

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE  
PETRÓLEO**

**RENATA SOARES DOS SANTOS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**

**DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO - 2020**

# BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO

**RENATA SOARES DOS SANTOS**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Marco Antonio Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2020

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S237

Santos, Renata Soares dos.

Bioprospecção de bactérias degradadoras de petróleo / Renata Soares dos Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

56 f.

Bibliografia: 37 - 44.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Marco Antonio Martins.

1. isolamento. 2. hidrocarbonetos. 3. bioestimulação. 4. bioaugmentação. 5. atenuação natural. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

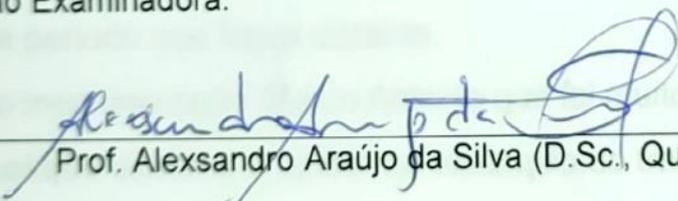
# BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO

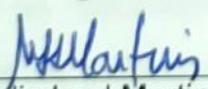
**RENATA SOARES DOS SANTOS**

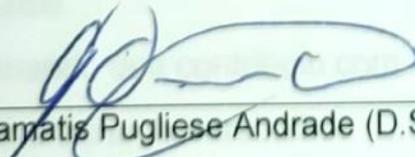
“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2020

Comissão Examinadora:

  
Prof. Alexandre Araújo da Silva (D.Sc., Química) – UERJ

  
Prof.ª Meire Leis Leal Martins (PhD, Microbiologia e Biotecnologia) – UENF

  
Prof. Gabriel Ramatis Pugliese Andrade (D.Sc., Solos e Nutrição de Plantas) – UENF

  
Prof. Marco Antonio Martins (PhD, Microbiologia do solo) – UENF  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho, durante essa etapa.

À minha mãe pela dedicação e por ter me proporcionou a oportunidade de realizar os meus estudos de graduação e a partir disso eu ter tido a possibilidade de seguir com a pós-graduação como desejava.

À minha filha que foi meu maior presente durante o mestrado e mesmo nos momentos mais difíceis, foi o incentivo para eu continuar. E a Rafael por ter cuidado dela nesse período que fiquei distante.

Ao meu orientador Marco Antonio que foi muito paciente durante todo esse período, sempre disposto a ajudar na execução do trabalho.

À técnica de laboratório Andreia que me ajudou muito durante esse período, com todos os processos e metodologias que usei. Além dos conselhos que foram muitos.

À Fernando que contribuiu com a montagem do experimento e tirou muitas dúvidas que tive durante o trabalho.

À Jorge que me ajudou nas fases finais do doutorado e que foi muito importante como um grande amigo e incentivador...me dando forças quando eu queria desistir.

Aos amigos que fiz durante todo esse período, dentro e fora da universidade (Fran, Gustavo, Naiara, Rayane e Socorro) vocês com pequenas ações me ajudaram muito a passar por esse período longe da minha família.

As pessoas maravilhosas que conheci de outros laboratórios e disciplinas que amei muito conviver durante esse período (Renata, Quenia, Erica, Samara e muitos outros que não vou lembrar o nome agora)

Aos professores e técnicos que tive o prazer de conviver e de adquirir muito conhecimento.

E por último e não menos importante, agradeço especialmente a Wesley que foi muito importante na última etapa do meu doutorado, sem dúvidas foi um grande apoio e amigo nessa fase.

Posso dizer que todos foram fundamentais na conquista dessa etapa da minha vida, passei por muitos problemas pessoais. Mas vocês foram o meu suporte para seguir em frente...muito obrigada a todos vocês.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Solos contaminados por petróleo e seus derivados .....	3
2.2 Remediação do petróleo no solo .....	5
2.3 Bioprospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo .....	7
2.4 Fatores que influenciam a ação das bactérias degradadoras de petróleo .....	9
2.5 Torta de filtro de cana-de-açúcar .....	10
2.6 Testes de toxicidade em ambientes contaminados por petróleo.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Isolamento, identificação e caracterização das bactérias .....	12
3.1.1 Isolamento .....	12
3.1.2 Identificação .....	13
3.1.3 Caracterização .....	14
3.2 Atividade hidrocarbonoclástica das bactérias isoladas .....	14
3.3 Avaliação da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) .....	15
3.4 Ensaio ecotoxicológico com germinação de alface .....	16
3.5 Análise estatística .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Isolamento, identificação e caracterização das bactérias .....	20
4.1.1 Isolamento .....	20

4.1.2 Identificação .....	21
4.1.3 Caracterização .....	24
4.2 Atividade hidrocarbonoclástica das bactérias isoladas .....	26
4.3 Avaliação da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) .....	28
4.4 Ensaio ecotoxicológico com germinação de alface .....	31
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## RESUMO

DOS SANTOS, RENATA SOARES. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro, 2020. Bioprospecção de bactérias degradadoras de petróleo. Orientador: Marco Antonio Martins.

A recuperação de solos contaminados por petróleo e seus derivados pode ser realizada utilizando bactérias degradadoras de hidrocarbonetos. O uso de isolados bacterianos aumenta exponencialmente a concentração de organismos realizando esta função, acelerando o processo de biorremediação. O objetivo do trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a eficiência de bactérias degradadoras de petróleo no processo de biorremediação. Para o isolamento foi utilizado 1 g de solo em solução enriquecida e petróleo como única fonte de carbono, incubada a 30 °C, a 160 rpm, por 7 dias. O solo utilizado para o isolamento foi classificado como Argissolo Vermelho Distrófico, e foi coletado em uma área de aproximadamente 800m<sup>2</sup>, às margens da BR-101, no Km 88, em Ibitioca, Campos dos Goytacazes - RJ, onde ocorreu um vazamento de pelo menos 30 mil litros de diesel, proveniente de um acidente com um caminhão tanque Scania bi-trem. A coleta foi realizada no mesmo dia em que ocorreu vazamento do produto a uma profundidade de 0-20 cm. Ao final do isolamento foram obtidas 9 bactérias, nas quais foram realizadas a avaliação da eficiência carbonoclástica com o uso de três técnicas de biorremediação (bioaumentação, bioestimulação e atenuação natural). O experimento de biorremediação foi conduzido por 85 dias em casa de vegetação, em delineamento casualizado, com 7 tratamentos: Controle (T1); Petróleo (T2); Petróleo + C1 (T3); Petróleo + C2 (T4); Controle com torta de filtro e petróleo (T5); Petróleo + C1 + torta de filtro (T6); Petróleo + C2 + torta de filtro (T7) com 4 repetições. Foram realizadas 4 coletas de solo durante o experimento, incluindo o tempo 0 (1 dia de experimento)

e as demais com intervalos de 28 dias. Após a avaliação dos hidrocarbonetos totais de petróleo foi realizado um ensaio ecotoxicológico com semente de alface (*Lactuca sativa* L.) da variedade Branca de Boston Manteiga, sem defensivos da marca Feltrin, testando a toxicidade do solo derivado do experimento de avaliação carbonoclástica. Os resultados mostraram que as bactérias B2 (*Pseudomonas* sp.), B5 (*Klebsiella* sp.) e B7 (*Rhodococcus* sp.) isoladas, degradaram hidrocarbonetos com maior eficiência da *Klebsiella* sp. (B5). Após o processo de biorremediação, observou-se que todos os tratamentos degradaram mais de 50% dos hidrocarbonetos totais de petróleo no solo, com destaque para os tratamentos T6 e T7, em que foi aplicada a técnica de bioaugmentação (adição de microrganismos selecionados) com bioestimulação (adição de nutrientes). Diante dos resultados apresentados, concluiu-se que: a bactéria B2 (*Pseudomonas* sp.), B5 (*Klebsiella* sp.) e B7 (*Rhodococcus* sp.) foram mais eficientes em degradar os hidrocarbonetos totais de petróleo; e que a biorremediação com as técnicas de bioaugmentação + bioestimulação (T6 e T7) foi mais eficiente, sendo superior a 87%; O teste ecotoxicológico foi um ótimo indicador para confirmar a redução da toxicidade do solo nos tratamentos mais eficientes na biorremediação.

**Palavras-chave:** isolamento, hidrocarbonetos, bioestimulação, bioaugmentação, atenuação natural

## ABSTRACT

DOS SANTOS, RENATA SOARES. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro, 2020. Bioprospection of degrading petroleum bacteria. Advisor: Marco Antonio Martins.

The recovery of soils contaminated by oil and its derivatives can be carried out by hydrocarbon-degrading bacteria. The use of bacterial isolates exponentially increases the concentration of organisms performing this function, accelerating the bioremediation process. The objective of the work was to isolate, characterize and evaluate the efficiency of oil-degrading bacteria in the bioremediation process. For isolation, 1 g of soil in enriched solution and oil as the sole carbon source, incubated at 30 ° C, at 160 rpm for 7 days was used. The soil used for the isolation was classified as Argisol Red Dystrophic and collected in an area of approximately 800m<sup>2</sup> on the banks of BR-101, at Km 88, in Ibitioca, Campos dos Goytacazes - RJ, where there was a leak of at least 30 thousand liters diesel fuel from an accident with a Scania bi-train tanker. The collection was carried out on the same day that the product leaked to a depth of 0-20 cm. At the end of the isolation, 9 bacteria were obtained and the carbonoclastic efficiency assessment was performed using three bioremediation techniques (bio-augmentation, biostimulation and natural attenuation). The bioremediation experiment was conducted for 85 days in a greenhouse in a randomized design with 7 treatments: Control (T1); Oil (T2); Oil + C1 (T3); Oil + C2 (T4); Control with filter cake and oil (T5); Oil + C1 + filter cake (T6); Oil + C2 + filter cake (T7) with 4 repetitions. Four soil collections were carried out

during the experiment, including time 0 (1 day of experiment) and the others with intervals of 28 days. After evaluating the total oil hydrocarbons, an ecotoxicological test was performed with lettuce seed (*Lactuca sativa* L.) of the White variety of Boston Butter without pesticides of the Feltrin brand, testing the toxicity of the soil derived from the carbonoclastic evaluation experiment. The results showed that bacteria B2 (*Pseudomonas* sp.), B5 (*Klebsiella* sp.) And B7 (*Rhodococcus* sp.) Isolated degraded hydrocarbons, with greater efficiency of *Klebsiella* sp. (B5). After the bioremediation process, they observed that all treatments degraded more than 50% of the total oil hydrocarbons in the soil, with emphasis on the T6 and T7 treatments, which were applied the bio-augmentation technique (addition of selected microorganisms) with biostimulation (addition of nutrients). In view of the results presented, we can conclude that: the bacteria B2 (*Pseudomonas* sp.), B5 (*Klebsiella* sp.) And B7 (*Rhodococcus* sp.) Were more efficient in degrading the total oil hydrocarbons; bioremediation with the techniques of bio-augmentation + biostimulation (T6 and T7) was more efficient, being higher than 87%; The ecotoxicological test was a great indicator to confirm the reduction of soil toxicity in the most efficient treatments in bioremediation.

**Keywords:** isolation, hydrocarbons, biostimulation, bioaugmentation, natural attenuation

## 1. INTRODUÇÃO

O petróleo é a fonte de energia mais importante na atualidade, possibilitando a realização de diversas atividades, principalmente a formação de combustíveis. Entretanto, uma das principais preocupações ambientais é o potencial de contaminação do solo e da água por hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs). Os Hidrocarbonetos, mesmo em pequenas concentrações, podem causar um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente, pois possui alta toxicidade, tornando o petróleo um dos mais persistentes contaminantes orgânicos do meio ambiente (Paula et al., 2006; Hassanshahian et al., 2012; Maqbool et al., 2012; Santos et al., 2018a; Imam et al., 2019).

A contaminação do solo com HTPs ocorre principalmente por acidentes durante a exploração e transporte do petróleo, devido a falhas nesses processos. Em função da existência de atividades de exploração de petróleo (Bacia de Campos), assim como da indústria de cana e álcool (na região de Campos), predomina nesta via o tráfego de produtos das Classes de Risco 2 (gases), 3 (líquidos inflamáveis) e 8 (substâncias corrosivas). Com isso, no período de 2014 a 2016, foram registrados muitos acidentes na rodovia entre Campos dos Goytacazes e Rio Bonito, sendo 56% deles envolvendo produtos inflamáveis (INEA RJ, 2017).

A fim de minimizar os impactos causados pela contaminação do solo por hidrocarbonetos, a legislação brasileira (Resolução CONAMA nº 420) exige que seja feita a remediação dessas áreas, diminuindo a interferência ambiental e restaurando os ecossistemas. Ao longo dos anos diversas técnicas vêm sendo

desenvolvidas para a atenuação e remoção de contaminantes provenientes da indústria petrolífera. Os processos biológicos têm mais destaque por serem métodos naturais, e relativamente simples, menos agressivos e mais adequados para manutenção do equilíbrio ecológico (Brito et al., 2010; Weber e Santos, 2013).

