



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL CURSO
DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

VITOR EMANUEL MONTEIRO MAGALHÃES

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS E
ANERÓBIOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
DECORRENTE DE CONTAMINAÇÃO DE DERIVADOS DE
PETRÓLEO**

RECIFE, 2023



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

Apoio



Gestão



VITOR EMANUEL MONTEIRO MAGALHÃES

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS
DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
DECORRENTE DE CONTAMINAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Civil e Ambiental.

Área de concentração: Biotecnologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. FABRÍCIO MOTTERAN

RECIFE, 2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Magalhães, Vitor Emanuel Monteiro.

Seleção de microrganismos aeróbios e aneróbios degradadores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos decorrente de contaminação de derivados de petróleo / Vitor Emanuel Monteiro Magalhães. - Recife, 2023. 48p : il., tab.

Orientador(a): Fabrício Motteran

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Civil - Bacharelado, 2023.

Inclui referências.

1. biorremediação. 2. microbiota indígena. 3. hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 4. enriquecimento microbiano. 5. identificação microbiana. 6. degradação do fenantreno. I. Motteran, Fabrício. (Orientação). II. Título.

540 CDD (22.ed.)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

ATA DA DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO CIVIL

CANDIDATO: Vitor Emanuel Monteiro Magalhães

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Fabrício Motteran

Examinador 1: Danúbia Maria da Silva Freitas

Examinador 2: Felipe Filgueiras de Almeida

TÍTULO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO: SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS E ANAERÓBIOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS DECORRENTE DE CONTAMINAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO

LOCAL: Videoconferência

DATA: 07/08/2023 **HORÁRIO DE INÍCIO:** 09:00.

Em sessão pública, após exposição de cerca de 30 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca com NOTA: 9,0 no Exame Final de Trabalho de Conclusão de Curso

1) (X) aprovado (nota $\geq 7,0$), pois foi demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização no tema da monografia e o texto do trabalho aceito.

As revisões observadas pela banca examinadora deverão ser corrigidas e verificadas pelo orientador no prazo máximo de 30 dias (o verso da folha da ata poderá ser utilizado para pontuar revisões).

O trabalho com nota no seguinte intervalo, **3,0 = < nota < 7,0**, será reapresentado, gerando-se uma nota ata; sendo o trabalho aprovado na reapresentação, o aluno será considerado **aprovado com exame final**.

2) () reprovado(s). (nota <3,0)

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca e pelo(s) candidato(s).

Recife, 07 de agosto de 2023

Orientador: Fabrício Motteran.....

Avaliador 1: Danúbia Maria da Silva Freitas.....

Avaliador 2: Felipe Filgueiras de Almeida.....

Candidato 1: Vitor Emanuel Monteiro Magalhães.....

Coordenação do Curso de Engenharia Civil-Dcivil

Rua Acadêmico Hélio Ramos s/nº. Cidade Universitária. Recife-PE CEP: 50740-530.

Fones: (081)2126.8220/8221 Fone/fax: (081)2126.8219.

AGRADECIMENTOS

À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, por meio do Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – PRH-ANP/FINEP, em particular ao PRH 48.1 “Caracterização e Simulação de Reservatórios, Energias renováveis e Biotecnologia Ambiental” (PROCESSO ANP N°48610.201019/2019-38), do Departamento de Energia Nuclear do Centro de Tecnologia e Geociências da UFPE, pelo apoio financeiro. Em especial aos meus orientadores, Professor Fabrício Motteran e Professora Bruna Fernandes, por todo apoio técnico e direcionamento a ser seguido com a pesquisa, me guiando através de resultados para conclusões importantes. Sempre se mostraram disponíveis a ensinar todos os processos.

À Danúbia Freiras por ter auxiliado e acompanhado em todas as etapas cromatográficas dentro daquelas feitas utilizando o HPLC, filtragens SPE entre vários outros processos laboratoriais realizados no Laboratório de Biologia Molecular. Sempre pude contar e sempre esteve disponível para me ajudar nos momentos mais difíceis.

À Felipe Filgueiras, que, além de me ensinar como realizar toda a metodologia de análise de concentração de fenantreno, me guiou nos primeiros importantes meses de pesquisa de maneira muito extrovertida e guardo com muito carinho os seus ensinamentos.

À Manoella Almeida pelo companheirismo e leveza no processo de isolamento através do plaqueamento com estriamento dos nossos “bichinhos”, de seleção microbiana, e análise de resultados, enquanto fazia em paralelo a sua pesquisa de mestrado e que me incentivou a continuar durante os últimos meses de pesquisa.

À toda equipe de técnicos e professores do Laboratório de Saneamento Ambiental pela integração dos pesquisadores, disponibilização de estrutura seja na forma de equipamentos, reagentes, instruções, entre várias outras formas.

À toda equipe da universidade e LSA que, durante o momento de pandemia da COVID19, fizeram com que fossem tomados os procedimentos recomendados de distanciamento para mitigação de riscos de propagação do vírus.

Por fim, agradeço a todos meus familiares, namorada e amigos que me acompanharam e auxiliaram direta e indiretamente nessa jornada.

RESUMO

Apesar de alternativas renováveis para fontes de energia serem cada vez mais comuns, a queima de combustível fóssil ainda registra um valor expressivo no conjunto da matriz energética mundial, representando cerca de 31% de toda a produção mundial em 2022 (*Statistical Review of World Energy 2022*). Dentre os combustíveis fósseis, o petróleo se caracteriza como o principal, sendo extraído a partir de plataformas *onshore* e *offshore*, transportados por embarcações, caminhões ou dutos e, por fim, refinados. Contudo, mesmo que haja medidas de segurança, acidentes relacionados à extração e transporte dessa matéria prima são catastróficos e imprevisíveis, gerando graves impactos ambientais para ecossistemas atingidos. Uma das mais promissoras alternativas para recuperação de áreas afetadas por acidentes envolvendo derramamento de petróleo é a biorremediação, que se utiliza de microbiota para degradar os compostos que formam no óleo. Dessa forma, essa pesquisa se voltou para o estudo da biodegradação do fenantreno, pertencente ao grupo dos hidrocarbonetos policíclico aromáticos (HPA), principal grupo de hidrocarbonetos presentes na composição do óleo bruto. Através deste estudo, pôde-se isolar, selecionar e identificar a microbiota enriquecida por meio de microcosmos contendo com fenantreno, de modo que fizesse dele sua principal fonte de carbono. Ao total, foram realizados dois experimentos independentes a partir de enriquecimento de microcosmos em batelada, sendo as amostras finais submetidas ao isolamento, seleção e identificação microbiana a partir do processo de metabarcoding para análise do rRNA do gene 16S. O processo de isolamento microbiano resultou em duas principais colônias, que chamamos de A1 e B3 tendo um resultado de fator de degradação médio de 80,3% durante o período de 29 dias. Ao todo, foram identificados 6 principais filos bacterianos, os Actinobacteria, Bacteriodetes, Euryarchaeota, Firmicutes, Protobacteria e Synergistetes. Assim sendo, os filos Firmicutes e Protobacteria foram os com maior abundância relativa. O resultado traz um novas informações sobre a ecologia microbiana relacionada a degradação do fenantreno e outros HPAs presentes no óleo bruto, auxiliando assim nos processos de biorremediação ambiental.

