



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

NATANNA TAYNÁ DE MELO SILVA

**ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS NITRO E  
CLOROAROMÁTICOS DE *SITE* CONTAMINADO**

Recife  
2022

NATANNA TAYNÁ DE MELO SILVA

**ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS NITRO E  
CLOROAROMÁTICOS DE *SITE* CONTAMINADO**

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

**Área de concentração:** Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa.

Orientador: Prof. Dr. Jim Spain.

Recife

2022

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Sandra Maria Neri Santiago, CRB-4 / 1267

S586e

Silva, Natanna Tayná de Melo.

Estratégias para biorremediação de compostos nitro e cloroaromáticos de *site* contaminado / Natanna Tayná de Melo Silva. – 2022.

92 f.: il., figs., tabs., abrev. e siglas.

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa.

Orientador: Prof. Dr. Jim Spain.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia civil. 2. Biosparging. 3. Bioaumentação e bioestimulação. 4. Microrganismos nativos. 5. Biorremediação. 6. Biodegradabilidade de solo. 7. Nitrocumeno. I. Pessôa, Sávia Gavazza dos Santos (Orientadora). II. Spain, Jim (Orientador). III. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2022-243

NATANNA TAYNÁ DE MELO SILVA

**ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS NITRO E  
CLOROAROMÁTICOS DE *SITE* CONTAMINADO**

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

Aprovada em: 10/03/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Antônio de Souza Queiroz (Examinador Externo)  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof. Dr. Mário Takayuki Kato (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Participação por videoconferência  
Dr. James K. Henderson (Examinador Externo)  
Corteva Agriscience

---

Participação por videoconferência  
Dra. Adriana Ururahy Soriano (Examinador Externo)  
Petrobras

---

Participação por videoconferência  
Profª. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Examinador Externo)  
Universidade Federal do Ceará

À minha família.

Fonte inesgotável de amor!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta vitória concedida. Por se fazer presente em cada detalhe, me oferecendo a sabedoria necessária para perseverar nessa trajetória. Meu guia e minha fortaleza, que nunca me desampara.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Sávia Gavazza, por todos os ensinamentos desde a época da graduação, afinal, são onze anos me orientando com tanta sabedoria e serenidade. Por compartilhar seu conhecimento e por confiar a mim o desafio desse trabalho. Por ser tão presente, mesmo em outra cidade. Pelas sessões de “terapia” e por me encorajar a ir atrás dos meus sonhos. Por todo carinho, cuidado e preocupação. Obrigada por tudo! A senhora é fonte de inspiração profissional e de ser humano.

Ao meu orientador externo, Jim Spain, que tanto me ensinou. Sempre tão disponível todas as vezes que o procurei. Obrigada por ter ido para bancada me ensinar a parte prática, por cada reunião científica e cada e-mail trocado. Sua orientação foi essencial para minha formação!

À empresa onde este trabalho foi desenvolvido e que me acolheu de braços abertos. À Erin Mack, Paloma Carvalho e Ruy Silva que não mediram esforços para o desenvolvimento do meu trabalho. A James K. Henderson por ser tão humano e entender meus sonhos e necessidades. A todos os funcionários e empresas de consultoria e terceirizadas, sempre colaborativos. À Paola Barreto por compartilhar seu conhecimento e participar de forma ativa para o desenvolvimento desde trabalho. Marcílio e Davi, obrigada por todas as coletas realizadas. À Lígia agradeço por todo conhecimento compartilhado no laboratório. A Getinho, por cada cafezinho, pipoca, sopinha e vidrarias lavadas com tanto amor. À Camila Carneiro, pelas extrações de DNA. Um agradecimento especial à Ruth e Renata. Além de colegas de trabalho, tornaram-se amigas. Que me deram todo apoio emocional nos momentos difíceis e cumpriram um papel de família neste tempo que fiquei longe da minha. Vocês foram peça fundamental para minha jornada ser mais tranquila.

À professora Elizabeth Edwards por tantos ensinamentos e dispor de seu valioso tempo para discutir meus dados. À Line Lonhein, por conduzir as análises de bioinformática. À Camila Nesbo pela disponibilidade em ajudar com o sequenciamento genômico. A contribuição de vocês foi indispensável para este trabalho.

Aos meus pais, Val e Elizeu, por todo apoio que deram todas as vezes em que eu precisei sair de casa para ir atrás dos meus sonhos. Essa conquista pertence, sobretudo, a vocês. Obrigada por todas as vezes que eu liguei e vocês viajaram para me ajudar. Estou aqui

impulsionada pelo desejo de retribuir todo carinho, dedicação e cuidado que tiveram comigo durante toda a minha vida. Amo incondicionalmente!

Aos meus irmãos, Larissa e Igor, amores da minha vida! De nada valeriam nossas conquistas se não estivéssemos de mãos dadas. Obrigada por todo apoio e por compartilharmos todos os momentos. Por cada abraço na chegada e por aquecerem meu coração para que eu pudesse retornar com a energia renovada.

Aos professores do LSA, Mário Kato, Lourdinha Florêncio, Fabrício Motteran, Wanderli Leite, Bruna Magnus e Bruna Fernandes. Aos técnicos do laboratório, Danúbia, Ronaldo e Iago.

Ao grupo Gavazza pelas conversas, ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento da pesquisa. Em especial, Celinha, Isabelle, Fernanda, Sofia, Osmar, Devson, Gabriel, Roberto, Júlio e Felipe.

Ao meu namorado, Mateus, por todo apoio nessa reta final. Por me ajudar com os gráficos, por se preocupar em me alimentar e proporcionar um ambiente tranquilo e confortável para que eu pudesse escrever. Obrigada por tanto companheirismo!

À FACEPE pela bolsa de doutorado concedida, através do processo nº IBPG-0013-3.07/18.

## RESUMO

Compostos nitro e cloroaromáticos são intermediários na produção de corantes, produtos farmacêuticos, herbicidas, cosméticos e explosivos. Por serem xenobióticos, são tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. No Brasil, há relatos de contaminação ambiental por esses poluentes, sendo assim, a biorremediação é ferramenta estratégica para a proteção ambiental. Nesse sentido, foram avaliadas estratégias para biorremediação de um local contaminado por esses compostos. O experimento foi dividido em 3 blocos de atividades. No primeiro, foi monitorada a concentração dos contaminantes na água subterrânea após a aplicação de um sistema piloto de *biosparging*, como também a mudança da população microbiana e a quantificação por NMP. Os resultados mostraram que a técnica funcionou muito bem, removendo até 99% dos contaminantes orgânicos. Além disso, estimulou o crescimento da população microbiana, passando de 103 para 106 NMP.L-1, e o ambiente passou a ser dominado por arqueas aeróbias. O gênero mais abundante foi *Candidatus Nitrosotalea*, que está diretamente relacionada com a oxidação de amônia em ambiente ácido. No segundo bloco se avaliou a capacidade de microrganismos nativos degradar aerobiamente os principais contaminantes presentes nas águas subterrâneas do local, através do enriquecimento dessas culturas em laboratório, bem como a identificação dos microrganismos envolvidos no processo. Todos os contaminantes testados (2-, 3-; e 4-CA, 2,3-; e 3,4-DCA, MCB, 1,2-DCB, 2-, 3-; e 4-CNB, 2,3-; e 3,4-DCNB e 4-NC) foram degradados, indicando que a população nativa é capaz de metabolizar os poluentes orgânicos. Os principais gêneros encontrados foram *Diaphorobacter*, *Sediminibacterium*, *Cupriavidus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, todos envolvidos em degradação aeróbia de compostos aromáticos. O principal achado deste trabalho foi obter cultura que degrada 4-NC, jamais reportado em literatura. O terceiro bloco de atividade incluiu bioestimulação e bioaumentação para a biodegradação em solo, em escala laboratorial. O pH alcalino não foi fator limitante. Já a umidade precisou ser ajustada para valores entre 15% e 25% para suportar o processo de biodegradação. Uma cultura cultivada em laboratório e solo tratado foram utilizados como inóculo para tratar solo contaminado. Os resultados foram promissores e dão embasamento para o desenvolvimento de testes de biorremediação de solo no local contaminado.

Palavras-chave: *biosparging*; bioaumentação e bioestimulação; microrganismos nativos; biorremediação; biodegradabilidade de solo; 4-nitrocumeno.

## ABSTRACT

Nitro and chloroaromatic compounds are intermediates in the production of dyes, pharmaceuticals, herbicides, cosmetics and explosives. As they are xenobiotics, they are toxic, mutagenic, and carcinogenic. In Brazil, there are reports of environmental contamination by those pollutants, so bioremediation is a strategic tool for environmental protection. In this sense, strategies for bioremediation of a site contaminated by these compounds were evaluated. The experiment was divided into 3 blocks of activities. In the first, the concentration of contaminants in groundwater was monitored after the application of a pilot biosparging system, as well as the change microbial population and MPN quantification. The results showed that the technique was successful, removing up to 99% of organic contaminants. In addition, it stimulated the growth of the microbial population, from 10<sup>3</sup> to 10<sup>6</sup> NMP.L<sup>-1</sup>, and the environment became dominated by aerobic archaea. The most abundant genus was *Candidatus Nitrosotalea*, which is directly related to the oxidation of ammonia in an acidic environment. In the second block, the ability of native microorganisms to aerobically degrade the main contaminants present in the groundwater of the site was evaluated, the enrichment of these cultures was carried out in the laboratory, as well as the identification of the microorganisms involved in the process. All contaminants tested (2-CA, 3-CA, 4-CA, 2,3-DCA, 3,4-DCA, MCB, 1,2-DCB, 2-NCB, 3-NCB, 4-NCB, 2,3-DCNB, 3,4-DCNB and 4-NC) were degraded, indicating that the native population is able to metabolize organic pollutants. The main genera found were *Diaphorobacter*, *Sediminibacterium*, *Cupriavidus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas*, all involved in aerobic degradation of aromatic compounds. The main finding of this work was to obtain a culture that degrades 4-NC, never reported in the literature. The third block of activity included biostimulation and bioaugmentation for soil biodegradation on a laboratory scale. Alkaline pH is not a limiting factor. The moisture had to be adjusted to values between 15% and 25% to support biodegradation process. A laboratory-grown crop and treated soil were used as inoculum to treat contaminated soil. The results were promising and provide a basis for the development of on-site soil bioremediation tests.

Keywords: *biosparging*; bioaugmentation and biostimulation; native microorganisms; bioremediation; soil biodegradability; 4-nitrocumene

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma para definir e implementar processos de biorremediação	22
Figura 2 -	Via de degradação aeróbia de 3,4-dicloroanilina por <i>Acinetobacter baylyi</i> GFJ2	26
Figura 3 -	Vias de degradação aeróbia de clorobenzenos	30
Figura 4 -	Vias de degradação de (a) 2-cloronitrobenzeno e (b) 4-cloronitrobenzeno	32
Figura 5 -	Etapas do experimento	34
Figura 6 -	Projeto piloto do biosparging cedido pela empresa de consultoria	38
Figura 7 -	Corte A-A' da planta do biosparging	39
Figura 8 -	Fotografia do Sistema de Biosparging	39
Figura 9 -	Fotografia da realização do teste de respirometria	40
Figura 10 -	Microplacas de 96 poços para teste de NMP	42
Figura 11 -	Fotografia dos sistemas utilizados para coleta de amostras para extração de DNA: (a) Bomba peristáltica para amostragem do biosparging. (b) Filtro Sterivex™	43
Figura 12 -	Fotografia dos microcosmos	44
Figura 13 -	Escavação para coleta de amostra de solo	46
Figura 14 -	Escavação para coleta de solo e pontos amostrados	47
Figura 15 -	Mesocosmos para teste de biorremediação de solo	48
Figura 16 -	Resultados dos testes de respirometria nas condições avaliadas.	51
Figura 17 -	Concentração de BTEX (▲), Cloroanilinas (●), Clorobenzenos (◆), Nitroclorobenzenos (■) e outros (Δ) ao longo do tempo de operação do biosparging, nos poços de monitoramento (A) BS-MW-01, (B) BS-MW-02, (C) BS-MW-03, (D) BS-MW-04, (E) BS-MW-05 e (F) PM-013. A linha pontilhada (--) representa o somatório dos contaminantes e (*) eficiência de remoção	53
Figura 18 -	Número Mais Provável de microrganismos que degradam mCB (●), 1,2-DCB (●), 2-CA (●), 2,3-DCA (●), 3,4-DCA (●)	54
Figura 19 -	Perfil taxonômico no nível de reino da comunidade microbiana nas amostras do biosparging	55

Figura 20 -	Perfil taxonômico no nível de gênero da comunidade microbiana das amostras do poço BS-MW-01	56
Figura 21 -	Biodegradação e enriquecimento das culturas ao longo do tempo. (A) 2-CA, (B) 3-CA, (C) 4-CA, (D) 2,3-DCA, (E) 3,4-DCA, (F) MCB, (G) 1,2-DCB, (H) 2-CNB, (I) 3-CNB, (J) 4-CNB, (K) 2,3-DCNB e (L) 3,4-DCNB. A linha pontilhada em cada gráfico representa seu respectivo controle abiótico. A Estrela indica o momento que foi retirada amostra para extração de DNA	59
Figura 22 -	Perfil taxonômico no nível de gênero das comunidades microbianas dos microcosmos das culturas enriquecidas	61
Figura 23 -	Similaridade entre as comunidades microbianas dos microcosmos avaliados para diferentes contaminantes. Painel A: análise de componentes principais aplicada à abundância relativa de gênero das diferentes comunidades microbianas. Painel B: dendrograma representando a divergência taxonômica em nível e gênero	65
Figura 24 -	Ensaio cinéticos de degradação do (A) 2,3-DCA, (B) 3,4-DCA, (C) 3-CNB, (D) 2,3-DCNB e (E) 3,4-DCNB ao longo do tempo. A linha pontilhada (---) representa o controle abiótico, (▲) densidade óptica celular, (■) concentração de N-nitrito e (●) concentração dos contaminantes avaliados	66
Figura 25 -	Teste de inibição da atividade microbiana nas diluições 1:1 (A), 1:5 (B), 1:20 (C) e controle abiótico (D). A linha pontilhada (---) representa o somatório da concentração dos contaminantes, (●) 1,2-DCB, (●) MCB, (●) 3- e 4-CA, (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCA, (●) 3-CNB, (●) 4-CNB, (●) 2,3-DCNB e (●) 3,4-DCNB	68
Figura 26 -	Concentração dos contaminantes na cultura mista: (●) 1,2-DCB, (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCA, (●) 2,3-DCNB, (●) 3,4-DCNB, (●) 3- e 4-CA e (*) concentração total do spike	69
Figura 27 -	Perfil taxonômico no nível de gênero da comunidade microbiana da cultura mista	70
Figura 28 -	Teste de solo em T1 (A), T2 (B) e T3 (C). A concentração dos contaminantes é representada por: (●) 2-CNB, (●) 2,3-DCA, (●)	72

- 3,4-DCNB, (●) BEHP, (---) Total de orgânicos. Parâmetros físico-químicos (■) umidade (▲) pH
- Figura 29 - Estágio 2 dos testes de solo. Painel (A) Tratamento 2A, (B) Tratamento 2B, (C) Tratamento 2C e (D) Tratamento 2D. Concentração dos contaminantes: (●) 2-CNB (●) 2,3-DCA (●) 3,4-DCNB (●) BEHP. Parâmetros físico-químicos: (■) umidade (▲) pH 74
- Figura 30 - Ensaio do estágio 1, após fase lag. Painel (A) mostra Tratamento 1, Painel (B), Tratamento 2. A concentração dos contaminantes está representada por (●) 2-CNB (●) 2,3-DCA (●) 3,4-DCNB (●) BEHP (---) Total de orgânicos. Parâmetros físico-químicos por (■) umidade (▲) pH 75
- Figura 31 - Degradação dos contaminantes de interesse (●) 2-CNB, (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCNB, (●) BEHP, (●) 2,5-DCA, (---) Total de orgânicos, submetidos ao Tratamento 3 (painel A), solo autoclavado inoculado com solo ativo, e ao Tratamento 4 (painel B), solo contaminado inoculado com solo ativo. Parâmetros físico-químicos: (■) umidade (▲) pH 76
- Figura 32 - Concentração dos contaminantes: (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCNB, (●) BEHP, (●) 2,5-DCA e (---) Total de orgânicos nos Tratamentos 5 (A) e 6 (B) ao longo do tempo no estágio 4 dos testes de solo. Parâmetros físico-químicos: (■) umidade (▲) pH 77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tecnologias de biorremediação	23
Tabela 2 -	Degradação aeróbia de anilinas e cloroanilinas reportados em literatura	27
Tabela 3 -	Degradação aeróbia de clorobenzenos reportados em literatura	28
Tabela 4 -	Degradação aeróbia de nitroclorobenzenos reportados em literatura	33
Tabela 5 -	Características dos Contaminantes de Interesse - COI. Informações obtidas no PubChem Compound Database	36
Tabela 6 -	Cronograma de amostragem do biosparging	37
Tabela 7 -	Parâmetros de monitoramento do biosparging	39
Tabela 8 -	Condições experimentais para o teste de respirometria	41
Tabela 9 -	Condições aplicadas no teste de inibição de atividade microbiana em solo	46
Tabela 10 -	Condições experimentais testadas no Estágio 2 do teste de solo	49
Tabela 11 -	Comparação das taxas de degradação dos contaminantes de ordem zero (K0) e primeira ordem (K1)	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2A5CP	2-amino-5-cloromucônico
2C4NP	2-Cloro-4-nitrofenol
4C2NP	4-Cloro-2-nitrofenol
AOA	Arqueas oxidadoras de amônia
AR	Abundância relativa
BEHP	Bis-(2-etilhexil)-ftalato
BS	Biosparging
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
CA	Cloroanilina
CB	Clorobenzeno
CNB	Cloronitrobenzeno
COI	Comtaminantes de interesse
D1	Diluição 1:1
D2	Diluição 1:5
D3	Diluição 1:20
DCA	Dicloroanilina
DCB	Diclorobenzeno
DCNB	Dicloronitrobenzeno
EEC	European Economic Community
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatógrafo líquido de alta pressão
MCB	Monoclorobenzeno

MW	Monitoring well
NC	Nitrocumeno
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio dissolvido
S1	Solo do local 1
S2	Solo do local 2
S2	Solo do local 3
SVOC	Semivolatile Organic Compound
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
T4	Tratamento 4
T5	Tratamento 5
T6	Tratamento 6
TCA	Ácido Tricarboxílico
US EPA	U.S. Environmental Protection Agency
VOC	Volatile Organic compound

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1	OBJETIVO	19
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>20</b>
2.1	HISTÓRICO DA CONTAMINAÇÃO DO SITE	20
2.2	ESTRATÉGIAS DE BIODEGRADAÇÃO	20
2.3	BIORREMEDIAÇÃO	21
2.4	COMPOSTOS CLOROAROMÁTICOS	24
<b>2.4.1</b>	<b>Cloroanilinas</b>	<b>25</b>
2.4.1.1	Mecanismos de biodegradação anaeróbia das cloroanilinas	25
<b>2.4.2</b>	<b>Clorobenzenos</b>	<b>28</b>
2.4.2.1	Mecanismos de biodegradação aeróbia dos clorobenzenos	28
<b>2.4.3</b>	<b>Cloronitrobenzenos</b>	<b>30</b>
2.4.3.1	Mecanismos de biodegradação aeróbia de cloronitrobenzenos	30
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>34</b>
3.1	COMPOSTOS QUÍMICOS E MEIO MINERAL	34
3.2	TESTE PILOTO BIOSPARGING	37
<b>3.2.1</b>	<b>Respirometria</b>	<b>40</b>
<b>3.2.2</b>	<b>VOCs/SVOCs</b>	<b>41</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Densidade microbiana</b>	<b>41</b>
<b>3.2.4</b>	<b>DNA</b>	<b>42</b>
3.3	BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE COMPOSTOS NITRO E CLOROAROMÁTICOS POR MICRORGANISMOS NATIVOS DE SITE CONTAMINADO	44
<b>3.3.1</b>	<b>Biodegradação aeróbia</b>	<b>44</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Culturas de enriquecimento</b>	<b>45</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Análises da comunidade microbiana</b>	<b>45</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Cinética de degradação e crescimento microbiano</b>	<b>45</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Métodos analíticos</b>	<b>45</b>
3.4	TESTES DE BIODEGRADABILIDADE EM SOLO	46
<b>3.4.1</b>	<b>Teste de inibição de atividade dos microrganismos</b>	<b>46</b>

3.4.2	Cultura mista	47
3.4.3	Biodegradação do solo	47
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	51
4.1	<i>TESTE PILOTO BIOSPARGING</i>	51
4.1.1	Respirometria	51
4.1.2	VOCs/SVOCs	52
4.1.3	Densidade microbiana	54
4.1.4	Mudança na comunidade microbiana após aplicação do biosparging	55
4.2	BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE COMPOSTOS NITRO E CLOROAROMÁTICOS POR MICRORGANISMOS NATIVOS DE SITE CONTAMINADO	58
4.2.1	Biodegradação aeróbia e enriquecimento microbiano	58
4.2.2	Comunidade microbiana	60
4.2.3	Cinética de degradação e crescimento microbiano	65
4.3	TESTES DE BIODEGRADABILIDADE EM SOLO	67
4.3.1	Teste de inibição de atividade dos microrganismos	67
4.3.2	Cultura mista	68
4.3.3	Biodegradação do solo	70
5	<b>CONCLUSÕES</b>	79
	<b>REFERÊNCIAS</b>	81

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de novos produtos e processos que facilitam a vida humana e melhoram a economia mundial. Em contrapartida, o setor industrial ganhou peso nos problemas ambientais com o aumento do número de compostos químicos sintéticos liberados no meio ambiente. Infelizmente, a natureza não desenvolve aparato metabólico para degradar os contaminantes com a mesma velocidade com que a indústria química prospera. Por serem xenobiótico, vários compostos são tóxicos e mutagênicos (ARORA; BAE, 2014; LI et al., 1999; NAIR, 1986), representando uma ameaça ao meio ambiente.

Anilinas cloradas e nitrobenzenos clorados fazem parte desses poluentes. Eles são amplamente utilizados na produção de corantes, produtos farmacêuticos, perfumes, pesticidas, herbicidas, cosméticos e explosivos (BLASER; STEINER; STUDER, 2009). Existem alguns relatos de contaminação por esses poluentes orgânicos no Brasil. Recentemente, Kraus (2018) descreveu um site contaminando na Bahia. A lista de contaminantes incluía nitro e cloroaromáticos, que eram usados na a produção de herbicida. Vários dos compostos estão listados como poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) e Comunidade Econômica Europeia (EEC). Conseqüentemente, há demandas eminentes por tecnologias eficientes para remediação de áreas contaminadas por estes poluentes.

Os compostos nitro e cloroaromáticos representam um grupo de contaminantes ambientais resistentes ao ataque microbiano devido à alta estabilidade do anel benzênico juntamente com os efeitos das propriedades eletrofílicas dos grupos nitro e cloro (JU; PARALES, 2010). Entretanto, devido à prevalência dos contaminantes no meio ambiente, os microrganismos desenvolvem mecanismos para metabolizar o carbono disponível. Além disso, há evidências de que as bactérias podem usar esses contaminantes como única fonte de carbono e energia (SANGODKAR et al., 1989). Uma abordagem comum para a triagem de microrganismos altamente eficiente é coletar amostras de locais contaminados e, em seguida, enriquecer esses microrganismos em laboratório. Diversos grupos de pesquisa descrevem bactérias capazes de biodegradar aerobiamente cloroanilinas (HONGSAWAT; VANGNAI, 2011; NITISAKULKAN et al., 2014; ZHANG et al., 2010a), clorobenzenos (FIELD; SIERRA-ALVAREZ, 2008; TAKAGI et al., 2009), nitrobenzenos (NISHINO; SPAIN, 1993; QI; ZHENG; ZHANG, 2012) e cloronitrobenzenos (LIU et al., 2011; PALATUCCI et al., 2019; WU et al., 2009a; XIAO et al., 2006). No entanto, para o 4-nitrocumeno (4-NC) ainda não há

relato de microrganismos degradadores. Desta forma, a identificação de microrganismos com tal habilidade e a investigação dos seus mecanismos de degradação é um desafio atual, que pode auxiliar na descontaminação de áreas degradadas por estes contaminantes. Esta tarefa tem encontrado suporte nos avanços das técnicas moleculares, como, por exemplo, o sequenciamento genômico, que permite a obtenção das informações genéticas de microrganismos isolados. Essas técnicas permitem que os pesquisadores explorem culturas microbianas de diferentes locais, caracterizando sua composição e conseqüentemente, esclarecendo como os processos bioquímicos acontecem nos ambientes naturais, reatores biológicos ou em ensaios de laboratório.

Esse conhecimento, atrelado as técnicas de biorremediação, promovem a restauração do ambiente contaminado. Métodos de biorremediação, como bioestimulação e bioaugmentação estão recebendo maior atenção em comparação com tecnologias de remediação física e química devido ao seu menor custo e perturbação do ambiente (LIU et al., 2013; LU et al., 2014). Por meio da biorremediação, a toxicidade dos poluentes pode ser reduzida pela utilização do potencial metabólico dos microrganismos que transformam, mineralizam ou mesmo imobilizam os poluentes altamente tóxicos em formas menos tóxicas. No entanto, a eficaz atividade dos microrganismos depende de diversos fatores, como por exemplo, concentração e natureza química dos poluentes, disponibilidade e características fisiológicas do microrganismo.

Diante dessas complexidades, o presente trabalho pretendeu ampliar o conhecimento sobre a biodegradabilidade aeróbia dos compostos nitro e cloroaromáticos, especialmente do 4-NC, aliando a pesquisa acadêmica aos projetos de biorremediação de um *site* contaminado por estes compostos.