Para a descontaminação do solo pode ser utilizada a biorremediação, que é uma técnica eficaz e oferece um ótimo custo-benefício quando é mediada por microrganismos. Predominando o uso de bactérias nesses processos de biorremediação (Quintella et al., 2019). Que devem possuir a capacidade efetiva em degradar os hidrocarbonetos presentes no solo.

Os microrganismos indígenas isolados de solos contaminados por óleos combustíveis e aplicados em consórcios, são os que apresentam maior eficiência (Souza et al., 2010; Tonini et al., 2010; Pinhati et al., 2014; Guarino et al., 2017; Al-Hawash et al., 2018; Imam et al., 2019; Pacwa-Płociniczak et al., 2019). Diante do exposto, o objetivo da pesquisa foi isolar, identificar, caracterizar bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e avaliar sua eficiência no processo de remediação de um solo contaminado com petróleo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Solos contaminados por petróleo e seus derivados

O petróleo constitui uma importante fonte energética para a vida cotidiana e a atividade industrial mundial (Souza et al., 2010; Maqbool et al., 2012; Morais Filho e Coriolano, 2016; Guarino et al., 2017). No Brasil, em janeiro de 2019, foi registrado uma produção de petróleo com 2,6 milhões de barris por dia (bbl/d). O estado do Rio de Janeiro é responsável por 72% dessa produção (Figura 1), e a bacia de Campos, sozinha, representa 45% do que é produzido no território nacional (ANP, 2019).

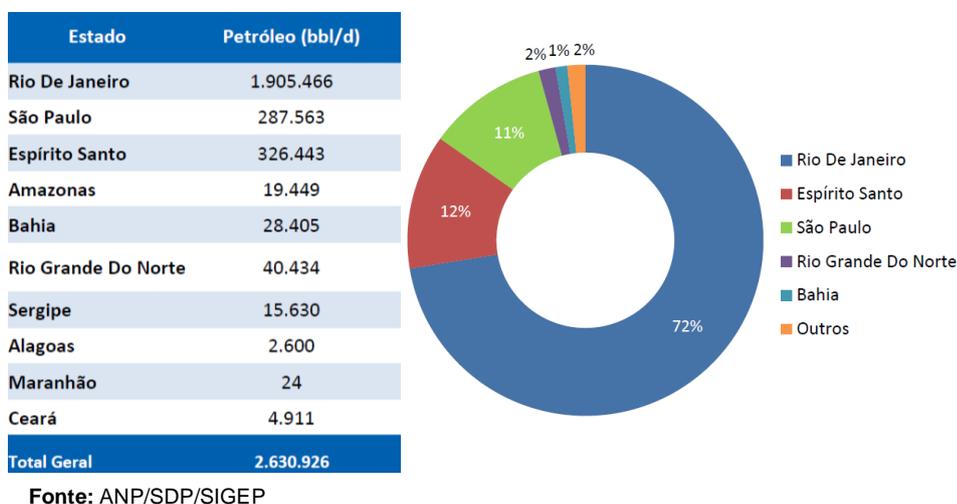


Figura 1. Distribuição da produção de petróleo por estado

O petróleo é formado principalmente por carbono e hidrogênio (hidrocarbonetos), sendo utilizado na geração de combustíveis (gasolina, gás natural, gás de petróleo liquefeito, óleo diesel e querosene de aviação) e na fabricação de diversos produtos, como: plásticos, tintas, borrachas sintéticas, farmacêuticos, cosméticos, entre outros da indústria petroquímica (Morais Filho e Coriolano, 2016; Imam et al., 2019).

Apesar de todos os benefícios o petróleo contém em sua composição contaminantes como enxofre e metais pesados, que causam grandes riscos para o meio ambiente durante a sua extração, transporte, refino, até o consumo (Paula et al., 2006; Lopes e Piedade, 2010; Moraes Filho e Coriolano, 2016). A maior parte do petróleo é biodegradável (60% - 90%), mas o restante, em estado bruto ou refinado, é recalcitrante (10% - 40%), e mesmo sendo uma pequena porção, representa toneladas de poluentes impactando o ecossistema (Paula et al., 2007; Tonini et al., 2010).

O petróleo possui em sua composição uma cadeia de hidrocarbonetos, sendo a maior parte constituída por alcanos e hidrocarbonetos aromáticos. Assim o petróleo apresenta alta toxicidade, tornando um dos mais persistentes contaminantes orgânicos do meio ambiente (Paula et al., 2006; Hassanshahian et al., 2012; Maqbool et al., 2012; Imam et al., 2019). O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, são os hidrocarbonetos que constantemente são identificados e quantificados, antes e durante um processo de remediação de área contaminada por petróleo (Imam et al., 2019). Esses hidrocarbonetos monoaromáticos exigem uma maior preocupação ambiental porque suas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzênico, tornando mais difícil a degradação desses hidrocarbonetos (Andrade et al., 2010; Lopes e Piedade, 2010).

Na exploração e transporte de petróleo pode ocorrer desastres, devido a falha nesses processos, decorrentes de acidentes e vazamentos com alto risco de contaminação de todo um ecossistema, pelos hidrocarbonetos presentes neste combustível (Lopes e Piedade, 2010; Souza et al., 2010; Hassanshahian et al., 2012; Haghollahi et al., 2016; Moraes Filho e Coriolano, 2016; Guarino et al., 2017; Imam et al., 2019).

## 2.2 Remediação do petróleo no solo

Nos últimos vinte anos a contaminação ambiental por petróleo e derivados vem causando a mobilização de empresas privadas e do poder público em todo o mundo (Wetler-Tonini et al., 2011). A principal preocupação é a contaminação de solo e da água por hidrocarbonetos derivados de petróleo que, mesmo em pequenas concentrações, podem causar um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente (Souza et al., 2010).

A legislação brasileira (Resolução CONAMA nº 420) exige a remediação de áreas contaminadas para minimizar a interferência ambiental e restaurar os ecossistemas, por isso, vem sendo realizados grandes esforços para o desenvolvimento de tecnologias limpas. Algumas das técnicas mais empregadas atualmente são: química, oxidação química *in-situ*; física, extração de vapores no solo; e biológica, atenuação natural e biorremediação (Conceição et al., 2007; Andrade et al., 2010; Souza et al., 2010).

A oxidação *in-situ* tem o objetivo de degradar rapidamente os contaminantes, por meio de reações químicas que promovem a oxidação ou a redução das espécies de interesse presentes em uma determinada área. No entanto, a extração de vapores se baseia fundamentalmente na aplicação de fluxos de ar, condicionada a três fatores específicos: volatilidade do contaminante, ausência de ar em ambientes saturados com água, e permeabilidade do solo (Andrade et al., 2010). A atenuação natural é uma remediação passiva de solo que envolve a ocorrência de diversos processos de origens naturais, como a biodegradação, a volatilização, a dispersão, a diluição e a adsorção, promovidos na subsuperfície (Andrade et al., 2010; Chaudhary e Kim, 2019).

Dentre as técnicas citadas, os processos biológicos se destacam por serem métodos naturais e relativamente simples, menos agressivos e mais adequados para manutenção do equilíbrio ecológico (Brito et al., 2010; Weber e Santos, 2013). Sendo assim, a biorremediação é uma técnica eficaz à descontaminação, em especial, de solo com hidrocarbonetos de petróleo (Agamuthu et al., 2013; Haghollahi et al., 2016; Imam et al., 2019). Esta técnica oferece um interessante custo-benefício quando é mediada por microrganismos (Subashchandrabose et al., 2019). No processo biológico também existe a possibilidade de serem usadas plantas, biofitorremediação, em ambientes *in situ* e/ou *ex situ* (Conceição et al.,

2007; Andrade et al., 2010; Brito et al., 2010; Souza et al., 2010; Tonini, et al., 2010; Morais Filho e Coriolano, 2016).

Neste contexto, o laboratório de Microbiologia do solo do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes-RJ, vem desenvolvendo pesquisas voltadas para a remediação de solos contaminados com petróleo e óleo diesel (Figura 2).

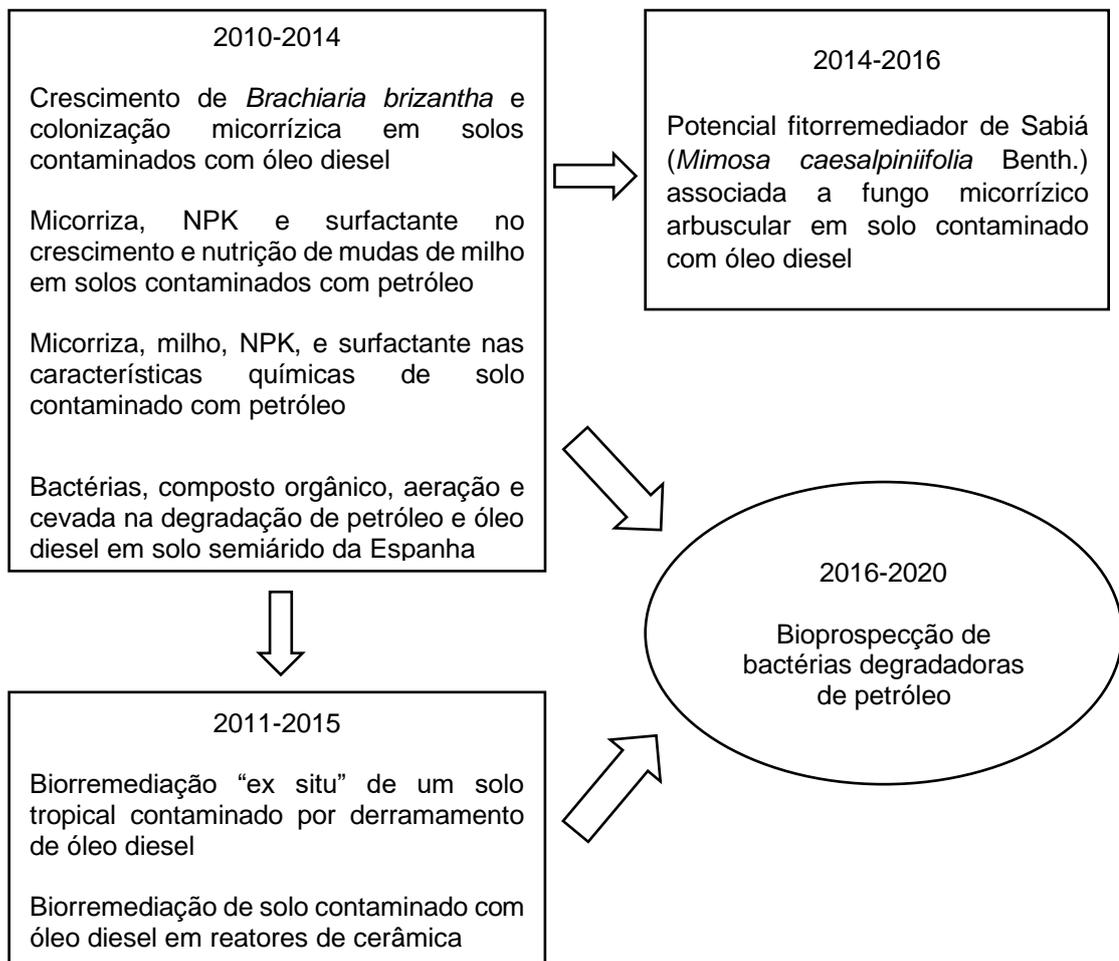


Figura 2. Trabalhos realizados pelo laboratório de Microbiologia do solo da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Mostrando a importância de ter um projeto que abrange vários métodos capazes de concluir o que realmente é mais aplicável para a remediação do solo na região de estudo.

### 2.3 Bioprospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo

O processo de remediação do solo começa a partir do momento que as bactérias entram em contato com esse contaminante, inicialmente ocorre a volatilização da fração mais simples do petróleo e as demais são degradadas quando a bactéria utiliza o carbono presente nos hidrocarbonetos totais do petróleo.

A contaminação ambiental por petróleo e derivados tem proporcionado um aumento na demanda de estudos de caracterização de microrganismos, que poderão ser aplicados na biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo (Wetler-Tonini et al., 2011). Os hidrocarbonetos são micropoluentes perigosos, pois apresentam propriedades mutagênicas e carcinogênicas (Brito et al., 2010), e são resistentes à degradação. Eles são comumente encontrados em locais com extração de petróleo, produção de gás e indústrias de processamento de madeira (Kuppusamy et al., 2017).

A bioprospecção de organismos degradadores de derivados de petróleo incentiva o tratamento biológico de solos contaminados por estes compostos, e contribui para a gestão e recuperação de áreas contaminadas (Souza et al., 2010). Para o sucesso da biorremediação é imprescindível verificar a procedência dos microrganismos e sua adaptação em sobreviver aos ambientes contaminados (Tonini et al., 2010; Morais Filho e Coriolano, 2016).

Desde a década de 1950 vem sendo realizado o isolamento de linhagens puras de bactérias e fungos capazes de metabolizar os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) (Quintella et al., 2019). Dentre estes, é predominante o uso das bactérias (57%) pertencentes, principalmente, aos gêneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros (Jacques et al., 2005; Jacques et al., 2007a; Quintella et al., 2019).