Palavras chaves: biorremediação; microbiota indígena; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; enriquecimento microbiano; identificação microbiana; degradação do fenantreno; metabarcoding

ABSTRACT

Despite the increasing prevalence of renewable alternatives for energy sources, fossil fuel combustion still constitutes a significant portion of the global energy matrix, accounting for approximately 31% of the total global production in 2022 (Statistical Review of World Energy 2022). Among fossil fuels, petroleum stands out as a primary source, extracted from both onshore and offshore platforms, transported via vessels, trucks, or pipelines, and ultimately refined. However, even with safety measures in place, accidents related to the extraction and transportation of this raw material are catastrophic and unpredictable, leading to severe environmental impacts on affected ecosystems. One of the most promising alternatives for remediating areas affected by accidents involving oil spills is bioremediation, which employs microbial communities to degrade the compounds present in oil. Thus, this research focused on the study of phenanthrene biodegradation, a member of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) group, which constitutes a major component of crude oil composition. Through this study, microbiota enriched with phenanthrene were isolated, selected, and identified using reactors as enrichment sources for carbon. Two independent experiments were conducted through batch reactor enrichment, and the final samples underwent microbial isolation, selection, and identification using metabarcoding analysis of the 16S rRNA gene. The microbial isolation process resulted in the identification of two predominant colonies, designated as A1 and B3, yielding an average degradation factor of 80.3% over a 29-day period. A total of six major bacterial phyla were identified, namely Actinobacteria, Bacteroidetes, Euryarchaeota, Firmicutes, Proteobacteria, and Synergistetes. Among these, the Firmicutes and Proteobacteria phyla exhibited the highest relative abundances. This outcome provides new insights into the microbial ecology associated with phenanthrene and other PAHs degradation present in crude oil, thus aiding in environmental bioremediation processes.

Palavras chaves: bioremediation; indigenous microbiota; polycyclic aromatic hydrocarbons; microbial enrichment; microbial identification; phenanthrene biodegradation; metabarcoding.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Fluxograma das etapas do estudo.
- Figura 2 Mapa do local de extração do sedimento do rio utilizado.
- Figura 3 Fluxograma de metodologia extração de fenantreno.
- Figura 4 Microcosmos durante o final da primeira semana de análise (T1).
- Figura 5 Inóculo inativado utilizado.
- Figura 6 Processo de filtração à vácuo do meio marinho adaptado
- Figura 7 Cabine de fluxo laminar utilizada no processo de repiques.
- Figura 8 Recorte da regão do meio sólido da placa de Petri contendo a colônia de interesse.
- Figura 9 Configuração dos microcosmos de enriquecimento microbiano utilizados.
- Figura 10 Processo de extração em fase sólida (SPE) utilizando a coluna C18-E.
- Figura 11 Frascos âmbar destinados à análise de cada reator.
- Figura 12 Curva de decaimento da concentração de fenantreno dos microcosmos
- Figura 13 Curva de decaimento da concentração de fenantreno de cada reator.
- Figura 14 Comprimento dos *contigs* do sequenciamento das amostras do reator, inóculo, A1 e B3.
- Figura 15 Distribuição da qualidade das leituras com base no número de *reads* das amostras do reator, inóculo, A1 e B3.
- Figura 16 *Boxplot* da distribuição da qualidade das leituras com base no número de *reads* das amostras do reator, inóculo, A1 e B3.
- Figura 17 Abundância Relativa entre os filos sequenciados das cepas do Reator, Inóculo, A1 e B3.
- Figura 18 *Chord diagram* dos gêneros presentes e suas predominâncias do Reator, Inóculo, A1 e B3.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Concentrações dos compostos no meio mineral utilizado para os microcosmos.
- Tabela 2 Concentrações do meio mineral adaptado para utilização no processo de isolamento microbiano do inóculo petroquímico.
- Tabela 3 Concentrações do meio líquido 2216 adaptado para utilização no processo de isolamento microbiano do inóculo.
- Tabela 4 Concentrações do meio líquido 2216 adaptado para utilização no processo de enriquecimento microbiano.
- Tabela 5 Concentrações de fenantreno detectado pelo HPLC ao longo das 8 semanas de experimento.
- Tabela 6 OD 600 do inóculo anterior à sua ativação.
- Tabela 7 Concentrações de fenantreno detectado pelo HPLC ao longo da ativação do inóculo petroquímico.
- Tabela 8 Absorbância medida das análises de densidade óptica na faixa de 600nm para o Reator com a cepa A1.
- Tabela 9 Absorbância medida das análises de densidade óptica na faixa de 600nm para o Reator com a cepa B3.
- Tabela 10 Degradação do fenantreno para o reator A1
- Tabela 11 Degradação do fenantreno para o reator B3.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
FEN	Fenantreno
DQO	Demanda Química de Oxigênio
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
DAD	<i>Diode-Array Detector</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
rRNA	Ácido nucleico ribossomal
pH	Potencial hidrogeniônico
T	Tempo
BP	<i>Boiling point</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivos gerais	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 MICROCOSMOS INOCULADOS COM SEDIMENTO DE MANGUEZAL....	18
4.1.1 MONTAGEM DOS MICROCOSMOS	18
4.1.3 EXTRAÇÃO DO FENANTRENO	19
4.1.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	21
4.1.4 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	22
4.2 ATIVAÇÃO DO INÓCULO PETROQUÍMICO	22
4.2.1 ATIVAÇÃO DO INÓCULO.....	22
4.3 ISOLAMENTO MICROBIANO ATRAVÉS DO PLAQUEAMENTO	25
4.5 ENRIQUECIMENTO MICROBIANO E DEGRADAÇÃO DO FENANTRENO	
.....	28
4.5.1 MONTAGEM DO PROCESSO DE ENRIQUECIMENTO DOS	
MICROCOSMOS	28
4.5.2 FILTRAGEM À VÁCUO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	30
4.5.3 MEDIÇÕES DE FENANTRENO PELO HPLC.....	32
5 RESULTADOS.....	33

5.1 EXPERIMENTO COM SEDIMENTO DE MANGUEZAL.....	33
5.1.1 CONCENTRAÇÃO DE FENANTRENO	33
5.2 ATIVAÇÃO DO INÓCULO PETROQUÍMICO	35
5.2.1 DENSIDADE ÓPTICA	35
5.2.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH), DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) E SÓLIDOS TOTAIS DO INÓCULO	35
5.2.3 CONCENTRAÇÃO DE FENANTRENO	35
5.3 ENRIQUECIMENTO MICROBIANO	36
5.3.1 DENSIDADE ÓPTICA	36
5.3.2 CONCENTRAÇÃO DE FENANTRENO DOS MICROCOSMOS A1 E B3	37
5.4 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	39
5.4.1 CONTIGS DE 250PB	39
5.4.2 ÍNDICE DE PHRED	40
5.4.1 COMPARAÇÃO DO FASTA E FASTQ NO MG-RAST.....	41
6 CONCLUSÕES	44
6.1 SEDIMENTO DO MAGUEZAL COMO INÓCULO.....	44
6.2 LODO PETROQUÍMICO COMO INÓCULO.....	44
6.3 MÉTODO SPE PARA LEITURA DA CONCENTRAÇÃO.....	44
6.4 PLAQUEAMENTO COMO SELEÇÃO MICROBIANA	45
6.5 PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DO FENANTRENO	45
6.5.1 PRINCIPAIS GRUPOS MICROBIANOS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

Ao decompor compostos que constituem os derivados do petróleo, é possível gerar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são considerados xenobióticos e frequentemente encontrados em diversos ambientes. Esses compostos são orgânicos recalcitrantes, bioacumuláveis e, em sua maioria, semivoláteis, constituídos por dois ou mais anéis benzênicos fundidos linear ou angularmente com forte energia de ressonância, o que dificulta sua degradação natural (Di Toro et al., 2000).