## 1.1 OBJETIVO

Avaliar estratégias para biodegradação de compostos nitro e cloroaromáticos presentes em um *site* contaminado.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- a) Investigar se existem minerais ou compostos orgânicos dissolvidos na água subterrânea do site contaminado que não são identificados como contaminantes preocupantes, mas exercem demanda bioquímica de oxigênio a ser considerada no projeto de suprimento de O<sub>2</sub> do sistema de *biosparging*.
- b) Monitorar a concentração dos contaminantes voláteis e semi-voláteis ao longo do período de aplicação do *biosparging*, assim como a mudança na comunidade microbiana.
- c) Verificar a capacidade de microrganismos nativos em degradar aerobicamente os principais nitro e cloroaromáticos presentes nas águas subterrâneas do site contaminado.
- d) Obter culturas de enriquecimento capazes de degradar isômeros de cloroanilinas, clorobenzenos e nitroclorobenzenos e identificar os microrganismos envolvidos no processo.
- e) Obter parâmetros físico-químicos e identificar a presença de microrganismos nativos que degradem os contaminantes presentes no solo para apoiar o desenvolvimento de testes de biorremediação em solo.
- f) Verificar a capacidade de microrganismos cultivados em laboratório em degradar os contaminantes alvo quando presentes em solo.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Esta seção apresenta a fundamentação teórica que deu embasamento para o desenvolvimento da pesquisa.

### 2.1 HISTÓRICO DA CONTAMINAÇÃO NO SITE

A empresa do local alvo deste estudo iniciou suas atividades em 1987 e teve seu encerramento em 2014. Ela costumava produzir e armazenar matérias-primas para a produção de um herbicida que é amplamente utilizado para controlar ervas daninhas aquáticas e terrestres. O processo de produção partia do benzeno e incluía a formação de diclorobenzeno (DCB), dicloronitrobenzeno (DCNB) e dicloroanilina (DCA).

Nos primórdios, a contaminação ambiental da área se deu principalmente por lixiviação pela chuva durante o armazenamento de produtos químicos e resíduos, enquanto a Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) do pólo industrial era construída. Em 2012 foi iniciada uma investigação mais profunda para avaliar a contaminação do solo e da água subterrânea e uma diversidade de contaminantes foi encontrada nas camadas rasas e profundas deste local. Os compostos foram divididos nas seguintes categorias: anilinas e cloroanilinas (CA), clorobenzenos (CB), cloronitrobenzenos (CNB), BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), ftalatos e outros. Os compostos de interesse (COIs) para este estudo são os grupos das cloroanilinas (2-, 3- e 4-CA, 2,3- e 3,4-DCA), clorobenzenos (MCB e 1,2-DCB) e cloronitrobenzenos (2-, 3- e 4-CNB, 2,3- e 3,4-DCNB), por terem sido os grupos detectados em maiores níveis de concentração e incidência. Estratégias e mecanismos bioquímicos para remediação destes contaminantes de interesse (COIs) estão apresentados a seguir.

### 2.2 ESTRATÉGIAS DE BIODEGRADAÇÃO

O sistema metabólico que tem se mostrado mais apto para biodegradar contaminantes é o microbiano, uma vez que os microrganismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando ativamente dos principais ciclos biogeoquímicos e, representando, portanto, o suporte de manutenção da vida na Terra. Os microrganismos ao encontrarem compostos xenobióticos em seu ambiente são desafiados a desenvolver novas vias catabólicas, alterando suas próprias informações genéticas como resultado de mutações em genes estruturais ou recrutamento de genes (REINEKE, 1986). Quando um novo contaminante

percorre todos os passos catalíticos de uma determinada rota metabólica, provavelmente ele se torna uma possibilidade nutritiva para o microrganismo, sendo os produtos de sua degradação aproveitados pelo seu metabolismo constitutivo e energético. Entretanto, o produto químico sintético pode ser apenas parcialmente degradado –biotransformado- por determinada enzima de uma rota catabólica sem que o produto resultante contribua para o crescimento do microrganismo, esta transformação metabólica é conhecida por cometabolismo (ALEXANDER, 1999).

Entre os microrganismos podem ocorrer troca de material genético na natureza. Muitas rotas metabólicas de compostos complexos estão localizadas no genoma plasmidial. Os plasmídeos podem ser trocados entre microrganismos de mesma espécie ou entre espécies diferentes, por meio de mecanismos de conjugação ou transformação de células naturalmente competentes (RASUL CHAUDHRY; CHAPALAMADUGU, 1991). Estes processos de troca de material genético favorecem a disseminação de genes, e, conseqüentemente, a disseminação potencial de enzimas relacionadas ao metabolismo catabólico de uma molécula recalcitrante e/ou xenobiótica (REINEKE, 1986).

Se um sistema microbiano possuir todos os requisitos bioquímicos e genéticos necessários para a degradação de um composto xenobiótico, mas as características físico-químicas e nutricionais do meio não forem adequadas as necessidades metabólicas do microrganismo, a biodegradação não ocorrerá. Por esta razão, a implementação de técnicas de biorremediação em um ambiente contaminado contribui para a otimização dos processos de biodegradação.

### 2.3 BIORREMEDIAÇÃO

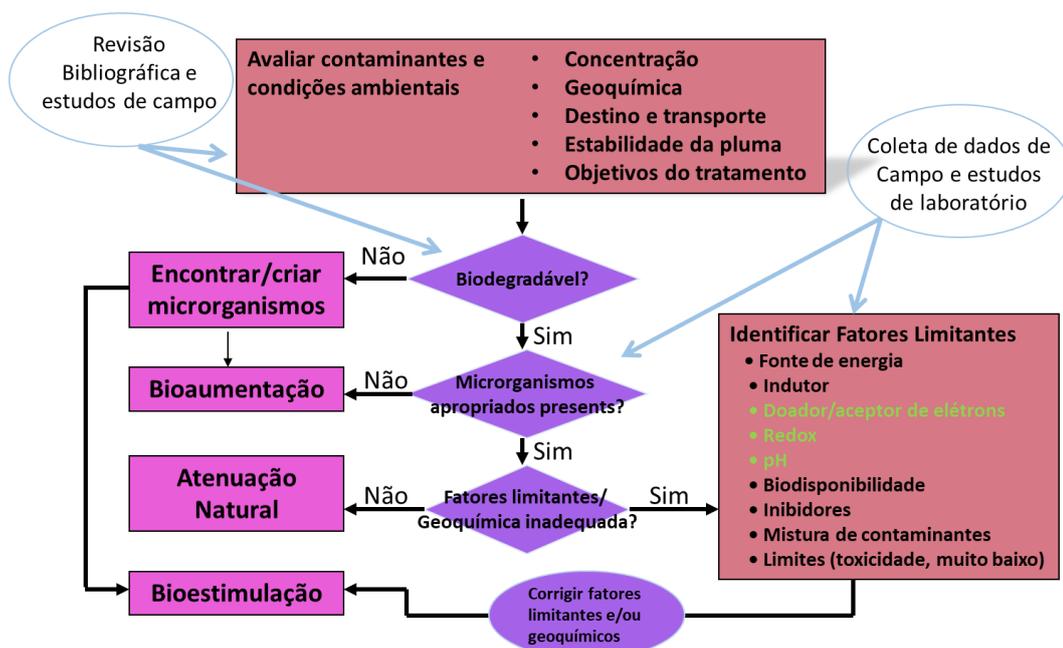
As atividades industriais expuseram o solo e as águas subterrâneas a diferentes compostos tóxicos, prejudiciais aos seres humanos e aos ecossistemas. Para alcançar a concentração desejável e segura dos contaminantes no ambiente, diferentes técnicas de remediação podem ser aplicadas.

A biorremediação é uma técnica de remediação, e consiste no uso intencional da biodegradação (CHISHTI et al., 2013), que nada mais é que um processo natural em que os microrganismos alteram e decompõem os contaminantes em outros compostos (HOFF, 1993). Com isso, a biorremediação é uma abordagem de baixo custo, quando comparada a técnicas de remediação química ou física, além de ser ambientalmente amigável.

As técnicas de biorremediação visam acelerar o processo em que os microrganismos quebram as moléculas, reduzindo a abundância dos contaminantes no ambiente por degradação, desintoxicação, estabilização ou transformação (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

A biorremediação tem sido estudada desde a década de 1940 (ZOBELL, 1946), mas tornou-se conhecida e estudada de maneira mais ampla na década de 1980 (HOFF, 1993). Por ser uma tecnologia complexa, sua implementação ocorre em etapas que compreendem um estudo do ambiente, do tipo de contaminante, dos riscos e da legislação pertinente (Figura 1). O fluxograma apresentado na Figura 1 foi elaborado pelo Prof. Jim Spain da University of West Florida e é aqui utilizada com sua autorização. A primeira coisa a se saber, seguindo o fluxograma, é qual tipo e quantidade do poluente presente, bem como avaliação de natureza biológica, geológica, geofísica e hidrológica do local contaminado, e o objetivo da biorremediação. Em seguida, busca-se na literatura informações sobre a biodegradabilidade do contaminante. Em caso negativo, pode-se descobrir ou adaptar microrganismos com habilidade de degradar o xenobiótico. Se for biodegradável, estudos em laboratório são necessários para verificar a presença de microrganismos nativos ou se será necessário fazer uso da bioaumentação, pela adição de culturas degradadoras. Quando os microrganismos estão presentes, os fatores limitantes precisam ser avaliados quanto a necessidade de correção por meio de técnicas de engenharia, ou se procede com a atenuação natural.

Figura 1 - Fluxograma para definir e implementar processos de biorremediação



Fonte: A Autora (2022)

Alguns exemplos de técnicas de biorremediação são apresentados na Tabela 1. Quando o tratamento é feito no local, denomina-se *in situ*, quando há transferência do material a ser tratado para outro local, o tratamento é *ex situ* (HAMZAH et al., 2013).

Tabela 1 - Tecnologias de biorremediação

<b>Técnica</b>	<b>Mecanismos envolvidos</b>	<b>Aplicação</b>
Biopilha ( <i>ex situ</i> )	- Solo contaminado é empilhado. - Temperatura, aeração, umidade e nutrientes são controlados para otimizar a atividade microbiana.	Azubuike; Chikere; Okpokwasili (2016); Dias et al. (2015)
Biorreator ( <i>ex situ</i> )	- Solo e água contaminados são colocados em um reator e os elementos necessários são fornecidos: microrganismos, oxigênio, agitação, nutrientes, etc. - Os processos biológicos ocorrem em reator fechado que converte os contaminantes perigosos em produtos não perigosos.	Tomei; Daugulis (2013)
Compostagem ( <i>ex situ</i> )	- Solo contaminado é misturado com aditivos orgânicos não tóxicos (esterco, resíduos agrícolas, lodo de esgoto). - A mistura é espalhada em pilhas ou leiras.	Saum; Jiménez; Crowley (2018); Tomei; Daugulis, (2013)
<i>Landfarming</i> ( <i>in situ</i> ou <i>ex situ</i> )	- Solo contaminado é espalhado na superfície do solo e microrganismos nativos são estimulados para promover a degradação aeróbia dos contaminantes. - O cultivo periódico do solo é necessário para a aeração adequada.	Jeong; Jeong; Kim (2015)
<i>Bioventing</i> ( <i>in situ</i> )	- Fornecimento de oxigênio para os microrganismos nativos em solo contaminado da zona não saturada, através da circulação por injeção e/ou sucção de ar, de forma controlada.	Brusseau et al. (2013)

<i>Biosparging</i> ( <i>in situ</i> )	- Fornecimento de oxigênio para os microrganismos nativos em água subterrânea contaminado (zona saturada), injetando ar de maneira controlada.	Azubuiké; Chikere; Okpokwasili (2016); Kao et al. (2008)
Fitorremediação ( <i>in situ</i> ou <i>ex situ</i> )	- Uso de plantas e comunidades microbianas na rizosfera para degradar, extrair, conter ou imobilizar contaminantes do solo e da água.	Ali; Khan; Sajad (2013)
Bioestimulação ( <i>in situ</i> ou <i>ex situ</i> )	- Fornecimento de nutrientes, oxigênio, ajuste de umidade, pH e temperatura para estimular o crescimento dos microrganismos nativos.	Ruberto; Vazquez; Mac Cormack (2003); Yang et al. (2009)
Bioaumentação ( <i>in situ</i> ou <i>ex situ</i> )	- Adição de microrganismos degradadores dos contaminantes de interesse.	Ruberto; Vazquez; Mac Cormack (2003)

Fonte: A Autora (2022)

A viabilidade da aplicação de cada uma das técnicas de tratamento apresentadas na Tabela 1 depende da natureza do poluente e das características do local. O sucesso da biorremediação vai depender de microrganismos capazes de adaptação rápida e uso eficiente de poluentes como substrato ou em cometabolismo. Este processo pode ser influenciado por diversos parâmetros, como temperatura, fonte de carbono, energia, pH, teor de umidade e oxigênio. Portanto, a compreensão das vias catabólicas, mecanismos e enzimas responsáveis é um meio eficaz para definir fatores importantes para a remoção eficiente dos poluentes, contribuindo para implantação de diferentes técnicas de biorremediação.

## 2.4 COMPOSTOS CLOROAROMÁTICOS

Os itens a seguir nesta seção apresentam como os contaminantes estudados são encontrados e quais mecanismos de degradação.

### 2.4.1 Cloroanilinas

As cloroanilinas (CAs), incluindo monocloroanilinas e dicloroanilinas, são matérias-primas para diferentes processos industriais e são frequentemente encontradas nesses efluentes (ORGE; FARIA; PEREIRA, 2015). Por exemplo, elas são intermediárias na produção de corantes, produtos farmacêuticos, pesticidas e herbicidas (BOON et al., 2000). Esses compostos podem persistir na natureza por um longo tempo e acumular-se em organismos vivos (ZHU et al., 2012). Pesticidas aromáticos com grupos amino como diuron, linuron, propanil e triclocarban podem ser transformados em CAs no ambiente (SILAR et al., 2011). Além disso, os nitrobenzenos clorados podem ser reduzidos as CAs correspondentes, o que pode levar ao acúmulo de CAs nas águas subterrâneas e no solo (ZHANG et al., 2017). A acumulação de dicloroanilina (DCAs) no ambiente também pode ser causada pela redução completa do grupo nitro durante a transformação anóxica de compostos nitroaromáticos clorados, como os dicloronitrobenzenos (OKUTMAN TAS et al., 2006).

#### 2.4.1.1 Mecanismos de biodegradação aeróbia das cloroanilinas

Muitas bactérias foram isoladas e caracterizadas por sua capacidade de degradar cloroanilinas (2-CA, 3-CA e 4-CA). A etapa inicial da degradação da monocloroanilina é a desaminação oxidativa por dioxigenase no clorocatecol correspondente. O clorocatecol é degradado por meio da via de ortoclivagem ou metaclivagem. A maioria das bactérias que degradam a cloroanilina, degradam a anilina por meio da via de ortoclivagem. *Pseudomonas acidovorans* CA50 foi capaz de mineralizar 2-cloroanilina por meio da via de ortoclivagem (HINTEREGGER; LOIDL; STREICHSBIER, 1994). *Brevundimonas diminuta* INMI KS-7 degrada 3- e 4-cloroanilina por meio da via de ortoclivagem com formação de 4-cloropirocatecol, ácido 3-cloromucônico, ácido maleilacético e ácido 3-cetoadípico (SUROVTSEVA; IVOYLOV; KARASEVICH, 1986). A degradação da anilina por meio da via de metaclivagem foi observada em *Diaphorobacter* PCA039, que metaboliza 4-cloroanilina via 4-clorocatecol, 2-hidroxi-5-cloromucônico semialdeído, 5-cloro-4-oxalocrotonato e 5-cloro-2-oxo-4-hidroxipentanoato (ZHANG et al., 2010b). Da mesma forma, *Comamonas testosteroni* 12 metaboliza 3-cloroanilina por meio da via de metaclivagem (BOON et al., 2000).

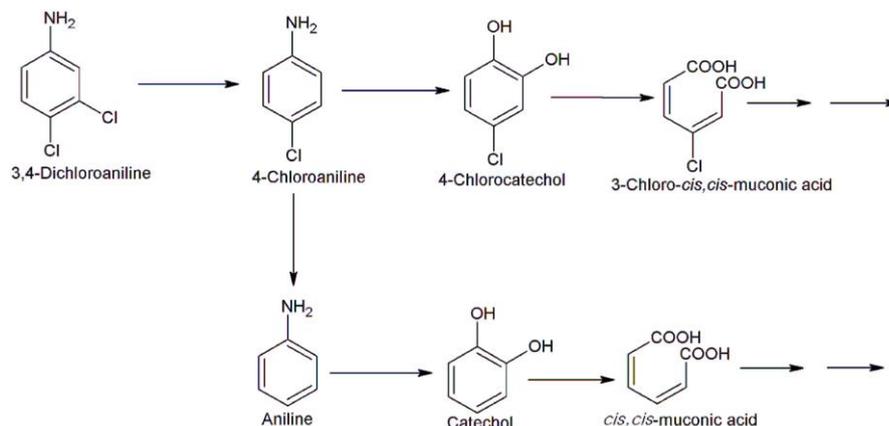
A degradação bacteriana de dicloroanilinas também é reportada. *Bacillus megaterium* IMT21 e *Rhodococcus* sp. T1-1 foram utilizados para degradação de cinco isômeros de

dicloroanilina, incluindo 3,4-, 2,3-, 2,4-, 2,5- e 3,5-DCA, como únicas fontes de carbono e energia (LEE et al., 2008; YAO et al., 2011). A cepa IMT21 degrada 2,3-, 2,4- e 2,5-DCA via dicloroaminofenol e 3,4- e 3,5-DCA via dicloroacetanilida (YAO et al., 2011). No entanto, nenhum metabólito foi detectado na degradação de qualquer um dos isômeros de dicloroanilina pela cepa T1-1 (LEE et al., 2008). Outra bactéria, *Alcaligenes faecalis* H1 mineralizou 3,4-dicloroanilina por meio da desaminação oxidativa inicial com formação de 4,5-dicloropirocatecol (SUROVTSEVA; SUKHIKH; IVOYLOV, 1993) enquanto *Pseudomonas fluorescens* 26-K mineralizou 3,4-dicloroanilina via 4-amino-2-clorofenol por desalogenação inicial e hidroxilação subsequente (TRAVKIN et al., 2003). *Brevundimonas diminuta* INMI KS-7 degrada 3,4-dicloroanilina via 4,5-dicloropirocatecol e ácido dicloromucônico (SUROVTSEVA; IVOYLOV; KARASEVICH, 1986).

Uma cepa de *Pseudomonas* sp. degrada 3,4-dicloroanilina na presença de anilina via 4,5-diclorocatecol, 3,4-dicloromuconato, 3-clorobutenolida, 3-cloromaleilacetato e 3-cloro-4-cetoadipato (YOU; BARTHA, 1982). A ramificação da via de degradação da 3,4-dicloroanilina foi observada em *Acinetobacter baylyi* cepa GFJ2 que a utilizou como sua única fonte de energia de carbono (HONGSAWAT; VANGNAI, 2011).

A etapa inicial de degradação envolve a desalogenação de 3,4-dicloroanilina em 4-cloroanilina, que é posteriormente biotransformada por meio de duas rotas diferentes (Figura 2). Na primeira rota, a 4-cloroanilina sofre desalogenação para produzir anilina, que é posteriormente degradada pela rota de formação do catecol e da via de ortoclivagem. Na segunda rota, a 4-cloroanilina sofre dioxigenação em 4-clorocatecol e amônia. A degradação adicional do 4-clorocatecol prossegue através da via de clivagem do orto-anel (HONGSAWAT; VANGNAI, 2011).

Figura 2 - Via de degradação aeróbia de 3,4-dicloroanilina por *Acinetobacter baylyi* GFJ2



Fonte: Adaptado de Hongsawat e Vangnai (2011)

Uma compilação da literatura que descreve a biodegradação das cloroanilinas é apresentada na Tabela 2. Esta revisão revela que *Pseudomonas* e *Delftia* são os microrganismos mais comuns relacionados à degradação aeróbia de anilina e cloroanilinas.

Tabela 2 - Degradação aeróbia de anilinas e cloroanilinas reportados em literatura

<b>Substrato</b>	<b>Microrganismo reportado</b>	<b>Referência</b>
Anilina, 3-, 4- e 2-CA	<i>Pseudomonas acidovorans</i> CA26, CA28, CA37, CA45	Hinteregger; Loidl; Streichsbier (1994)
2-, 3- e 4-CA, 3,4-DCA	<i>Pseudomonas acidovorans</i> cepa BN3.1 <i>Pseudomonas ruhlantii</i> cepa FRB2 <i>Pseudomonas cepacia</i> cepa JH230	Brunsbach; Reineke (1993)
Anilina, 2-, 3- e 4-CA	<i>Acinetobacter baumannii</i> CA2 <i>Pseudomonas putida</i> CA16 <i>Klebsiella</i> sp. CA17	Vangnai; Petchkroh (2007)
2-, 3- e 4-CA, 2,3-, 3,4- e 2,4-DCA	<i>Delftia tsuruhatensis</i> H1	Zhang et al. (2010a)
2,3-, 2,4-, 2,5-, 3,4- e 3,5-DCA	<i>Bacillus megaterium</i> IMT21	Yao et al. (2011)
3,4-DCA, 4-CA	<i>Acinetobacter baylyi</i> cepa GFJ2	Hongsawat; Vangnai (2011)
Anilina, 3-CA	<i>Comamonas testosterone</i> cepa A <i>Delftia acidovorans</i> cepa B <i>Delftia acidovorans</i> cepa C	Shah (2014)
Anilina, 4-CA	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Comamonas testosterone</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Shah (2015)
Anilina, 2-, 3- e 4-CA, 2,3- e 3,4-DCA	<i>Burkholderia</i> <i>Betaproteobacteria</i>	Kraus (2018)

Fonte: A Autora (2022)

## 2.4.2 Clorobenzenos

Os clorobenzenos (CBs) têm sido utilizados industrialmente como solventes, produtos de limpeza de superfícies e matérias-primas para outros compostos, o que os tornou contaminantes comuns das águas subterrâneas e do solo (FUNG et al., 2009). Eles também são usados para produzir pesticidas e corantes (CHAKRABORTY; COATES, 2004) e, portanto, foram amplamente liberados no meio ambiente ao longo dos anos. Sua persistência no ecossistema é, em parte, decorrente da dificuldade de biodisponibilidade que está limitada por sua baixa solubilidade (PIEPER; REINEKE, 2000). São compostos tóxicos e considerados contaminantes prejudiciais à saúde humana e animal.

### 2.4.2.1 Mecanismos de biodegradação aeróbia dos clorobenzenos

A degradação aeróbia dos clorobenzenos tem sido extensivamente estudada. Há vários relatos de que eles podem ser utilizados como única fonte de carbono e energia. Esses compostos podem ser metabolizados a CO<sub>2</sub> por vias bem caracterizadas, sendo dependentes das condições experimentais, microrganismos envolvidos e posição dos átomos de cloro no anel benzeno (HAIGLER; NISHINO; SPAIN, 1988; MARS et al., 1997; PATEL; VYAS, 2015; POTRAWFKE; TIMMIS; WITTICH, 1998; SANDER et al., 1991; SOMMER; GÖRISCH, 1997; SPAIN; NISHINO, 1987; VAN DER MEER JR et al., 1998; VYAS; MURTHY, 2015; YADAV et al., 1995). Bactérias que utilizam CBs como fonte de carbono e energia foram isoladas e vários gêneros foram encontrados (Tabela 3), indicando um alto nível de biodiversidade.

Tabela 3 - Degradação aeróbia de clorobenzenos reportados em literatura

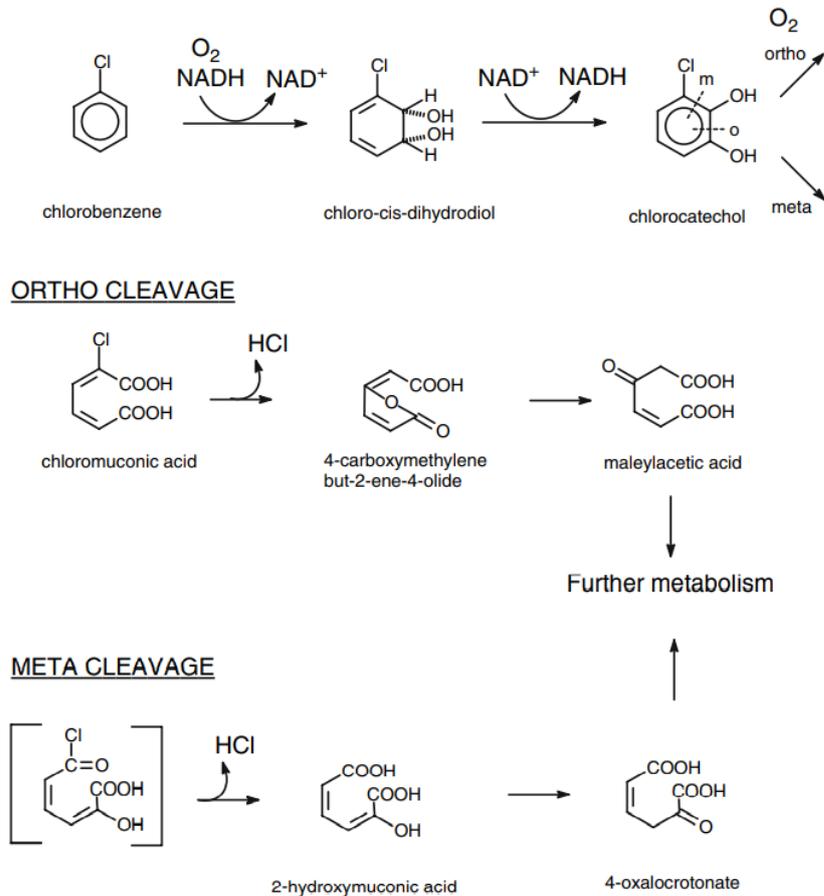
<b>Substrato</b>	<b>Microrganismo reportado</b>	<b>Referência</b>
1,2-DCB	<i>Pseudomonas</i> sp. JS100	Haigler; Nishino; Spain (1988)
1,4-DCB	<i>Pseudomonas</i> sp. JS6	Spain; Nishino (1987)
1,2-, 1,3-DCB	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa JS150	Haigler; Nishino; Spain (1988)
1,4-DCB, CB	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa JS1474, JS1344, JS700, JS701, JS150	Nishino; Spain (1993)

DCBs	<i>Burkholderia sp. cepa</i> PS14	Rapp; Timmis (1999)
MCB	<i>Escherichia hermanni</i>	Kiernicka; Seignez; Peringer (1999)
MCB	<i>Ralstonia sp. cepa</i> JS705	Van Der Meer JR et al. (1998)
MCB, 1,4-DCB	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	Reh fuss and Urban, 2005
MCB	<i>Xanthobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Xanthobacter sp.</i> , <i>Paenibacillus sp.</i> , <i>Kocuria sp.</i> , <i>Stenotrophomonas sp.</i>	Vogt et al. (2004)
MCB	<i>Acidovorax avenae</i>	Monferrán; Echenique; Wunderlin (2005)

Fonte: A Autora (2022)

O ataque degradativo de clorobenzenos é iniciado por uma dioxigenase para produzir intermediários dihidrodiol clorados, que são subsequentemente rearomatizados por dihidrodiol desidrogenase, produzindo clorocatecóis como intermediários (HAIGLER; NISHINO; SPAIN, 1988; MARS et al., 1997; POTRAWFKE; TIMMIS; WITTICH, 1998; SANDER et al., 1991; SPAIN; NISHINO, 1987; VAN DER MEER JR et al., 1998). Os clorocatecóis são subsequentemente oxidados por dois tipos de dioxigenases de clorocatecol, causando ortoclivagem, convertendo catecol 1,2-dioxigenase em ácidos cloromucônicos (HAIGLER; NISHINO; SPAIN, 1988; POTRAWFKE; TIMMIS; WITTICH, 1998; SANDER et al., 1991; SOMMER; GÖRISCH, 1997; SPAIN; NISHINO, 1987) ou por metaclivagem, convertendo catecol 2,3-dioxigenase em ácido 2-hidroxi-6-clorocarbonil mucônico (KLECKA; GIBSON, 1981; MARS et al., 1997; PETTIGREW; HAIGLER; SPAIN, 1991). Os ácidos cloro-mucônico são metabolizados posteriormente em intermediários do ciclo de Krebs, conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Vias de degradação aeróbia de clorobenzenos



Fonte: Field; Sierra-Alvarez (2008)

### 2.4.3 Cloronitrobenzenos

Os cloronitrobenzenos (CNBs) são compostos tóxicos e cancerígenos que são utilizados na produção de corantes, herbicidas, pesticidas e outras substâncias químicas nas últimas décadas (ZHU et al., 2015). Embora esses compostos sejam intencionalmente aplicados ao ambiente para uso agrícola, o manuseio e o armazenamento inadequados desses compostos podem resultar em severa contaminação do solo e das águas subterrâneas (JU; PARALES, 2010).