Por isso, a adição de bactérias nativas que metabolizam hidrocarbonetos se tornou uma efetiva metodologia para a biorremediação de ambientes contaminados com óleo diesel (Souza et al., 2010). Algumas bactérias têm a capacidade de utilizar os hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia para o seu crescimento (Oliveira e Alves, 2013; Paula et al., 2006; Jacques et al.,

2007b; Al-Hawash et al., 2018), resultando na degradação desses compostos e na sua eliminação do ambiente, como exemplificado pela Figura 3.

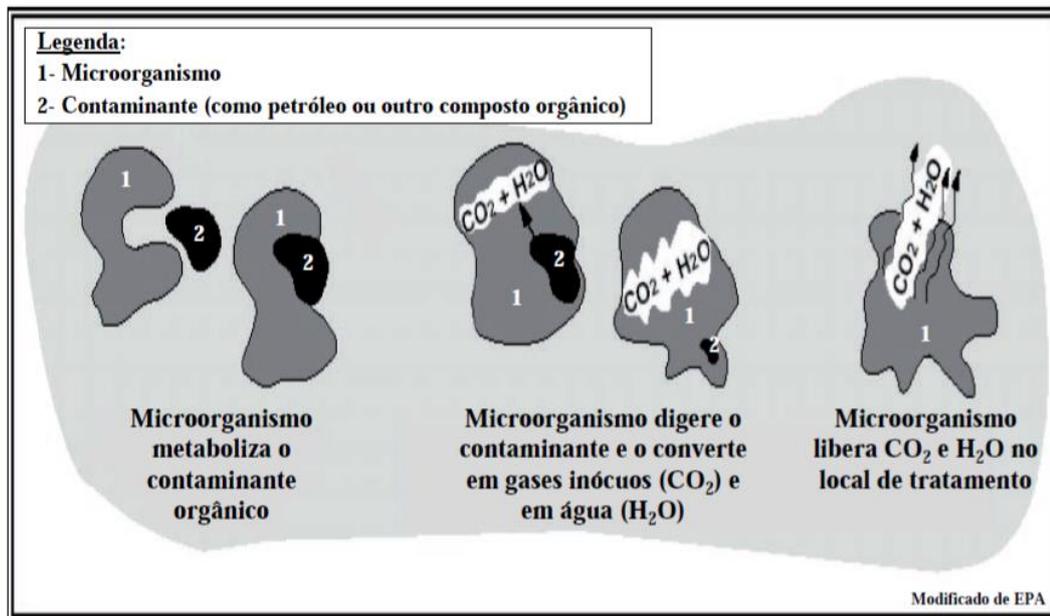


Figura 3. Esquema Simplificado da ação de microrganismos em processos de biorremediação (Andrade et al., 2010).

No processo de biorremediação, as bactérias devem possuir a capacidade efetiva em degradar os hidrocarbonetos presentes no solo (Imam et al., 2019; Pacwa-Płociniczak et al., 2019). Os microrganismos indígenas (Guarino et al., 2017), em consórcios microbianos (Tonini et al., 2010; Pinhati et al., 2014) e isolados de solos contaminados por óleos combustíveis (Souza et al., 2010; Al-Hawash et al., 2018), são os que apresentam maior eficiência.

Segura et al. (2016) avaliaram a capacidade de cinco estirpes de bactérias, em uma área de mangue do Peru para biodegradar hidrocarbonetos de petróleo, e concluíram que elas têm capacidade de degradar e utilizar os hidrocarbonetos como fonte de carbono. Pinhati et al. (2014), estudando a eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo, verificaram que as maiores taxas de degradação foram obtidas utilizando um consórcio microbiano, que apresenta uma alta capacidade enzimática capaz de degradar os poluentes.

## 2.4 Fatores que influenciam a ação das bactérias degradadoras de petróleo

A descontaminação dos locais com microrganismos autóctones (do próprio local da contaminação) ou alóctones (trazidos de outro local), pode ser realizada por meio de bioaugmentação, bioestimulação ou atenuação natural (Andrade et al., 2010).

A bioaugmentação é a adição de microrganismos, nativos ou exógenos, que degradam hidrocarbonetos do solo, quando as comunidades microbianas nativas não possuem as capacidades catabólicas desejadas (Fuentes et al., 2014; Koshlaf et al., 2016). A bioestimulação consiste na adição de nutrientes, otimizando as condições ambientais, permitindo assim, o aumento da taxa de crescimento e das atividades metabólicas dos microrganismos e, conseqüentemente, o aumento da velocidade e da porcentagem de biodegradação (Andrade et al., 2010; Fuentes et al., 2014; Chaudhary e Kim, 2019). Na atenuação natural a descontaminação ocorre através de processos naturais como a biodegradação, volatilização, dispersão, diluição e adsorção. A principal vantagem é que, mesmo sem o acréscimo de nutrientes no solo ou a adequação de qualquer condição ambiental, a redução do contaminante pode acontecer de maneira eficiente e contínua (Andrade et al., 2010).

A eficiência de cada processo de degradação depende de fatores físicos, químicos e biológicos como: biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, estrutura molecular do poluente e sua concentração (Admon et al., 2001; Mrozik e Piotrowska-Seget, 2010; Tonini et al., 2010; Suja et al., 2014; Koshlaf et al., 2016). Portanto, é essencial traçar o perfil e caracterizar a amostra de solo contaminada a ser estudada, antes do início do experimento de biodegradação (Abena et al., 2019).

Das técnicas citadas, a adição de nutrientes é muito utilizada para otimizar a ação das bactérias degradadoras de petróleo. Essa técnica tem a finalidade principal de melhorar o desempenho dos microrganismos nativos do solo contaminado por petróleo e derivados (Rizzo et al., 2007; Andrade et al., 2010; Morais Filho e Coriolano, 2016).

Os nutrientes podem ser obtidos de fontes orgânicas e inorgânicas, contudo, os nutrientes orgânicos podem reduzir os custos no processo de

biorremediação, além de ajudar a diminuir os resíduos no meio ambiente (Koshlaf et al., 2016; Abena et al., 2019). Os estudos de Koshlaf et al. (2016) demonstraram que a adição de resíduos vegetais em solo contaminado levou a um aumento significativo na degradação de HTP no solo, em comparação com os obtidos no solo controle.

## 2.5 Torta de filtro de cana-de-açúcar

A torta de filtro de cana-de-açúcar é um resíduo vegetal composto da mistura de bagaço moído e lodo da decantação, sendo proveniente do processo de clarificação do açúcar. No processamento da cana-de-açúcar são produzidos, para cada tonelada de cana moída, cerca de 30 kg de torta de filtro e 240 kg de bagaço de cana (Dematê, 1992). Grande parte dos subprodutos da cana-de-açúcar não são desperdiçados. O bagaço, por exemplo, é utilizado para a produção de energia, enquanto a vinhaça (rica em potássio) e a torta de filtro são utilizadas como fertilizantes nas próprias plantações de cana (Vitti, 2006; Santos et al., 2012).

A torta de filtro contribui para o sucesso da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) pela alta presença de bactérias, e pela composição química (Bernardino et al., 2018; Abena et al., 2019). Cerca de 85,1% da torta de filtro é constituída de matéria orgânica e uma pequena fração mineral composta por fósforo, nitrogênio, cálcio, além de teores consideráveis de potássio, magnésio, enxofre, micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu) e baixas concentrações de metais pesados como crômio, cádmio e chumbo (Cr, Cd, Pb) (Bernardino et al., 2018).

A torta de filtro, além de ser um resíduo que contribui para a biorremediação, é de fácil acesso, reduzindo os custos do processo de remediação. Também é um resíduo utilizado em outras práticas agrícolas, mostrando vários benefícios para a nutrição das plantas e a microbiota do solo. Mesmo a torta de filtro sendo um resíduo rico em bactérias, ela favorece a multiplicação dos microrganismos presentes no solo, e conseqüentemente auxilia no desenvolvimento e nutrição das bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, sendo já utilizada em trabalhos de biorremediação.

## 2.6 Testes de toxicidade em ambientes contaminados por petróleo

Os testes de toxicidade avaliam as respostas de organismos vivos quando submetidos a um agente nocivo, detectando ou medindo o efeito de substâncias, resíduos ou fatores ambientais, que atuam isoladamente ou em conjunto, sobre os seres vivos. Estes testes determinam o tempo e as concentrações necessárias para que o agente tóxico possa causar efeitos adversos detectáveis (Okumura, 2011). Assim, a ecotoxicologia permite avaliar os efeitos tóxicos de compostos, estudando substâncias sob vários fatores de interferência, sem ser necessário um conhecimento profundo sobre o ecossistema e suas intrarrelações (Fantin, 2009).

Os testes ecotoxicológicos têm sido usados com sucesso como ferramenta para monitorar a eficiência da biorremediação no solo, sendo um importante instrumento para avaliar os riscos ecológicos em locais poluídos (Jiang et al., 2016). No entanto, poucos estudos combinam estes testes toxicológicos com uma avaliação detalhada das comunidades microbianas nos solos poluídos por petróleo (Sheppard et al., 2011). Para garantir a avaliação adequada dos riscos dos sítios contaminados e a monitorização dos processos de biorremediação, devem ser combinados ensaios de toxicidade e análises químicas de solos dessas áreas (Coulon et al., 2005).

Para a avaliação da adequação do solo para sustentar os organismos vivos, é necessário método de teste biológico de baixo custo, como complemento da análise química. O teste de triagem para emergência de mudas de alface é aplicável a solos contaminados, especialmente por ser um teste econômico e que pode ser realizado em um curto período. Além disso, a triagem para emergência não requer equipamentos avançados para medições ou para o cultivo de plantas, e pode ser conduzido por qualquer técnico de laboratório qualificado, sem treinamento especial (ISO 17126, 2005). Al-Wabel et al. (2019) constataram o efeito negativo dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) na germinação da alface, mostrando o quanto a planta é sensível, e apresenta uma resposta rápida para a avaliação de toxicidade.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. As análises foram executadas no laboratório de microbiologia do solo da UENF. O solo utilizado, classificado como Argissolo Vermelho Distrófico (Santos et al., 2018b), foi coletado em uma área de aproximadamente 800m<sup>2</sup>, às margens na BR-101, no Km 88, em Ibitioca, Campos dos Goytacazes - RJ, onde ocorreu um vazamento de pelo menos 30 mil litros de diesel, proveniente de um acidente com um caminhão tanque Scania bi-trem. A coleta foi realizada no mesmo dia em que ocorreu o vazamento do produto, a uma profundidade de 0-20 cm (Tellechea et al., 2016).

#### 3.1 Isolamento, identificação e caracterização das bactérias

##### 3.1.1 Isolamento

As bactérias foram isoladas do solo descrito anteriormente, conforme metodologia de Zhao et al. (2011), com modificação. Para o isolamento foi adicionado uma amostra de 1 g de solo em 100 mL de solução enriquecida (g/L): 0,5 Extrato de levedura; 2,0 NaCl; 0,8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,3 MgCl<sub>2</sub>; 0,01 FeSO<sub>4</sub>; 0,01 CaCl<sub>2</sub>; 4,0 NaNO<sub>3</sub> e 1% (v/v) de petróleo como única fonte de carbono, incubada a 30 °C em agitador, a 160 rpm por 7 dias.

Após a incubação foi realizada uma diluição seriada até 10<sup>-9</sup>, com adição de 90 mL de solução enriquecida em cada diluição. Foram utilizadas as amostras

$10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$ , com três repetições em cada diluição, e uma amostra sem diluição como controle. Foi adicionado 10% (v/v) de petróleo em todas as amostras e agitado a 160 rpm, por 7 dias. A amostra com maior diluição que apresentou degradação do petróleo foi selecionada como consórcio funcional para o isolamento das bactérias.

As espécies bacterianas foram isoladas por enriquecimento seletivo, usando o meio de sais minerais Buschnell Haas (BH) (Bushnell e Haas, 1941), composto por (g/L): 0,20  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02  $\text{CaCO}_2$ ; 1,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,0  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,05  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; e 20,0 ágar. Foi utilizado o método de espalhamento em placa, e adicionadas 0,1 mL da amostra obtida na etapa anterior em placas de ágar BH, incubadas a 30° C com 1% (v/v) de petróleo por até 5 dias. Para validação as colônias observadas foram reinoculadas mediante estrias em placas de ágar BH, e incubadas a 30° C. Após a validação, os isolados foram purificados em placas de ágar nutriente ((g/L): 1,0 extrato de carne; 2,0 extrato de levedura; 5,0 peptona; 5,0 cloreto de sódio 15,0 ágar), antes de serem diferenciadas com base em suas morfologias. Os estoques de culturas puras foram mantidos a -80 °C em glicerol a 50%.

