N.; DAFFONCHIO, D. **Biotechnologies for marine oil spill cleanup: indissoluble ties with microorganisms.** *Trends in biotechnology*, v. 35, n. 9, p. 860-870, 2017.

MARGESIN, R.; WALDER, G.; SCHINNER, F. **Bioremediation assessment of a BTEX-contaminated soil.** *Acta Biotechnologica*, v. 23, n. 1, p. 29-36, 2003.

MARMUR, J. **A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms.** *Journal of Molecular Biology*, v. 3, n. 2, p. 208–218, 1961.

MARUTHI, Y. A.; HOSSAIN, K.; THAKRE, S. ***Aspergillus flavus*: a potential bioremediator for oil contaminated soils.** *European Journal of Sustainable Development*, v. 2, n. 1, p. 57-57, 2013.

MEKONNEN, B. A.; ARAGAW, T. A.; GENET, M. B. **Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements.** *Frontiers in Environmental Science*, v. 12, p. 1354422, 2024.

MICHAEL-IGOLIMA, U.; ABBEY, S. J.; IFELEBUEGU, A. O. **A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils.** *Environmental Advances*, v. 9, p. 100319, 2022.

MOHAMMADI, M.; KHORRAMI, M. K. **Application of robust principal component analysis–multivariate adaptive regression splines for the determination of API gravity in crude oil samples using ATR-FTIR spectroscopy.** *Arabian Journal of Chemistry*, v. 16, n. 9, p. 105083, 2023.

MOHANTA, S.; PRADHAN, B.; BEHERA, I. D. **Impact and remediation of petroleum hydrocarbon pollutants on agricultural land: a review.** *Geomicrobiology Journal*, v. 41, n. 4, p. 345-359, 2024.

MOKRANI, S.; HOUALI, K.; YADAV, K. K.; ARABI, A. I. A.; ELTAYEB, L. B.; CABRAL-PINTO, M. M. S.; NABTI, E-H. **Bioremediation techniques for soil organic pollution: Mechanisms, microorganisms, and technologies-A comprehensive review.** *Ecological Engineering*, v. 207, p. 107338, 2024.

MULLA, S.; BAGEWAD, Z. K.; FANIBAND, B.; BILAL, M.; CHAE, J-C.; BANKOLE, P. O.; SARATALE, G. D.; BHARGAVA, R. N.; GURUMURTHY, D. M. **Various strategies applied for the removal of emerging micropollutant sulfamethazine: a systematic review.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 30, n. 28, p. 71599-71613, 2023.

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, p. 562813, 2020.

PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. **Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects.** *Enzyme research*, v. 2011, n. 1, p. 475193, 2011.

PROSKUROWSKI, G.; LILLEY, M. D.; SEEWALD, J. S.; FRÜ -GREEN, G. L.; OLSON, E. J.; LUPTON, J. E.; SYLVA, S. P.; KELLEY, D. S. **Abiogenic hydrocarbon production at Lost City hydrothermal field.** *Science*, v. 319, n. 5863, p. 604-607, 2008.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. **Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods.** *Talanta*, v. 105, p. 292-305, 2013.

RAMIREZ-CORREDORES, M. M. **The science and technology of unconventional oils: finding refining opportunities.** *Academic press*, 2017.

RANDAZZO, A.; VENTURI, S.; TASSI, F. **Soil processes modify the composition of volatile organic compounds (VOCs) from CO₂-and CH₄-dominated geogenic and landfill gases: A comprehensive study.** *Science of The Total Environment*, v. 923, p. 171483, 2024.

RENGARAJAN, T.; RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; LOKESHKUMAR, B.; RAJENDRAN, P.; NISHIGAKI, I. **Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer.** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 5, n. 3, p. 182-189, 2015.

ROBERT, M.; MERCADE, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. **Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1.** *Biotechnology letters*, v. 11, n. 12, p. 871-874, 1989.

SAMPAIO, G. R.; GUIZELLINI, G. M.; SILVA, S. A.; ALMEIDA, A. P.; PINAFFI-LANGLEY, A. C. C.; 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, 2021.

LIMA, S. D.; OLIVEIRA, A. F.; GOLIN, R.; LOPES, V. C. P.; CAIXETA, D. S.; LIMA, D. M.; MORAIS, E. B. **Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil.** *Brazilian Journal of Biology*, v. 80, n. 2, p. 354-361, 2019.

SCHNEIKER, S.; DOS SANTOS, V. A. P.; BARTELS, D.; BEKEL, T.; BRECHT, M.; BUHRMESTER, J.; CHERNIKOVA, T. N.; DENARO, R.; FERRER, M.; GERTLER, C.; GOESMANN, A.; GOLYSHINA, O. V.; KAMINSK, F.; KHACHANE, A. N.; LANG, S.; LINKE, B.; MCHARDY, A. C.; MEYER, F.; NECHITAYLO, T.; PÜLER, A.; REGENHARDT, D.; RUPP, O.; SABIROVA, J. S.; SELBITSCHKA, W.; YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; VORHÖLTER, F.-J.; WEIDNER, S.; KAISER, O.; GOLYSHIN, P. N.

Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature biotechnology*, v. 24, n. 8, p. 997-1004, 2006.