#### 2.4.3.1 Mecanismos de biodegradação aeróbia de cloronitrobenzenos

Os CNBs são considerados recalcitrantes à degradação microbiana devido a sua natureza química. Em razão da presença de grupos de retirada de elétrons (cloro e nitro), a densidade eletrônica em torno dos anéis aromáticos é muito baixa, tornando os CNBs

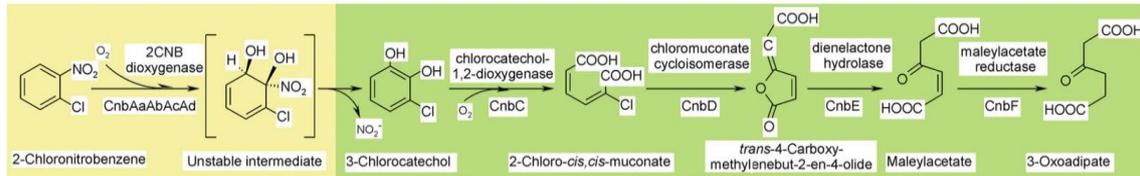
deficientes em elétrons. As oxigenases, que desempenham papel crucial na degradação aeróbia de todos os compostos aromáticos (ARORA et al., 2009), geralmente não conseguem agir sobre esses compostos desestabilizados. A degradação microbiana dos CNBs pode ser iniciada pela remoção oxidativa do grupo nitro, no qual esta reação catalisada por oxigenase (monooxigenase ou dioxigenase) adiciona um ou ambos os átomos de oxigênio molecular ao anel aromático da molécula de CNB. Como resultado, ocorre a remoção do grupo nitro. A degradação adicional do CNB prossegue pela remoção do grupo cloro antes ou depois da clivagem do anel (ARORA; JAIN, 2011; GHOSH et al., 2010).

A degradação microbiana de CNBs é significativamente influenciada pelas posições dos grupos cloro e nitro nos anéis de benzeno. Os compostos, que têm grupos nitro nas posições orto- ou meta-, são considerados mais recalcitrantes em comparação com os compostos que têm grupos nitro nas posições para- (ARORA; SASIKALA; RAMANA, 2012). Por exemplo, o 4-cloro-2 nitrofenol (4C2NP) é mais recalcitrante do que 2-cloro-4-nitrofenol (2C4NP) (TABAK; CHAMBERS; KABLER, 1964).

As bactérias que degradam o 2C4NP não poderiam degradar o 4C2NP devido a mudanças nas posições dos grupos cloro e nitro (PANDEY et al., 2011). A razão é que as enzimas que atuam nas posições para- não conseguem atuar nas posições meta- ou orto- ou vice-versa. A degradação de CNBs com grupos cloro e nitro em diferentes posições é geralmente catalisada por enzimas específicas. O efeito da posição do grupo cloro na natureza recalcitrante do anel benzeno é menor em comparação com a posição do grupo nitro. No entanto, a presença de vários átomos de cloro no anel aromático aumenta significativamente a natureza recalcitrante de um anel de benzeno (TABAK; CHAMBERS; KABLER, 1964).

Poucas bactérias são conhecidas por utilizar o cloronitrobenzeno como sua única fonte de carbono e energia. A via de degradação do 2-CNB foi estudada em *Pseudomonas putida* OCNB-1, que o utilizou como única fonte de carbono e energia (WU et al., 2009a). Liu et al. (2005) relataram que *Pseudomonas stutzeri* ZWLR2-1 usou 2-CNB como sua única fonte de carbono e energia. O ataque inicial por dioxigenase formou 3-clorocatecol com liberação concomitante de nitrito, possivelmente através de um intermediário de nitrohidrodiol, análoga à dioxigenação do nitrobenzeno em *Comamonas* sp. Cepa JS765 (LESSNER et al., 2002; NISHINO; SPAIN, 1995) e dioxigenação de 2-nitrotolueno em *Pseudomonas* sp JS42 (AN; GIBSON; SPAIN, 1994; PARALES et al., 1996). A degradação adicional do 3-clorocatecol procedeu pela via orto-clivagem do anel (ARORA; SASIKALA; RAMANA, 2012; WU et al., 2011).

Figura 4 - Via de degradação de 2-cloronitrobenzeno.



Fonte: Liu et al. (2011).

A via de degradação do 4-CNB foi estudada em *Comamonas sp.* cepa CNB-1 (WU et al., 2006), *Pseudomonas putida* ZWL73 (ZHEN et al., 2006) e *Comamonas sp.* cepa LW1 (KATSIVELA et al., 1999), que utilizaram 4-CNB como única fonte de carbono e energia. Apesar de não haver relatos de culturas puras que degradam 3-CNB, alguns pesquisadores estudaram sua degradação por consórcio de bactérias selecionadas (PARK et al., 1999). Os autores reportam a degradação completa de 3-CNB e 4-CNB por cooperação bioquímica entre *P. putida* HS12 e *Rhodococcus sp.* HS51. Inicialmente, a cepa HS12 converteu CNBs em clorohidroxiacetanilidas por meio do processo de redução e subsequente acetilação. Posteriormente, a cepa HS51 degradou as clorohidroxiacetanilidas por meio da liberação de amônia e cloreto.

Recentemente, Palatucci et al. (2019) utilizaram amostras de solo e água subterrânea provenientes da mesma área contaminada, alvo da presente tese de doutorado, e identificaram bactérias responsáveis pela degradação aeróbia de 2,3 e 3,4-DCNBs. Os enriquecimentos produziram duas cepas de bactérias capazes de degradar 3,4-DCNB (*Diaphorobacter sp.* JS3050 e *Diaphorobacter sp.* JS3052) e uma capaz de degradar 2,3-DCNB (*Diaphorobacter sp.* JS3051). Quando esses DCNBs foram degradados, o nitrito foi liberado como produto final da degradação. Foi a primeira vez que a biodegradação aeróbia de dicloronitrobenzenos foi relatada na literatura.

A Tabela 4 reúne microrganismos responsáveis pela biodegradação aeróbia dos CNBs.

Tabela 4 - Degradação aeróbia de nitroclorobenzenos reportados em literatura

<b>Substrato</b>	<b>Microorganismo reportado</b>	<b>Referência</b>
4-NCB	<i>Pseudomonas putida</i> ZWL73	Xiao et al. (2006)
4-NCB	<i>Comamonas</i> sp. Cepa CNB-1	Wu et al. (2006)
2-NCB	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZWLR	Liu; Wang; Zhou (2005)
2-NCB	<i>Pseudomonas putida</i> OCNB-1	Wu et al. (2009)
3,4-DCNB	<i>Diaphorobacter</i> sp. cepa JS3050 <i>Diaphorobacter</i> sp. cepa JS3052	Palatucci et al. (2019)
2,3-DCNB	<i>Diaphorobacter</i> sp. cepa JS3051	Palatucci et al. (2019)

Fonte: A Autora (2022)

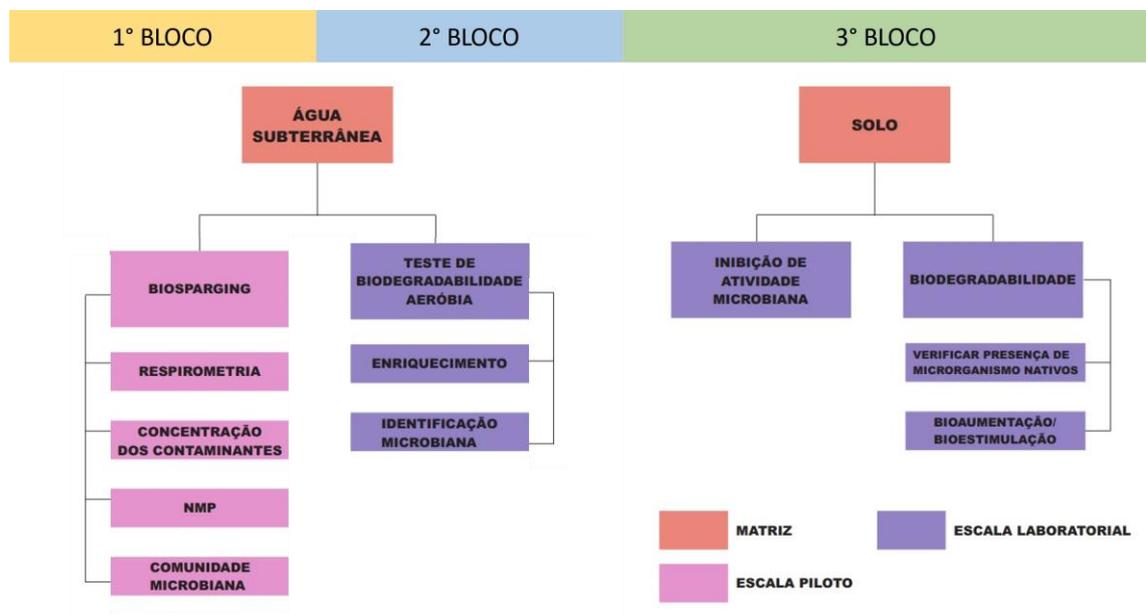
Os contaminantes apontados nesta seção são passíveis de tratamento biológico para atingir concentrações seguras e desejáveis no meio ambiente. Portanto, técnicas de biorremediação podem ser aplicadas em locais contaminados por estes poluentes.

### 3 METODOLOGIA

A presente pesquisa foi desenvolvida para contribuir com a tratabilidade da água subterrânea e solo contaminados por nitro e cloroaromáticos de um setor industrial. O experimento foi dividido em 3 blocos de atividades e envolveu diversas etapas, como apresentado na Figura 5. Avaliamos a mudança da comunidade microbiana e o decaimento da concentração dos contaminantes ao se aplicar a técnica de biorremediação por *biosparging* na área contaminada. Também foi avaliada a capacidade das bactérias nativas em degradar aerobiamente os contaminantes de interesse do *site*. Por fim, foi estudada a biodegradação dos mesmos contaminantes quando presentes no solo, em escala laboratorial.

Trata-se de uma pesquisa colaborativa desenvolvida em parceria com os pesquisadores Jim Spain da University of West Florida, Elizabeth Edwards e Line Lonhein da University of Toronto, Paola Barreto da empresa de consultoria Jacobs e funcionários da empresa proprietária da área em estudo.

Figura 5 - Etapas do experimento



Fonte: A Autora (2022)

#### 3.1 COMPOSTOS QUÍMICOS E MEIO MINERAL

Os compostos químicos utilizados nos experimentos estão especificados na Tabela 5. Todos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

O meio mineral para crescimento dos microrganismos contém 10 mL da solução tampão fosfato (27,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 34,8 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0, em 1L de água ultra-pura), 10 mL de solução de sais (7,0 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 2,0 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 1L de água ultra-pura), 2 mL da solução de minerais (0,3 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,1 g de  $\text{ZnCl}$ , 0,1 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,75 g de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e 0,1 g de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  e 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado em 1L de água ultra-pura) e 2mL da solução de cloreto de magnésio (50,8 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). (Adaptado de Kraus, 2018).

Tabela 5 - Características dos Contaminantes de Interesse - COI. Informações obtidas no *PubChem Compound Database*.

Grupo	COI	Fórmula Química	Peso molecular (g/mol)	CAS #	Pureza	Ponto de ebulição (°C)	Ponto de fusão (°C)	Solubilidade em água (mg/L)/T(°C)
Clorobenzenos	MCB	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl	112,56	108-90-7	99,8	132	-45	500/25
	1,2-DCB	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	147,00	95-50-1	99	180	-17	156/25
Cloronitrobenzenos	2-CNB	ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	157,55	88-73-3	99	246	31-33	590/20
	3-CNB	ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	157,55	121-73-3	99	236	46	390/20
	4-CNB	ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	157,55	100-00-5	99	242	84	243/20
	2,3-DCNB	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	192,00	3209-22-1	99	257	61	62,4/20
	3,4-DCBN	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	192,00	99-54-7	99	261	55	92,1/29
Cloroanilinas	2-CA	ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	127,57	95-51-2	99	209	-2	8165/25
	3-CA	ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	127,57	108-42-9	99	230	-10	5400/20
	4-CA	ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	127,57	106-47-8	99	232	72	3900/25
	2,3-DCA	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N	162,02	608-27-5	99	252	24	-
	3,4-DCA	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N	162,02	95-76-1	98	272	72	-
Nitrocu meno	4-NC	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165,19	1817-47-6	99	121	100	-

Fonte: A Autora (2022)

### 3.2 TESTE PILOTO *BIOSPARGING*

Para distribuir adequadamente o ar no aquífero para que este atinja a zona de influência de projeto, bem como para monitorar o desempenho do sistema, o layout mostrado na Figura 6 foi proposto por uma empresa de consultoria. Um corte A-A' é apresentado na Figura 7.

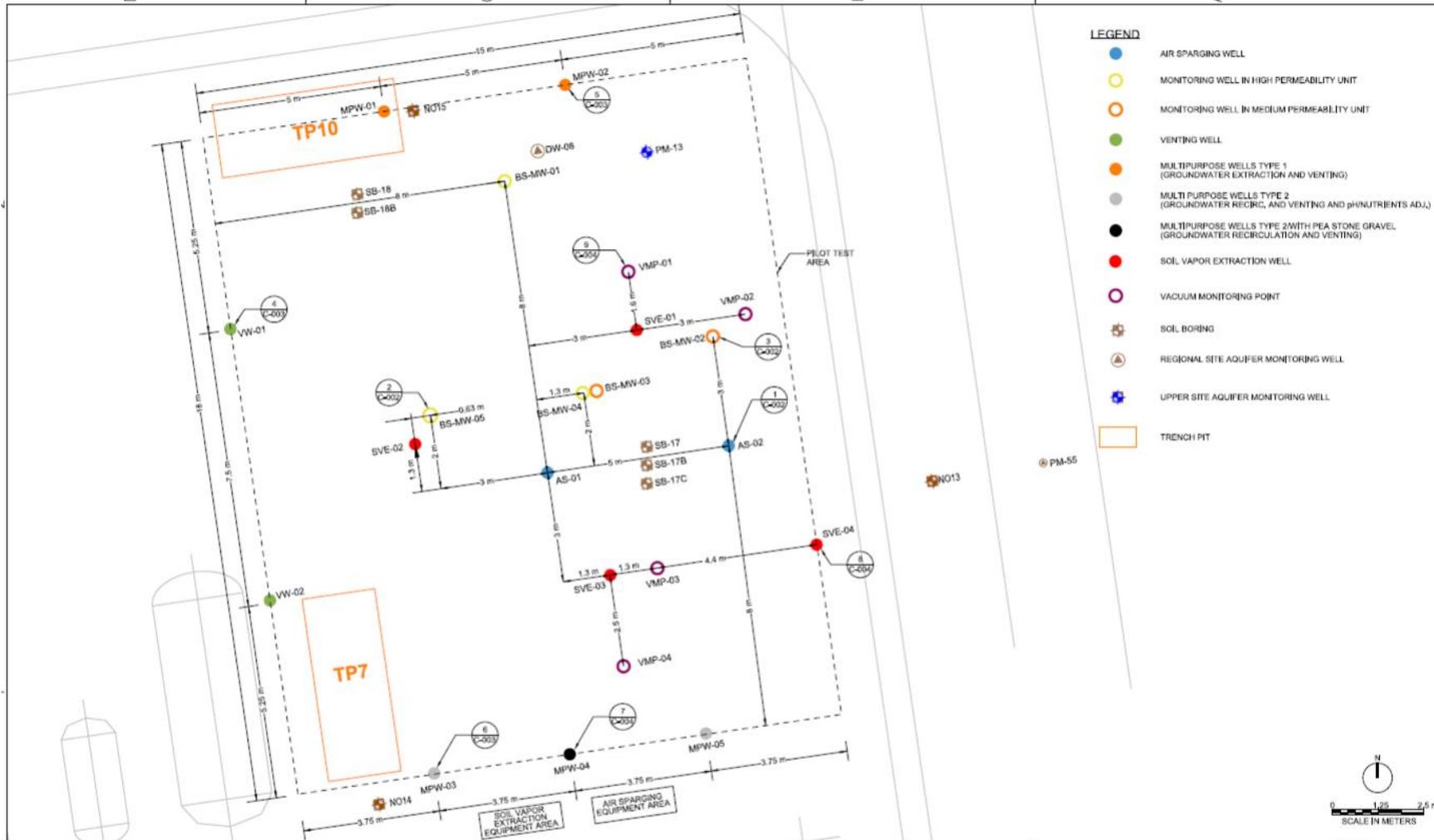
As concentrações iniciais de COIs foram medidas para estabelecer uma linha de base para estimar a taxa de remoção dos contaminantes. Duas rodadas de amostragem de água subterrânea para linha de base foram realizadas, incluindo uma amostragem adicional em PM-13 imediatamente antes de iniciar a aeração. A duração do teste foi de 12 meses, conforme cronograma apresentado na Tabela 6. A amostragem foi realizada para análise de compostos orgânicos voláteis (*Volatile Organic compound* - VOCs), compostos orgânicos semivoláteis (*Semivolatile Organic Compound* - SVOCs), parâmetros de biodegradação e amostras de DNA (Tabela 7). Os poços de monitoramento são PM-13 e BS-MW-01 a BS-MW-05. Uma fotografia do sistema é mostrada na Figura 8. BS-MW-02 e BS-MW-03 são poços mais profundos e localizam-se em uma camada de baixa permeabilidade, os demais, estão localizados em região mais permeável.

Tabela 6 - Cronograma de amostragem do *biosparging*

Campanha	Evento de amostragem	Data de amostragem
1	Baseline	15/01/20
2	Baseline	27/02/20
2	Baseline (PM-13)	28/05/20
3	Performance 1(mês 1)	30/06/20
4	Performance 2 (mês 2)	03/08/20
5	Performance 3 (mês 3)	03/09/20
6	Performance 4 (mês 6)	03/12/20
7	Performance 5 (mês 9)	04/04/21
8	Performance 6 (mês 12)	07/06/21

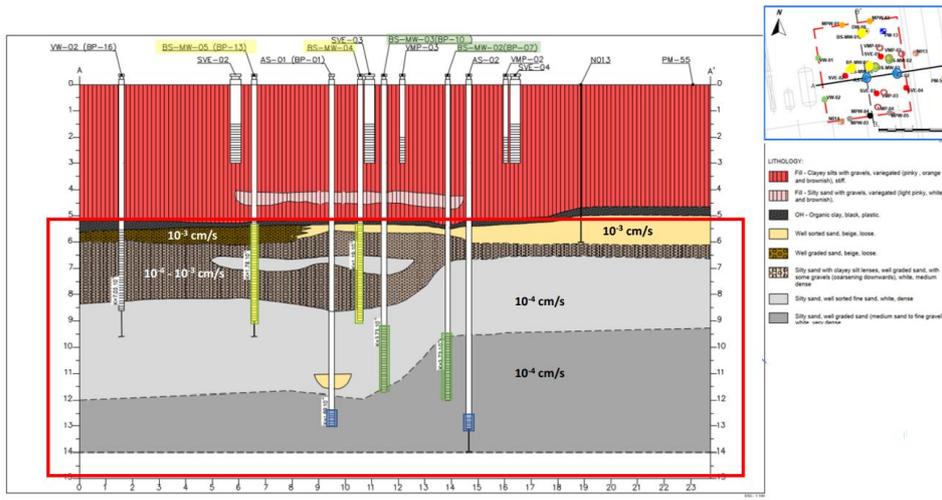
Fonte: A Autora (2022)

Figura 6 - Projeto piloto do *biosparging* cedido pela empresa de consultoria



Fonte: Empresa de consultoria (2022)

Figura 7 - Corte A-A' da planta do biosparging.



Fonte: Empresa de consultoria (2022)

Tabela 7 - Parâmetros de monitoramento do biosparging

Parâmetros	Frequência
Concentração na água subterrânea de VOCs/SVOCs	Mensalmente (mês 1-3)
	Trimestralmente (mês 4-12)
DNA	Mensalmente (mês 1-3)
	Trimestralmente (mês 4-12)
NMP	Mensalmente (mês 1-3)
	Trimestralmente (mês 4-12)
Teste de respirometria	Baseline

Fonte: A Autora (2022)

Figura 8 - Fotografia do Sistema de Biosparging



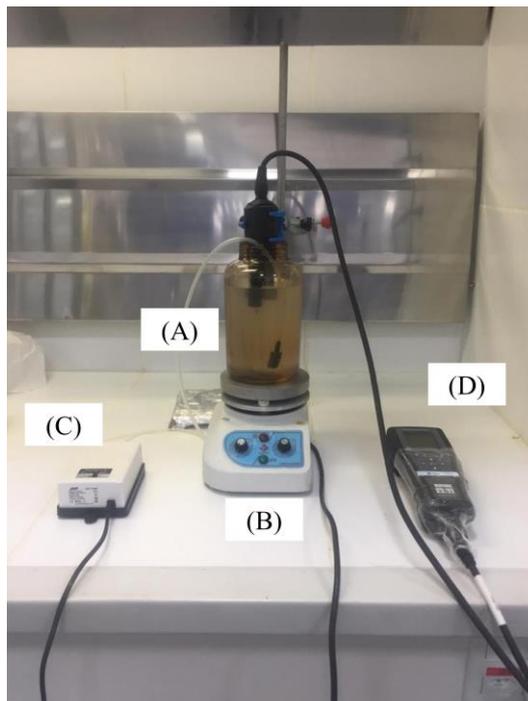
Fonte: A Autora (2022)

### 3.2.1 Respirometria

O teste de respirometria foi realizado com o objetivo de avaliar se havia nas amostras de água subterrânea coletadas outros compostos orgânicos que competissem com os COIs pelo oxigênio disponível. Desta forma, se pretendia contribuir para o dimensionamento do sistema de aeração por *Biosparging*.

O respirômetro (Figura 9) consistiu em um reator com volume total de 500 mL, no qual 250 mL de água subterrânea contaminada foi adicionada, agitada com auxílio de barra e agitador magnético. A amostra foi aerada continuamente por meio de compressores de ar de baixa vazão. Após atingir a saturação (Oxigênio dissolvido - OD  $\sim 8 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a aeração foi interrompida e a concentração de OD foi registrada a cada 1 minuto com a sonda multiparâmetro YSI® Professional Plus (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH 45387 USA). A concentração dos contaminantes foi determinada por HPLC. O metabolismo dos microrganismos foi avaliado em quatro condições distintas, com adição de inóculo, adição de contaminantes (spike) ou ambos, conforme Tabela 8.

Figura 9 - Fotografia da realização do teste de respirometria. O aparato experimento era constituído por reator (A), agitador magnético (B), compressor de ar (C) e sonda multiparâmetro (D).



Fonte: A Autora (2022)

Tabela 8 - Condições experimentais para o teste de respirometria

	<b>Cultura mista (10 mL)</b>	<b>Spike (100µM – mCB, 1,2-DCB, 2-CA, 2,3-DCA, and 3,4-DCA)</b>
Condição 1	não adicionada	não realizado
Condição 2	não adicionada	realizado
Condição 3	adicionada	não realizado
Condição 4	adicionada	realizado

Fonte: A Autora (2022)

### 3.2.2 VOCs/SVOCs

VOC e SVOC foram quantificados por um laboratório local. A análise foi feita usando cromatografia gasosa (GC) Agilent 7890, equipado com coluna HP-5 (0,20 mm x 50 m) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e detector por ionização de chama (FID). A temperatura do injetor foi de 200 °C, o gás de arraste durante a execução foi o hidrogênio. O detector operou a 300 °C, com fluxo de H<sub>2</sub> a 30 mL/min, fluxo de ar sintético de 300 mL/min, N<sub>2</sub> de 30 mL/min e fluxo total de 17 mL/min.

Para os VOCs, o forno foi programado da seguinte forma: 35 °C por 6 min, rampa 2 °C/min a 55 °C por 16 min, rampa 5 °C/min a 114 °C por 37,75 min. O tempo total de execução é de 43,6 min por vial de amostra. Para SVOCs, o forno foi programado da seguinte forma: 60 °C, rampa de 5 °C/min a 180 °C por 24 min, rampa de 20 °C/min a 290 °C por 39,5 min. O tempo total de execução foi de 43,6 min por vial de amostra.