### 3.1.2 Identificação

Os procedimentos de extração de DNA foram realizados no laboratório CRB-JD na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil. O DNA das amostras foi extraído com o kit *Wizard® Genimic DNA Purification* (Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Extratos de DNA foram utilizados para amplificação do 16S rRNA por PCR. O 16S rRNA foi amplificado, ambos com um par de primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Em seguida foi preparada a reação de sequenciamento de produtos de PCR, avaliando em gel de agarose 2% e verificando apenas uma banda no gel, sendo esta referente à amplificação com Taq DNA polimerase.

Foi utilizado o marcador *low mass dna ladder* (Life), pois este serve como marcador de tamanho e concentração. A quantificação foi realizada no equipamento Qubit e com alíquota de 2 ul do produto de PCR, e a purificação enzimática do produto foi feita utilizando o método Exo/FastAP. A reação foi realizada em termociclador (*SimpliAmp Thermal Cycler*), utilizando as seguintes

condições: 96 °C por 1 min, 35-40 ciclos de ampliação a 96 °C/15 s, 50 °C/ 15 s, 60 °C/4 min e Hold 4 °C. A purificação pós-reação foi feita por precipitação com Acetato de sódio, EDTA e Etanol. Posteriormente foi adicionado formamida e as amostras seguiram para a injeção no ABI3500, a fim de obter o sequenciamento.

As sequências 16S rRNA foram analisadas usando o banco de dados GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e as identificações foram feitas com base na homologia da sequência 16S rRNA, usando a ferramenta BLAST nucleotídeo (blastn).

Os alinhamentos de sequência e o desenho da árvore filogenética foram realizados usando o programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007). As sequências foram inicialmente submetidas à análise BLAST *on-line* do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para confirmar a identidade da sequência. As cepas presentes no banco de dados, com alta similaridade de sequência com os isolados, foram copiadas e manipuladas no MEGA 4.

### 3.1.3 Caracterização

As bactérias foram repicadas em caldo nutriente ((g/L): 1,0 extrato de carne; 2,0 extrato de levedura; 5,0 peptona; 5,0 cloreto de sódio) a 30 °C com agitador a 120 rpm, e realizada a leitura em densidade óptica (OD<sub>600</sub>) até os isolados chegarem na fase estacionária (Santos et al., 2005), e obter a curva de crescimento de cada bactéria isolada.

As bactérias também foram crescidas em placas contendo meio BH com o petróleo, para observar como ocorre o seu crescimento somente com o petróleo como fonte de carbono, e compará-las quando crescidas em meio caldo nutriente.

A coloração de gram foi realizada com base no protocolo de Yano et al. (1991), para observar o formato das células bacterianas e se os isolados estavam puros.

### 3.2 Atividade hidrocarbonoclástica das bactérias isoladas

A atividade hidrocarbonoclástica foi realizada seguindo a metodologia descrita por Mansur et al. (2014) e Hanson et al. (1993), para confirmar se as bactérias isoladas degradam o petróleo como única fonte de carbono e energia. As

bactérias foram crescidas em meio Caldo nutriente a 30 °C em agitador a 120 rpm, entre 24h-48h. Após esse período, as bactérias foram colhidas por centrifugação (4 °C, 5000 rpm, 5 min) e depois lavadas duas vezes com água destilada estéril para remover totalmente o meio de cultura. Antes da utilização, as bactérias foram suspensas em 1mL de água estéril.

Foi montado um ensaio em placas Biolog MT2, utilizando as bactérias, petróleo, o indicador DCPIP e o meio BH, com 3 tratamentos: T1 (Controle com meio BH + Petróleo), T2 (meio BH + Bactéria) e T3 (meio BH + Bactéria + petróleo). Os resultados do T3 foram observados a fim de confirmar visualmente se as bactérias degradavam os hidrocarbonetos presentes no petróleo. O indicador DCPIP passa da coloração azul para incolor com o processo de degradação pela ação da atividade das bactérias degradadoras (Fioravanti et al., 2012).

### 3.3 Avaliação da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP)

As bactérias foram inoculadas em 15 mL de caldo nutriente e incubadas a 30 °C durante 48h. Após esse período foram colhidas a 4 °C por centrifugação a 5000 rpm durante 5 min e depois lavada duas vezes em NaCl (0,85%), os grânulos foram novamente suspensos individualmente em NaCl (0.85% p/v, 5 mL) (Koshlaf et al., 2016).

Na condução dos experimentos foi preparado um substrato, também conhecido como “solo artificial tropical” (SAT), conforme a metodologia (ABNT NBR 15537, 2014). Este mesmo substrato foi utilizado nos testes ecotoxicológicos, porém, com a adição de 15% (p) de torta de filtro, que foi obtida da Cooperativa Agroindustrial do Estado do Rio de Janeiro LTDA (COAGRO), em Sapucaia - RJ. Após a preparação desse substrato, foi realizada sua análise química e microbiológica (tabela 2).

Na sequência, 300g de solo foram acondicionados em vasos de cerâmica. O solo em cada vaso foi contaminado com 5% (v/p) de petróleo, 15 dias antes da instalação do experimento. Após esse período, as bactérias obtidas pelo isolamento foram adicionadas aos tratamentos, tendo sido utilizados dois consórcios bacterianos: C1(B1, B2, B3, B4, B7); C2 (B5, B6, B8, B9).

O experimento foi conduzido por 85 dias em casa de vegetação, em delineamento casualizado com 7 tratamentos: Controle (T1); Petróleo (T2);

Petróleo + C1 (T3); Petróleo + C2 (T4); Petróleo + torta de filtro (T5); Petróleo + C1 + torta de filtro, (T6); Petróleo + C2 + torta de filtro (T7) com 4 repetições. Foram realizadas 4 coletas de solo durante o experimento, incluindo o tempo 0 (1 dia de experimento), e as demais coletas com intervalos de 28 dias (29, 57 e 85 dias). Durante o experimento foi mantida a umidade do solo em 50% da capacidade de campo.

Ao final do experimento, os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) presentes no solo foram extraídos por método de extração contínua em aparelho tipo Soxhlet, durante um período de 4 h, usando o diclorometano como solvente (Koh, 1983). Os extratos obtidos foram analisados na Central Analítica Fernanda Coutinho (IQ/ UERJ), por cromatografia a gás de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM), utilizando um cromatógrafo a gás 456-GC (*Bruker Daltonics Inc.*), acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolar Scion MS-TQ (*Bruker Daltonics Inc.*).

As análises foram realizadas utilizando as seguintes condições: coluna BR-5MS (30m x 0.25mm x 0,25µm); modo de injeção Split 1:20; temperatura do injetor 280 °C; gás de arraste He; fluxo constante de 1.0 mL/min; temperatura inicial de 80 °C (2min), seguida por uma taxa de aumento a 4 °C/min até 270 °C, e após até 300n°C a 10n°C/min, permanecendo por 25 min.; fonte de íons a 230n°C e 70 eV; linha de transferência a 250n°C; e faixa de massas de 40-500 Da.

A identificação e a quantificação dos compostos foram realizadas através do software MS Workstation (MSWS 8 *System Control, Bruker Daltonics Inc.*) e comparação com análise de diesel padrão Petrobrás. O cálculo de área foi obtido por meio da soma da integração de todos os picos na faixa cromatográfica de 4.00 – 50.00min, condizente com a faixa de avaliação do petróleo.

### 3.4 Ensaio ecotoxicológico com germinação de alface

O ensaio foi realizado em caixas de plástico tipo gerbox seguindo o protocolo ISO 17126 (2005) com semente de alface (*Lactuca sativa* L.) da variedade Branca de Boston Manteiga sem defensivos da marca Feltrin. O teste foi conduzido com o solo derivado do experimento de avaliação carbonoclástica. Foram mantidos os tratamentos: Controle (T1); Petróleo (T2); Petróleo + C1 (T3); Petróleo + C2 (T4); Petróleo + torta de filtro (T5); Petróleo + C1 + torta de filtro, (T6);

Petróleo + C2 + torta de filtro (T7) e utilizada 3 amostras compostas para cada tratamento. Em cada caixa gerbox foi colocada 40 sementes e mantida a umidade em 85% durante os 7 dias de teste.

As caixas gerbox foram cobertas com fita escura nas laterais e fundo para evitar entrada de luz e utilizadas sem a tampa. Nas primeiras 48 horas permaneceram totalmente no escuro e depois intercalando 16 horas de luz e 8 horas no escuro em BOD a 22°C. A contagem de germinação foi feita diariamente durante 7 dias, considerando germinadas as sementes com a emissão da radícula. Ao término do teste foi contabilizada somente as plântulas normais, medindo as radículas de 5 plântulas de cada repetição.

Com os dados obtidos após a finalização do teste foram calculados o índice de velocidade de germinação (IVG), o tempo médio de germinação (TMG), o índice de crescimento radicular (ICR) e o índice de germinação (IG), utilizando as seguintes fórmulas.

Equação de índice de velocidade de germinação:

$$IVG = \sum (ni/ti)$$

Onde:

$ni$  = número de sementes que germinaram

$ti$  = tempo após instalação do teste

$i = 1 \rightarrow 7$  dias

Equação de tempo médio de germinação:

$$TMG = (\sum niti) / \sum ni$$

Onde:

$ni$  = número de sementes germinadas por dia

$ti$  = tempo de incubação

$i = 1 \rightarrow 7$  dias

Equação de índice de crescimento radicular:

$$ICR = CRA/CRC$$

Onde:

*ICR*: índice de crescimento radicular

*CRA*: comprimento da radícula na amostra

*CRC*: comprimento da radícula no controle

Equação do índice de germinação:

$$IG = ICR \times (PNA/PNC) \times 100$$

Onde:

*IG*: índice de germinação

*ICR*: índice de crescimento

*PNA*: número de plântulas normais na amostra

*PNC*: número de plântulas normais no controle

Os valores de *ICR* e *IG* do controle foram considerados respectivamente como 1 e 100. E as fórmulas desses índices foram obtidas por Carvalho e Carvalho (2009), Gryczak et al. (2018).

Young et al. (2012) separou os valores de *ICR* e *IG* em categorias de acordo com o efeito toxicológico observado:

*ICR*: índice de crescimento radicular

- Inibição do alongamento radicular (I):  $0 < x < 0,8$
- Sem efeitos significativos (SE):  $0,8 \leq x \leq 1,2$
- Estimulação do alongamento radicular (S):  $x > 1,2$

*IG*: índice de germinação

- Inibição do crescimento das sementes (IS):  $x < 80\%$
- Estimulação do crescimento das sementes (EC):  $x > 120\%$

### 3.5 Análise estatística

Os dados de hidrocarbonetos totais de petróleo e do teste ecotoxicológico foram analisados quanto a homogeneidade das variâncias dos erros pelo teste de Cochran, e da normalidade pelo teste de Lilliefors. Posteriormente, os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste Tukey a 5 % de probabilidade. A correlação dos dados foi realizada pelo teste de Pearson com significância de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento, identificação e caracterização das bactérias

#### 4.1.1 Isolamento

A partir do solo contaminado com óleo diesel, foram isoladas 9 bactérias degradadoras de petróleo pelas características morfológicas (tamanho, cor e aparência da colônia). As características mais observadas foram colônias com diâmetros inferiores a 1,0mm, coloração branca e colônias opacas (Figura 4). As bactérias foram identificadas como *Pseudomonas* sp. (B2), *Rhodococcus* sp. (B3, B6, B7), *Bacillus* sp. (B4, B8), *Klebsiella* sp. (B5), *Ochrobactrum* sp (B9), sem identificação (B1).

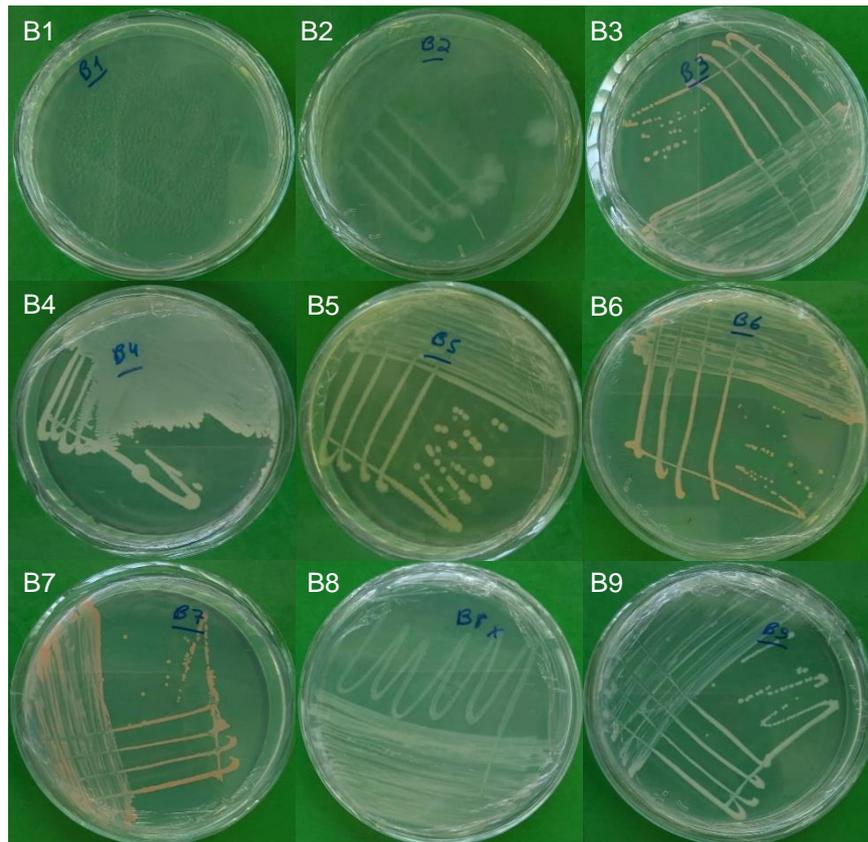


Figura 4. Características morfológicas (tamanho/cor/ aparência da colônia) das bactérias degradadoras de petróleo. Legenda: B1 (<1,0mm/branca/ translúcida), B2 (>1,0mm/ branca/ opaca), B3 (<1,0mm/ rosada/ opaca), B4 (>1,0mm/ branca/ opaca), B5 (>1,0mm/branca/ opaca – acidificou o pH do meio), B6 (<1,0mm/ rosada/ opaca), B7 (<1,0mm/ laranja/ opaca), B8 (>1,0mm/ Branca/ opaca), B9 (<1,0mm/ branca/ opaca). B2 (*Pseudomonas* sp.); B3, B6, B7 (*Rhodococcus* sp.); B4, B8 (*Bacillus* sp.); B5 (*Klebsiella* sp.), B9 (*Ochrobactrum* sp), B1 (sem identificação).