SHAH, A.; SHAH, M. **Characterization and bioremediation of wastewater: a review exploring bioremediation as a sustainable technique for pharmaceutical wastewater.** *Groundwater for Sustainable Development*, v. 11, p. 100383, 2020.

SIDDIQUA, A.; HAHLADAKIS, J. N.; AL-ATTIYA, W. A. KA. **An overview of the environmental pollution and health effects associated with waste landfilling and open dumping.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, n. 39, p. 58514-58536, 2022.

SILVA, A. S.; ANDRIZEN, G. A.; MORAIS, H. V.; DE-ANDRADE, L.; BERNADINO, L. B.; SANTOS, L. A.; MACHADO, M. R.; OLIVEIRA, V. V.; PAES, M. F. 2016. **Biorremediação: micro-organismos x resíduos.** *Genética Na Escola*, 11(2), 100–107.

SONG, B.; TANG, J.; ZHEN, M.; LIU, X. **Effect of rhamnolipids on enhanced anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons in nitrate and sulfate sediments.** *Science of the Total Environment*, v. 678, p. 438-447, 2019.

SPEIGHT, J. G. **The chemistry and technology of petroleum.** *CRC press*, 2006.

TEIXEIRA, J.; DELERUE-MATOS, C.; MORAIS, S.; OLIVEIRA, M. **Environmental contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons and contribution from biomonitoring studies to the surveillance of global health.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 31, n. 42, p. 54339-54362, 2024.

THI MO, L.; IRINA, P.; NATALIA, S.; IRINA, N.; LENAR, A.; ANDREY, F.; EKATARINA, A.; SERGEY, A.; OLGA, P. **Hydrocarbons biodegradation by *Rhodococcus*: assimilation of hexadecane in different aggregate states.** *Microorganisms*, v. 10, n. 8, p. 1594, 2022.

TIAN, Y.; PAN, L.; MIAO, J.; LEI, F.; XU, R.; ZHANG, X. **The mechanism of apoptosis of *Chlamys farreri* hemocytes under benzopyrene stress in vitro.** *Science of the Total Environment*, v. 794, p. 148731, 2021.

TYAGI, R.; CHAUDHARY, A. **Biosensors: Remediation Tool for Indoor Air Pollution**. In: *Recent Advances in Metrology: Select Proceedings of AdMet 2021*. Singapore: *Springer Nature Singapore*, 2022. p. 279-287.

URAKAWA, H.; RAJAN, S.; FEENEY, M. E.; SOBECK, P. A.; MORTAZAVI, B. **Ecological response of nitrification to oil spills and its impact on the nitrogen cycle**. *Environmental microbiology*, v. 21, n. 1, p. 18-33, 2019.

VARONA-TORRES, E.; CARLTON-JR, D. D.; HILDENBRAND, Z. L., SCHUG, K. A. **Matrix-effect-free determination of BTEX in variable soil compositions using room temperature ionic liquid co-solvents in static headspace gas chromatography mass spectrometry**. *Analytica chimica acta*, v. 1021, p. 41-50, 2018.

VASILYEVA, G.; MIKHEDOVA, E.; ZINNATSHINA, L.; STRIJAKOVA, E.; AKHMETOV, L.; SUSHKOVA, S.; ORTEGA-VALVO, J-J. **Use of natural sorbents for accelerated bioremediation of grey forest soil contaminated with crude oil**. *Science of the Total Environment*, v. 850, p. 157952, 2022.

VASSILIOU, M. S. **Historical dictionary of the petroleum industry**. *Bloomsbury Publishing PLC*, 2018.

VOLKOVA, I.; GURA, D.; AKSENOV, I. **Abiogenic and Biogenic Petroleum Origin: A Common Theory for Geological Surveys**. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, v. 18, n. 1, p. 59-65, 2021.

VOZKA, P.; KILAZ, G. **How to obtain a detailed chemical composition for middle distillates via GC×GC-FID without the need of GC× GC-TOF/MS**. *Fuel*, v. 247, p. 368-377, 2019.

WANG, S.; WANG, D.; YU, Z.; DONG, X.; LIU, S.; CUI, H.; SUN, B. **Advances in research on petroleum biodegradability in soil**. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 23, n. 1, p. 9-27, 2021.

WALD, J.; HROUDOVA, M.; JANSKA, J.; VRCHOTOVA, B.; MACEK, T.; UHLIK, O. **Pseudomonads rule degradation of polyaromatic hydrocarbons in aerated sediment**. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 1268, 2015.

WHITE T.J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**, pp. 315–322 in M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky (Eds): *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego (USA) 1990.

WOLFE, D.; MICHEL, J.; HAMEED, M. J.; PAYNE, J. R.; GALT, J. A.; WATABAYASHI, G.; BRADDOCK, J.; HANNA, S.; SALE, D.; SHORT, J.; O'CLAIRE, C.; RICE, S. **The fate of the oil spilled from the Exxon Valdez**. *Environmental science & technology*, v. 28, n. 13, p. 560A-568A, 1994.

WU, M.; DICK, W. A.; LI, W.; WANG, X.; YAN, Q.; WANG, T.; XU, L.; ZHANG, M.; CHEN, L. **Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 107, p. 158-164, 2016.

YAN, J.; WANG, L.; FU, P. P.; YU, H. **Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list**. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 557, n. 1, p. 99-108, 2004.