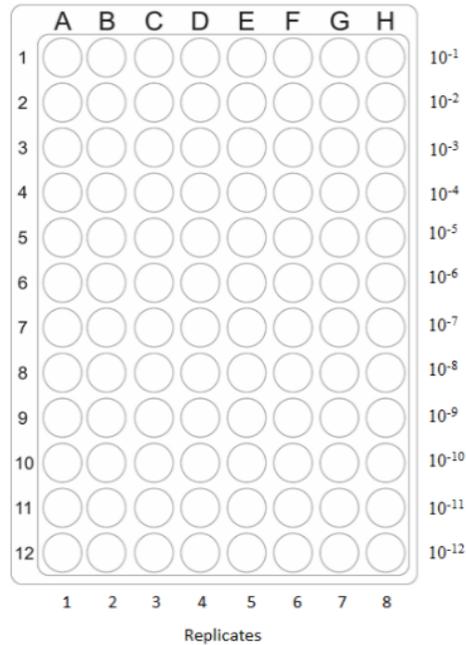
### 3.2.3 Densidade microbiana

A contagem de microrganismos específicos por contaminante na região de aplicação do *biosparging* foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP) por meio de microplacas de 96 poços com fundo U. Os contaminantes escolhidos foram MCB, 1,2-DCB, 2-CA, 2,3-DCA e 3,4-DCA por serem encontrados em maior concentração no local estudado. O inóculo é água subterrânea proveniente dos 6 poços de monitoramento do *biosparging* (PM-13 e BS-MW-01 a BS-MW-05 – Figura 6), totalizando 30 microplacas por campanha.

Em cada poço da microplaca era adicionado 200 µM do contaminante individualmente e 180 µL de meio mineral. Na primeira linha da microplaca foi adicionado 20 µL de inóculo,

onde foi homogeneizado e transferido 20  $\mu\text{L}$  para a linha seguinte e assim sucessivamente. O resultado são 12 diluições com 8 replicatas (Figura 10). As microplacas foram incubadas por 15 dias a 30 °C. Então, por inspeção visual, o número de poços positivos para crescimento de microrganismos foi obtido. O NMP foi calculado de acordo com Jarvis et al. (2010).

Figura 10 - Microplacas de 96 poços para teste de NMP

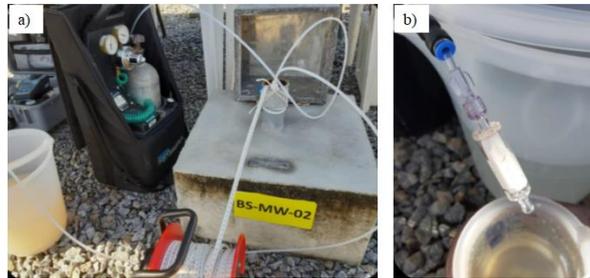


Fonte: A Autora (2022)

### 3.2.4 DNA

Volume entre 250-1000 mL das amostras de água subterrânea dos 6 poços de monitoramento do *biosparging* foi bombeado e filtrado através de um filtro Sterivex™ 0,2  $\mu\text{m}$  (Figura 11). O filtro foi vedado com parafilm, embalado em saco Zip Lock e mantido em freezer a -20 °C para extração do DNA. A membrana foi cortada e, então, o DNA foi extraído usando um kit da PowerSoil® DNA (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram enviadas para um laboratório externo para sequenciamento.

Figura 11 - Fotografia dos sistemas utilizados para coleta de amostras para extração de DNA:  
 (a) Bomba peristáltica para amostragem do *biosparging*. (b) Filtro Sterivex™



Fonte: A Autora (2022)

O DNA passou por análise de qualidade através da quantificação por fluorescência através do equipamento Qubit® 3.0 Fluorometer e kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific). As reações de PCR foram feitas tendo como volume final de 20  $\mu$ L, contendo 10  $\mu$ L de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3 $\mu$ L de cada oligonucleotideo forward a 10 $\mu$ M e 0,3 $\mu$ L de cada oligonucleotideo reverse a 10 $\mu$ M, 2 $\mu$ L de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para completar 20 $\mu$ L.

Para a amplificação foram utilizados primers para região V6-V8. O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 26 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 52°C por 30 seg., extensão a 72°C por 30 seg. e uma extensão final a 72°C por 7 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após reação de amplificação de cada amostra pode ser comprovada através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v). Tamanho do amplicon ~600bp. As PCRs foram submetidas as etapas de purificação utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de primers.

Para reação de indexação foram inseridos os indexadores nos adaptadores comuns, que são necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de amplificação consiste de: incubação à 72°C por 3 minutos, desnaturação inicial à 95°C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). As bibliotecas geradas foram submetidas as etapas de purificação utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos do total de

moléculas e restos de primers. Após isso, foi realizada a quantificação pela metodologia de PCR Tempo Real utilizando Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), todos de acordo com protocolo do fabricante. Gerou-se um Pool equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 3nM para realização do sequenciamento 16 S rRNA, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent V6 600 ciclos – leitura de 2 x 300pb.

### 3.3 BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE COMPOSTOS NITRO E CLOROAROMÁTICOS POR MICRORGANISMOS NATIVOS DE SITE CONTAMINADO

Este item apresenta a metodologia dos experimentos envolvidos com a biodegradação aeróbia.

#### 3.3.1 Biodegradação aeróbia

Amostras de água subterrânea, contaminadas por compostos cloronitroaromáticos foram coletadas na área de estudo e usadas como inóculo para testes de biodegradabilidade aeróbia. Os ensaios foram realizados em garrafas Boston de 250 mL (microcosmos, Figura 12), contendo o contaminante específico, 50 mL de água subterrânea contaminada e 50 mL de meio mineral. As garrafas foram fechadas com tampa Mininert® e mantidas em temperatura ambiente de  $27 \pm 4$  °C. O MCB, 1,2-DCB, 2-CA, 3-CA, 4-CA, 2,3-DCA, 3,4-DCA, 2-CNB, 3-CNB, 4-CNB, 2,3-DCNB, 3,4-DCNB e 4-NC foram adicionados individualmente aos microcosmos em uma concentração de 100  $\mu$ M. Para controle abiótico, microcosmos nas mesmas condições, mas com água estéril ao invés do inóculo, foram preparados. Para isso, o material foi esterilizado em autoclave por 30 minutos a 127 °C e 1,5 kgf/cm<sup>2</sup>.

Figura 12 - Fotografia dos microcosmos



Fonte: A Autora (2022)

#### 3.3.2 Culturas de enriquecimento

Uma vez que os contaminantes foram consumidos, transferiu-se 10% do volume do licor misto do microcosmo para um novo microcosmo contendo meio fresco (diluição de 1:10). A composição do meio e as condições de incubação foram as mesmas dos ensaios de biodegradação descritos anteriormente. A concentração dos contaminantes variou de 200 a 400  $\mu\text{M}$ , a depender do contaminante. Após várias transferências, foram retiradas amostras para extração de DNA.

### 3.3.3 Análises da comunidade microbiana

Amostras dos microcosmos foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 min, o *pellet* formado foi submetido a extração de DNA e sequenciamento conforme descrito no item 3.2.4.

### 3.3.4 Cinética de degradação e crescimento microbiano

As culturas de enriquecimento do 3-CNB, 2,3-DCA, 3,4-DCA, 2,3-DCNB e 3,4-DCNB foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 min, o *pellet* resultante da cetrifusão foi adicionado em garrafas Boston de 1L contendo 200  $\mu\text{M}$  para cloronitrobenzenos e 350  $\mu\text{M}$  para cloroanilinas e 400 mL de meio mineral estéril. As garrafas foram regularmente amostradas para determinação das concentrações dos contaminantes, liberação de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  e densidade celular ( $\text{OD}_{600}$ ). O crescimento microbiano foi monitorado espectrofotometricamente medindo a turbidez da cultura a 600nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os controles estéreis foram preparados por autoclavagem.

### 3.3.5 Métodos analíticos

A concentração dos contaminantes foi monitorada por um cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) Agilent 1100 Series (Waldbronn, Germany), acoplado a um detector UV/VIS, equipado com uma coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 (3,5 $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 nm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA), exposta a  $\text{H}_2\text{O}$ /metanol (40/60% v/v), fase móvel em execução isocrática (1,0 mL/min) a 40 °C. O volume de injeção era 5 $\mu\text{L}$ . Todas as amostras eram retiradas dos microcosmos com seringa de vidro, diluída 1:1 com acetonitrila (grau gradiente, adquirido pela Merck).

O nitrito foi medido em 5mL de amostra utilizando o kit NitriVer® 2 Nitrite Reagent Powder Pillow, método 8153 (Hach Company, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

### 3.4 TESTES DE BIODEGRADABILIDADE EM SOLO

Todos os testes realizados com solo estão discriminados nesta seção.

#### 3.4.1 Teste de inibição de atividade dos microrganismos

Amostras de solo foram coletadas (Figura 13) para serem utilizadas como inóculo em microcosmos de 250 mL. Foi adicionado 100 mL de meio mineral e 20 gramas de uma mistura dos solos em diferentes diluições, conforme apresentado na Tabela 9. Três condições diferentes foram testadas, mais controle abiótico. A inativação dos microrganismos no controle abiótico se deu por esterilização do solo em autoclave por 30 minutos a 127 °C e 1,5 kgf/cm<sup>2</sup>, por dois dias consecutivos. Os ensaios foram realizados em triplicata. O monitoramento da concentração dos contaminantes foi realizado por HPLC, utilizando metodologia descrita no item 3.3.5.

Figura 13 - Escavação para coleta de amostra de solo



Fonte: A Autora (2022)

Tabela 9 - Condições aplicadas no teste de inibição de atividade microbiana em solo

Diluição 1:1 (D1)	Diluição 1:5 (D2)	Diluição 1:20 (D3)	Controle abiótico
20g de solo contaminado	4g de solo contaminado + 16g de solo sem contaminação	1g de solo contaminado + 19g de solo sem contaminação	20g de solo autoclavado contaminado

Fonte: A Autora (2022)

#### 3.4.2 Cultura mista

Uma cultura mista foi desenvolvida a partir das culturas individuais obtidas no item 3.3.2. Em um microcosmo com volume total de 250 mL foi adicionado 10 mL das culturas de enriquecimento do 3 e 4-CA, 2,3 e 3,4-DCA, 2,3 e 3,4-DCNB e 1,2DCB, 30 mL de meio mineral e 100  $\mu\text{M}$  de cada contaminante, exceto dos isômeros do DCNB, cuja concentração foi de 80  $\mu\text{M}$ . O monitoramento da concentração dos contaminantes também foi realizado por HPLC (item 3.3.5). Após a degradação de todos os contaminantes, uma transferência 1:10 foi realizada.

### 3.4.3 Biodegradação de contaminantes em solo

Os testes foram realizados em quatro estágios, descritos a seguir. Amostras de solo contaminado foram coletados de locais diferentes do site, indicados como S1, S2 e S3 (Figura 14). A concentração dos contaminantes foi determinada por cromatografia gasosa, conforme descrito no item 3.2.2. O solo coletado em S2 continha maior teor de compostos orgânicos totais (460 mg/kg) do que o coletado em S1 (180 mg/kg) e S3 (35 mg/kg). Solo destas três localidades foram misturados nestes experimentos para garantir a concentração total de contaminantes desejada no início dos testes. O valor medido para o total de contaminantes é a soma dos valores obtidos para 2-CNB, 2,3-DCA, 3,4-DCNB, BEHP e 2,5-DCA.

Figura 14 - Escavação para coleta de solo e pontos amostrados



Fonte: A Autora (2022)

#### 3.4.3.1 Estágio 1

Após a caracterização das amostras de solo, experimentos foram montados para avaliar a eficácia da biodegradação. Os testes foram conduzidos em recipientes de vidro, de aproximadamente 1,8 L de volume total, denominados de mesocosmos, onde foram testadas três condições diferentes:

- Tratamento 1 – sem ajustes - (T1): nenhum ajuste foi aplicado, com intuito de medir a taxa na qual as bactérias existentes no solo podem degradar os constituintes sob condições aeróbias.
- Tratamento 2 – ajuste de pH/umidade/inoculação - (T2): quando necessário, o pH e a umidade foram ajustados para 6,5-7,5 e 15-30%, respectivamente. Após três semanas de monitoramento, 20 mL da cultura mista, descrita no item 3.4.2, foi adicionada. O pH foi ajustado com solução de fosfato dipotássico (50mM) e a umidade, com água destilada.
- Tratamento 3 – controle estéril - (T3): mediu-se a taxa de degradação devido a processos abióticos (incluindo volatilização). O solo foi esterilizado, via autoclave, por dois dias consecutivos por 30 minutos, a 127 °C e 1,5 kgf/cm<sup>2</sup>.

Em recipiente estéril foi adicionado 0,4 kg de solo de S1 diluído por mistura com 2,6 kg de solo de S3 (Figura 14). Após homogeneização manual, 800g da mistura de solo foi transferida para cada mesocosmo (Figura 15). Amostras de solo de cada tratamento foram coletadas para análise de linha de base (T1 = 70 mg/kg, T2 = 60 mg/kg e T3 = 50 mg/kg). O monitoramento dos contaminantes foi realizado por cromatografia gasosa duas vezes por semana.

Figura 15 - Mesocosmos para teste de biorremediação de solo.



Fonte: A Autora (2022)

### 3.4.3.2 Estágio 2

A partir de T2 (Figura 15), novas condições experimentais foram testadas (Tabela 10 – Condições experimentais testadas no Estágio 2 do teste de solo (Tabela 10) para avaliar a capacidade da cultura mista, cultivada em meio líquido, de funcionar como inóculo de solo e também para avaliar se a concentração dos COIs aplicada em T2 estava inibindo a atividade dos microrganismos do solo. Os ensaios foram realizados em microcosmos sacrifício de 40 mL, contendo 20g de solo. O primeiro microcosmo foi analisado após 4 dias e o segundo, após 8 dias. Em todos os tratamentos a umidade foi mantida entre 15-30%.

Tabela 10 – Condições experimentais testadas no Estágio 2 do teste de solo

<b>Tratamento 2A</b>	<b>Tratamento 2B</b>	<b>Tratamento 2C</b>	<b>Tratamento 2D</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajuste de umidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adição de 2 mL de meio mineral com pH 6,8.</li> <li>• Ajuste do pH do solo para 7, quando necessário.</li> <li>• Reinoculação com 2 mL da cultura mista</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diluição do solo na proporção 1:5 (20% solo do tratamento 2, 80% de solo sem contaminação).</li> <li>• Reinoculação com 2 mL da cultura mista.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Em solo sem contaminação foi feito um spike com uma mistura de contaminantes similar a concentração do solo no início de tratamento 2</li> <li>• Inoculação com 2 mL da cultura mista</li> </ul>

Fonte: A Autora (2022)

#### 3.4.3.3 Estágio 3

Nesta etapa adicionou-se 100 g de solo tratado (50 g T1 + 50 g T2) no solo estéril do Tratamento 3 (T3). O objetivo era verificar se um solo tratado poderia funcionar como inóculo para remediar um solo contaminado. Ainda com esse objetivo, um mesocosmo adicional foi montado, nominado Tratamento 4 (T4), adicionando outros 100 g de solo tratado (50 g T1 + 50 g T2) em 700 g de solo contaminado com concentração total de orgânicos em torno de 90 mg/kg.

#### 3.4.3.4 Estágio 4

Neste estágio a intenção era avaliar se a cultura mista em meio líquido funcionaria como inóculo de solo também em mesocosmos. Para isto, 800 g de solo contaminado (concentração similar a T4) foi inoculado com o pellet resultante da centrifugação de 100 mL da cultura mista, configurando o Tratamento 5 (T5). Um outro mesocosmo, nominado Tratamento 6 (T6), foi montado adicionando-se 800 g de solo contaminado, mas com concentração de orgânicos mais alta (160 mg/kg), aproximadamente duas vezes a concentração de T5, inoculado com o pellet resultante da centrifugação de 100 mL da cultura mista.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados das pesquisas realizadas durante o desenvolvimento desse trabalho.

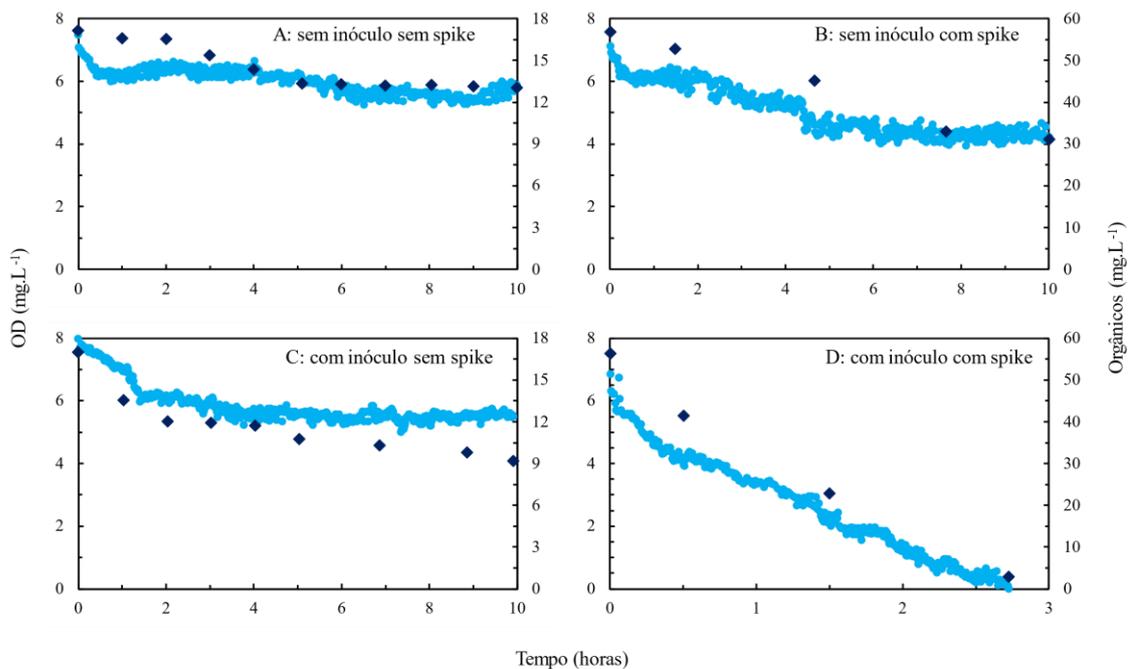
### 4.1 TESTE PILOTO *BIOSPARGING*

Os resultados dos testes relacionados ao *biosparging* estão descritos nesta seção.

#### 4.1.1 Respirometria

Para determinar se existiam minerais dissolvidos ou compostos orgânicos não identificados, mas que também demandassem oxigênio, na área de aplicação do *biosparging*, as amostras de água subterrânea do PM13 foram submetidas a testes de respirometria. A amostra fresca foi aerada até a saturação. Após o desligamento do equipamento, houve uma pequena queda nas concentrações de oxigênio dissolvido e dos contaminantes (Figura 16, painel A).

Figura 16 - Resultados dos testes de respirometria nas condições avaliadas.



Fonte: A Autora (2022)

A baixa concentração total de contaminantes ( $\sim 17 \text{ mg.L}^{-1}$ ) na água subterrânea fez com que se acreditasse que os microrganismos não foram estimulados a degradá-los. Então, fez-se um spike na amostra com uma mistura de contaminantes (Figura 16, painel B), resultando em um aumento no consumo de OD, uma vez que a adição de fonte de carbono aumenta a taxa de respiração dos microrganismos. Após 5h do teste, não houve mais decaimento na concentração do OD e dos contaminantes. Suspeitou-se que não existiam microrganismos suficientes na água subterrânea coletada para promover a degradação dos contaminantes. Uma terceira condição foi testada, adicionando inóculo a água subterrânea coletada inicialmente (Figura 16, painel C). Uma queda maior na concentração de OD foi observada, quando comparada a condição A e uma diminuição de 50% na concentração dos contaminantes em 10h. Com isso, constatou-se baixa quantidade carbono disponível. Por fim, na última condição testada adicionou-se uma mistura de contaminantes e inóculo (Figura 16, painel D). Em menos de 3h houve consumo total dos contaminantes e do oxigênio dissolvido. Portanto, há evidências de que não existem outras substâncias na água subterrânea que geram demanda adicional de oxigênio para ser considerada no projeto de aeração do *biosparging*.

#### 4.1.2 VOCs/SVOCs

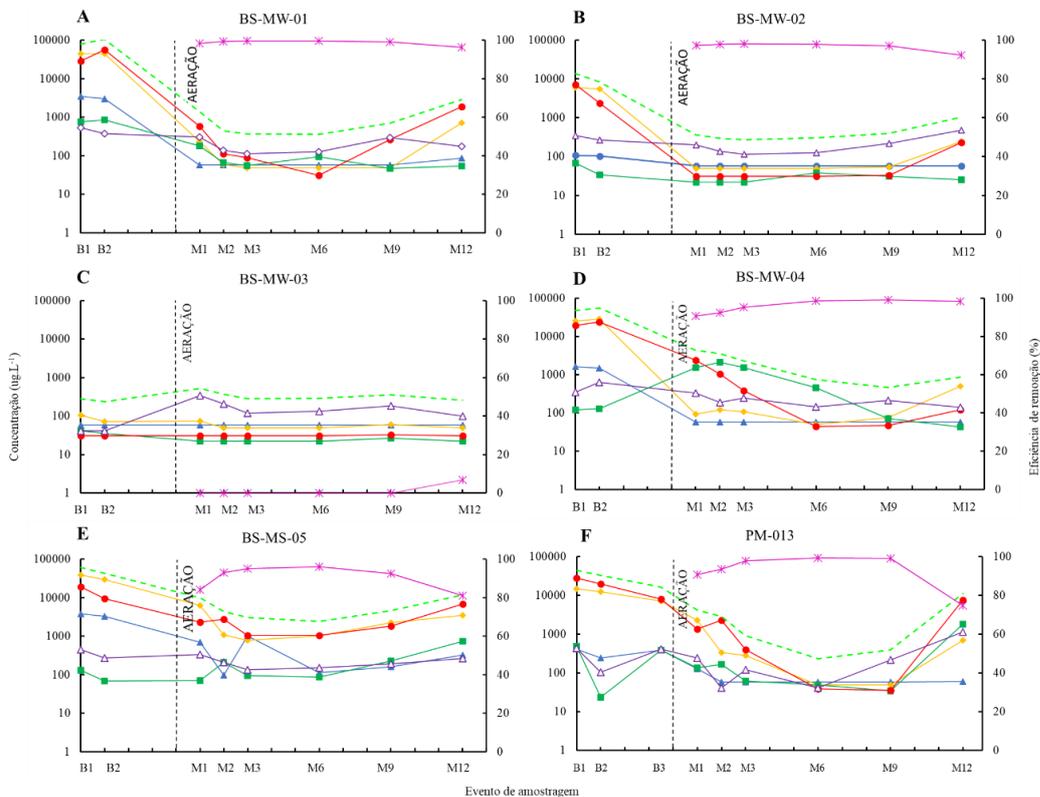
Duas campanhas de amostragens de água subterrânea em todos os poços de monitoramento foram realizadas para linha de base antes do início da operação do sistema. A aeração seria ligada em seguida, porém, devido a pandemia do coronavírus, o início da operação foi adiado em 3 meses. Após a retomada das atividades, um novo evento de amostragem de linha de base foi realizado apenas no poço PM-13, tendo constatado que o comportamento era semelhante a campanha feita antes da pandemia. Em seguida, o sistema de aeração foi ligado. Durante o primeiro mês, as injeções de ar funcionaram em modo pulsado, 9 horas por dia, 5 dias por semana. A partir do segundo mês, o sistema foi operado 24 horas por dia, 7 dias por semana. A estratégia de aeração de águas subterrâneas estimula as bactérias nativas a degradar o poluente orgânico presente.

Os resultados obtidos, por grupo de contaminantes, estão apresentados na Figura 17. Os dados mostram claramente que o *biosparging* resultou em redução importante na concentração dos poluentes orgânicos. Desde o primeiro mês após a aeração, 90% da contaminação foi removida em todos os poços monitorados, chegando atingir 99% até o final da operação, exceto em BS-MW-03 (Figura 17, painel C), que teve eficiência de remoção de apenas 7%. Isto provavelmente foi ocasionado por uma limitação de substrato, já que era o poço com a menor

concentração de contaminantes, com média de  $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ , então os microrganismos não foram estimulados. Alta eficiência de remoção de poluentes orgânicos a partir da aplicação do sistema de *biosparging* também foi encontrada por (KAO et al., 2008; MACHACKOVA et al., 2012; SPERRY; STANLEY; KAY, 2001). Os autores utilizaram a técnica para biorremediação de local contaminado por hidrocarbonetos de petróleo.

Apesar dos bons resultados obtidos neste trabalho, a concentração de alguns contaminantes ainda não se enquadra nos padrões estabelecidos pela legislação brasileira que dispõe sobre os valores da presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas (Conama n° 420, 2009). Mesmo assim, os resultados indicam que o sistema de *biosparging* é promissor para acelerar o processo de biorremediação do local contaminado.

Figura 17 - Concentração de BTEX ( $\blacktriangle$ ), Cloroanilinas ( $\bullet$ ), Clorobenzenos ( $\blacklozenge$ ), Nitroclorobenzenos ( $\blacksquare$ ) e outros ( $\blacktriangle$ ) ao longo do tempo de operação do *biosparging*, nos poços de monitoramento (A) BS-MW-01, (B) BS-MW-02, (C) BS-MW-03, (D) BS-MW-04, (E) BS-MW-05 e (F) PM-013. A linha pontilhada (---) representa o somatório dos contaminantes e ( $*$ ) eficiência de remoção do somatório dos contaminantes.