#### 4.1.2 Identificação

As bactérias identificadas foram depositadas no banco de germoplasma da Embrapa agrobiologia, e apresentaram alta homologia (maior que 99%) quando comparadas com as sequências parciais do 16S rRNA (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação das bactérias quanto a homologia

Bactéria	Acesso n°.	Sequência similar*; Identificação*	Gênero similar
B2	BR13882	<i>Pseudomonas nitritireducens</i> estirpe WZBFD3-5A2 16S ribossomal RNA, sequência parcial, ID: NR 133020.1; 99,36%.	<i>Pseudomonas</i> sp.
B3	BR13922	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> estirpe PDB9 16S ribossomal RNA, sequência parcial, ID: NR 025033.1; 99,71%.	<i>Rhodococcus</i> sp.
B4	BR13921	<i>Bacillus safensis</i> estirpe NBRC 100820 16S ribossomal RNA, sequência parcial, ID: NR 113945.1; 99,93%.	<i>Bacillus</i> sp.
B5	BR13896	<i>Klebsiella grimontii</i> estirpe SB73 16S ribossomal RNA, sequência parcial, ID: NR 159317.1; 99,52%.	<i>Klebsiella</i> sp.
B6	BR13932	<i>Rhodococcus biphenylivorans</i> estirpe TG9 16S ribossomal RNA, sequência parcial, ID: NR 134798.1; 99,71%.	<i>Rhodococcus</i> sp.
B7	BR13923	<i>Rhodococcus ruber</i> estirpe DSM 43338 16S ribossomal RNA, sequência parcial, ID: NR 118602.1; 99,71%.	<i>Rhodococcus</i> sp.
B8	BR13883	<i>Bacillus pumilus</i> estirpe NBRC 12092 16S ribossomal RNA, sequência parcial, ID: NR 112637.1; 99,79%.	<i>Bacillus</i> sp.
B9	BR13924	<i>Ochrobactrum intermedium</i> LMG 3301 16S ribossomal RNA, sequência parcial, ID: NR 026039.1; 99,69%	<i>Ochrobactrum</i> sp

Legend: ID (Sequence ID), \*Program Blast (BLASTN).

A partir dessas sequências obtidas da base de dados do BLAST nucleotídeo (blastn), foi construída a árvore filogenética (Figura 5).

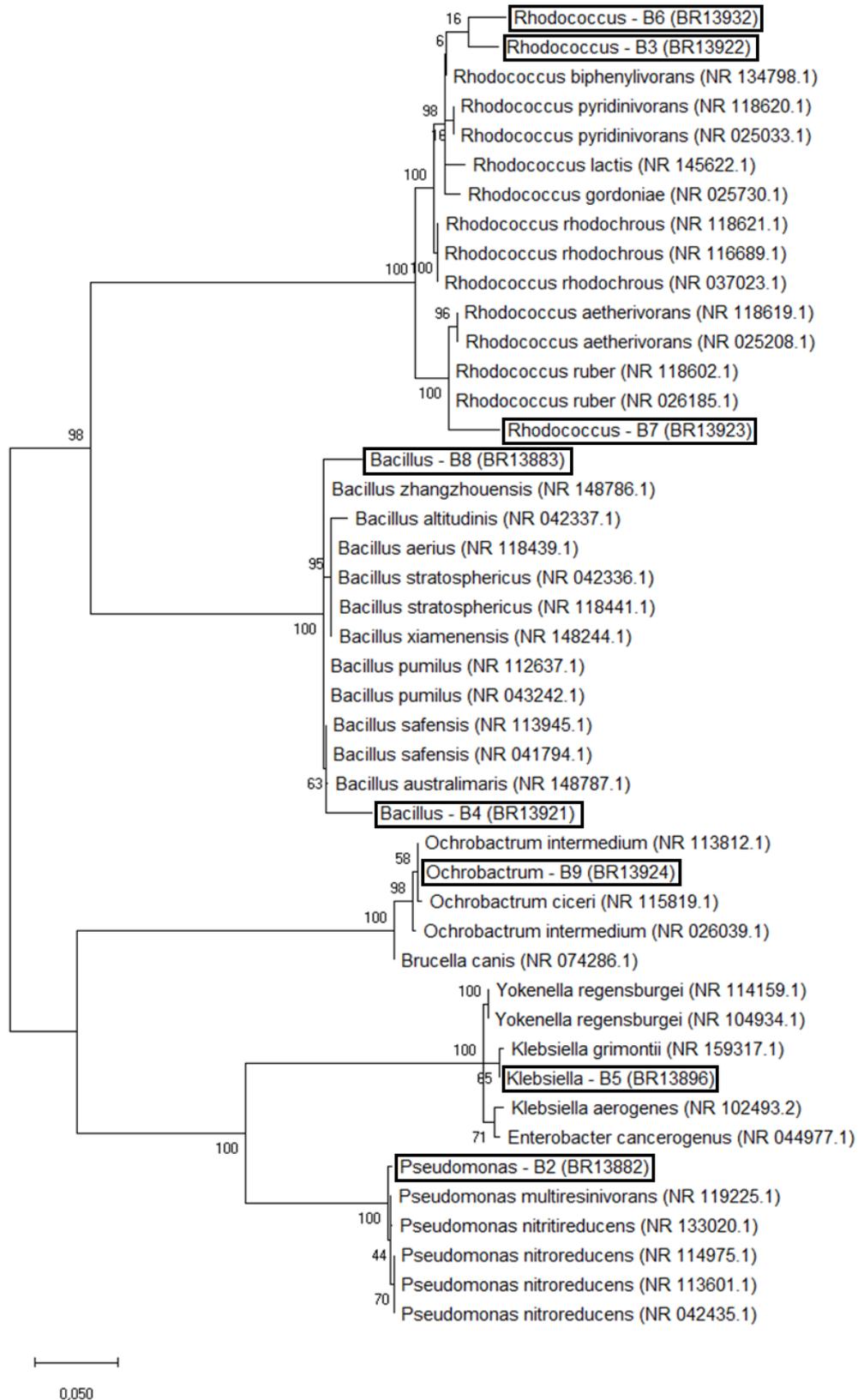


Figura 5. Árvore filogenética com a relação evolutiva de bactérias degradadoras de petróleo. Legenda: B2 (*Pseudomonas* sp.); B3, B6, B7 (*Rhodococcus* sp.); B4, B8 (*Bacillus* sp.); B9 *Ochrobactrum* sp ; B5 (*Klebsiella* sp.).

A árvore de consenso de *bootstrap*, inferida a partir de 500 réplicas, é usada para representar a história evolutiva dos táxons analisados (Felsenstein, 1985). As ramificações correspondentes às partições reproduzidas em menos de 50% de replicações de autoinicialização são recolhidas, e a porcentagem de árvores replicadas, nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (500 repetições), são mostrados próximos aos galhos (Felsenstein, 1985). Esta análise envolveu 40 sequências nucleotídicas, e havia um total de 1573 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (Kumar et al., 2018).

A árvore filogenética mostra as relações entre as bactérias isoladas em hidrocarbonetos de petróleo e as estirpes mais semelhantes por comparação. As espécies mais próximas têm maior semelhança nas sequências. Todos os gêneros isolados foram citados em outros trabalhos de remediação de solos contaminados por petróleo e óleo diesel, sendo citadas as bactérias da espécie *Bacillus safensis* (Pinhati et al., 2014) e dos gêneros *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rhodococcus* sp. como potenciais para degradação de hidrocarbonetos, e que se destacam em processos de biorremediação (Jacques et al., 2005; Venkateswaran e Harayama, 1995; Song et al., 2011; Fuentes et al., 2014; Xu et al., 2016; Quintella et al., 2019; Xu et al., 2019).

#### 4.1.3 Caracterização

Dentre as bactérias isoladas somente a B2 (*Pseudomonas* sp.), B5 (*Klebsiella* sp.) e B9 (*Ochrobactrum* sp. foram identificadas como Gram-negativa. Já o tempo de crescimento das colônias variaram entre 24 e 48 horas, tanto em placa com ágar nutriente, como em caldo nutriente. Apresentaram um crescimento mais rápido (durante 24 horas), as bactérias B1, B2, B5 e B9 (Figura 6).

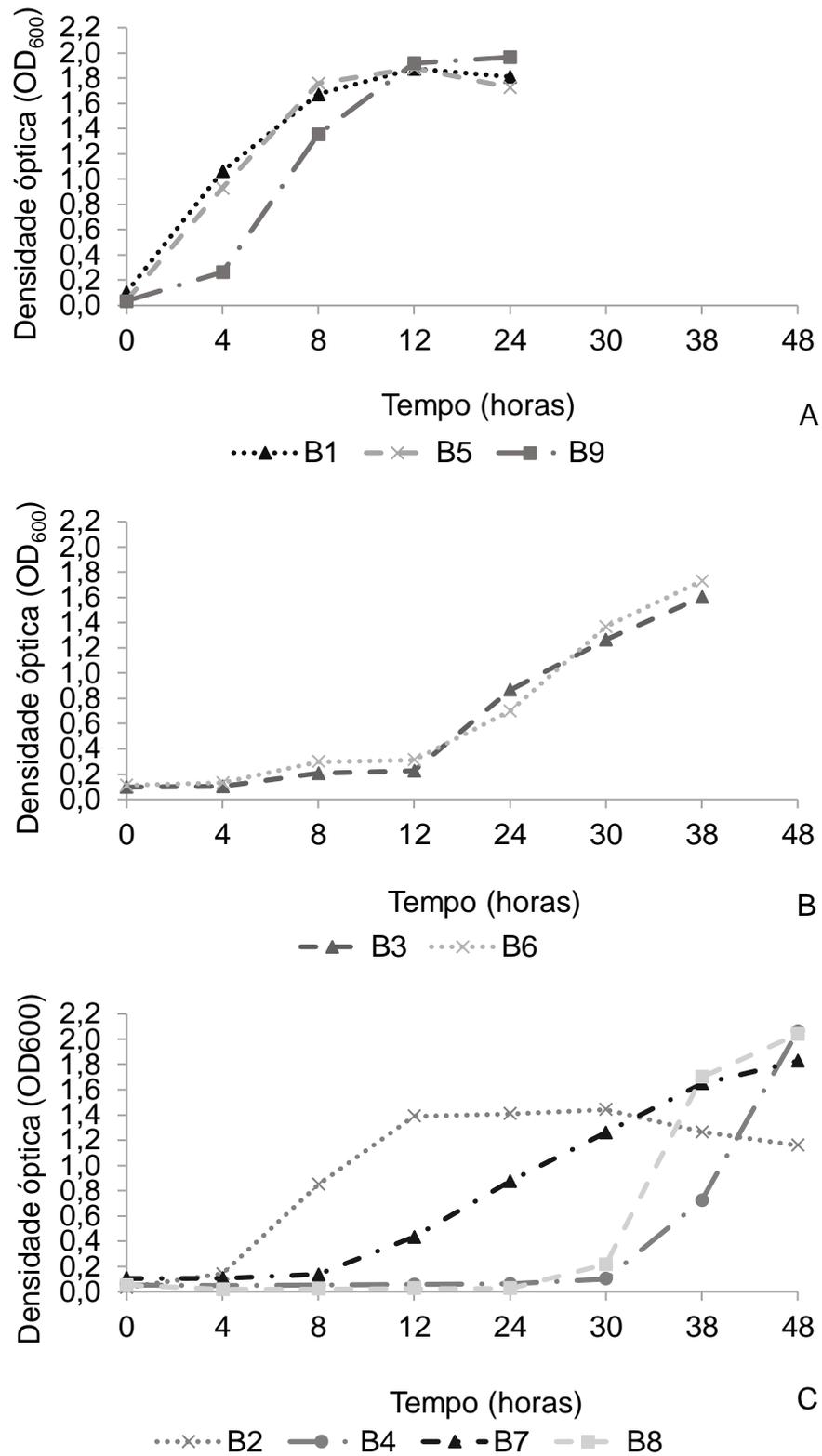


Figura 6. Curvas de crescimento com 24 horas (A), 38h (B) e 48 horas (C) com densidade óptica (OD<sub>600</sub>). Legenda: *Pseudomonas* sp. (B2), *Rhodococcus* sp. (B3, B6, B7), *Bacillus* sp. (B4, B8), *Klebsiella* sp. (B5), *Ochrobactrum* sp (B9), B1 (sem identificação).