A alta hidrofobicidade e baixa volatilidade dos HPAs contribuem para sua persistência no meio ambiente. Geralmente, os HPAs são adsorvidos em sedimentos ricos em matéria orgânica e acumulados nas cadeias tróficas (Imam et al., 2022). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA, 2018) lista 16 principais HPAs, o qual inclui-se o fenantreno (Puglisi et al., 2007). O fenantreno é considerado um dos compostos-modelo para estudos de degradação de HPA, uma vez que é mais prevalente em ambientes contaminados (Mrozik e Piotrowska-Seget, 2010), pois é um hidrocarboneto aromático tricíclico encontrado em grandes concentrações em locais contaminados com alcatrão de carvão e em ambientes aquáticos poluídos com derivados de petróleo por exemplo.

De acordo com de Almeida et al. (2022), microrganismos indígenas presentes em águas, solos e sedimentos são capazes de mineralizar HPAs e podem ser usados para processos de biorremediação. A degradação do HPA é influenciada por vários fatores físico-químicos e ambientais, bem como pela presença de microrganismos adaptados com as ferramentas enzimáticas necessárias para degradar esses compostos complexos (Xu et al., 2018). Vários microrganismos são relatados como capazes de degradar HPA em ambientes naturais (Meckenstock et al., 2016).

Contudo, o devido processo de enriquecimento, isolamento, seleção e identificação microbiana para posterior utilização da microbiota em regiões contaminadas costuma ser muito trabalhoso e demorado, sendo importante a manutenção de cepas bacterianas identificadas e inoculadas em laboratório (Mishra, et al., 2001).

Essa necessidade da disponibilidade de microrganismos degradadores de compostos do óleo bruto se mostra importante em situações de acidentes ambientais, como o que ocorreu no nordeste brasileiro a partir do ano de 2019 até início de 2020, onde houve um acidente ambiental envolvendo derramamento de óleo no litoral, sobretudo na costa do estado de Pernambuco, atingindo aproximadamente 3000 km de costa, indo do estado do Maranhão até o Rio de Janeiro.

Portanto, ainda há muitas lacunas a serem preenchidas no conhecimento de microrganismos degradadores de HPAs, especialmente do fenantreno, que podem ser utilizados para biorremediação de áreas contaminadas com derivados de petróleo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Para a análise da concentração de fenantreno durante o experimento com sedimento de solo de manguezal foi utilizado o procedimento adaptado da Wannoussa et al.. Com relação à quantificação do fenantreno foi seguido a metodologia proposta por Wannoussa et al., (2015), onde se utiliza 1 g do sedimento úmido, 1g de sulfato de sódio anidro e 10mL de hexano como solvente. As condições utilizadas para o procedimento de análise da concentração de fenantreno no HPLC foram de uma curva cromatográfica que abrange as concentrações de 0,5 - 12,5 mg/L de fenantreno, fluxo de fase móvel de 1 mL/minuto, coluna de fase estacionária C18 da MERCK, fase móvel composta de 80% de acetonitrila e 20% de água, detector DAD temperatura de forno de 40 °C, tempo de corrida de 8,5 minutos/vial, tempo de retenção de 7,1 minutos e volume inicial de injeção de 20 µL.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estudar o processo de degradação do fenantreno com microcosmos aeróbios e isolar, selecionar e identificar os principais grupos microbianos responsáveis pela degradação desse hidrocarboneto. Além dos objetivos gerais, o estudo tem como objetivos específicos:

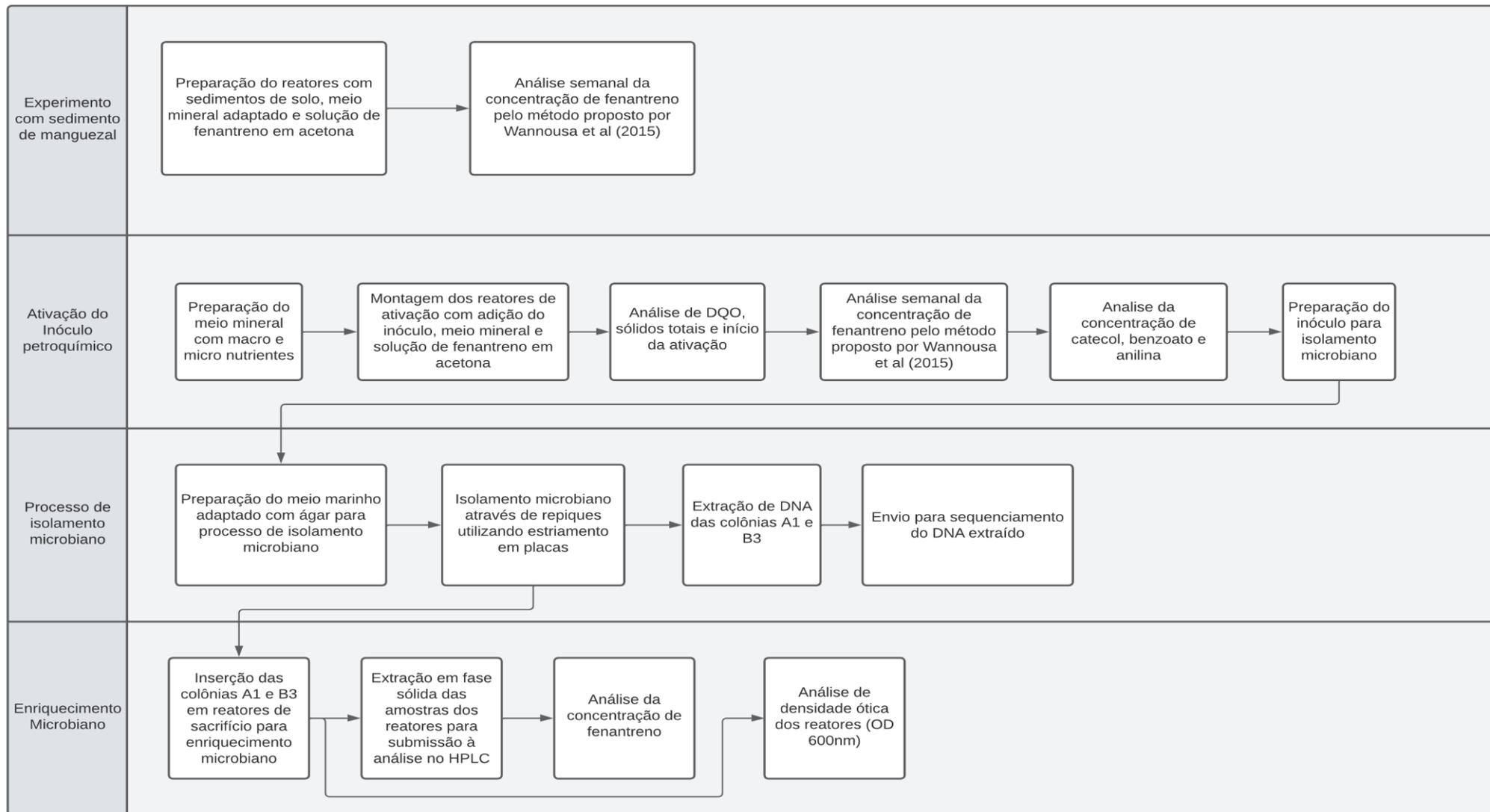
1. Enriquecer cepas selecionadas capazes de sobreviver em ambientes contaminados com fenantreno.
2. Realizar o isolamento, seleção e a identificação microbiana.
3. Estudar o processo de biodegradação do fenantreno a partir de cepas bacterianas isoladas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi subdividido em 4 etapas, sendo essas presentes no fluxograma abaixo:

Figura 1 – Fluxograma das etapas do estudo.