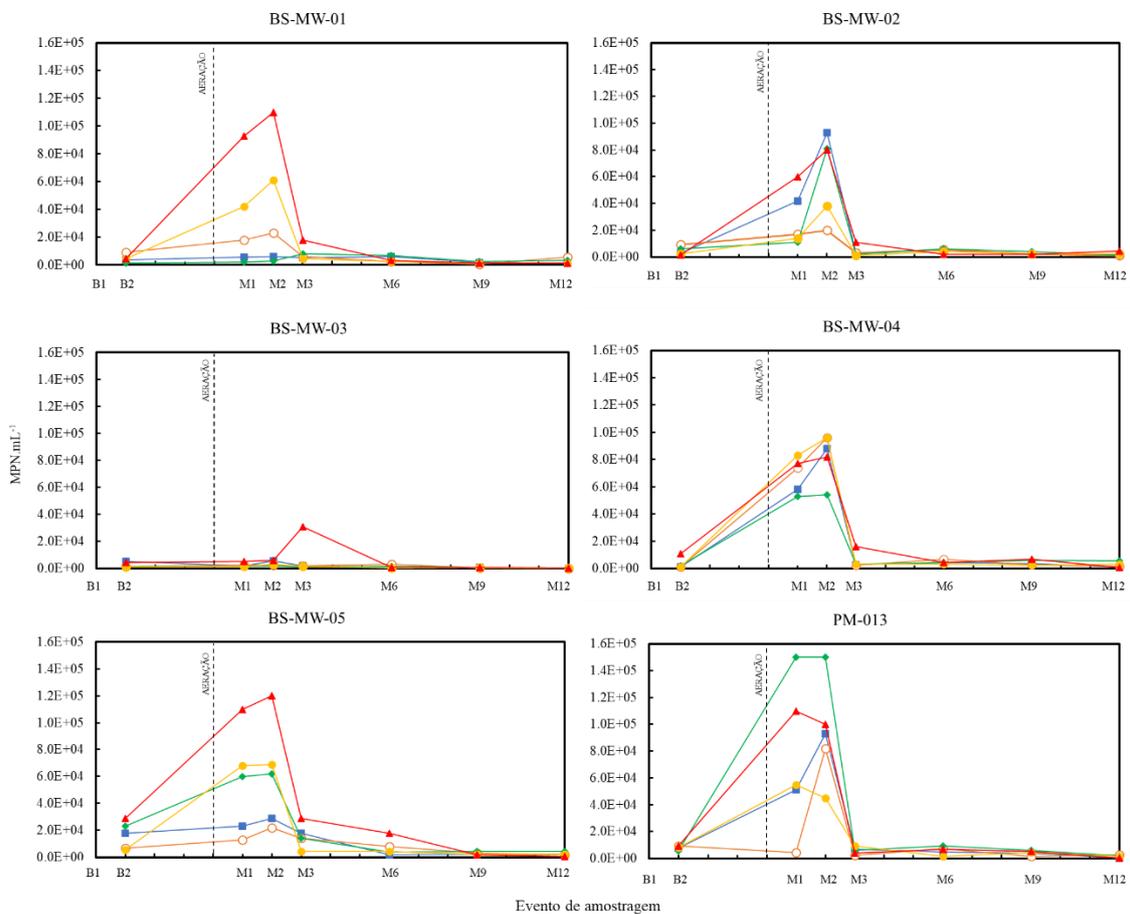


Fonte: A Autora (2022)

### 4.1.3 Número Mais Provável (NMP)

O desenvolvimento da microbiota no sistema *biosparging* foi avaliado pela estimativa do Número Mais Provável (NMP) das populações degradadoras. Essa técnica permite estimar a densidade dos grupos microbianos, sem a necessidade de contagem direta (ALEXANDER; CLARK, 1982). As taxas de crescimento estão apresentadas na Figura 18.

Figura 18 - - Número Mais Provável de microrganismos que degradam mCB (●), 1,2-DCB (○), 2-CA (●), 2,3-DCA (●), 3,4-DCA (●).



Fonte: A Autora (2022)

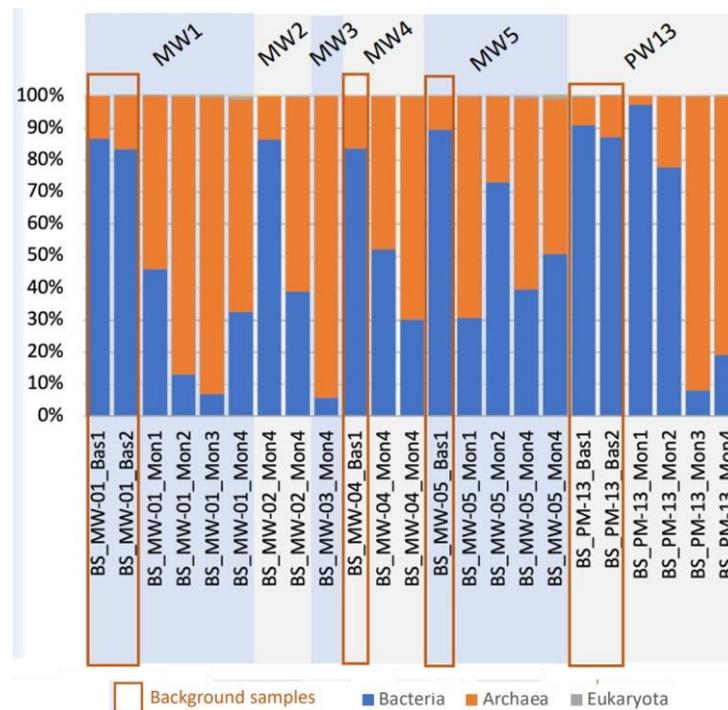
O aumento da população para todos os microrganismos durante os dois primeiros meses de aplicação do sistema *biosparging*, passando de  $10^3$  para  $10^6$   $\text{NMP.mL}^{-1}$ , nos permite afirmar que a adição de oxigênio estimulou o crescimento dos microrganismos nativos do site. A presença de uma alta população de microrganismos não indica necessariamente uma correlação direta com a eficiência de biodegradação. Porém, quantificar a fração da comunidade que degrada o contaminante utilizado no ensaio tem sido utilizado como um dos métodos mais

comuns de monitoramento da evolução do processo (GUO et al., 2012). Quando a concentração dos contaminantes nos poços avaliados decaiu, a estimativa do NMP diminuiu drasticamente, visto que não existia mais fonte de carbono disponível para consumo pelos microrganismos.

#### 4.1.4 Mudança na comunidade microbiana após aplicação do biosparging

Para verificar a mudança da comunidade microbiana no ambiente devido ao processo de *biosparging*, as amostras foram analisadas pelo sequenciamento do amplicon 16S rRNA da região de sequenciamento V6-V8. A análise de bioinformática foi conduzida por Line Lonhein, pesquisadora parceira da University of Toronto. A classificação taxonômica a nível de reino de algumas amostras está apresentada na Figura 19. Percebe-se uma mudança na abundância relativa (AR) entre as amostras de linha de base e as amostras após início da aeração, onde a AR das bactérias diminuiu e a das arqueas aumentou.

Figura 19 - Perfil taxonômico no nível de reino da comunidade microbiana nas amostras do *biosparging*.

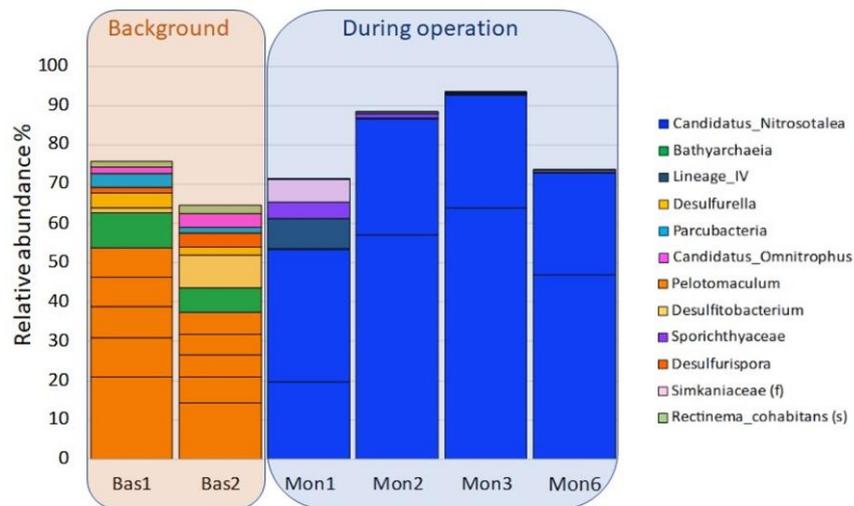


Fonte: A Autora (2022)

Até o momento, poucas amostras puderam ser processadas, então está apresentado na Figura 20 apenas o perfil taxonômico no nível de gênero das amostras do poço BS-MW-01.

Nela, há um comparativo entre as duas amostras de baseline (Bas 1 e Bas 2) com amostras dos meses 1, 2, 3 e 6 após a aplicação do *biosparging*.

Figura 20 - Perfil taxonômico no nível de gênero da comunidade microbiana das amostras do poço BS-MW-01



Fonte: A Autora (2022)

As amostras do background eram dominadas por bactérias e arqueas anaeróbias. *Pelotomaculum*, *Bathyarchaeia* e *Desulfitobacterium*, eram os microrganismos mais abundantes. *Parcubactérias*, *Desulfurispora* e *Desulfurella* estavam presentes em menor grau. *Pelotomaculum*, gênero de maior AR em Bas1 (52%) e Bas2 (38%), é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia estrita, ativa em condições mesofílicas/termofílicas da família *Peptococcaceae* (RAINEY, 2015). Este gênero é descrito como tendo potencial para degradar isômeros de ftalato (QIU et al., 2006) e oxidar o benzeno a dióxido de carbono em condições de redução de sulfato (DONG et al., 2016; HERRMANN et al., 2010; KLEINSTEUBER et al., 2008). *Desulfitobacterium* também são bactérias estritamente anaeróbias. Podem usar uma ampla variedade de aceptores de elétrons, como nitrato, sulfito, metais, ácidos húmicos e compostos orgânicos halogenados produzidos pelo homem ou de ocorrência natural (CHRISTIANSEN; AHRING, 1996; FUTAGAMI; FURUKAWA, 2016; SUYAMA et al., 2002; VILLEMUR et al., 2006).

Outro microrganismo abundante na linha de base foi *Bathyarchaeia*, que não foi especificada ao nível do gênero. É uma arquea presente em muitos habitats anóxicos (EVANS et al., 2015; HE et al., 2016). Utilizam uma variedade de substratos orgânicos (HE et al., 2016;

LAZAR et al., 2016; MENG et al., 2014), muitas vezes alimentando seu metabolismo através da acetogênese e metanogênese (YU et al., 2018). Esses microrganismos, provavelmente, contribuíam para atenuação natural do local estudo, antes do teste piloto de biorremediação.

Durante a operação do *biosparging*, os microrganismos dominantes nas águas subterrâneas sofreram uma mudança drástica desde o primeiro mês de operação, visto que 85% da contaminação já havia sido removida, sugerindo que as injeções de ar ativaram os microrganismos aeróbios nativos. Algumas bactérias do gênero *Diaphorobacter*, *Cupriavidus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, microrganismos predominantes nas culturas de enriquecimento, descritos a seguir na seção 4.2.2, foram encontradas nas amostras analisadas do *biosparging*. Entretanto, com abundância relativa menor que 1%. Curiosamente, o gênero com maior abundância relativa presente em todas as amostras foi *Candidatus Nitrosotalea*. É uma arquea pertencente ao filo *Thaumarchaeota*, obrigatoriamente aeróbia, predominante em solos ácidos que contém compostos nitrogenados e pode conter o gene *amoA* (ammonia monooxygenase  $\alpha$ -subunit) responsável pela oxidação da amônia (LEHTOVIRTA-MORLEY et al., 2011).

Os resultados físico-químicos do monitoramento do *biosparging* não fazem parte deste trabalho, portanto, não podem ser apresentados. Entretanto, pode-se dizer que as concentrações de nitrogênio amoniacal estavam altas no início da operação do *biosparging*, enquanto altas concentrações de nitrito e nitrato foram observadas ao longo do processo operacional, sugerindo que o processo de nitrificação aconteceu. Além disso, o pH decaiu e se manteve abaixo de 5,0 durante o período de monitoramento. Esses resultados corroboram com o aumento da abundância relativa das arqueas oxidadoras de amônia (AOA), visto que elas são reportadas por crescerem em concentrações extremamente baixas de íon amônio e em ambientes ácidos (MARTENS-HABBENA et al., 2009). Lehtovirta-Morley et al. (2011, 2016) isolaram uma AOA, *Candidatus Nitrosotalea devanaterrea*, que cresceu em ambiente ácido, na faixa de pH 4,0-5,5 contendo apenas 1,8  $\mu\text{M}$  de amônia. Os autores ainda verificaram que a taxa de crescimento específico diminuiu em valores altos de amônia.

Avaliações quantitativas baseadas no gene *amoA*, revelaram que as AOA são onipresentes no ambiente e estão entre os organismos vivos mais numerosos da Terra, muitas vezes superando as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) em muitos ambientes onde ocorre nitrificação (ALVES et al., 2018; WUCHTER et al., 2006), com o pH sendo um importante fator tanto para a composição quanto para a adaptação da comunidade (GUBRY-RANGIN et al., 2011, 2015; OTON et al., 2016).

Mais estudos precisam ser realizados para tentar entender o papel das arqueas na degradação dos compostos aqui estudados. Os microrganismos dominantes podem ser

explorados e isolados para melhor entendimento das atividades catabólicas e a relação com as mudanças filogenéticas.

## 4.2 BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE COMPOSTOS NITRO E CLOROAROMÁTICOS POR MICRORGANISMOS NATIVOS DE SITE CONTAMINADO

Esta seção apresenta os resultados dos testes de biodegradação aeróbia realizados com água subterrânea.

### 4.2.1 Biodegradação aeróbia e enriquecimento microbiano

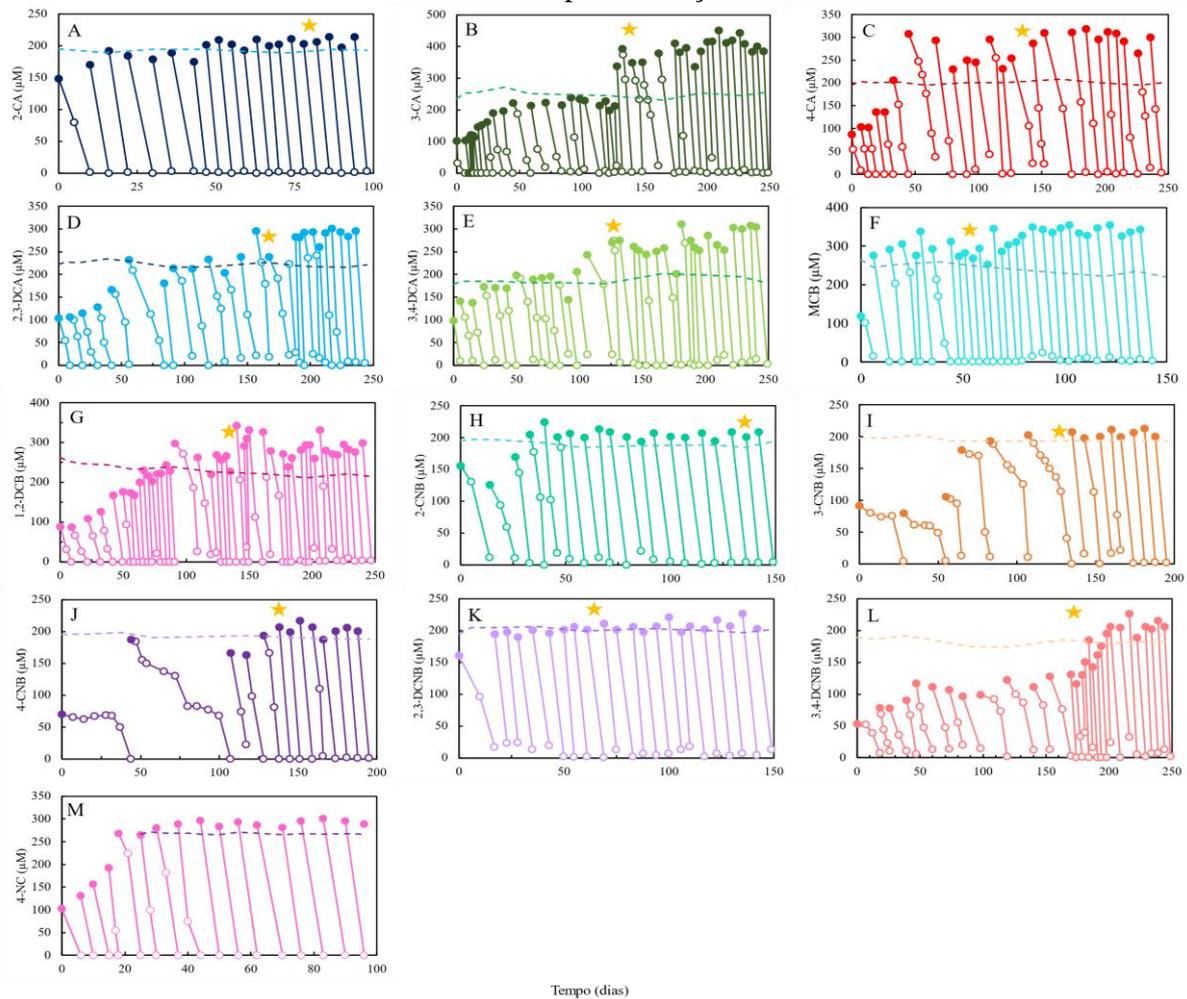
Os microrganismos presentes na água subterrânea utilizada como inóculo para os microcosmos promoveram a degradação de cada um dos contaminantes testados separadamente, com o mínimo de nutrientes adicionado (Figura 2). Esse achado indica a presença de microrganismos nativos no local contaminado. A comunidade bacteriana se desenvolveu na água subterrânea contaminada em função do período de exposição do ambiente aos compostos xenobióticos. Em locais contaminados, os microrganismos podem se adaptar para remover muitas substâncias tóxicas. Quando os microrganismos encontram um novo produto químico orgânico em seu ambiente, eles podem obter novos genes catabólicos, necessários para a degradação desse composto, transferidos de outros microrganismos por meio de eventos conjugacionais ou transformacionais ou podem modificar genes existentes por meio de processos mutacionais (RASUL CHAUDHRY; CHAPALAMADUGU, 1991). O conhecimento da diversidade funcional microbiana e dos fatores que influenciam metabolismo microbiano é crucial para a biorremediação de locais contaminados. A população microbiana nativa tem um papel importante no processo de degradação de contaminantes.

Não houve fase de latência para o grupo das cloroanilinas (Figura 21, painéis A, B, C, D e E) e clorobenzenos (Figura 21, painéis F e G), entretanto, é observada fase lag no grupo dos cloronitrobenzenos (Figura 21, painéis H, I, J, K e L). Isto acontece pela presença simultânea dos grupos cloro e nitro ligados ao anel benzênico, que desestabilizam a molécula, dificultando o ataque enzimático (ARORA; SASIKALA; RAMANA, 2012).

Após atividade positiva de degradação dos contaminantes, foi iniciada a etapa de enriquecimento. Cada marcador preenchido na Figura 21, indica uma nova transferência da cultura (1:10). A concentração dos contaminantes foi aumentada gradualmente, com valores que variaram entre 200-400  $\mu\text{M}$ , de acordo com a resposta da comunidade microbiana ao

aumento da concentração. Nos controles abióticos, representado pela linha pontilhada, a concentração dos contaminantes se manteve estável, indicando que o processo foi totalmente dependente de atividade biológica.

Figura 21 - Biodegradação e enriquecimento das culturas ao longo do tempo. (A) 2-CA, (B) 3-CA, (C) 4-CA, (D) 2,3-DCA, (E) 3,4-DCA, (F) MCB, (G) 1,2-DCB, (H) 2-CNB, (I) 3-CNB, (J) 4-CNB, (K) 2,3-DCNB, (L) 3,4-DCNB e (M) 4-NC. A linha pontilhada em cada gráfico representa seu respectivo controle abiótico. A Estrela indica o momento que foi retirada amostra para extração de DNA.



Fonte: A Autora (2022)

Ensaio anteriores de biodegradabilidade feitos com água subterrânea e solo contaminados desta área de estudo apontaram degradação aeróbia de MCB e 1,2-DCB (QUINTERO, 2016). Kraus (2018) em sua pesquisa observou degradação aeróbia de 2-CA, 3-CA, 4-CA, 2,3-DCA, 3,4-DCA, 1,2-DCB e anaeróbia de 2,3-DCA, 3,4-DCA, 2,5-DCNB, 3,4-DCNB, 1,2-DCB, 1,3-DCB e 1,4-DCB. Já Palatucci et al. (2019) relataram, pela primeira vez,

degradação aeróbia de 2,3-DCNB e 3,4-DCNB. Biodegradação dos isômeros do CNB não tinha sido testada anteriormente neste local.

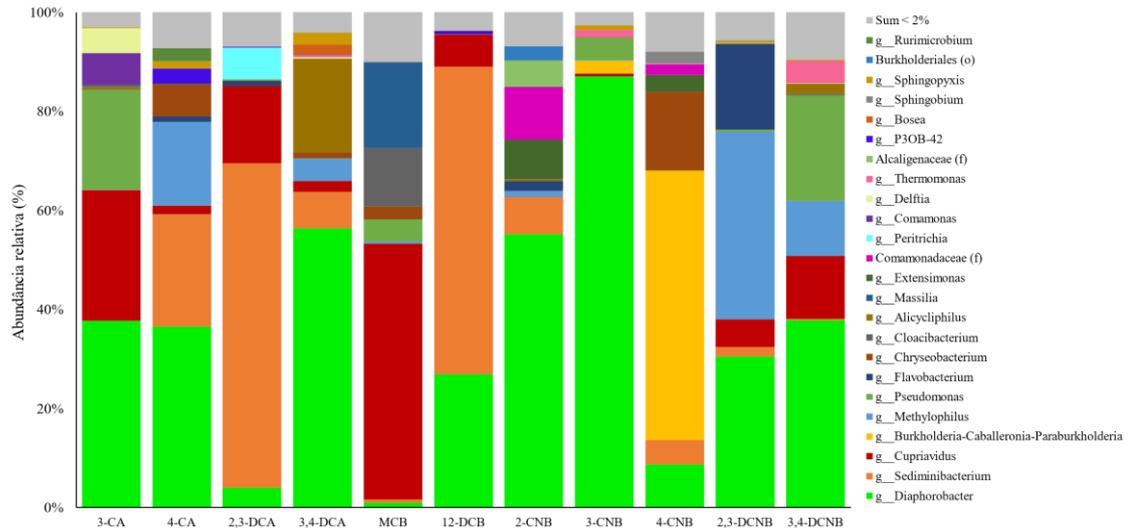
Outros estudos já haviam relatado a biodegradação aeróbia de 2-CA (HINTEREGGER; LOIDL; STREICHSBIER, 1994; VANGNAI; PETCHKROH, 2007), 3-CA (SHAH, 2014; SUROVTSEVA; IVOYLOV; KARASEVICH, 1986; VANGNAI; PETCHKROH, 2007), 4-CA (M, 2015; SUROVTSEVA; IVOYLOV; KARASEVICH, 1986; ZHANG et al., 2010a), 2,3-DCA (YAO et al., 2011; ZHANG et al., 2010a), 3,4-DCA (HONGSAWAT; VANGNAI, 2011; SUROVTSEVA; SUKHIKH; IVOYLOV, 1993; TRAVKIN et al., 2003; YAO et al., 2011), MCB (KIERNICKA; SEIGNEZ; PERINGER, 1999; MONFERRÁN; ECHENIQUE; WUNDERLIN, 2005; NISHINO; SPAIN, 1993; VOGT et al., 2004), 1,2-DCB (HAIGLER; NISHINO; SPAIN, 1988), 2-CNB (LIU; WANG; ZHOU, 2005; WU et al., 2009b), 3-CNB (PARK et al., 1999), 4-CNB (XIAO et al., 2006), 2,3-DCNB (PALATUCCI et al., 2019) e 3,4-DCNB (PALATUCCI et al., 2019). Entretanto, não há na literatura menção de microrganismo capaz de degradar 4-NC, apontando que existe um potencial metabólico muito grande instalado no site em estudo.

Embora tenha sido reportado consórcio bacteriano capaz de biodegradar 3-CNB, ainda não foi relatada cultura pura com habilidade de mineralizar este contaminante. Com isso, as culturas de enriquecimento do 4-NC e 3-CNB são candidatas ao isolamento dos microrganismos para obtenção de uma cultura pura capaz de biodegradá-los.

#### 4.2.2 Comunidade microbiana

A comunidade microbiana presente nos microcosmos foi analisada pelo sequenciamento da região V6-V8 do gene 16S rRNA. A amostra 2-CA teve apenas 26 leituras, consequentemente, não amplificou bem e, portanto, não foi possível interpretar os resultados. A Figura 22 mostra os perfis taxonômicos a nível de gênero. Foram encontrados 24 gêneros com abundância relativa maior que 2%. Não há uma diversidade microbiana muito grande por serem amostras já enriquecidas, então só os microrganismos que participam do processo de degradação conseguem crescer a cada nova transferência para um meio fresco. *Diaphorobacter*, *Sediminibacterium*, *Cupriavidus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* foram os mais dominantes, incluindo *Chryseobacterium*, *Alicyclophilus*, *Flavobacterium* e *Massilia* em menor grau.

Figura 22 - Perfil taxonômico no nível de gênero das comunidades microbianas dos microcosmos das culturas enriquecidas.



Fonte: A Autora (2022)

O gênero *Diaphorobacter* pertence à família Comamonadaceae e classe de Gammaproteobacteria. É composta por microrganismos aeróbios Gram-negativos. Algumas espécies foram descritas com habilidade para degradar aerobiamente alguns nitroaromáticos como isômeros do dicloronitrobenzeno (PALATUCCI et al., 2019) e nitrotoluenos (OBEROI; PHILIP; BHALLAMUDI, 2015; SINGH; RAMANATHAN, 2013), e algumas anilinas cloradas (REN et al., 2005; ZHANG; LIU; LIU, 2007). Este microrganismo está presente com alta abundância relativa nas culturas degradadoras de 3-CA (38%), 4-CA (37%), 3,4-DCA (56%), 1,2-DCB (27%), 2-CNB (55%), 3-CNB (87%) e 2,3-DCNB (30%) e 3,4-DCNB (38%), sendo assim, é possível que ele contribua para a via de biodegradação desses contaminantes.

A maioria das bactérias degradam cloroanilina por meio da via de ortoclivagem (HINTEREGGER; LOIDL; STREICHSBIER, 1994; SUROVTSEVA; IVOYLOV; KARASEVICH, 1986). Um fato interessante é que a degradação de 4-CA pela cepa *Diaphorobacter* PCA039 metaboliza 4-cloroanilina via 4-clorocatecol, 2-hidroxi-5-cloromucônico semialdeído, 5-cloro-4-oxalocrotonato e 5-cloro-2-oxo-4-hidroxipentanoato, que são compostos intermediários de uma via de metaclivagem típica (REN et al., 2005; ZHANG; LIU; LIU, 2007). Esta é uma possível via para biodegradação da cultura que degrada 4-CA neste trabalho, uma vez que uma espécie de *Diaphorobacter* está presente na comunidade bacteriana da cultura enriquecida.