As bactérias tiveram um desenvolvimento mais lento quando foram crescidas em meio BH, usando petróleo como única fonte de carbono (Tabela 2). Essa diferença no crescimento está diretamente relacionada ao desempenho das bactérias em degradar o petróleo. Para fazer a curva de crescimento foi utilizado um meio com fonte de carbono em abundância para estimular o crescimento das colônias e caracterizar nas condições mais favoráveis.

Tabela 2. Crescimento de bactérias em Meio Buschnell Haas (BH) e petróleo como única fonte de carbono

Bactérias	Meio BH	
	O.D <sub>600</sub>	T.I.
B1	0,669	18h
B2	0,246	20h
B3	0,555	20h
B4	0,387	20h
B5	0,985	18h
B6	0,687	20h
B7	0,396	20h
B9	0,236	18h

Legenda: *Pseudomonas* sp. (B2), *Rhodococcus* sp. (B3, B6, B7), *Bacillus* sp. (B4), *Klebsiella* sp. (B5), *Ochrobactrum* sp (B9), sem identificação (B1). Densidade óptica (O.D.), Tempo de incubação (T.I.).

#### 4.2 Atividade hidrocarbonoclástica das bactérias isoladas

A partir do teste da atividade hidrocarbonoclástica foi comprovada que todas as bactérias degradam hidrocarbonetos (Figura 7). A avaliação da degradação pelo teste com o indicador redox, 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) é feita somente de forma visual, mas é considerado um método rápido e confiável para a triagem de bactérias hidrocarbonoclásticas (Marzan et al., 2017).

Quando as bactérias utilizam hidrocarboneto, geram elétrons aceitos pelo DCPIP que é um corante aceitador de elétrons, mudando, assim, a cor do azul (oxidado) para incolor (reduzido), sendo possível determinar a capacidade do microrganismo em utilizar o hidrocarboneto (Mariano et al., 2008). As bactérias degradadoras utilizam os carbonos presentes nos hidrocarbonetos do petróleo para

se desenvolverem, já que o meio BH utilizado no teste não tem outra fonte de carbono. Sendo assim, a degradação do petróleo só foi possível a partir do uso do carbono pela bactéria presente no teste.

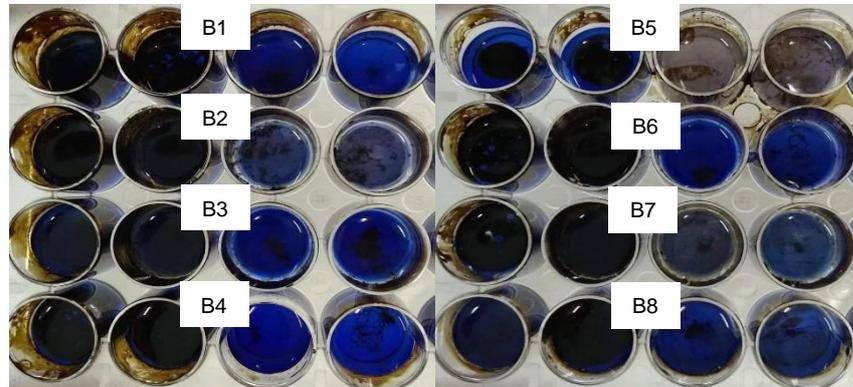


Figura 7. Teste da atividade hidrocarbonoclastica entre as bactérias isoladas. Legenda: B2 (*Pseudomonas* sp.); B3, B6, B7 (*Rhodococcus* sp.); B4, B8 (*Bacillus* sp.); B5 (*Klebsiella* sp.) e B1 (sem identificação).

Os isolado B2 (*Pseudomonas* sp.), B5 (*Klebsiella* sp.) e B7(*Rhodococcus* sp.) foram eficientes em utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia, pois apresentaram visualmente uma coloração azul menos intensa (quase incolor). A B5 (*Klebsiella* sp.) apresentou-se mais eficiente nesse teste, e isso pode estar associada tanto à adaptação da bactéria no meio contaminado, como a sua estrutura celular.

Bactérias Gram-negativas são excepcionalmente versáteis e conhecidas pelas suas atividades metabólicas, que permitem que algumas delas cresçam em condições extremas de limitação de nutrientes. Além disso, na ausência de fontes de nutrientes, as bactérias Gram-negativas rapidamente adquirem a capacidade de degradar xenobióticos, por isso encontram-se frequentemente envolvidas em diversos processos de biorremediação (Sá-Correia et al., 2005). Diante deste contexto, podem ser encontrados diversos trabalhos que isolaram um alto número (>80%) de bactérias Gram-negativas degradadoras de hidrocarbonetos (Sikkema et al., 1995; Andrade 2008; Schultz, 2010).

Mesmo que as demais bactérias (B1, B3, B4, B6, B8) não tenham se mostrado eficientes no teste, existem vários trabalhos que usam consórcios bacterianos, com algumas bactérias que não são tão eficazes na degradação, mas

que podem servir de fonte de carbono para outros microrganismos. Tonini et al. (2010) afirmam que nenhum microrganismo sozinho tem a capacidade de degradar os hidrocarbonetos totais do petróleo. O consórcio bacteriano é recomendado em processos de biorremediação, sendo comprovado por Lin et al. (2010) e Łebkowska et al. (2011), que esses resultados são positivos na degradação.

#### 4.3 Avaliação da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP)

Todos os tratamentos utilizados foram capazes de degradar hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) (Tabela 3). Após os 85 dias de incubação, os tratamentos T6 e T7, se destacaram com maior degradação de HTP. Não foram mostrados os resultados das quatro coletas realizadas durante o experimento porque a regressão não foi significativa. Portanto, foram apresentadas na tabela 4, somente as avaliações realizadas na primeira (1 dia) e quarta coleta (85 dias).

Tabela 3. Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), em função dos tratamentos com 0 e 84 dias, após o início do experimento.

Tratamento (média)	Período de incubação (dias)		Biorremediação (HTP) <sup>1</sup> %
	0	84	
T2	2,80x10 <sup>8</sup> Ba	1,32x10 <sup>8</sup> Ab	53
T3	7,28x10 <sup>8</sup> Aa	1,76x10 <sup>8</sup> Ab	75
T4	6,40x10 <sup>8</sup> Ba	1,98x10 <sup>8</sup> Ab	69
T6	2,80x10 <sup>8</sup> Ba	3,54x10 <sup>7</sup> Bb	87
T7	3,80x10 <sup>8</sup> Ba	2,54x10 <sup>7</sup> Bb	92

(\*) Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si segundo o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ,  $n=3$ ). <sup>1</sup>Calculado pela diferença entre os valores do tempo 84 e 0 dia, dentro do mesmo tratamento. Legenda: T2 (Petróleo), T3 (Petróleo + Consórcio bacteriano 1), T4 (Petróleo + Consórcio bacteriano 2), T6 (Petróleo +Torta de Filtro + Consórcio bacteriano 1), T7 (Petróleo +Torta de Filtro + Consórcio bacteriano 2). Consórcio bacteriano 1 (B2, B3, B4, B7), Consórcio bacteriano 2 (B5, B6, B8, B9). B2 (*Pseudomonas* sp.); B3, B6, B7 (*Rhodococcus* sp.); B4, B8 (*Bacillus* sp.); B5 (*Klebsiella* sp.); B9 (*Ochrobactrum* sp.).

Nesse experimento foram utilizados três métodos de biorremediação: bioaugmentação (adição de microrganismos selecionados), bioestimulação (adição de torta de filtro/nutrientes) e atenuação natural. Obteve-se a degradação dos hidrocarbonetos por todos os métodos aplicados. Diversos trabalhos citam a

eficiência dessas técnicas em degradar hidrocarbonetos totais de petróleo (Bento et al., 2005; Agamuthu et al., 2013; Haghollahi et al., 2016; Koshlaf et al., 2016; Li et al., 2016; Aguelmous et al., 2018; Ani e Ochin, 2018; Abena et al., 2019; Huang et al., 2019; Kumar et al., 2019).

A maior porcentagem de degradação de hidrocarbonetos foi do T6 e T7, que usaram a bioaumentação + bioestimulação. Jiang et al. (2016) afirmam que é possível melhorar a remediação de hidrocarbonetos no solo, aplicando diferentes estratégias de biorremediação, como bioaumentação e bioestimulação, individualmente ou em combinação.

Os substratos utilizados no experimento apresentaram algumas características químicas e microbiológicas diferentes. O substrato 1 foi utilizado nos tratamentos T2, T3 e T4, e os demais tratamentos foi feito com torta de filtro, utilizando o substrato 2 (Tabela 4). Os tratamentos com torta de filtro continham bactérias presentes no resíduo orgânico, e junto com o consórcio bacteriano apresentaram degradação superior aos tratamentos sem a torta de filtro.

Um dos principais fatores que afetam a degradação de hidrocarbonetos de petróleo é a disponibilidade de microrganismos que podem catabolizar poluentes (Al-Hawash et al., 2018). Também é importante a adaptação da microbiota para o processo de biodegradação (Leonel et al., 2010), por meio do uso de consórcios bacterianos eficientes, pois o petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos de vários pesos moleculares, portanto, nenhuma cepa bacteriana isolada pode degradar todos os hidrocarbonetos encontrados no petróleo (Li et al., 2016).

Tabela 4. Análise química e microbiológica do solo artificial com e sem a torta de filtro.

SA	pH	C	MO	K	Ca	Mg	P	B	Zn	Cu	Fe	UFC g solo <sup>-1</sup>
	H <sub>2</sub> O	g/ dm <sup>3</sup>		mmol/dm <sup>3</sup>			mg/dm <sup>3</sup>					
1	5,4	23,60	40,69	20,90	17,70	12,80	32	0,38	5,12	0,81	84,51	1,13 x 10 <sup>-4</sup>
2	6,4	31,20	53,79	34,10	49,70	18,00	451	0,18	22,70	3,59	141,83	7,36 x 10 <sup>-2</sup>

\*pH em água; P, K, Fe, Zn, Cu usando extrator Mehlich 1; Ca e Mg usando extrator KCl 1mol/L; B usando extrator água quente. Legenda: Solo artificial (SA); Matéria orgânica (MO); Solo 1 (Areia + caulín + fibra de coco); Solo 2 (Areia + caulín + fibra de coco + torta de filtro).

A torta de filtro também tem a função de melhorar as condições químicas e físicas do solo (estrutura e porosidade), fornecendo oxigênio suficiente e nutrientes para a comunidade microbiana, favorecendo o crescimento das bactérias eficientes na degradação de hidrocarbonetos (Agamuthu et al., 2013; Abena et al., 2019). Tellechea et al. (2016) afirmaram que o uso de torta de filtro de cana-de-açúcar, associada ou não com adição de NPK, é um método essencial para biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos. A eficiência do uso de resíduos orgânicos (esterco de cabra/ vaca; lodo de esgoto; palha de arroz/ ervilha; serragem e efluente do moinho de óleo de palma) é relatada em vários trabalhos, estimulando a remoção de hidrocarbonetos com degradação maior que 70% (Agamuthu et al., 2013; Koshlaf et al., 2016; Aguelmous et al., 2018; Ani e Ochin, 2018; Huang et al., 2019).

Os tratamentos T3 e T4 apresentaram degradação de 76% e 56%, respectivamente, mesmo com a adição de consórcio bacteriano, corroborando os valores encontrados por Li et al. (2016). Essa degradação foi estatisticamente igual ao tratamento com atenuação natural. Provavelmente, este resultado se deve ao fato de os nutrientes do solo estarem abaixo do requisito ideal para a atividade microbiana, pois, segundo Abena et al. (2019), quando estão na proporção apropriada, podem estimular o crescimento, a atividade microbiana e melhorar os resultados gerais de biodegradação dos poluentes.