FLUXOGRAMA DE EXPERIMENTOS



Fonte: O Autor (2023)

4.1 MICROCOSMOS INOCULADOS COM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

4.1.1 MONTAGEM DOS MICROCOSMOS

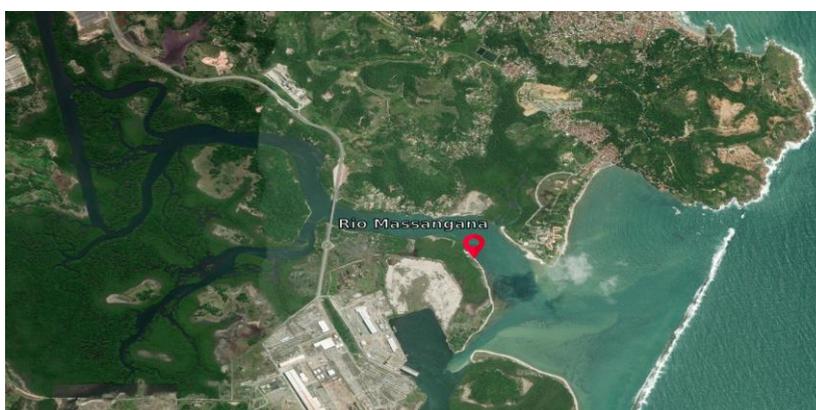
O experimento consistiu no primeiro processo de enriquecimento microbiano a partir de microcosmos em triplicata, contendo sedimento de solo, meio mineral e solução de fenantreno em acetona, onde a concentração de fenantreno nos microcosmos foi analisada semanalmente.

O sedimento de solo utilizado foi extraído do estuário do rio Massangana como está presente na Figura 2 e foi escolhido por ter sido atingido pelo derramamento de óleo 4 meses anterior à extração *in loco*. Esse sedimento foi extraído entre 0 e 20 cm do solo e sofreu peneiramento em uma malha de 1mm para retirada de pedras e raízes, sendo sua composição majoritária de areia fina, assim como realizado em de Almeida et al. (2022).

Para o meio mineral, foi utilizado o meio mineral adaptado com sais minerais e concentrações presentes na Tabela 1 assim como em Edwards e Grbic-Galic, (1994), enquanto para o fenantreno, foi utilizada solução de fenantreno em acetona na concentração de 5000 mg/L.

Por fim, para a montagem de cada um dos três microcosmos de 100 mL, foi adicionado 50g do sedimento de solo do manguezal, 30 mL do meio mineral adaptado e 1 mL solução contaminada de fenantreno em acetona.

Figura 2 – Mapa do local de extração do sedimento do rio utilizado.



Fonte: Scribble Maps (2023)

Tabela 1 - Concentrações dos compostos no meio mineral utilizado para os microcosmos.

Solução	Composto	Concentração (mg L⁻¹)
Solução tampão	K ₂ HPO ₄	348
	KH ₂ PO ₄	272
Solução salina	NH ₄ Cl	535
	CaCl ₂ .2H ₂ O	48
	FeCl ₂ .4H ₂ O	20
Solução de micronutrientes	H ₃ BO ₃	60
	ZnCl	0,2
	MnCl ₂	2,0
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,2
	Al ₂ (SO ₄) ₃ .18H ₂ O	0,2
	CoCl ₂ .6H ₂ O	3
	NiCl ₂ .6H ₂ O	1,5
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,2

Fonte: Edwards e Grbic-Galic (1994)

4.1.3 EXTRAÇÃO DO FENANTRENO

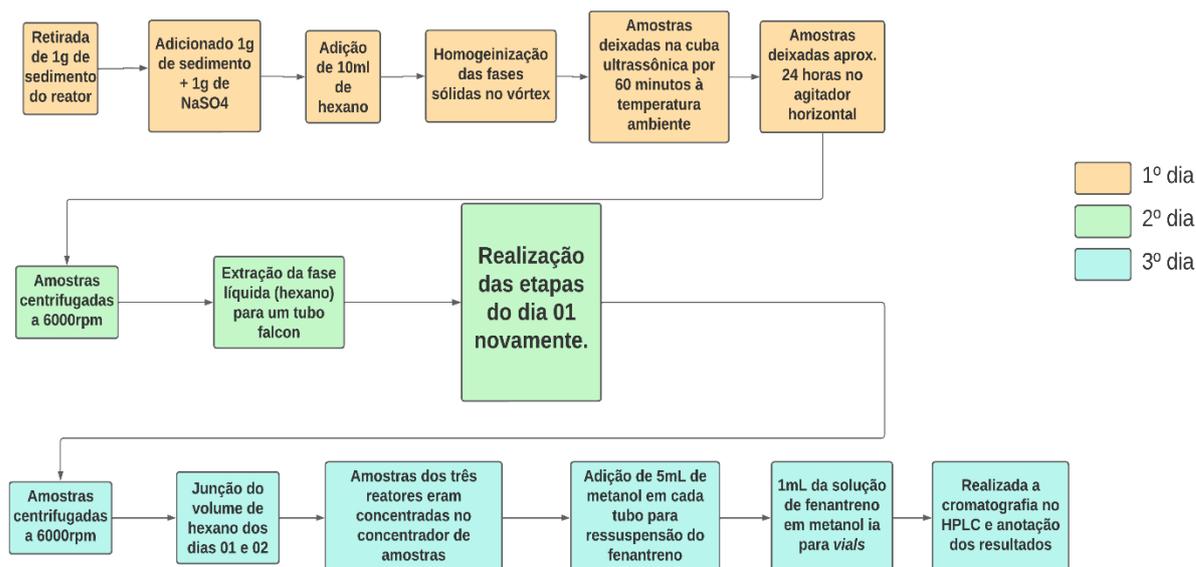
Para a análise de concentração de fenantreno presente nos microcosmos biológicos era feita uma coleta de 1g de sedimento de solo presente em cada um dos microcosmos da triplicata e adicionado 1 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄) com o auxílio de uma espátula para um tubo de ensaio de vidro 13x100 mm com tampa rosqueável, era adicionado 10mL do solvente hexano, levado ao vórtex (Agitador de laboratório vórtex Reax top) por aproximadamente 1 minuto cada tubo ou até a homogeneização da fase sólida dos tubos de ensaio e então eram deixados na cuba ultrassônica digital Solidsteel por 60 minutos à temperatura ambiente. Após isso, as amostras

foram deixadas no agitador horizontal A0-370 da Gehaka por aproximadamente 24 horas em 120 rpm a 28 ± 2 °C.