Gao et al. (2021) e Li et al. (2021) propuseram uma via catabólica de biodegradação do 3,4-DCNB pela cepa *Diaphorobacter* sp. JS3050 e 2,3-DCNB por *Diaphorobacter* sp. JS3050, respectivamente. Esses microrganismos foram encontrados no local deste estudo, podendo, então, ser uma possível rota. Na degradação do 3,4-DCNB uma nitroareno dioxigenase

converteu 3,4-DCNB estequiometricamente em 4,5-diclorocatecol, que foi transformado em 3,4-dicloromuconato por clorocatecol 1,2-dioxigenase de clivagem do anel, subsequentemente transformado em ácido  $\beta$ -cetoadípico. O catabolismo de 2,3-DCNB pela cepa JS3051 é iniciada por uma dioxigenase 2,3-DCNB do tipo Rieske que adiciona ambos os átomos de oxigênio molecular ao anel benzênico com liberação de nitrito e formação de 3,4-diclorocatecol, sendo subsequentemente degradado através de uma via de orto-clivagem. Uma rota metabólica para dicloroanilinas e nitroclorobenzeno por estes microrganismos ainda não foi relatada. Este achado mostra que *Diaphorobacter* é um potente degradador de uma ampla gama de compostos aromáticos, com potencial metabólico ainda não muito explorado.

*Sediminibacterium* foi outro gênero encontrado nas culturas de enriquecimento do 2,3-DCA, 1,2-DCB, 4-CA e 3,4-DCA, com abundância relativa de 66, 62, 23 e 7%, respectivamente. Pode ser uma bactéria anaeróbia ou aeróbia facultativa. Possui algumas espécies ligadas à degradação aeróbia de cloreto de vinila (LIU et al., 2018; WILSON et al., 2016). Não foi previamente associado à degradação aeróbia dos contaminantes aqui testados, no entanto, é provável que ele contribua para a degradação desses cloroaromáticos.

*Cupriavidus* foi o gênero mais abundante na cultura que degrada o MCB (52%). Analogamente, a cepa *Cupriavidus* sp JS3054, isolada de água subterrânea contaminada, degradou clorobenzeno (PALATUCCI et al., 2019). Diferentemente, Kraus (2018) encontrou *Pandoraea* como a unidade taxonômica mais abundante nos microcosmos que degradavam MCB e 1,2-DCB, que, por sua vez, não apareceu aqui em grau nenhum. Apesar de todas as amostras serem provenientes do mesmo local de estudo, é provável que tenham sido de pontos diferentes, podendo assim, a comunidade nativa ser outra. Diferentes estudos têm relatado *Cupriavidus* como microrganismo responsável pela degradação aeróbia do 2-cloro-4-nitrofenol (TIWARI et al., 2017), 2,6-dibromo-4-nitrofenol (MIN; CHEN; HU, 2019), pentacloronitrobenzeno (TENG et al., 2017), isômeros de nitrotolueno, nitrobenzeno, ácido 2-nitrobenzóico (TIWARI et al., 2020). Este gênero ainda foi relatado para biodegradar 2-cloro-4-nitrofenol em temperaturas variando de 20-40 °C e valores de pH de 5 a 10 (MIN; CHEN; HU, 2019), o que significa que podem sobreviver nos sedimentos ácidos do site estudado.

O gênero *Burkholderia* encontrado nas culturas do 3-CNB e 4-CNB, com abundância relativa de 3 e 54%, respectivamente, são bactérias aeróbias obrigatórias, Gram-negativas, com morfologia de bastonetes. Zhang et al. (2013) investigaram a degradação de 4-CNB por cocultura de duas bactérias isoladas de lodo ativado, *Sphingomonas* sp CNB3 e *Burkholderia* sp. CAN6. CNB3 pode degradar 4-CNB em 4-CA e, em seguida, CAN6 pode clivar o anel aromático através das vias de ortoclivagem. Uma vez que não temos uma cultura pura, também

pode estar acontecendo uma cooperação bioquímica entre os microrganismos presentes no microcosmo. Além do gênero *Burkholderia*, também foram encontrados *Chryseobacterium*, *Diaphorobacter*, *Sediminibacterium*, *Extensimonas*, com abundância relativa de 16, 9, 5 e 3%, respectivamente, entre os microrganismos detectados em menor grau. Apesar de não existirem relatos de cepas isoladas de *Burkholderia* degradando CNB, *Burkholderia* sp. DNT e *Burkholderia* R34 foram observadas para degradação aeróbia de 2,4-dinitrotolueno (DE LAS HERAS; CHAVARRÍA; DE LORENZO, 2011; JOHNSON; JAIN; SPAIN, 2000; SUEN; SPAIN, 1993), *Burkholderia* sp CBS3 degrada alguns nitroaromáticos (O’SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005), *Burkholderia* sp KZ2, alguns cloroaromáticos (O’SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005) e *Burkholderia* sp RKJ 800, 4-cloro-2-aminofenol (ARORA; BAE, 2014). Kraus (2018) também observou *Burkholderia* nos microcosmos que degradavam isômeros de cloroanilina e dicloroanilina. Palatucci et al. (2019) mineralizaram 1,2-DCB através da cepa *Burkholderia* sp. JS3053.

O gênero *Pseudomonas* presente na comunidade microbiana dos microcosmos que degradaram 3-CA (AR 20%), 3-CNB (AR 5%) e 3,4-DCNB (AR 21%) estão diretamente relacionados com a degradação de compostos aromáticos. São microrganismos aeróbios, com metabolismo estritamente respiratório, que utilizam oxigênio como aceptor final de elétrons e, em alguns casos, o nitrato pode ser usado como um aceptor de elétrons, permitindo que o crescimento ocorra anaerobiamente (PALLERONI, 2015). A degradação oxidativa de alguns substratos ou seus intermediários envolve ocasionalmente a participação de oxigenases, seguindo vias que convergem para um intermediário comum,  $\beta$ -cetoadipato. A clivagem do anel pode ser via orto ou meta, a depender do substrato no qual as células cresceram. Algumas cepas demonstraram habilidade de degradar uma ampla gama de poluentes orgânicos, incluindo 2-CNB (LIU; WANG; ZHOU, 2005; WU et al., 2009b), 4-CNB (XIAO et al., 2006), anilina e anilinas cloradas (BRUNSBACH; REINEKE, 1993; SHAH, 2015; VANGNAI; PETCHKROH, 2007).

Os microrganismos presentes em menor grau que possuem relação com a degradação de vários compostos xenobióticos são *Chryseobacterium* (OBEROI; PHILIP; BHALLAMUDI, 2015; QU et al., 2015; VURAL; VURAL; OZDEMIR, 2020), *Alicyclophilus* (WEELINK et al., 2008), *Flavobacterium* (HEMALATHA; VEERAMANIKANDAN, 2011), *Massilia* (SON et al., 2021; WANG et al., 2016), *Cloacibacterium* (JURELEVICIUS et al., 2013) e *Extensimonas* (WANG et al., 2021), com isso, podem fazer parte da via de degradação dos compostos aqui estudados.

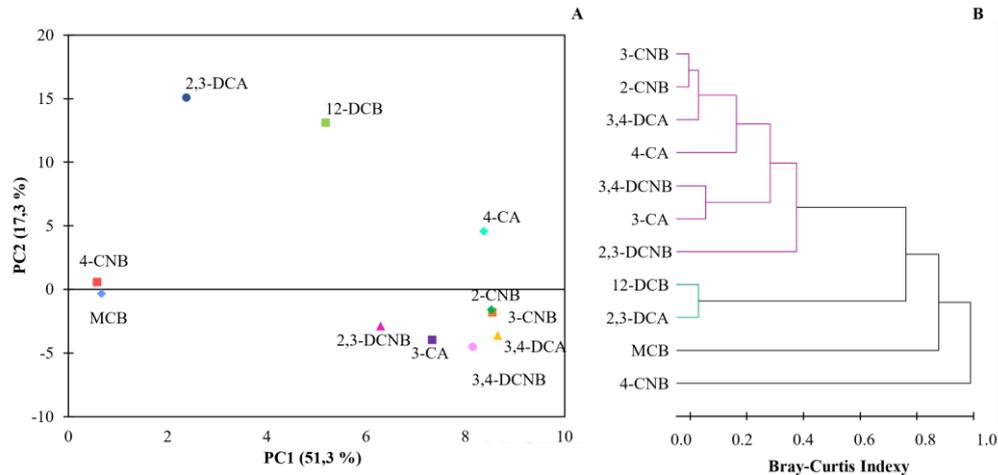
Em algumas amostras o gênero *Methylophilus* foi encontrado. Apesar de abundância relativa alta para 2,3-DCNB (38%), 4-CA (17%), 3,4-DCNB (11%), 3,4-DCA (5%), acredita-se que ele não participava da via metabólica de degradação dos contaminantes, visto que são bactérias que utilizam o metanol como única fonte de carbono e energia (JENKINS; BYROM; JONES, 1987) e não estão relacionados a degradação de nenhum aromático. A contaminação com metanol ocorreu devido a dissolução do composto no solvente, que, subsequentemente era evaporado. É provável que algum metanol ainda tenha permanecido nos microcosmos, fazendo com que esses microrganismos se desenvolvessem.

A arquea aeróbia *Candidatus Nitrosotalea*, microrganismo dominante nas amostras do *biosparging* na seção 4.1.4, também foi encontrada nas amostras de enriquecimento da 3-CA, 4-CA, 3,4-DCA, MCB, 3-CNB, 4-CNB e 2,3-DCNB. Entretanto, com abundância relativa menor que 0,1%.

As vias de degradação de compostos aromáticos ainda estão sendo amplamente analisadas. Mecanismos regulatórios, organização genética dos genes envolvidos, propriedades imunológicas das enzimas e estudos moleculares como bases para o melhoramento de cepas em possíveis aplicações de biorremediação são assuntos de grande importância básica e prática.

A Figura 23 ilustra a semelhança entre as comunidades microbianas estudadas. O Painel A mostra uma Análise de Componentes Principais dos dados de abundância (nível gênero), em que o primeiro (PC1) e o segundo (PC2) componentes principais explicam 51, 13 e 17,3% da variância dos dados, respectivamente. Valores mais próximos de PC1 e PC2 indicam maior similaridade entre as amostras. O painel B mostra um dendrograma baseado no Índice de Bray-Curtis, também comparando a distribuição dos gêneros dentro das comunidades microbianas. As comunidades microbianas do 3-CNB e 2-CNB, do 3-CA e 3,4-DCNB e do 2,3-DCA e 1,2-DCB foram as mais semelhantes entre si. Por outro lado, as culturas de enriquecimento do MCB e 4-CNB apresentaram comunidade microbiana mais distinta entre todas as amostras.

Figura 23 - Similaridade entre as comunidades microbianas dos microcosmos avaliados para diferentes contaminantes. Painel A: análise de componentes principais aplicada à abundância relativa de gênero das diferentes comunidades microbianas. Painel B: dendrograma representando a divergência taxonômica em nível e gênero.



Fonte: A Autora (2022)

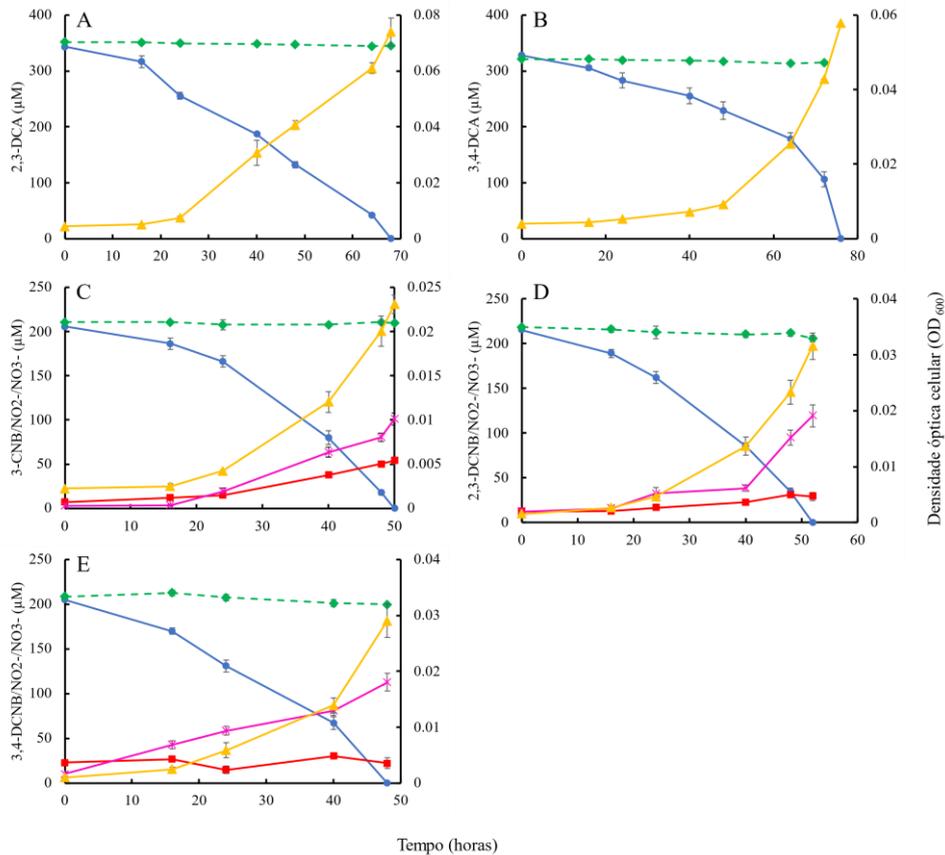
#### 4.2.3 Cinética de degradação e crescimento microbiano

O ensaio ao longo do tempo de degradação dos contaminantes, juntamente com o crescimento bacteriano e liberação de nitrito é mostrado na Figura 24. As culturas foram capazes de degradar 200  $\mu\text{M}$  de 3-CNB em 50h, 2,3-DCNB em 52h e 3,4-DCNB em 48h e 350  $\mu\text{M}$  de 2,3-DCA em 68h e 3,4-DCA em 76h. Nenhuma degradação foi observada nos controles abióticos, confirmando que o decaimento da concentração dos contaminantes foi por degradação biológica.

O crescimento celular nas culturas foi monitorado com medição da  $\text{OD}_{600}$ , que aumentou em todos os ensaios realizados, indicando que os contaminantes fornecem energia para suportar o crescimento microbiano. Nenhuma mudança na  $\text{OD}_{600}$  foi observada no controle abiótico. O tempo de duplicação da cultura calculado com base na  $\text{OD}_{600}$  foi de aproximadamente 16h em todas as culturas.

Apenas cerca de 15-25% do nitrito teórico foi detectado no meio líquido. Os microrganismos podem tanto tê-lo utilizado como fonte de nitrogênio para crescimento (PALATUCCI et al., 2019), quanto o nitrito pode ter sido convertido a nitrato. A liberação de nitrito durante a degradação do 3-CNB, 2,3-DCNB e 3,4-DCNB (Figura 24, painel C, D e E) sugere a eliminação do grupo nitro proveniente do ataque inicial por uma nitroareno dioxigenase (ZHOU; FUENMAYOR; WILLIAMS, 2001), resultando na formação do catecol correspondente (JU; PARALES, 2010; SINGH; RAMANATHAN, 2013). A via alternativa envolvendo a redução inicial do grupo nitro, resultaria na liberação de amônia.

Figura 24 - Ensaio cinéticos de degradação do (A) 2,3-DCA, (B) 3,4-DCA, (C) 3-CNB, (D) 2,3-DCNB e (E) 3,4-DCNB ao longo do tempo. A linha pontilhada (---) representa o controle abiótico, ( $\blacktriangle$ ) densidade óptica celular, ( $\blacksquare$ ) concentração de N-nitrito, ( $*$ ) concentração de N-nitrato e ( $\bullet$ ) concentração dos contaminantes avaliados.



Fonte: A Autora (2022)

Os dados de consumo dos contaminantes obtidos durante os experimentos puderam ser ajustados para modelos cinéticos de ordem zero e de primeira ordem, com valor de  $R^2$  superiores a 0,91 e 0,80, respectivamente (Tabela 11). Todas as condições ajustaram-se melhor ao modelo cinético de ordem zero. Isso indica que a taxa de reação é constante e independente da concentração dos contaminantes. O conhecimento acerca dos parâmetros cinéticos é muito valioso na avaliação da capacidade dos microrganismos no processo de degradação.

Tabela 11 - Comparação das taxas de degradação dos contaminantes de ordem zero ( $K_0$ ) e primeira ordem ( $K_1$ )

Cultura	Zero ordem		Primeira ordem	
	$K_0$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ )	$R^2$	$K_1$ ( $\text{d}^{-1}$ )	$R^2$

2,3-DCA	4.57	0.98	0.02	0.89
3,4-DCA	3	0.91	0.01	0.89
3-CNB	3.53	0.95	0.03	0.80
2,3-DCNB	3.6	0.97	0.03	0.88
3,4-DCNB	3.73	0.98	0.02	0.95

Fonte: A Autora (2022)

### 4.3 TESTES DE BIODEGRADABILIDADE EM SOLO

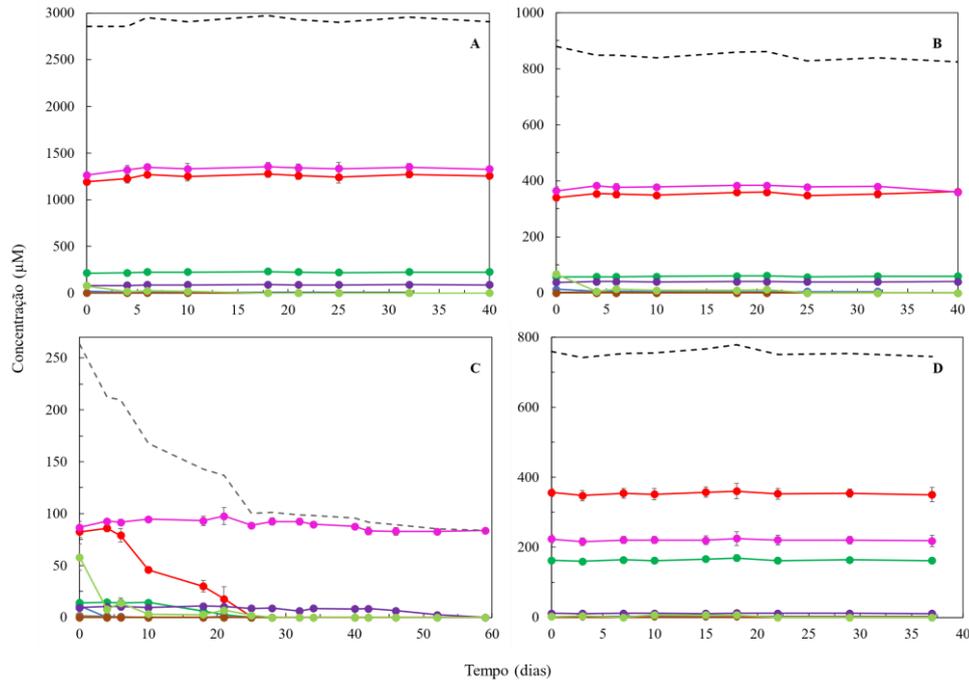
Os resultados dos testes de biodegradabilidade com solo estão apresentados nas seções seguintes.

#### 4.3.1 Teste de inibição de atividade dos microrganismos

Três concentrações diferentes de contaminantes orgânicos no solo foram avaliadas quanto a inibição da atividade microbiana. Os resultados estão apresentados na Figura 25. A diluição do solo contaminado com solo sem contaminação resultou na concentração total na fase líquida de 2854  $\mu\text{M}$  na diluição 1:1 (Figura 25, painel A), 880  $\mu\text{M}$  na diluição 1:5 (Figura 25, painel B), 263  $\mu\text{M}$  na diluição 1:20 (Figura 25, painel C) e 760  $\mu\text{M}$  no controle abiótico (Figura 25, painel D).

Em D1 (Diluição 1:1), o MCB foi completamente removido e o 1,2-DCB teve sua concentração diminuída em torno de 50%. D2 (Diluição 1:5) também se detectou remoção de 100% do MCB e 72% do 1,2-DCB. Já em D3 (Diluição 3), 100% dos contaminantes foram removidos, exceto o 3-CNB. O controle abiótico se manteve estável durante o período de operação, indicando que a remoção dos contaminantes foi decorrente da degradação biológica. Com isso, podemos inferir que os microrganismos não foram inibidos em concentração total de  $\sim 260 \mu\text{M}$ . A concentração do 3-CNB em D3 não decaiu provavelmente por não existir microrganismos que o degradassem no solo utilizado, no entanto, destaca-se que na seção 4.1.1, 3-CNB em concentração superior (200  $\mu\text{M}$ ) que no presente experimento (86  $\mu\text{M}$ ), foi passível de biodegradação. Logo, a concentração não deve ter sido fator limitante no experimento com solo, mas sim a ausência de microrganismos degradadores.

Figura 25 - Teste de inibição da atividade microbiana nas diluições 1:1 (A), 1:5 (B), 1:20 (C) e controle abiótico (D). A linha pontilhada (---) representa o somatório da concentração dos contaminantes, (●) 1,2-DCB, (●) MCB, (●) 3- e 4-CA, (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCA, (●) 3-CNB, (●) 4-CNB, (●) 2,3-DCNB e (●) 3,4-DCNB.



Fonte: A Autora (2022)

Diante deste cenário, pensando na aplicação da técnica de bioaumentação em locais onde a contaminação do solo não inibe a atividade microbiana, foi desenvolvida uma cultura capaz de degradar um conjunto de contaminantes, discutida no item a seguir.

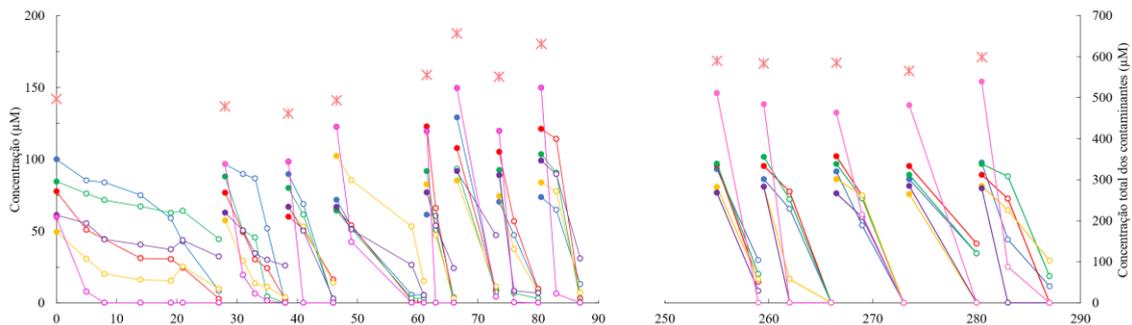
#### 4.3.2 Cultura mista em meio líquido – inóculo para solo

No local de estudo encontra-se uma diversidade de compostos orgânicos, por isso é importante obter uma cultura que consiga degradá-los quando em conjunto. Na seção 4.1.1 os contaminantes eram degradados individualmente, então uma pequena alíquota das culturas individuais do 3-CA, 4-CA, 2,3-DCA, 3,4-DCA, 1,2-DCB, 2,3-DCNB e 3,4-DCNB foram unidas em apenas um único microcosmo contendo esses contaminantes. O resultado está mostrado na Figura 26 e indica que a comunidade bacteriana pode funcionar bem na mistura de contaminantes e com o mínimo de nutrientes adicionados, apesar de não serem metabolizados na mesma velocidade. As taxas de degradação dependem de vários fatores, em especial, da concentração do contaminante e da quantidade de espécies catalisadoras, como as enzimas geradas pelos microrganismos.

O asterisco na Figura 26 indica quando uma transferência 1:10 para um novo microcosmo foi realizada e o somatório da concentração dos contaminantes adicionados. Embora as culturas já degradassem os contaminantes individualmente, a comunidade bacteriana

levou cerca de 25 dias para se adaptar quando submetida a mistura de contaminantes. O 3- e 4-CA foram mais rapidamente biodegradados, em 8 dias. Já o 3,4-DCA e 3,4-DCNB tiveram apenas remoção de 50% após quase 30 dias. Como os outros contaminantes já tinham sido consumidos, uma transferência 1:10 para um meio fresco foi realizada. Além dos 10 mL da cultura mista, foi adicionado 1 mL de cada cultura individual dos contaminantes que não haviam sido consumidos (3,4-DCA e 3,4-DCNB). Com isso, o 3,4-DCA foi completamente degradado, mas o 3,4-DCNB ainda não. Então, uma nova transferência foi realizada e mais cultura individual do 3,4-DCNB foi adicionada. Em menos de 10 dias praticamente todos os contaminantes foram degradados na terceira transferência. As transferências continuaram sendo realizadas e, cada vez que algum contaminante era degradado mais lentamente, sua respectiva cultura individual era adicionada. Essa cultura mista foi aplicada em ensaios de bioaugmentação posteriormente.

Figura 26 - Concentração dos contaminantes na cultura mista: (●) 1,2-DCB, (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCA, (●) 2,3-DCNB, (●) 3,4-DCNB, (●) 3- e 4-CA e (\*) concentração total do spike

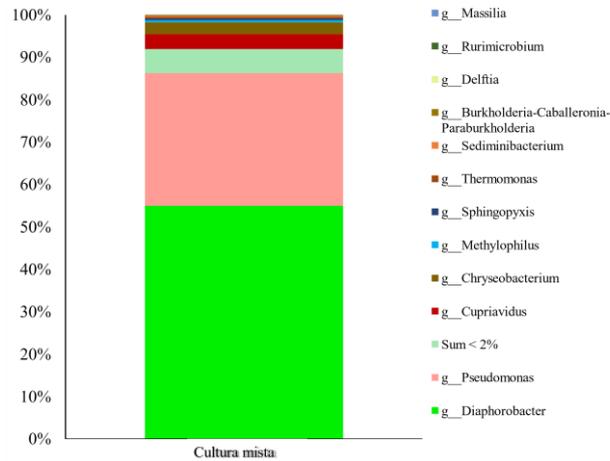


Fonte: A Autora (2022)

A comunidade microbiana da cultura mista foi analisada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. O DNA foi extraído após a sexta transferência. O perfil taxonômico no nível de gênero está apresentado na Figura 27. Os gêneros mais dominantes foram *Diaphorobacter* e *Pseudomonas*, com abundância relativa de 55 e 31% respectivamente, *Cupriavidus* e *Chryseobacterium* também foram encontrados, mas em menor grau (4 e 3%, respectivamente).