Além da eficiência da degradação com o uso da bioaugmentação e bioestimulação, o solo somente com petróleo (atenuação natural – T2) teve a degradação estatisticamente igual aos tratamentos T3 e T4, confirmando a sua eficiência em também degradar o petróleo, entretanto, não superando os tratamentos T6 e T7. Alguns autores relataram degradação igualmente as encontradas no presente trabalho (Bento et al., 2005; Guarino et al., 2017; Chen et al., 2019). Essa degradação, com mais de 50%, pode estar relacionada ao tipo de substrato usado no experimento. Haghollahi et al. (2016) confirmaram que o solo mais arenoso é favorável à biorremediação de hidrocarbonetos totais de petróleo, com degradação de 70%. Podendo ter sido menor no presente trabalho pela baixa quantidade de bactérias nesse solo

#### 4.4 Ensaio ecotoxicológico com germinação de alface

Após o processo de biorremediação e a confirmação da degradação dos hidrocarbonetos, foi realizado o ensaio com sementes de alface para avaliar a toxicidade do solo. É importante avaliar a ecotoxicologia do solo durante e após qualquer tratamento de remediação, pois foi demonstrado que a redução de contaminantes pode não contribuir na redução da toxicidade (Coulon et al., 2005).

No ensaio ecotoxicológico foi avaliado tanto a germinação das sementes como o seu crescimento radicular. Quando se observa o crescimento radicular, é visível o efeito tóxico dos hidrocarbonetos presentes no solo, principalmente no tratamento com atenuação natural (T2), já os tratamentos com bioestimulação (T6 e T7) apresentaram as maiores radículas (Figura 8). Jiang et al. (2016) também observaram o efeito do contaminante no crescimento radicular utilizando sementes de mostarda (*Brassica alba*). Essas plantas são utilizadas para teste de toxicidade pela sensibilidade, representatividade e facilidade de ser cultivada em qualquer região do mundo (Caldasso, 2018).

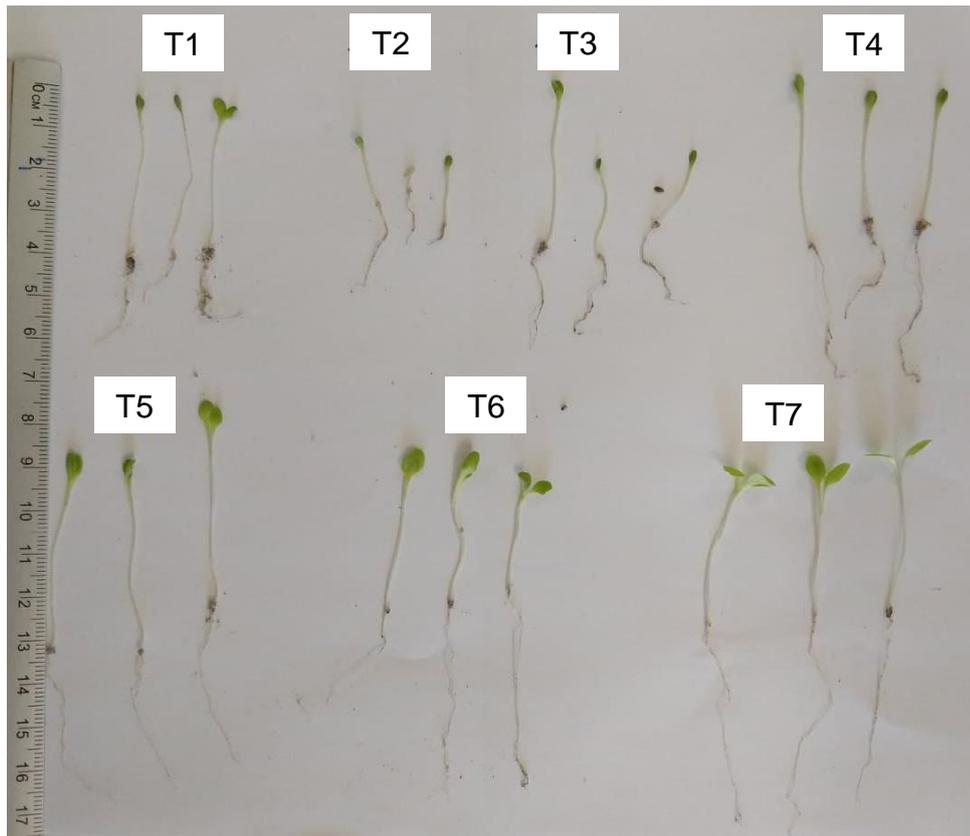


Figura 8. Resultado do ensaio de germinação de alface, mostrando a diferença no crescimento radicular entre os tratamentos. Legenda: T1 (Controle sem petróleo e sem bactéria), T2 (Petróleo), T3 (Petróleo + Consórcio bacteriano 1), T4 (Petróleo + Consórcio bacteriano 2), T5 (Controle com torta de filtro e sem o consórcio bacteriano), T6 (Petróleo +Torta de Filtro + Consórcio bacteriano 1), T7 (Petróleo +Torta de Filtro + Consórcio bacteriano 2). Consórcio bacteriano 1 (B1, B2, B3, B4, B7), Consórcio bacteriano 2 (B5, B6, B8, B9). B2 (*Pseudomonas* sp.); B3, B6, B7 (*Rhodococcus* sp.); B4, B8 (*Bacillus* sp.); B5 (*Klebsiella* sp.) e B1, B9 (em processo de identificação).

Os resultados visualizados na figura 8 podem ser confirmados pelos dados de crescimento médio radicular (CMR), conforme tabela 5, demonstrando maior crescimento médio radicular nos tratamentos T6 e T7. Esses tratamentos também apresentaram as maiores porcentagens de degradação de hidrocarbonetos (Tabela 4), mostrando que a redução da contaminação também reduziu a toxicidade do solo.

Tabela 5. Avaliações realizadas do ensaio ecotoxicológico com sementes de alface

Trat	PN (n)	IVG	TMG (dias)	CMR (mm)	ICR	IG (%)
T1	19 a	8,62 a	3,04 a	27,90 b	1 c	100 a
T2	13 a	4,67 a	4,18 a	26,02 b	0,93 c	71 a
T3	12 a	5,55 a	4,00 a	24,66 b	0,90 c	60 a
T4	12 a	4,76 a	3,73 a	32,69 b	1,20 bc	74 a
T6	18 a	7,37 a	3,37 a	48,31 a	1,76 a	179 a
T7	15 a	6,30 a	4,06 a	51,66 a	1,89 a	199 a
CV (%)	17,42	24,5	22,23	9,37	12,92	26,08

Legenda: Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ,  $n=3$ ).

T1 (Controle sem petróleo e sem bactéria), T2 (Petróleo), T3 (Petróleo + Consórcio bacteriano 1), T4 (Petróleo + Consórcio bacteriano 2), T6 (Petróleo +Torta de Filtro + Consórcio bacteriano 1), T7 (Petróleo +Torta de Filtro + Consórcio bacteriano 2). Consórcio bacteriano 1 (B1, B2, B3, B4, B7), Consórcio bacteriano 2 (B5, B6, B8, B9). PN (Plântulas normais), IVG (Índice de velocidade de germinação), TMG (Tempo médio de germinação), CMR (Crescimento médio radicular), ICR (Índice de crescimento radicular), IG (Índice de germinação).

O crescimento radicular é um ótimo parâmetro para avaliar a toxicidade do solo, pois a absorção do contaminante afeta diretamente o desenvolvimento radicular das plantas recomendadas nos testes ecotoxicológicos, por ser sensível a esses compostos xenobióticos.

Pela classificação de Young et al. (2012), os tratamentos (T2, T3, T4) não tiveram efeitos significativos na toxicidade com base no ICR, porém, quando foi observado o IG, percebeu-se uma inibição no crescimento das sementes. Os demais tratamentos (T6, T7) estimularam tanto o alongamento radicular, como o crescimento das sementes. Portanto, é possível afirmar que o uso da torta de filtro além de degradar os hidrocarbonetos, eliminou a toxicidade do solo.

A correlação negativa e significativa entre os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e os dados de plântula normal (PN), índice de velocidade de germinação (IVG) e índice de germinação (IG) (Tabela 6), mostraram que quanto maior o valor dos hidrocarbonetos, maior será o efeito tóxico na germinação e crescimento das sementes.

Tabela 6. Correlação entre os hidrocarbonetos totais de petróleo do solo e as avaliações do ensaio ecotoxicológico com sementes de alface

Correlação	(HTP)
PN (n)	-0,89
IVG	-0,85
IG	-0,71

Legenda: PN (Plântulas normais), IVG (Índice de velocidade de germinação), IG (Índice de germinação), HTP (Hidrocarbonetos totais de petróleo),

Diante deste resultado, pode-se afirmar que somente o monitoramento dos HTP não é suficiente para determinar o risco ambiental em um local contaminado após a biorremediação (Jiang et al., 2016). Afirma-se ainda que o teste ecotoxicológico foi fundamental para garantir que os tratamentos T6 e T7 fossem os mais eficientes na degradação dos hidrocarbonetos, favorecendo a melhoria das condições do substrato para ser utilizado para o plantio de espécies vegetais, e trazendo uma ótima alternativa para o uso dessas áreas após a remediação.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

O sucesso da biorremediação depende de fatores químicos, físicos e biológicos. Foram realizados no presente trabalho todos os procedimentos necessários para garantir a eficiência da degradação dos hidrocarbonetos presentes no solo, desde o isolamento de bactérias de um solo contaminado por óleo e com capacidade de degradar os HTP, até o uso de resíduo orgânico que potencializa a atividade das bactérias durante a remediação. Também foi realizado o experimento de biorremediação com o uso de consórcios bacterianos, cuja eficiência foi confirmada, quando comparado ao uso de somente uma espécie.

Os resultados do isolamento das bactérias mostraram que a B2 (*Pseudomonas* sp.), B5 (*Klebsiella* sp.) e B7 (*Rhodococcus* sp.) foram eficientes em degradar hidrocarbonetos. A bactéria *Klebsiella* sp. (B5), foi a que apresentou maior eficiência. Observou-se que todos os tratamentos degradaram mais de 50% dos hidrocarbonetos totais de petróleo no solo após o processo de biorremediação, com destaque para os tratamentos T6 e T7, em que foi aplicada a técnica de bioaumentação (adição de microrganismos selecionados), com bioestimulação (adição de nutrientes).

A realização do teste ecotoxicológico, para avaliar a toxicidade do solo após a biorremediação, demonstrou que o uso do resíduo vegetal (torta de filtro) além de ser mais eficiente na degradação, também reduziu a toxicidade do solo, que apresentou uma porcentagem entre 8-13% de hidrocarbonetos ainda presentes no solo. O teste com semente de alface mostrou que os tratamentos (T2, T3, T4),

mesmo degradando mais de 50% de HTP, apresentaram toxicidade no solo. Este teste é um complemento da biorremediação, usado para afirmar se o solo realmente não apresenta nenhum risco ambiental.

Diante dos resultados apresentados, concluiu-se que:

- A bactéria B2 (*Pseudomonas* sp.), B5 (*Klebsiella* sp.) e B7 (*Rhodococcus* sp.) foram mais eficientes em degradar os hidrocarbonetos totais de petróleo;
- A biorremediação, em conjunto com as técnicas de bioaugmentação + bioestimulação (T6 e T7), foi mais eficiente, sendo superior a 87%;
- O teste ecotoxicológico foi um ótimo indicador para confirmar a redução da toxicidade do solo nos tratamentos mais eficientes na biorremediação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abena, M. T. B., Li, T., Shah, M. N., Zhong, W. (2019). Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. *Chemosphere*, 234, 864-874.
- Admon, S., Green, M., Avnimelech, Y. (2001). Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. *Biorremediation Journal*, 5(3), 193-209.
- Agamuthu, P., Tan, Y. S., Fauziah, S. H. (2013). Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. *Procedia Environmental Sciences*, 18, 694-702.
- Agência Nacional de Petróleo (ANP) (2019). Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural. *Superintendência de Desenvolvimento e Produção – SDP*, n 101.
- Aguelmous, A., El Fels, L., Souabi, S., Zamama, M., Yasri, A., Lebrihi, A., Hafidi, M. (2018). Petroleum sludge bioremediation and its toxicity removal by landfill in gunder semi-arid conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*, 166, 482-487.
- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 71-76.
- Al-Wabel, M. I., Rafique, M. I., Ahmad, M., Ahmad, M., Hussain, A., Usman, A. R. (2019). Pyrolytic and hydrothermal carbonization of date palm leaflets: Characteristics and ecotoxicological effects on seed germination of lettuce. *Saudi journal of biological sciences*, 26(4), 665-672.
- Andrade, D. M. (2008). *Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina*. Dissertação (Engenharia ambiental). Florianópolis – SC, Universidade de Santa Catarina, 96 p.
- Andrade, J. D. A., Augusto, F., Jardim, I. C. S. F. (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética química*, 35(3), 17-43.