No dia posterior, as amostras eram centrifugadas na Centrífuga Hermle, modelo Z 206 a 6.000 rpm por 15 minutos para separação da fase líquida e sólida. O hexano que compõe a fase líquida era armazenado em tubos de fundo cônico de polipropileno de 50 mL e eram adicionados mais 10 mL de hexano nos tubos de ensaios de vidro 13x100 mm que ainda continham a fase sólida para realizar mais uma vez o processo de vórtex, ultrassom e agitação horizontal.

No terceiro dia de experimento era repetido o processo de centrifugação para separação das fases, coletado o hexano e misturado com os 10 mL de hexano do dia anterior e então todos os tubos Falcon eram levados ao concentrador de amostras, juntamente com um tubo de fundo cônico idêntico preenchido com água a fim de balancear os movimentos do concentrador de amostras. Todas as amostras eram então postas sem tampa para permitir a evaporação do solvente hexano nas condições de 60 °C, no modo baixo ponto de ebulição do concentrador (*Low BP*), com 25 minutos de tempo para a fase final e 5 minutos de fase final. Podemos acompanhar o processo de extração de fenantreno a partir do fluxograma presente na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma de metodologia extração de fenantreno.



Fonte: O Autor (2023)

4.1.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Após a evaporação do hexano pelo concentrador de amostras, era adicionado 10 mL de metanol aos tubos contendo o fenantreno, que havia sido dissolvido pelo hexano, a fim de dissolver mais uma vez o fenantreno ainda presente nos tubos de fundo cônico e seguir com o procedimento de análise cromatográfica. Os tubos após adição do metanol eram então agitados levemente a fim de dissolver o fenantreno que havia se acumulado nas paredes do tubo, e então eram extraídos 1mL de cada amostra utilizando-se de pipetas graduadas para vials de 1,5 mL e submetidos à cromatografia no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da Shimadzu, modelo LC20AT.

Para o HPLC (*High-performance liquid chromatography*), foi utilizado uma curva cromatográfica que abrange as concentrações de 0,5 - 12,5 mg/L de fenantreno. As condições de cromatografia líquida de alta eficiência foram um fluxo de fase móvel de 1 mL/minuto, coluna de fase estacionária C18 da MERCK, fase móvel composta de 80% de acetonitrila e 20% de água, detector *Diode-Array Detector* (DAD) para detecção das concentrações de fenantreno, temperatura de forno de 40 °C, tempo de corrida de 8,5 minutos/vial, tempo de retenção de 7,1 minutos e volume inicial de injeção de 20 µL. A curva de calibração para análise de fenantreno utilizada abrangia concentrações de 0,5 mg/L a 12 mg/L. Por fim, era anotado o valor final de concentração a partir de um tempo de retenção previsto na curva de calibração.

Figura 4 – Microcosmos durante o final da primeira semana de análise (T1).



Fonte: O Autor (2022)

4.1.4 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

Para a determinação da cinética de degradação do fenantreno e seus parâmetros foi utilizado o modelo matemático de decaimento de primeira ordem conforme a Equação 1, que é usado para baixas concentrações de substrato.

Equação 1

$$C = C_r + (C_i - C_r) \cdot e^{(-k^{app} \cdot t)}$$

Fonte: Mockaitis et al. (2012)

4.2 ATIVAÇÃO DO INÓCULO PETROQUÍMICO

4.2.1 ATIVAÇÃO DO INÓCULO

Para análises em novas condições de microcosmos, foi notado a necessidade da ativação de um novo inóculo para servir como microbiota dos microcosmos. Para isso, foi utilizado, um inóculo de origem petroquímica presente na Figura 5. Além disso, foram feitas alterações na metodologia de modo que aconteça a degradação do composto, até a etapa de análise no HPLC.

A princípio, foram utilizados 2 erlenmeyers de 250 mL como microcosmos a fim de enriquecer o inóculo petroquímico, garantindo sua ativação para a etapa de isolamento e

enriquecimento microbiano subsequentes. Para isso, utilizou-se do meio mineral presente na Tabela 2, que contém macro e micronutrientes importantes para o processo de enriquecimento da microbiota do inóculo. Mais informações estarão disponíveis após o processo de publicação da dissertação de mestrado que serviu como referência.

Figura 5 – Lodo petroquímico inativado utilizado como inóculo.



Fonte: O Autor (2022)

Tabela 2 - Concentrações do meio mineral adaptado para utilização no processo de isolamento microbiano do inóculo petroquímico.

Tipo	Composto	Concentração (mg L⁻¹)
Macronutrientes	K ₂ PH ₄	26,667
	KH ₂ PO ₄	40,000
	Na ₂ HPO ₄	80,000
	NH ₄ Cl	13,333
	CaCl ₂	0,227
	(NH ₄) ₂ SO ₄	66,667
	MgSO ₄ .7H ₂ O	6,667
Micronutrientes	FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,013
	MoO ₃	0,133
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,373
	H ₂ B ₃ O ₃	0,013
	CoCl ₃ .6H ₂ O	0,080

	MnSO ₄	0,013
	NiSO ₄ .6H ₂ O	0,109
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	25,93

Fonte: O Autor (2022)

O meio líquido era composto de 93,75 mL de água deionizada, 31,25 mL de meio mineral, 25 mL de lodo petroquímico (inóculo) e 0,78mL da solução de fenantreno em acetona (5000 mg/L), resultando em uma concentração de fenantreno de 25,93 mg/L, sendo 100 mL de *headspace* em cada reator. Além disso, foi adicionado 0,4 g de extrato de levedura aos microcosmos para servir de fonte de carbono à microbiota.

A medição do pH inicial do meio mineral foi feita com o medidor de pH mPA 210, a demanda química de oxigênio (DQO) foi feita com e para os sólidos totais utilizou-se da mufla à 550 °C e pesagens na balança analítica do prato de evaporação de cerâmica com o inóculo indicando a pesagem do prato (P1), a pesagem com o inóculo (P2) e a pesagem seca (Ps), sendo calculada da forma:

Equação 2

$$S = \frac{(P_2 - P_1)}{(P_2 - P_s)}$$

Fonte: O Autor

Ao final da ativação do inóculo petroquímico, que durou aproximadamente 2 meses, os microcosmos foram unidos e analisados em concentração de catecol, benzoato e anilina. Após isso, foi iniciado o processo de plaqueamento da microbiota.

4.3 ISOLAMENTO MICROBIANO ATRAVÉS DO PLAQUEAMENTO

Para o isolamento microbiano, foi preparado um meio marinho adaptado com ágar assim como utilizado em Eldon R. Rene (2006), et al para utilizar como meio sólido nas placas de Petri, sendo os compostos e as concentrações descritos na Tabela 3.

O meio produzido foi filtrado por filtração à vácuo como presente na Figura 6 com auxílio de uma bomba para sucção do meio líquido através do filtro, sendo esses de microfibras de vidro Whatman com diâmetro de 47 mm e poros de 1,2 μm até a filtragem completa do meio líquido, sendo após o processo adicionado a quantidade de ágar da Tabela 3.