Todos os gêneros estavam presentes nas amostras das culturas individuais e discutidos na seção 4.1.2. O *Diaphorobacter* é o mais abundante, indicando que pode ser um potente degradador dos contaminantes aqui presentes, contribuindo de forma significativa para biorremediação do local estudado.

Figura 27 - Perfil taxonômico no nível de gênero da comunidade microbiana da cultura mista



Fonte: A Autora (2022)

### 4.3.3 Biodegradação do solo

A aplicação de processos térmicos na área de estudo para remediação do solo contaminado não é energeticamente viável para as áreas de borda, onde as concentrações dos contaminantes são mais baixas. Nesses casos, a biorremediação é uma boa alternativa, visto que a atividade microbiana não é inibida por baixas concentrações de poluentes orgânicos. Alguns autores mostraram que a bioaugmentação e a bioestimulação aumentaram a atividade bioquímica dos microrganismos (BENTO et al., 2005; HARITASH; KAUSHIK, 2009; HAZEN et al., 2003; MENENDEZ-VEGA et al., 2007; SCHROLL et al., 2004). Diante disso, avaliou-se alguns mecanismos para acelerar o processo de biodegradação do solo utilizando essas técnicas. Os experimentos foram realizados em quatro etapas.

#### 4.3.3.1 Estágio 1 – Atenuação natural

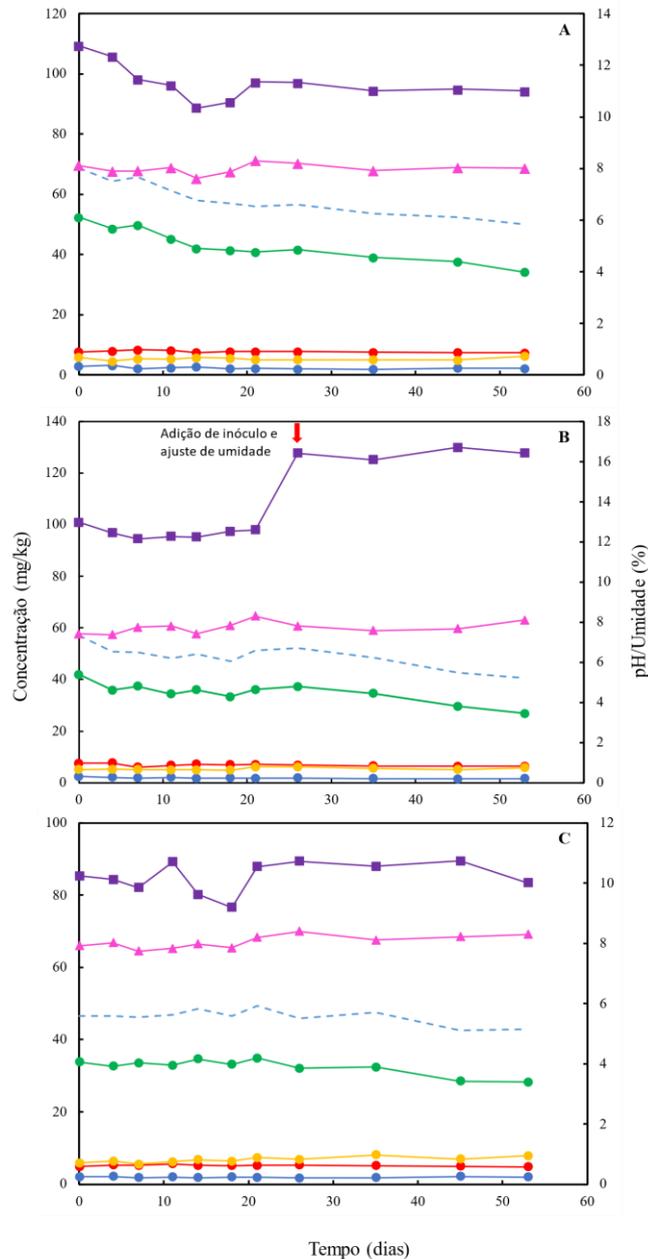
Neste estágio, os mesocosmos foram configurados para avaliar a eficácia da biodegradação a partir dos microrganismos nativos do solo. Os resultados estão apresentados na Figura 28. No tratamento 1 (Figura 28, painel A), foi avaliada a atenuação natural em que, após 50 dias, houve apenas 27% de remoção da contaminação. O pH ficou em torno de 7,6-8,3 e a umidade 10,3-12,8%. Nenhum ajuste foi realizado nesta condição.

Durante o monitoramento do Tratamento 2 (Figura 28, painel B), apenas 10% da concentração total dos contaminantes decaiu em 20 dias, então foi feito um ajuste na umidade para 15 % e a cultura mista da seção 4.3.2 foi utilizada como inóculo. Houve um aumento na degradação dos contaminantes para 28%, similarmente ao Tratamento 1, onde nenhum ajuste foi realizado. Portanto, a bioaugmentação e bioestimulação realizadas no Tratamento 2 não contribuíram para acelerar a biodegradação. A baixa eficiência da biorremediação pode ter sido causada pela limitada capacidade de sobrevivência do inóculo no solo testado.

No Tratamento 3 (Figura 28, painel C), controle abiótico, a concentração dos contaminantes manteve-se constante durante todo o período de monitoramento, indicando que o decaimento da concentração dos contaminantes em T1 e T2 foi decorrente da atividade biológica.

Diante desses resultados, alguns questionamentos surgiram sobre a concentração testada dos contaminantes ainda inibir a atividade microbiana; se podia existir no solo outros inibidores não identificados que levaram ao insucesso da bioaugmentação/bioestimulação; se o pH alcalino poderia ser um fator limitante, visto que afeta diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons  $H^+$  na permeabilidade celular e na atividade enzimática; se o teor de umidade poderia estar baixo, afetando negativamente o metabolismo microbiano, dificultando o acesso dos microrganismos no solo aos contaminantes; ou ainda se a quantidade de inóculo utilizada foi pequena. Por conseguinte, novos testes foram realizados e seus resultados estão discutidos na próxima seção.

Figura 28 - Teste de solo em T1 (A), T2 (B) e T3 (C). A concentração dos contaminantes é representada por: (●) 2-CNB, (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCNB, (●) BEHP, (---) Total de orgânicos. Parâmetros físico-químicos (■) umidade (▲) pH.



Fonte: A Autora (2022)

#### 4.3.3.2 Estágio 2 – Por que a bioaumentação e bioestimulação não aceleraram a degradação?

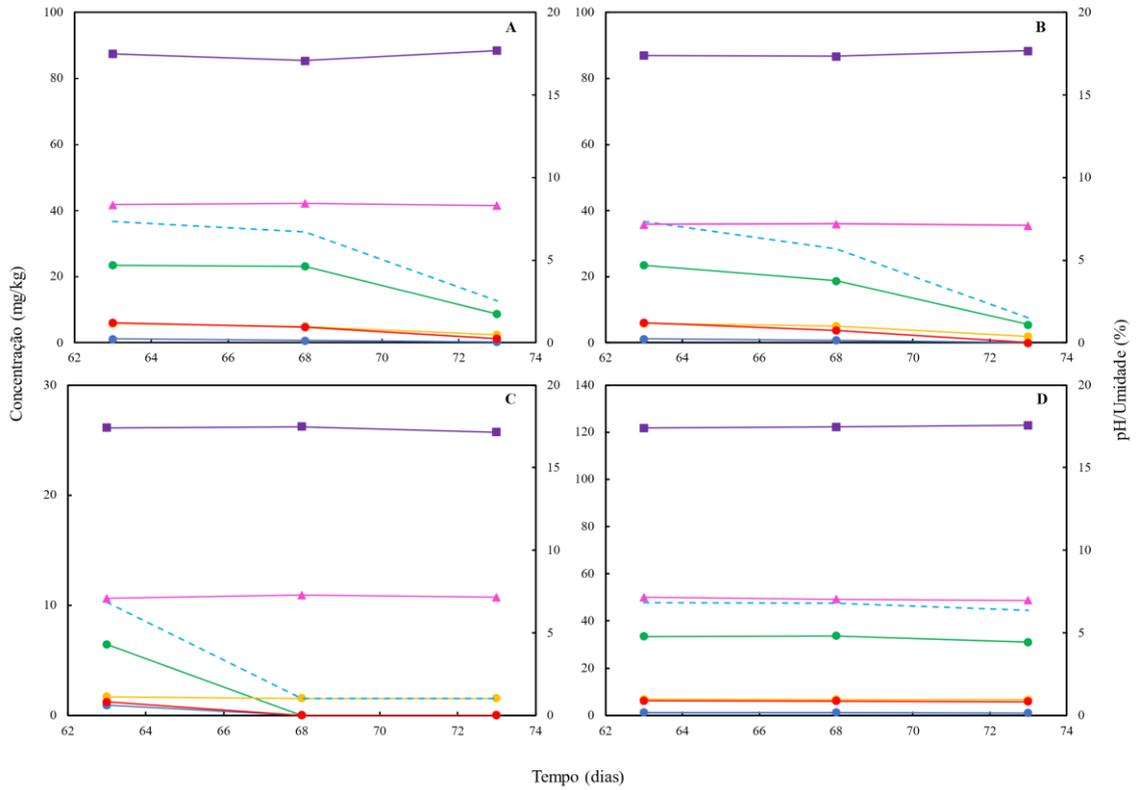
Com solo proveniente do Tratamento 2, testes adicionais foram realizados com intuito de responder as dúvidas do estágio 1. Os resultados estão mostrados na Figura 29. No Tratamento 2A (Figura 29, painel A), apenas a umidade foi ajustada. Como os ensaios foram realizados em frascos sacrifício, não se pôde ter um tempo de monitoramento maior, mas a concentração dos contaminantes foi reduzida em 65% após 10 dias. No Tratamento 2B (Figura 29, painel B), o pH foi ajustado para 7, houve adição de nutrientes e o solo foi novamente

inoculado com a cultura mista, resultando em redução de 80% da contaminação. Além dos ajustes realizados, a reinoculação também pode ter influenciado no aumento da biodegradação dos contaminantes presentes. Normalmente, há uma única aplicação de bioaumento e bioestimulação. Entretanto, alguns trabalhos avaliaram a inoculação múltipla de consórcio microbiano em solo, onde foi adicionado microrganismo no solo a cada 3 dias, e constataram que o aumento da biomassa de microrganismos degradantes presentes no solo encurta o processo de biorremediação. (ŁEBKOWSKA et al., 2011).

No Tratamento 2C foi avaliado se a concentração dos contaminantes estava inibindo a atividade biológica, então solo contaminado foi diluído com solo sem contaminação e inoculado com a cultura mista. Todos os contaminantes foram removidos (Figura 29, painel C), exceto o bis-(2-etilhexil)-ftalato (BEHP), visto que o inóculo adicionado não foi desenvolvido para degradar este contaminante. A fim de saber se existiam outros contaminantes presentes no solo que pudessem inibir a cultura de bioaugmentação, testou-se no Tratamento 2D, solo sem contaminação prévia enriquecido com mistura de contaminantes na mesma faixa de concentração inicial do Tratamento 2, inoculada com a cultura mista. Apenas 6% dos contaminantes foram removidos (Figura 29, painel D). Isto, provavelmente, deve-se ao fato do tempo ter sido curto para adaptação dos microrganismos ao novo ambiente.

Com o sucesso na degradação dos Tratamentos 2A, 2B e 2C, pode-se inferir que que o pH alcalino, as concentrações de orgânicos aqui testadas e quaisquer potenciais inibidores desconhecidos no solo do local não eram uma preocupação. No entanto, quando a concentração dos contaminantes são menores (Tratamento 2C – 10 mg/kg), a biodegradação ocorreu mais rapidamente.

Figura 29 - Estágio 2 dos testes de solo. Painel (A) Tratamento 2A, (B) Tratamento 2B, (C) Tratamento 2C e (D) Tratamento 2D. Concentração dos contaminantes: (●) 2-CNB (●) 2,3-DCA (●) 3,4-DCNB (●) BEHP. Parâmetros físico-químicos: (■) umidade (▲) pH.

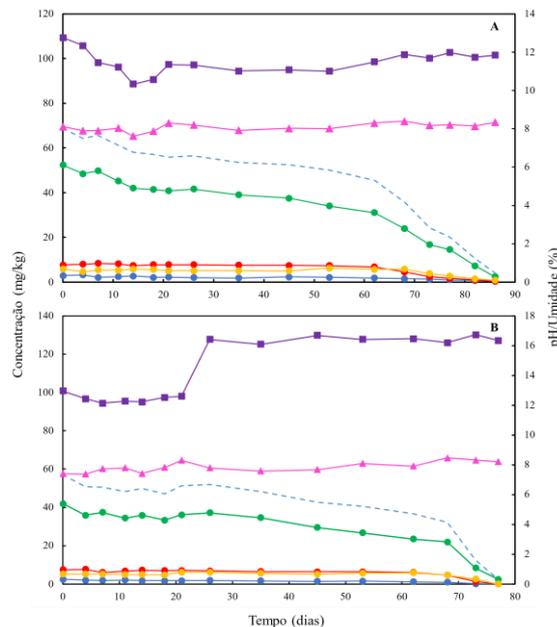


Fonte: A Autora (2022)

No momento que este estágio de teste estava sendo conduzido, os microcosmos do Tratamento 1 e 2 continuavam sendo monitorados e passaram a degradar os contaminantes com sucesso (

Figura 30). Mais de 95% dos compostos orgânicos foram removidos em 86 e 77 dias, respectivamente. Isso nos levou a entender que os microrganismos necessitam de um tempo maior para se adaptar ao novo ambiente, resultando em uma fase lag longa.

Figura 30 - Ensaio do estágio 1, após fase lag. Pannel (A) mostra Tratamento 1, Pannel (B), Tratamento 2. A concentração dos contaminantes está representada por (●) 2-CNB (●) 2,3-DCA (●) 3,4-DCNB (●) BEHP (---) Total de orgânicos. Parâmetros físico-químicos por (■) umidade (▲) pH



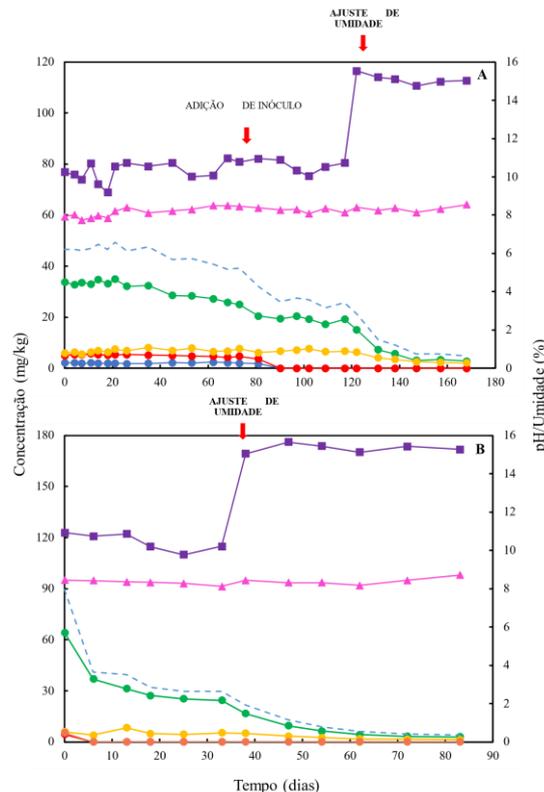
Fonte: A Autora (2022)

#### 4.3.3.3 Estágio 3 – Pode um solo tratado servir como inóculo ativo para tratar o solo contaminado?

Solo dos Tratamentos 1 e 2 foram usados como inóculo nos Tratamento 3 e 4. O Tratamento 3 não tinha microrganismos, pois havia sido autoclavado no estágio 1. Após 17 dias da adição do inóculo (solo ativo) houve uma redução na concentração dos contaminantes (33%), entretanto, esta condição se manteve em efeito platô por 30 dias (Figura 31, painel A). Então, a umidade foi ajustada para cerca de 15%. Imediatamente após o ajuste a população microbiana trabalhou na degradação dos contaminantes. Em Tratamento 4 solo fresco foi inoculado com solo ativo. A concentração inicial era de 90 mg/kg (Figura 31, painel B). Após 30 dias houve 67% em remoção dos contaminantes orgânico. Apesar disso, um efeito platô foi também observado (entre os dias 20 e 33 - Figura 31, painel B), então a umidade também foi ajustada para cerca de 15%. Em seguida, houve decaimento na concentração dos contaminantes.

O uso de solo contendo população microbiana ativa aumentou significativamente a mineralização dos contaminantes após ajuste da umidade, indicando que a população microbiana transferida sobreviveu e transferiu sua habilidade de degradação para o novo ecossistema microbiano. Sendo assim, solo ativo pode ser usado como inóculo em solo contaminado.

Figura 31 – Degradação dos contaminantes de interesse (●) 2-CNB, (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCNB, (●) BEHP, (●) 2,5-DCA, (---) Total de orgânicos, submetidos ao Tratamento 3 (painel A), solo autoclavado inoculado com solo ativo, e ao Tratamento 4 (painel B), solo contaminado inoculado com solo ativo. Parâmetros físico-químicos: (■) umidade (▲) pH.



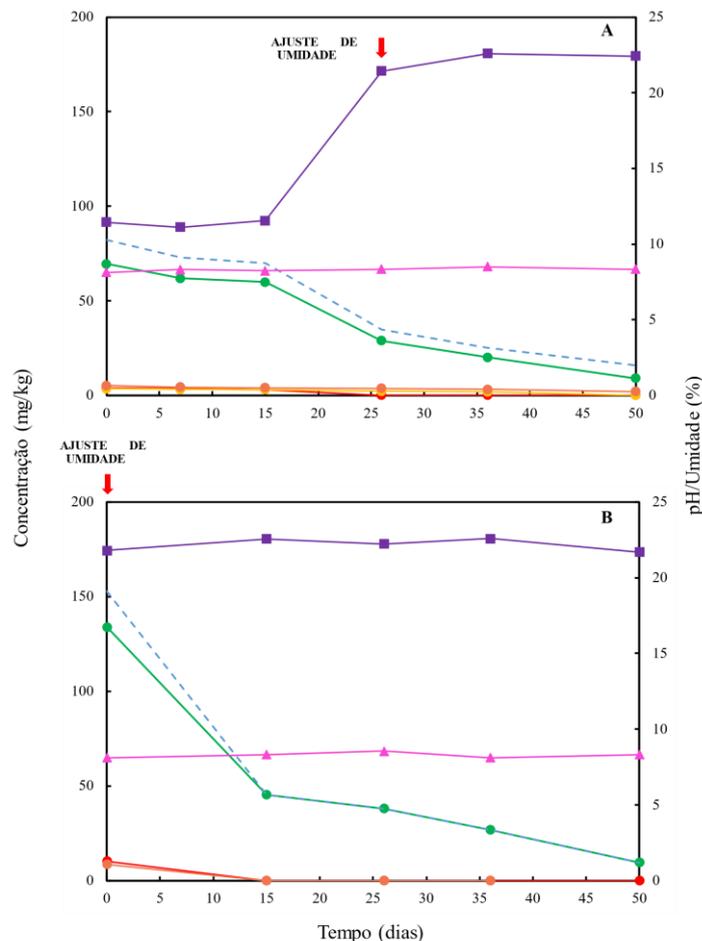
Fonte: A Autora (2022)

#### 4.3.3.4 Estágio 4 – Por que a adição de inóculo líquido não melhorou a degradação nos Estágios 1 e 2?

No estágio 1 o solo foi inoculado com a cultura mista em meio líquido (seção 4.3.3.1), mas não houve benefício significativo na biodegradação quando comparado a atenuação natural. Suspeitou-se que a quantidade adicionada não teria sido suficiente para intensificar a degradação. Então inoculou-se mais dois mesocosmos com solo fresco e pellet proveniente da

centrifugação de 100 mL da cultura mista. No tratamento 5 (Figura 32, painel A), a concentração total inicial dos contaminantes foi de 80 mg/kg, onde também se observou maior remoção dos contaminantes após a umidade ser ajustada para cerca de 23%. A eficiência de degradação em T5 foi de 90%. No tratamento 6 (Figura 32, painel B) a umidade ajustada para 22% desde o início, fazendo com que o dobro da concentração de T5 (160 mg/kg) fosse degradado em 50 dias também. Isso significa que maior quantidade de inóculo líquido funcionou melhor para inoculação no solo, especialmente quando a umidade foi ajustada para cerca de 20%.

Figura 32 - Concentração dos contaminantes: (●) 2,3-DCA, (●) 3,4-DCNB, (●) BEHP, (●) 2,5-DCA e (---) Total de orgânicos nos Tratamentos 5 (A) e 6 (B) ao longo do tempo no estágio 4 dos testes de solo. Parâmetros físico-químicos: (■) umidade (▲) pH.



Fonte: A Autora (2022)

A degradação biológica de compostos orgânicos foi observada com eficiência maior que 90% somente quando a umidade foi maior que 20%. Tanto a cultura mista, mantida em meio

líquido, quanto o solo contendo população microbiana ativa funcionaram como bons inóculos para a biorremediação de solo contaminado na área de estudo. A concentração máxima da soma dos contaminantes testada neste estudo foi de 150 mg/kg e o uso da cultura mista resultou em 96% de degradação. É imprescindível entender melhor as condições ideais para bioaugmentação/bioestimulação no local para que os contaminantes sejam degradados a níveis aceitáveis pela legislação.

## 5 CONCLUSÕES

O teste de respirometria, que antecedeu a implementação do sistema biosparging, indicou que na água subterrânea do local contaminado não existiam minerais ou compostos orgânicos não identificados que exerceriam demanda adicional de oxigênio para ser considerada no projeto de aeração. Durante a operação, o sistema de *biosparging* resultou na conversão dos poluentes orgânicos, chegando a atingir eficiência de remoção dos contaminantes de até 99%, indicando boa adequação do processo para biorremediação do local contaminado. A adição de oxigênio estimulou o crescimento da população microbiana local logo no primeiro mês, que passou de  $10^3$  para  $10^6$  NMP.L<sup>-1</sup>. Quando a concentração dos contaminantes atingiu limites indetectáveis, a estimativa do NMP diminuiu drasticamente, visto que não existia mais fonte de carbono disponível para consumo dos microrganismos. A análise do gene 16S rRNA indicou que a comunidade microbiana mudou drasticamente ao longo do processo e remediação. Inicialmente o ambiente era dominado por bactérias e arqueas anaeróbias. Após a aeração, arqueas aeróbias cresceram, sendo a *Candidatus Nitrosotalea* o microrganismo de maior abundância relativa, cujo metabolismo está diretamente relacionado com a oxidação de amônia em ambiente ácido e com baixa disponibilidade de N-NH<sub>3</sub>. Íon amônia é liberado no meio a partir da degradação aeróbia de anilina e já estava presente na água subterrânea antes mesmo do acionamento do *biosparging*.

Os microrganismos presentes na água subterrânea foram capazes de biodegradar todos os compostos de interesse - COIs (2-CA, 3-CA, 4-CA, 2,3-DCA, 3,4-DCA, MCB, 1,2-DCB, 2-NCB, 3-NCB, 4-NCB, 2,3-DCNB, 3,4-DCNB e 4-NC), indicou a existência de microrganismos nativos no local com capacidade de metabolizar os poluentes orgânicos. A prática de enriquecimento dos cultivos realizados na presença dos contaminantes de interesse resultou em baixa diversidade microbiana, já que os microrganismos envolvidos nos processos de degradação foram favorecidos a cada nova transferência. Dentre tais microrganismos, os gêneros aeróbios mais dominantes apontados no sequenciamento 16S rRNA foram *Diaphorobacter*, *Sediminibacterium*, *Cupriavidus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, e em menor grau *Chryseobacterium*, *Alicyclophilus*, *Flavobacterium* e *Massilia*. Um achado muito importante desse trabalho foi obter cultura que degrada 4-NC, ainda não reportada na literatura. Isso indica que existe um potencial metabólico muito grande instalado no site em estudo. Os ensaios cinéticos com os enriquecimentos da 2,3-DCA, 3,4-DCA, 3-CNB, 2,3-DCNB e 3,4-DCNB revelaram que houve crescimento celular em todas as culturas, com tempo de duplicação de aproximadamente 16h, indicando que os contaminantes fornecem energia para suportar o

crescimento microbiano. A liberação de nitrito foi abaixo do esperado estequiometricamente, sugerindo que os microrganismos podem tê-lo utilizado como fonte de nitrogênio para crescimento, ou ainda pode ter sido convertido a nitrato. Os dados de consumo dos contaminantes foram melhor ajustados ao modelo cinético de ordem zero, indicando que a taxa de reação é constante e independente da concentração dos contaminantes.

Os experimentos realizados com solo contaminado pelos COIs indicaram que o pH alcalino não inibiu a ação microbiana. No entanto, a umidade foi um fator limitante, sendo que a degradação dos COIs aconteceu mais rapidamente quando foi ajustada para valores entre 15-20%. Os contaminantes (2-CNB, 2,3-DCA, 3,4-DCNB e BEHP), presentes no experimento que simulava atenuação natural, foram quase completamente removidos, indicando a presença de microrganismos no solo com capacidade de degradar os poluentes orgânicos. Todos os mesocosmos que foram inoculados com a cultura mista, cultivada em meio líquido no laboratório, ou com solo que apresentava atividade microbiana, promoveram remoção dos COIs após ajuste de umidade. Os resultados obtidos na presente tese lançam luz ao processo de biorremediação de compostos nitro e cloroaromáticos e abrem perspectivas à otimização da recuperação de águas subterrâneas e de solos de área industrial contaminada.