- Ani, K. A., Ochin, E. (2018). Response surface optimization and effects of agricultural wastes on total petroleum hydrocarbon degradation. *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*, 7(4), 564-574.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (2014). Ecotoxicologia terrestre - Toxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae): NBR 15537. Rio de Janeiro.
- Bento, F. M., Camargo, F. A., Okeke, B. C., Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource technology*, 96(9), 1049-1055.
- Bernardino, C. A. R., Mahler, C. F., Veloso, M. C. C., Romeiro, G. A., Schroeder, P. (2018). Torta de Filtro, Resíduo da Indústria Sucoalcooleira - Uma Avaliação por Pirólise Lenta. *Revista Virtual de Química*, 10(3), 551-573.
- Brito, G. C. B., de Souza, D. B., Vasconcelos, F. C. W., Braga, L. C. (2010). A Importância da Bioprospecção de Microrganismos em Áreas Contaminadas com Produtos Derivados do Petróleo. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 3(3), 291-310.
- Bushnell, L. D., Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41(5), 653.
- Caldasso, F. A. (2018). *Avaliação da fitotoxicidade de lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de pescado utilizando olerícolas como bioindicadores*. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Pelotas – RS, Universidade Federal de Pelotas, 64 p.
- Carvalho, D. B. D., Carvalho, R. I. N. D. (2009). Qualidade fisiológica de sementes de guanxuma sob influência do envelhecimento acelerado e da luz. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 31(3), 489-494.
- Chaudhary, D. K., Kim, J. (2019). New insights into bioremediation strategies for oil-contaminated soil in cold environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 58-72.
- Chen, F., Li, X., Zhu, Q., Ma, J., Hou, H., Zhang, S. (2019). Bioremediation of petroleum-contaminated soil enhanced by aged refuse. *Chemosphere*, 222, 98-105.
- Conceição, D., Jacques, R., Bento, F., Simonetti, A., Selbach, P., Camargo, F. (2007). Redução de cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com cromo. *Ciência Rural*, 37(6), 1661-1667.
- Coulon, F., Pelletier, E., Gourhant, L., Delille, D. (2005). Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere*, 58(10), 1439-1448.
- Dematê, J.L.I. (1992). Uso Agronômico de Resíduos x Fertilizantes na Cultura da Cana-de-açúcar. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 20, Piracicaba. Resumos. Piracicaba: Fundação Cargill, p. 213-252.
- Fantin, A., Freitas, D., Fagnani, G., Lapa, T. (2009). Teste de sensibilidade em sementes de Rúcula (*Eruca sativa*) e Alface (*Lactuca sp.*) em contato com diferentes concentrações do pesticida Glifosato. *Limeira: UNICAMP-CESET*.

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Fioravanti, K. L., Celino, J. J., Rossi-Alva, J. C. (2012). Isolamento, seleção e identificação de microorganismos degradadores de petróleo e seus derivados em sedimentos de manguezais contaminados. *Cadernos de Geociências*, 9(2).
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 4781-4794.
- Gryczak, M., Kilipper, J. T., de Costa, P. D., Maccari, A. (2018). sementes de *Lactuca sativa* como bioindicador de toxicidade em resíduos de construção civil. *Tecnologia e Ambiente*, 24, 233-242.
- Guarino, C., Spada, V., Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation–Assistited Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, 170, 10-16.
- Haghollahi, A., Fazaelpoor, M. H., Schaffie, M. (2016). The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. *Journal of environmental management*, 180, 197-201.
- Hanson, K. G., Desai, J. D., Desai, A. J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology techniques*, 7(10), 745-748.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*, 64(1), 7-12.
- Huang, Y., Pan, H., Wang, Q., Ge, Y., Liu, W., Christie, P. (2019). Enrichment of the soil microbial community in the bioremediation of a petroleum-contaminated soil amended with rice straw or sawdust. *Chemosphere*, 224, 265-271.
- Imam, A., Suman, S. K., Ghosh, D., Kanaujia, P. K. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.
- Instituto Estadual do Ambiente (INEA) (2017). Diagnóstico dos acidentes ambientais no Estado do Rio de Janeiro, 1983-2016: enfoque no transporte rodoviário de produtos perigosos. Rio de Janeiro.
- International Organization for Standardization (ISO) (2005). Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soilflora - Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.). 17126. 10p.
- Jacques, R. J. S., Bento, F. M., Camargo, F. A. O. (2007b). Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência e Natura*, 29(1), 7-24.
- Jacques, R. J., Okeke, B. C., Bento, F. M., Peralba, M. C., Camargo, F. A. (2007a). Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon–degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. *Bioremediation Journal*, 11(1), 1-11.

- Jacques, R. J., Santos, E. C., Bento, F. M., Peralba, M. C., Selbach, P. A., Sá, E. L., Camargo, F. A. (2005). Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International biodeterioration & biodegradation*, 56(3), 143-150.
- Jiang, Y., Brassington, K. J., Prpich, G., Paton, G. I., Semple, K. T., Pollard, S. J., Coulon, F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*, 161, 300-307.
- Koh, T. S. (1983). Ultrasonic preparation of fat-free biological materials for elemental analysis. *Analytical chemistry*, 55(11), 1814-1815.
- Koshlaf, E., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Taha, M., Haleyur, N., Makadia, T. H., Ball, A. S. (2016). Bioremediation potential of diesel-contaminated Libyan soil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 133, 297-305.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
- Kumar, A. G., Rajan, N. N., Kirubakaran, R., Dharani, G. (2019). Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. *Marine pollution bulletin*, 146, 741-750.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., Naidu, R., Megharaj, M. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 168, 944-968.
- Łebkowska, M., Zborowska, E., Karwowska, E., Miaśkiewicz-Pęska, E., Muszyński, A., Tabernacka, A., Jęczalik, M. (2011). Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. *Ecological Engineering*, 37(11), 1895-1900.
- Leonel, L. V., do Nascimento, E. G., Bertozzi, J., Bôas, L. A. V., Bôas, G. T. V. (2010). Biorremediação do solo. *Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa*, 26(51), 37-52.
- Li, X, Zhao, L, Adamb, M. (2016). Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China. *Marine pollution bulletin*, 105(1), 43-50.
- Lin, T. C., Pan, P. T., Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 27-34.
- Lopes, A., Piedade, M. T. F. (2010). O período da contaminação com petróleo influencia a rebrota de *Echinochloa polystachya* (HBK) Hitchcock em solo de várzea da Amazônia Central?. *Biota Neotropica*, 10(4), 143-148.
- Mansur, A. A., Adetutu, E. M., Kadali, K. K., Morrison, P. D., Nurulita, Y., Ball, A. S. (2014). Assessing the hydrocarbon degrading potential of indigenous bacteria isolated from crude oil tank bottom sludge and hydrocarbon-contaminated soil of Azzawiya oil refinery, Libya. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18), 10725-10735.

- Maqbool, F., Wang, Z., Xu, Y., Zhao, J., Gao, D., Zhao, Y. G., Bhatti, Z. A., Xing, B. (2012). Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania cannabina* in bioaugmented soil with free and immobilized consortium. *Journal of hazardous materials*, 237, 262-269.
- Mariano, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D. D. F. D., Pirôllo, M. P. S., Contiero, J. (2008). Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 133-142.
- Marzan, L. W., Sultana, T., Hasan, M. M., Mina, S. A., Islam, M. R., Rakibuzzaman, A. G. M., Khan, M. I. H. (2017). Characterization of furnace oil bioremediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites of the Sundarbans, Bangladesh. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 103-113.
- Morais Filho, M. C., Coriolano, A. C. F. (2016). Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. *HOLOS*, 7, 133-150.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological research*, 165(5), 363-375.
- Okumura, D. T. (2011). *Estudos ecotoxicológicos com as espécies *Argyrodiaptomus furcatus* e *Notodiaptomus iheringi* (Copepoda, Calanoida)*. Doutorado (Ciência e Tecnologia de Alimentos). São Carlos - SP, Universidade de São Paulo, 312p.
- Oliveira, R. M., & Alves, F. (2013). Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. *Periódico Científico do Núcleo de Biociências*, 3(5).
- Pacwa-Płociniczak, M., Czapla, J., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z. (2019). The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 169, 615-622.
- Paula, A. M. D., Siqueira, J. O. D., Soares, C. R. F. S. (2007). Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31(4), 805-811.
- Paula, A. M. D., Soares, C. R., Siqueira, J. O. (2006). Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 10(2), 448-455.
- Pinhati, F. R., Del Aguila, E. M., Tôrres, A. P. R., Sousa, M. P. D., Santiago, V. M. J., Silva, J. T., Paschoalin, V. M. F. (2014). Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. *Química Nova*, 37(8), 1269-1274.
- Quintella, C. M., Mata, A. M., Lima, L. C. (2019). Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. *Journal of environmental management*, 241, 156-166.

- Rizzo, A. C. D. L., Leite, S. G. F., Soriano, A. U., Santos, R. L. C. D., Sobral, L. G. S. (2007). Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. Rio de Janeiro, 76 p.
- Rodrigues, D. F., Sakata, S. K., Comasseto, J. V., Bicego, M. C., Pellizari, V. H. (2009). Diversity of hydrocarbon-degrading *Klebsiella* strains isolated from hydrocarbon-contaminated estuaries. *Journal of applied microbiology*, 106(4), 1304-1314.
- Sá-Correia, I; Viegas, C. A.; Teixeira, M. C.; Leitão, J. H.; Moreira, L. M.; Fialho, A. M.; Menezes, J. C. (2005). Vias de degradação de compostos aromáticos xenobióticos. Grupo de Ciências Biológicas do IST:<http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/pagina.asp?id=1298&canal=biologia.html>. 05/02/2020.
- Santos, A. R., Ferrat, G. C., Eichelmann, M. C. G. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev. Latinoamericana Microbiología*, 47, 92-101.
- Santos, D.H., Tiritan, C.S., Foloni, J.S.S. (2012) Efeito residual da adubação fosfatada e torta de filtro na brotação de soqueiras de cana-de-açúcar *Revista Agrarian Dourados*, 5, n15, p1-6.
- Santos, H. G., Jacomine, P. K. T., Dos Anjos, L. H. C., De Oliveira, V. A., Lumbreras, J. F., Coelho, M. R., ... & Cunha, T. J. F. (2018b). *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília, DF: Embrapa.
- Santos, I. F., Ferreira, S. L., Domínguez, C., Bayona, J. M. (2018a). Analytical strategies for determining the sources and ecotoxicological risk of PAHs in river sediment. *Microchemical Journal*, 137, 90-97.
- Schultz, F. M. (2010). Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel. Dissertação (Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente). Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 137 p.
- Segura, B. E. R., Mogollón, A. H., Zapata, A. O., Peña, E. G. V., Moran, P. P., Madrid, J. O. (2016). Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. *Química Viva*, 15(1), 20-30.
- Sheppard, P. J., Adetutu, E. M., Makadia, T. H., Ball, A. S. (2011). Microbial community and ecotoxicity analysis of bioremediated, weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Soil Research*, 49(3), 261-269.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 59(2), 201-222.
- Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., Hu, Z. (2011). Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Marine pollution bulletin*, 62(10), 2122-2128.
- Souza, D. B., Brito, G. C. B., Vasconcelos, F. C. W., da Conceição Braga, L. (2010). Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de estudos ambientais*, 12(2), 38-46.
- Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Venkidusamy, K., Palanisami, T., Naidu, R., Megharaj, M. (2019). Bioremediation of soil long-term contaminated with PAHs by algal–bacterial synergy of *Chlorella* sp. MM3 and *Rhodococcus*

- wratislaviensis* strain 9 in slurry phase. *Science of The Total Environment*, 659, 724-731.
- Suja, F., Rahim, F., Taha, M. R., Hambali, N., Razali, M. R., Khalid, A., Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 115-122.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1596-1599.
- Tellechea, F. R. F., Martins, M. A., da Silva, A. A., da Gama-Rodrigues, E. F., Martins, M. L. L. (2016). Use of sugarcane filter cake and nitrogen, phosphorus and potassium fertilization in the process of bioremediation of soil contaminated with diesel. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18027-18033.
- Tonini, R. M. C. W., de Rezende, C. E., Grativol, A. D. (2010). Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, 14(4), 1025-1035.
- Venkateswaran, K., Harayama, S. (1995). Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. *Canadian journal of microbiology*, 41(9), 767-775.
- Vitti, G.C., Oliveira, D.B. de., Quintino, T.A. (2006). Micronutrientes na cultura da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. (Org.). Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: CP 2. p. 121-138.
- Weber, B. D., Santos, A. A. (2013). Utilização da biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. *Engenharia Ambiental (Online)-Espírito Santo do Pinhal*, 10(1), 114-133.
- Wetler-Tonini, R. M. C., de Rezende, C. E., Grativol, A. D. (2011). Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. *Revista Virtual de Química*, 3(2), 78-87.
- Xu, X., Chen, X., Su, P., Fang, F., Hu, B. (2016). Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria strains enriched from Yangtze River sediments. *Environmental technology*, 37(5), 513-520.
- Xu, X., Zhou, H., Chen, X., Wang, B., Jin, Z., Ji, F. (2019). Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized *Klebsiella* sp. in soil washing effluent. *Chemosphere*, 223, 140-147.
- Yano, D. M. Y., Attili, D. S., Gatti, M. S. V., Eguchi, S. Y., Oliveira, U. M. (1991). Técnicas de microbiologia em controle de qualidade. *Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia" André Tosello*.
- Young, B. J., Riera, N. I., Beily, M. E., Bres, P. A., Crespo, D. C., Ronco, A. E. (2012). Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 182-186.

Zhao, D., Liu, C., Liu, L., Zhang, Y., Liu, Q., Wu, W. M. (2011). Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(8), 1244-1248.