Figura 6 – Processo de filtração à vácuo do meio marinho adaptado



Fonte: O Autor (2022)

Para o processo de plaqueamento foram utilizadas Placas de Petri 100x15 mm e alças de inoculação de 10 μ L. O plaqueamento foi feito dentro da cabine de fluxo laminar presente na Figura 7, sendo feita a pré-higienização dentro da cabine com álcool 70% e esterilização com raios ultravioletas (UV) seguindo cuidados para evitar ao máximo contaminação das placas com cepas indesejadas.

Figura 7 – Cabine de fluxo laminar utilizada no processo de repiques.



Fonte: O Autor (2022)

O procedimento de início do plaqueamento consistiu no estriamento da microbiota do momento após a ativação do inóculo em uma placa de Petri, onde o ágar presente nas placas que foi preparado com o meio adaptado. A cada novo estriamento das cepas, novas placas foram sendo necessárias, uma vez que era notada diferenciação visual entre diferentes grupos bacterianos em diferentes segmentos das estrias.

Tabela 3 - Concentrações do meio líquido 2216 adaptado para utilização no processo de isolamento microbiano do inóculo.

Concentração dos compostos no meio 2216 adaptado (mg/L)	
Composto	Concentração (mg L ⁻¹)
Citrato férrico	100,0
Cloreto de sódio	19450,0
Cloreto de magnésio	8800,0
Sulfato de sódio	3240,0
Cloreto de cálcio	1800,0
Cloreto de potássio	550,0
Bicarbonato de sódio	160,0
Brometo de potássio	80,0

Cloreto de estrôncio	34,0
Ácido bórico	22,0
Silicato de sódio	4,0
Fluoreto de sódio	2,4
Nitrato de amônia	1,6
Fosfato de sódio	8,0
Peptona	5000,0
Fenantreno	198,8
Extrato de levedura	1000,0
Ágar (adicionado após filtração)	18750,0

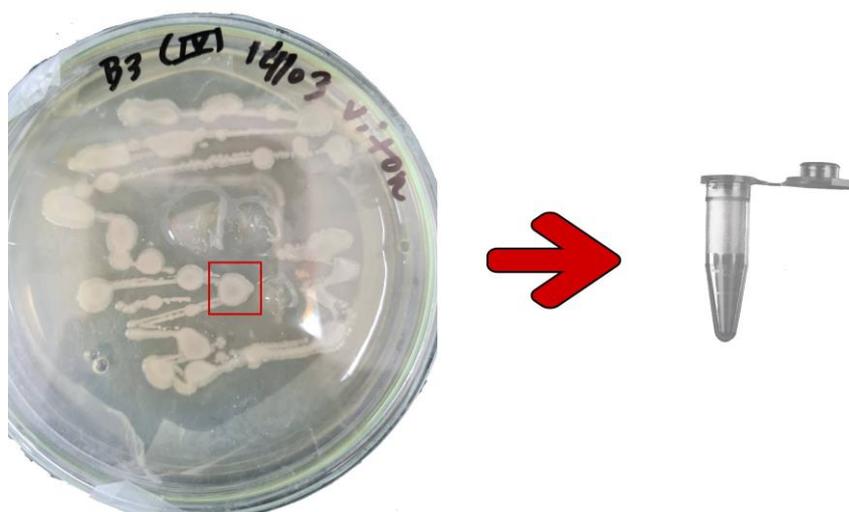
Fonte: Eldon R. Rene adaptado

Após o processo de isolamento, as cepas que melhor se adaptaram ao meio com o fenantreno foram submetidas ao processo de identificação microbiana, a fim de obter resultados para comparação com a base de dados *MG-RAST*, assim podendo identificar geneticamente a microbiota do local.

As cepas escolhidas juntamente com o inóculo armazenado refrigerado anterior ao processo de plaqueamento foram enviados para o laboratório NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, SP, Brasil) através de microtubos tipo Eppendorfs contendo 0,5 mL de glicerol e um recorte quadrado da amostra da região do plaqueamento de cada Placa, conforme na Figura 8.

Após isso, foi utilizado do mesmo método de inserção de ágar, porém para preparação de oito microcosmos de sacrifício, a fim de seguir com análise de degradação de fenantreno.

Figura 8 – Recorte da região do meio sólido da placa de Petri contendo a colônia de interesse.



Fonte: O Autor (2023)

4.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA E PROCESSAMENTO DE DADOS

O processo de análise do material genético das cepas foi realizado por meio do método de metabarcoding. A partir das análises de DNA da microbiota, foi possível armazenar os dados de nucleotídeos desses DNAs em formato de texto no formato de “.fasta” e “.fastq”. Com isso, podemos realizar comparações entre esses arquivos e bancos de dados de bases nitrogenadas sequenciadas de microbiotas já catalogadas e relacionar o sequenciamento presente no arquivo FASTA com o banco de dados. O *MG-RAST* foi o banco de dados escolhido para fazer essa comparação com o DNA extraído do reator, inóculo, isolado A1 e isolado B3.

Para o pós-processamento dos dados, foi utilizado o Past 4.03 e o Origin 2022, de modo que fosse possível relacionar a base de dados obtida pelo MG-RAST com gráficos que auxiliam no entendimento das colônias analisadas.

4.5 ENRIQUECIMENTO MICROBIANO E DEGRADAÇÃO DO FENANTRENO

4.5.1 MONTAGEM DO PROCESSO DE ENRIQUECIMENTO DOS MICROCOSMOS

Foram preparados oito microcosmos aeróbios para enriquecimento da microbiota presente no plaqueamento, sendo utilizado um meio líquido similar ao 2216 presente no

plaqueamento, como podemos ver na Tabela 4. Os microcosmos preparados adicionando estão como os presentes na Figura 9.

Figura 9 – Configuração dos microcosmos de enriquecimento microbiano utilizados.



Fonte: O Autor (2022)

Tabela 4 - Concentrações do meio líquido 2216 adaptado para utilização no processo de enriquecimento microbiano.

Concentração dos compostos no meio 2216 adaptado (mg/L)	
Composto	Concentração (mg L ⁻¹)
Citrato férrico	140,0
Cloreto de sódio	27250,0
Cloreto de magnésio	12320,0
Sulfato de sódio	4536,0
Cloreto de cálcio	2500,0
Cloreto de potássio	770,0
Bicarbonato de sódio	224,0

Brometo de potássio	120,0
Cloreto de estrôncio	47,5
Ácido bórico	30,8
Silicato de sódio	5,6
Fluoreto de sódio	3,4
Nitrato de amônia	2,2
Fosfato de sódio	11,2
Peptona	7000,0
Fenantreno	365,0
Extrato de levedura	1400,0

Fonte: Houjin Li (2005) adaptado

4.5.2 FILTRAGEM À VÁCUO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A cada 10 dias eram feitas medições de densidade ótica (OD 600) e de concentração de fenantreno dos microcosmos. As amostras eram mantidas em movimento por um agitador horizontal à 100 rpm entre os processos de medições.

Para medir o OD 600 de cada reator, era preparada uma solução diluída em água destilada, sendo a diluição de 4:1 e então submetido ao espectrofotômetro Spectroquant prove 300 da Merck para o comprimento de onda citado.