#### Sugestões para trabalhos futuro

- Isolar microrganismos que degradam 3-CNB e 4-NC, obter suas informações genéticas e rotas metabólicas;
- Avaliar níveis de concentrações que inibem a atividades dos microrganismos nas culturas individuais;
- Entender o papel dos microrganismos na cultura mista;
- Encontrar degradadores para bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP);
- Avaliar o processo de biodegradação em solo com concentrações mais altas de poluentes orgânicos;
- Comparar as eficiências das diferentes formas de inoculação – líquida ou solo tratado – na aceleração do processo de biorremediação dos contaminantes de interesse no solo.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. 2nd. ed. [s.l.] New York: Academic Press, 1999.
- ALEXANDER, M.; CLARK, F. E. **Methods of Soil Analysis**. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, 1982.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, maio 2013.
- ALVES, R. J. E. et al. Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1517, 17 dez. 2018.
- AN, D.; GIBSON, D. T.; SPAIN, J. C. Oxidative release of nitrite from 2-nitrotoluene by a three-component enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain JS42. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 24, p. 7462–7467, dez. 1994.
- ARORA, P. K. et al. OxDBase: a database of oxygenases involved in biodegradation. **BMC Research Notes**, v. 2, n. 1, p. 67, 2009.
- ARORA, P. K.; BAE, H. Toxicity and microbial degradation of nitrobenzene, monochloronitrobenzenes, polynitrobenzenes, and pentachloronitrobenzene. **Journal of Chemistry**, v. 2014, 2014.
- ARORA, P. K.; JAIN, R. K. Pathway for Degradation of 2-Chloro-4-Nitrophenol in *Arthrobacter* sp. SJCon. **Current Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 568–573, 30 dez. 2011.
- ARORA, P. K.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V. Degradation of chlorinated nitroaromatic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2265–2277, 2012.
- AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 180, 16 nov. 2016.
- BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p. 1049–1055, jun. 2005.
- BLASER, H.-U.; STEINER, H.; STUDER, M. Selective Catalytic Hydrogenation of Functionalized Nitroarenes: An Update. **ChemCatChem**, v. 1, n. 2, p. 210–221, 5 out. 2009.
- BOON, N. et al. Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading *Comamonas testosteroni* Strain, I2 gfp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2906–2913, jul. 2000.
- BRUNSBACH, F.; REINEKE, W. Degradation of chloroanilines in soil slurry by specialized organisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 2–3, nov. 1993.

- BRUSSEAU, M. L. et al. Characterization and Remediation of Chlorinated Volatile Organic Contaminants in the Vadose Zone. **Vadose Zone Journal**, v. 12, n. 4, p. 1–17, 15 nov. 2013.
- CHAKRABORTY, R.; COATES, J. D. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 437–446, 1 maio 2004.
- CHISHTI, Z. et al. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. **Journal of Environmental Management**, v. 114, p. 372–380, jan. 2013.
- CHRISTIANSEN, N.; AHRING, B. K. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an Anaerobic, Reductively Dechlorinating Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 442–448, 1 abr. 1996.
- DE LAS HERAS, A.; CHAVARRÍA, M.; DE LORENZO, V. Association of dnt genes of Burkholderia sp. DNT with the substrate-blind regulator DntR draws the evolutionary itinerary of 2,4-dinitrotoluene biodegradation. **Molecular Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 287–299, out. 2011.
- DIAS, R. L. et al. Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site biostimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated Antarctic soil. **Polar Biology**, v. 38, n. 5, p. 677–687, 14 maio 2015.
- DONG, X. et al. Reconstructing metabolic pathways of a member of the genus Pelotomaculum suggesting its potential to oxidize benzene to carbon dioxide with direct reduction of sulfate. **FEMS Microbiology Ecology**, p. fiw254, 22 dez. 2016.
- EVANS, P. N. et al. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. **Science**, v. 350, n. 6259, p. 434–438, 23 out. 2015.
- FIELD, J. A.; SIERRA-ALVAREZ, R. Microbial degradation of chlorinated benzenes. **Biodegradation**, v. 19, n. 4, p. 463–480, 2008.
- FUNG, J. M. et al. Reductive Dehalogenation of Dichlorobenzenes and Monochlorobenzene to Benzene in Microcosms. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 7, p. 2302–2307, 1 abr. 2009.
- FUTAGAMI, T.; FURUKAWA, K. The Genus *Desulfitobacterium*. In: **Organohalide-Respiring Bacteria**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016. p. 173–207.
- GAO, Y. et al. A Nag-like dioxygenase initiates 3,4-dichloronitrobenzene degradation via 4,5-dichlorocatechol in *Diaphorobacter* sp. strain JS3050. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 1053–1065, 10 fev. 2021.
- GHOSH, A. et al. Degradation of 4-Nitrophenol, 2-Chloro-4-nitrophenol, and 2,4-Dinitrophenol by *Rhodococcus imtechensis* Strain RKJ300. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 3, p. 1069–1077, 1 fev. 2010.
- GUBRY-RANGIN, C. et al. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 52, p. 21206–21211, 27 dez.

2011.

GUBRY-RANGIN, C. et al. Coupling of diversification and pH adaptation during the evolution of terrestrial Thaumarchaeota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 30, p. 9370–9375, 28 jul. 2015.

GUO, H. et al. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. **Chemosphere**, v. 87, n. 11, p. 1273–1280, jun. 2012.

HAIGLER, B. E.; NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C. Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 294–301, fev. 1988.

HAMZAH, A. et al. Biodegradation of Crude Oil by Constructed Bacterial Consortia and the Constituent Single Bacteria Isolated From Malaysia. **Bioremediation Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–10, mar. 2013.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 1–15, set. 2009.

HAZEN, T. C. et al. Biopiles for Remediation of Petroleum-Contaminated Soils: A Polish Case Study. In: **The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 229–246.

HE, Y. et al. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 16035, 4 jun. 2016.

HEMALATHA, S.; VEERAMANIKANDAN, P. Characterization of Aromatic Hydrocarbon Rading Bacteria from Petroleum Contaminated Sites. **Journal of Environmental Protection**, v. 02, n. 03, p. 243–254, 2011.

HERRMANN, S. et al. Functional characterization of an anaerobic benzene-degrading enrichment culture by DNA stable isotope probing. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 401–411, fev. 2010.

HINTEREGGER, C.; LOIDL, M.; STREICHSBIER, F. *Pseudomonas acidovorans*: a bacterium capable of mineralizing 2-chloroaniline. **Journal of Basic Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 77–85, 1994.

HOFF, R. Z. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, n. 9, p. 476–481, set. 1993.

HONGSAWAT, P.; VANGNAI, A. S. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2–3, p. 1300–1307, 2011.

JARVIS, B.; WILRICH, C.; WILRICH, P. T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. **Journal of**

**Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1660–1667, 2010.

JENKINS, O.; BYROM, D.; JONES, D. Methylophilus: A New Genus of Methanol-Utilizing Bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 446–448, 1 out. 1987.

JEONG, S.-W.; JEONG, J.; KIM, J. Simple surface foam application enhances bioremediation of oil-contaminated soil in cold conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 164–170, abr. 2015.

JOHNSON, G. R.; JAIN, R. K.; SPAIN, J. C. Properties of the trihydroxytoluene oxygenase from Burkholderia cepacia R34: an extradiol dioxygenase from the 2,4-dinitrotoluene pathway. **Archives of Microbiology**, v. 173, n. 2, p. 86–90, 7 fev. 2000.

JU, K.-S.; PARALES, R. E. Nitroaromatic Compounds, from Synthesis to Biodegradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 2, p. 250–272, 2010.

JURELEVICIUS, D. et al. Bacterial Community Response to Petroleum Hydrocarbon Amendments in Freshwater, Marine, and Hypersaline Water-Containing Microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 5927–5935, 1 out. 2013.

KAO, C. M. et al. Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation. **Chemosphere**, v. 70, n. 8, p. 1492–1499, 2008.

KATSIVELA, E. et al. Initial Reactions in the Biodegradation of 1-Chloro-4-Nitrobenzene by a Newly Isolated Bacterium, Strain LW1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1405–1412, abr. 1999.

KIERNICKA, J.; SEIGNEZ, C.; PERINGER, P. Escherichia hermannii —a new bacterial strain for chlorobenzene degradation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 4 jan. 1999.

KLECKA, G. M.; GIBSON, D. T. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from Pseudomonas putida by 3-chlorocatechol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1159–1165, maio 1981.

KLEINSTEUBER, S. et al. Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 143–157, out. 2008.

KRAUS, S. DE P. Q. Aerobic and Anaerobic Biotransformation of Chloroanilines, Chlorobenzenes, and Dichloronitrobenzenes at a Complex Industrial Site in Brazil and Analysis of Associated Microbial Communities. p. 176, 2018.

LAZAR, C. S. et al. Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of Bathyarchaeota in estuarine sediments. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 1200–1211, abr. 2016.

ŁEBKOWSKA, M. et al. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering**,

v. 37, n. 11, p. 1895–1900, nov. 2011.

LEE, J. B. et al. Microbial biodegradation and toxicity of vinclozolin and its toxic metabolite 3,5-dichloroaniline. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 343–349, 2008.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. E. et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 15892–15897, 20 set. 2011.

LEHTOVIRTA-MORLEY, L. E. et al. Identifying Potential Mechanisms Enabling Acidophily in the Ammonia-Oxidizing Archaeon “Candidatus Nitrosotalea devanattera”. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 9, p. 2608–2619, maio 2016.

LESSNER, D. J. et al. Molecular Characterization and Substrate Specificity of Nitrobenzene Dioxygenase from *Comamonas* sp. Strain JS765. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 634–641, fev. 2002.

LI, Q. et al. Acute immunotoxicity of p-chloronitrobenzene in mice: II. Effect of p-chloronitrobenzene on the immunophenotype of murine splenocytes determined by flow cytometry. **Toxicology**, v. 137, n. 1, p. 35–45, set. 1999.

LI, T. et al. A Recently Assembled Degradation Pathway for 2,3-Dichloronitrobenzene in *Diaphorobacter* sp. Strain JS3051. **mBio**, v. 12, n. 4, 31 ago. 2021.

LIU, H. et al. Patchwork Assembly of nag -Like Nitroarene Dioxygenase Genes and the 3-Chlorocatechol Degradation Cluster for Evolution of the 2-Chloronitrobenzene Catabolism Pathway in *Pseudomonas stutzeri* ZWLR2-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4547–4552, 1 jul. 2011.

LIU, H.; WANG, S.-J.; ZHOU, N.-Y. A new isolate of *Pseudomonas stutzeri* that degrades 2-chloronitrobenzene. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 4, p. 275–278, fev. 2005.

LIU, W. et al. Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oily-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Festuca arundinacea* L.). **Plant and Soil**, v. 371, n. 1–2, p. 533–542, 21 out. 2013.

LIU, X. et al. Integrated methodological approach reveals microbial diversity and functions in aerobic groundwater microcosms adapted to vinyl chloride. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 9, 1 set. 2018.

LU, L. et al. Microbial Metabolism and Community Structure in Response to Bioelectrochemically Enhanced Remediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 7, p. 4021–4029, 14 abr. 2014.

M, P. S. Microbial degradation of 4-chloroaniline by a bacterial consortium. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 1, p. 17–25, 7 jan. 2015.

MACHACKOVA, J. et al. Major factors affecting in situ biodegradation rates of jet-fuel during large-scale biosparging project in sedimentary bedrock. **Journal of Environmental**

**Science and Health, Part A**, v. 47, n. 8, p. 1152–1165, jul. 2012.

MARS, A. E. et al. Microbial degradation of chloroaromatics: Use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 14, p. 4530–4537, 1997.

MARTENS-HABBENA, W. et al. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. **Nature**, v. 461, n. 7266, p. 976–979, 30 out. 2009.

MENENDEZ-VEGA, D. et al. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, n. 5–6, p. 310–321, nov. 2007.

MENG, J. et al. Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. **The ISME Journal**, v. 8, n. 3, p. 650–659, 10 mar. 2014.

MIN, J.; CHEN, W.; HU, X. Biodegradation of 2,6-dibromo-4-nitrophenol by *Cupriavidus* sp. strain CNP-8: Kinetics, pathway, genetic and biochemical characterization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 361, p. 10–18, jan. 2019.

MONFERRÁN, M. V.; ECHENIQUE, J. R.; WUNDERLIN, D. A. Degradation of chlorobenzenes by a strain of *Acidovorax avenae* isolated from a polluted aquifer. **Chemosphere**, v. 61, n. 1, p. 98–106, set. 2005.

NAIR, R. ET AL. Subchronic inhalation toxicity of p-nitroaniline and p-nitrochlorobenzene in rats\*1. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 618–627, maio 1986.

NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2520–2525, ago. 1993.

NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C. Oxidative Pathway for the Biodegradation of Nitrobenzene by *Comamonas* sp. Strain JS765. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2308–2313, jun. 1995.

NITISAKULKAN, T. et al. Degradation of chloroanilines by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* T57. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 3, p. 292–297, 2014.

O’SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 8–11, jul. 2005.

OBEROI, A. S.; PHILIP, L.; BHALLAMUDI, S. M. Biodegradation of Various Aromatic Compounds by Enriched Bacterial Cultures: Part A—Monocyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 7, p. 1870–1888, 9 ago. 2015.

OKUTMAN TAS, D. et al. Kinetics of the Microbial Reductive Dechlorination of Pentachloroaniline. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 14, p. 4467–4472, 1 jul.

2006.

ORGE, C. A.; FARIA, J. L.; PEREIRA, M. F. R. Removal of oxalic acid, oxamic acid and aniline by a combined photolysis and ozonation process. **Environmental Technology**, v. 36, n. 9, p. 1075–1083, 3 maio 2015.

OTON, E. V. et al. Phylogenetic congruence and ecological coherence in terrestrial Thaumarchaeota. **The ISME Journal**, v. 10, n. 1, p. 85–96, 3 jan. 2016.

PALATUCCI, M. L. et al. Aerobic biodegradation of 2,3- and 3,4-dichloronitrobenzene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 378, n. May, p. 120717, 2019.

PALLERONI, N. J. Pseudomonas. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1–1.

PANDEY, J. et al. Reductive dehalogenation mediated initiation of aerobic degradation of 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) by Burkholderia sp. strain SJ98. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 597–607, 28 nov. 2011.

PARALES, J. V. et al. Cloning and sequencing of the genes encoding 2-nitrotoluene dioxygenase from Pseudomonas sp. JS42. **Gene**, v. 181, n. 1–2, p. 57–61, nov. 1996.

PARK, H. S. et al. Degradation of chloronitrobenzenes by a coculture of Pseudomonas putida and a Rhodococcus sp. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1083–91, mar. 1999.

PATEL, A.; VYAS, T. K. Chlorobenzene Degradation via Ortho-Cleavage Pathway by Newly Isolated Microbacterium sp. Strain TAS1CB from a Petrochemical-Contaminated Site. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 24, n. 7, p. 786–795, 3 out. 2015.

PETTIGREW, C. A.; HAIGLER, B. E.; SPAIN, J. C. Simultaneous biodegradation of chlorobenzene and toluene by a Pseudomonas strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 157–162, jan. 1991.

PIEPER, D. H.; REINEKE, W. Engineering bacteria for bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 262–270, jun. 2000.

POTRAWFKE, T.; TIMMIS, K. N.; WITTICH, R.-M. Degradation of 1,2,3,4-Tetrachlorobenzene by Pseudomonas chlororaphis RW71. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3798–3806, out. 1998.

QI, Y.; ZHENG, C. L.; ZHANG, Y. T. Microbial Degradation of Nitrobenzene by Immobilized Cells of Micrococcus luteus. **Advanced Materials Research**, v. 599, p. 52–59, nov. 2012.

QIU, Y.-L. et al. Pelotomaculum terephthalicum sp. nov. and Pelotomaculum isophthalicum sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. **Archives of Microbiology**, v. 185, n. 3, p. 172–182, 11 abr. 2006.

- QU, J. et al. Novel *Chryseobacterium* sp. PYR2 degrades various organochlorine pesticides (OCPs) and achieves enhancing removal and complete degradation of DDT in highly contaminated soil. **Journal of Environmental Management**, v. 161, p. 350–357, set. 2015.
- QUINTERO, P. A. B. Inhibitory and Synergistic Effects During Biodegradation of Mixed Contaminants at an Industrial Site in South America. p. 194, 2016.
- RAINEY, F. A. Pelotomaculum. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1–6.
- RAPP, P.; TIMMIS, K. N. Degradation of chlorobenzenes at nanomolar concentrations by *Burkholderia* sp. strain PS14 in liquid cultures and in soil. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2547–52, jun. 1999.
- RASUL CHAUDHRY, G.; CHAPALAMADUGU, S. Biodegradation of halogenated organic compounds. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 59–79, 1991.
- REINEKE, W. Construction of bacterial strains with novel degradative capabilities for chloroaromatics. **Journal of Basic Microbiology**, v. 26, n. 9, p. 551–567, 1986.
- REN, H. et al. [Isolation and characterization of a p-chloroaniline-degrading bacterial strain]. **Huan jing ke xue= Huanjing kexue**, v. 26, n. 1, p. 154–8, jan. 2005.
- RUBERTO, L.; VAZQUEZ, S. C.; MAC CORMACK, W. P. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, n. 2, p. 115–125, set. 2003.
- SANDER, P. et al. Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1430–40, maio 1991.
- SANGODKAR, U. M. X. et al. Molecular basis of biodegradation of chloroaromatic compounds. **Acta Biotechnologica**, v. 9, n. 4, p. 301–316, 1989.
- SAUM, L.; JIMÉNEZ, M. B.; CROWLEY, D. Influence of biochar and compost on phytoremediation of oil-contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, n. 1, p. 54–60, 2 jan. 2018.
- SCHROLL, R. et al. Biomineralisation of 1,2,4-trichlorobenzene in soils by an adapted microbial population. **Environmental Pollution**, v. 127, n. 3, p. 395–401, fev. 2004.
- SHAH, M. P. Microbial Degradation of 3-Chloroaniline by two Bacterial Strains isolated from Common Effluent Treatment Plant. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 155–165, 2014.
- SHAH, M. P. Microbial degradation of 4-chloroaniline by a bacterial consortium. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 1, p. 17–25, 7 jan. 2015.
- SILAR, P. et al. Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with

aromatic amines, a major class of pollutants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 477–477, 18 jun. 2011.

SINGH, D.; RAMANATHAN, G. Biomineralization of 3-nitrotoluene by *Diaphorobacter* species. **Biodegradation**, v. 24, n. 5, p. 645–655, 2 set. 2013.

SOMMER, C.; GÖRISCH, H. Enzymology of the degradation of (di)chlorobenzenes by *Xanthobacter flavus* 14p1. **Archives of Microbiology**, v. 167, n. 6, p. 384–391, 20 maio 1997.

SON, J. et al. *Massilia aromaticivorans* sp. nov., a BTEX Degrading Bacterium Isolated from Arctic Soil. **Current Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 2143–2150, 17 maio 2021.

SPAIN, J. C.; NISHINO, S. F. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1010–1019, 1987.

SPERRY, K. L.; STANLEY, C.; KAY, J. Field Trial of Biosparging with Oxygen for Bioremediation of Volatile Organic Compounds. **Remediation Journal**, v. 11, n. 4, p. 47–62, 2001.

SUEN, W. C.; SPAIN, J. C. Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 6, p. 1831–1837, mar. 1993.

SUROVTSEVA, E. G.; IVOYLOV, V. S.; KARASEVICH, Y. Metabolism of chlorinated anilines in *Pseudomonas diminuta*. **Mikrobiologiya**, v. 55, p. 591–595, 1986.

SUROVTSEVA, E. G.; SUKHIKH, A. P.; IVOYLOV, V. S. Isozymes of the pathway for aniline and 4-chloroaniline preparatory metabolism in *Alcaligenes* sp. **Mikrobiologiya**, v. 61, p. 99–106, 1993.

SUYAMA, A. et al. Molecular Characterization of the PceA Reductive Dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. Strain Y51. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 13, p. 3419–3425, jul. 2002.

TABAK, H. H.; CHAMBERS, C. W.; KABLER, P. W. MICROBIAL METABOLISM OF AROMATIC COMPOUNDS I. **Journal of Bacteriology**, v. 87, n. 4, p. 910–919, abr. 1964.

TAKAGI, K. et al. Aerobic Mineralization of Hexachlorobenzene by Newly Isolated Pentachloronitrobenzene-Degrading *Nocardioides* sp. Strain PD653. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4452–4458, jul. 2009.

TENG, Y. et al. Biodegradation of pentachloronitrobenzene by *Cupriavidus* sp. YNS-85 and its potential for remediation of contaminated soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 10, p. 9538–9547, 25 abr. 2017.

TIWARI, J. et al. Biodegradation and detoxification of chloronitroaromatic pollutant by *Cupriavidus*. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 184–191, jan. 2017.

TIWARI, J. et al. Remediation of different nitroaromatic pollutants by a promising agent of

Cupriavidus sp. strain a3. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111138, dez. 2020.

TOMEI, M. C.; DAUGULIS, A. J. Ex Situ Bioremediation of Contaminated Soils: An Overview of Conventional and Innovative Technologies. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 20, p. 2107–2139, 5 jan. 2013.

TRAVKIN, V. M. et al. Degradation of 3,4-dichloro- and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-k. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 38, n. 2, p. 121–132, 2003.

VAN DER MEER JR et al. Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4185–93, nov. 1998.

VANGNAI, A. S.; PETCHKROH, W. Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, n. 2, p. 209–216, 2007.

VILLEMUR, R. et al. The Desulfitobacterium genus. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 5, p. 706–733, set. 2006.

VOGT, C. et al. Bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 68, n. 1–2, p. 121–141, jan. 2004.

VURAL, C.; VURAL, C.; OZDEMIR, G. Monitoring of the degradation of aromatic hydrocarbons by bioaugmented activated sludge. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 52–62, 31 jan. 2020.

VYAS, T. K.; MURTHY, S. R. Chlorobenzene degradation by *Bacillus* sp. TAS6CB: A potential candidate to remediate chlorinated hydrocarbon contaminated sites. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 382–388, mar. 2015.

WANG, H. et al. Efficient biodegradation of phenanthrene by a novel strain *Massilia* sp. WF1 isolated from a PAH-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 13, p. 13378–13388, 30 jul. 2016.

WANG, M. et al. Soil Microbiome Structure and Function in Ecopiles Used to Remediate Petroleum-Contaminated Soil. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, 15 mar. 2021.

WEELINK, S. A. B. et al. Isolation and Characterization of *Alicyclophilus denitrificans* Strain BC, Which Grows on Benzene with Chlorate as the Electron Acceptor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6672–6681, nov. 2008.

WILSON, F. P. et al. *Nocardioideis*, *Sediminibacterium*, *Aquabacterium*, *Variovorax*, and *Pseudomonas* linked to carbon uptake during aerobic vinyl chloride biodegradation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 19062–19070, 24 out. 2016.

WU, H. et al. Degradation of o-chloronitrobenzene as the sole carbon and nitrogen sources by *Pseudomonas putida* OCNB-1. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 1, p. 89–95,

2009a.

WU, H. et al. Degradation of o-chloronitrobenzene as the sole carbon and nitrogen sources by *Pseudomonas putida* OCNB-1. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 1, p. 89–95, jan. 2009b.

WU, J. et al. Novel Partial Reductive Pathway for 4-Chloronitrobenzene and Nitrobenzene Degradation in *Comamonas* sp. Strain CNB-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1759–1765, mar. 2006.

WU, Z. et al. Isolation of a heavy metal-resistant 4-Chloronitrobenzene degrader *Cupriavidus* sp. D4 and cloning of its *cnb* genes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 6, p. 871–876, 2011.

WUCHTER, C. et al. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12317–12322, 15 ago. 2006.

XIAO, Y. et al. Characterization of genes involved in the initial reactions of 4-chloronitrobenzene degradation in *Pseudomonas putida* ZWL73. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 166–171, 2006.

YADAV, J. S. et al. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2560–2565, jul. 1995.

YANG, S.-Z. et al. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. **Pedosphere**, v. 19, n. 3, p. 371–381, jun. 2009.

YAO, X. F. et al. Degradation of dichloroaniline isomers by a newly isolated strain, *Bacillus megaterium* IMT21. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 721–725, 2011.

YOU, I. S.; BARTHA, R. Stimulation of 3,4-dichloroaniline mineralization by aniline. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 678–681, set. 1982.

YU, T. et al. Growth of sedimentary Bathyarchaeota on lignin as an energy source. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 23, p. 6022–6027, 5 jun. 2018.

ZHANG, L. et al. Biodegradation of 4-chloronitrobenzene by biochemical cooperation between *Sphingomonas* sp. strain CNB3 and *Burkholderia* sp. strain CAN6 isolated from activated sludge. **Chemosphere**, v. 91, n. 9, p. 1243–1249, maio 2013.

ZHANG, L. LI et al. Biodegradation of 2-chloroaniline, 3-chloroaniline, and 4-chloroaniline by a novel strain *Delftia tsuruhatensis* H1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 875–882, 2010a.

ZHANG, S. et al. Anaerobic Dehalogenation of Chloroanilines by *Dehalococcoides mccartyi* Strain CBDB1 and *Dehalobacter* Strain 14DCB1 via Different Pathways as Related to Molecular Electronic Structure. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 7, p. 3714–3724, 4 abr. 2017.

ZHANG, T. et al. A novel degradation pathway of chloroaniline in *Diaphorobacter* sp. PCA039 entails initial hydroxylation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 665–673, 12 abr. 2010b.

ZHANG, T.; LIU, S.; LIU, Z. [A novel metabolism pathway for the biodegradation of chloroanilines]. **Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica**, v. 47, n. 1, p. 83–7, fev. 2007.

ZHEN, D. et al. Plasmid-mediated degradation of 4-chloronitrobenzene by newly isolated *Pseudomonas putida* strain ZWL73. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 797–803, 1 out. 2006.

ZHOU, N.-Y.; FUENMAYOR, S. L.; WILLIAMS, P. A. nag Genes of *Ralstonia* (Formerly *Pseudomonas*) sp. Strain U2 Encoding Enzymes for Gentisate Catabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 700–708, 15 jan. 2001.

ZHU, L. et al. Reaction kinetics of the degradation of chloroanilines and aniline by aerobic granule. **Biochemical Engineering Journal**, v. 68, p. 215–220, out. 2012.

ZHU, L. et al. Succession of microbial community and enhanced mechanism of a ZVI-based anaerobic granular sludge process treating chloronitrobenzenes wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 157–166, mar. 2015.

ZOBELL, C. E. Action of Microorganisms On hydrocarbons. v. 10, n. 295, p. 1–49, 1946.