Para o acompanhamento da degradação do fenantreno a amostra dos microcosmos era inicialmente filtrada à vácuo e extraída pelo processo de *solid phase extraction* (SPE). Na filtragem à vácuo, o meio líquido era submetido à sucção pela bomba Primatec modelo 131 para atravessar o filtro de fibra de vidro Whatman com poros variados, sendo priorizado o de menor poro de 1,2 µm chegando até poros de 0,45 mm e logo após era iniciado a extração em fase sólida (SPE) com cartuchos C18-E da Merck sendo este devidamente limpo com metanol, ativados com solução de 5% isopropanol e 95% água destilada, passado o meio líquido dos microcosmos e por fim 10 ml de diclorometano para captação do fenantreno retido nas colunas.

Para movimentação dos líquidos pela coluna era utilizada a mesma bomba Primatec modelo 131 utilizado no processo de filtração. Esse processo resultava na produção de uma solução de fenantreno diluído em diclorometano e armazenado em frascos âmbar para cada reator analisado. A disposição dos materiais durante o processo de utilização da coluna C18

pode ser observado na Figura 10 e os frascos âmbar com seus respectivos *vials* estão na Figura 11. Os frascos eram mantidos na capela de exaustão por aproximadamente 24 horas ou até evaporação completa do diclorometano. Era então adicionado 2 mL de metanol para diluição do fenantreno dos frascos e transferidos 1 mL para *vials*.

Figura 10 – Processo de extração em fase sólida (SPE) utilizando a coluna C18-E.



Fonte: O Autor (2022)

Figura 11 – Frascos âmbar destinados à análise de cada reator.



Fonte: O Autor (2022)

4.5.3 MEDIÇÕES DE FENANTRENO PELO HPLC

Foram realizadas quatro análises de concentração em duplicata nos dias 0, 10, 20 e 30 do início de enriquecimento dos microcosmos, sendo o fenantreno suspenso em metanol e analisado no HPLC com curva cromatográfica de 0,05 a 0,5 mg/L. As condições cromatográficas foram as mesmas do experimento com sedimento de manguezal, apenas diferenciando-se na curva cromatográfica utilizada, uma vez que seriam detectados menores concentrações de fenantreno. Utilizou-se um fluxo de fase móvel de vazão 1 mL/minuto, uma coluna de fase estacionária C18 da MERCK, fase móvel composta de 80% de acetonitrila e 20% de água, detector *Diode-Array Detector* (DAD) para detecção das concentrações de fenantreno, temperatura de forno de 40 °C, tempo de corrida de 8,5 minutos/vial, tempo de retenção de 7,1 minutos e volume inicial de injeção de 20 µL.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO COM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

5.1.1 CONCENTRAÇÃO DE FENANTRENO

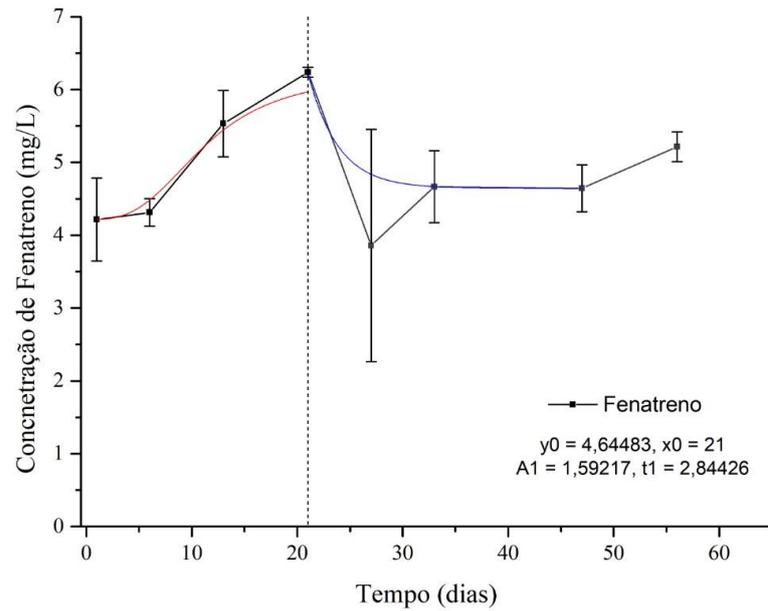
A concentração de fenantreno durante as oito semanas analisadas dos microcosmos com sedimento de manguezal estão presentes na Tabela 5. As curvas de decaimento da concentração de fenantreno nos microcosmos estão presentes na Figura 12 e Figura 13, sendo essa a curva gerada quando utilizada a equação de cinética de degradação de Mockaitis et al. (2012). O y_0 representa o C_{residual} da Equação 1, o x_0 representa a inclinação máxima registrada k_1^{app} .

Tabela 5 - Concentrações de fenantreno detectado pelo HPLC ao longo das 8 semanas de experimento.

Concentração de fenantreno ao longo das semanas (mg L ⁻¹)						
Semana	1A	2A	3A	Média	D.P.	C. Var.
T0	3,63	4,77	4,24	4,21	0,57	13,53%
T1	4,15	4,52	4,28	4,31	0,19	4,36%
T2	6,05	5,35	5,20	5,53	0,45	8,22%
T3	6,29	6,27	6,16	6,24	0,07	1,11%
T4	1,27	4,42	3,80	3,00	1,59	53,20%
T5	4,12	5,09	4,78	4,67	0,49	10,59%
T6	4,88	4,78	4,28	4,65	0,32	6,96%
T7	5,00	5,42	5,23	5,21	0,21	3,94%
T8	4,89	5,70	5,15	5,25	0,41	7,82%

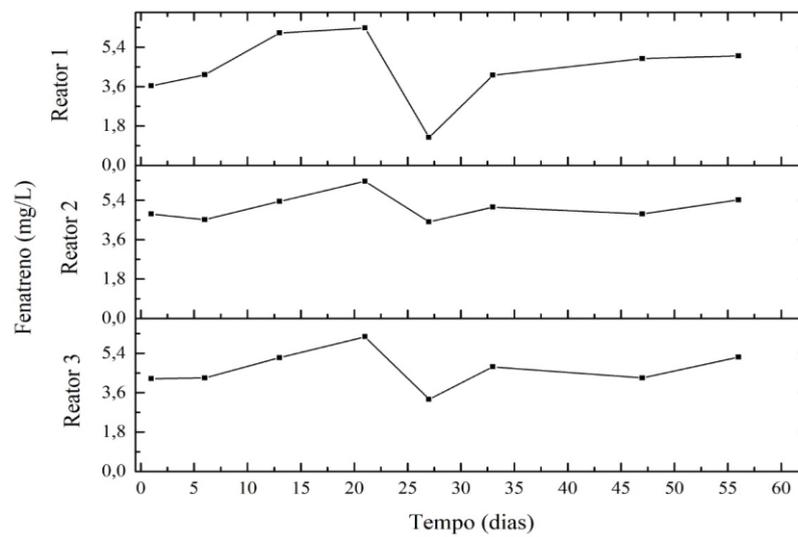
Fonte: O Autor (2022)

Figura 12 – Curva de decaimento da concentração de fenantreno dos microcosmos.



Fonte: O Autor (2022)

Figura 13 – Curva de decaimento da concentração de fenantreno de cada reator.



Fonte: O Autor (2022)

5.2 ATIVAÇÃO DO INÓCULO PETROQUÍMICO

5.2.1 DENSIDADE ÓPTICA

O OD 600 medido antes anterior à ativação do inóculo está presente na Tabela 6.

Tabela 6 – OD 600 do inóculo anterior à sua ativação.

Semana	Densidade Óptica (600nm)			Média	D.P.	C. Var.
	1A	2A	3A			
Início	0,294	0,297	0,323	0,305	0,013	4,27%

Fonte: O Autor (2022)

5.2.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH), DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) E SÓLIDOS TOTAIS DO INÓCULO

No início da ativação do inóculo, foi feita a medição do potencial hidrogeniônico do meio mineral utilizado, do DQO do inóculo e sólidos totais do inóculo, onde foram obtidos os valores de pH=6,73 a 31 °C/23 mV, DQO de 6065,47 mgDQO/L e 42,37% de sólidos totais presentes no inóculo petroquímico.

5.2.3 CONCENTRAÇÃO DE FENANTRENO

A concentração de fenantreno medida durante o processo de ativação do inóculo petroquímico está presente na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações de fenantreno detectado pelo HPLC ao longo da ativação do inóculo petroquímico.

Concentração de fenantreno do meio (mg L ⁻¹)					
	1A	2A	Média	D.P.	C. Var.
Inicial	6,444	7,551	7,00	0,78	11,18%
Final	6,296	7,033	6,66	0,52	7,82%

Fonte: O Autor (2022)

5.3 ENRIQUECIMENTO MICROBIANO

5.3.1 DENSIDADE ÓPTICA

Tabela 8 - Absorbância medida das análises de densidade óptica na faixa de 600nm para o Reator com a cepa A1.

Densidade Óptica (OD 600)							
Colônia	A ₁				Média	D.P.	C. Var (%)
Dia	1	2	3	4			
0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000
10	0,319	0,289	0,301	0,318	0,307	0,014	4,704
20	0,465	0,484	0,458	0,480	0,472	0,012	2,604
30	0,303	0,300	0,303	0,300	0,302	0,002	0,574

Fonte: O Autor (2022)

Tabela 9 - Absorbância medida das análises de densidade óptica na faixa de 600nm para o Reator com a cepa B3.

Densidade Óptica (OD600)								
Colônia		B ₃				Média	D.P.	C. Var (%)
Dia	1	2	3	4				
0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,0010	0,000	0,000	
10	0,293	0,287	0,337	0,26	0,2942	0,032	10,845	
20	0,354	0,354	0,354	0,354	0,3428	0,015	4,414	
30	0,324	0,339	0,324	0,339	0,3320	0,009	2,612	

Fonte: O Autor (2022)

5.3.2 CONCENTRAÇÃO DE FENANTRENO DOS MICROCOSMOS A1 E B3

A partir da análise da degradação do fenantreno dos microcosmos de enriquecimento microbiano A1 e B3, obtivemos os resultados de concentração presentes na Tabela 10 e Tabela 11.

Tabela 10 - Degradação do fenantreno para o reator A1

Concentração de fenantreno (mg L ⁻¹)						
Colônia		A ₁		Média	D.P.	C. Var (%)
Dia	1	2				
0	0,80	0,80	0,80	0,00	0,00	

10	0,07	0,04	0,06	0,02	0,39
20	0,26	0,26	0,26	0,00	0,00
30	0,15	0,22	0,19	0,05	0,27

Fonte: O Autor (2022)

Tabela 11 - Degradação do fenantreno para o reator B3

Concentração de fenantreno (mg L ⁻¹)					
Colônia	B ₃		Média	D.P.	C. Var (%)
Dia	1	2			
0	0,80	0,80	0,80	0,00	0,00
10	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00
20	0,14	0,16	0,15	0,01	9,43
30	0,12	0,13	0,13	0,01	5,66

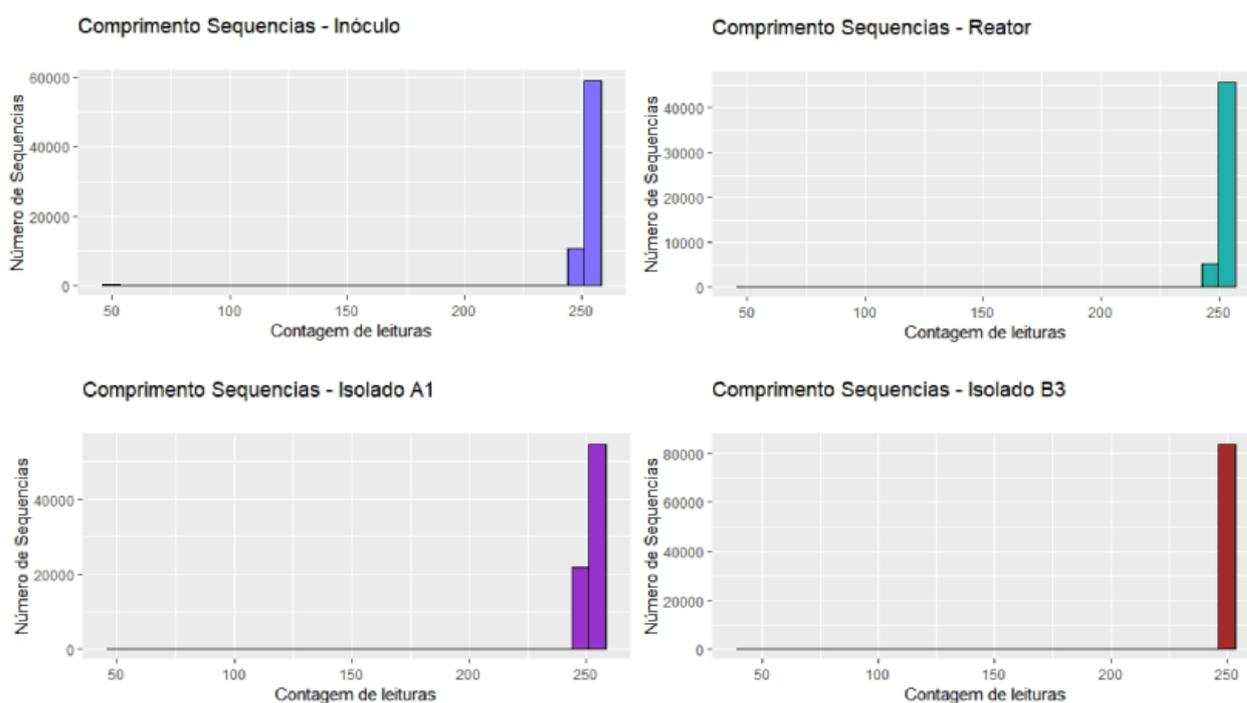
Fonte: O Autor (2022)

5.4 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

5.4.1 CONTIGS DE 250PB

Para os resultados obtidos na identificação microbiana das cepas A1 e B3, foi requerido análises de laboratório com 250 pares de base (pb), de modo que fosse comprovado a eficiência do sequenciamento e dos *primers* utilizados. Conseguimos observar na Figura 14 a predominância de 250 bp dentro do comprimento das seqüências solicitadas.

Figura 14 – Comprimento dos *contigs* do sequenciamento das amostras do reator, inóculo, A1 e B3.

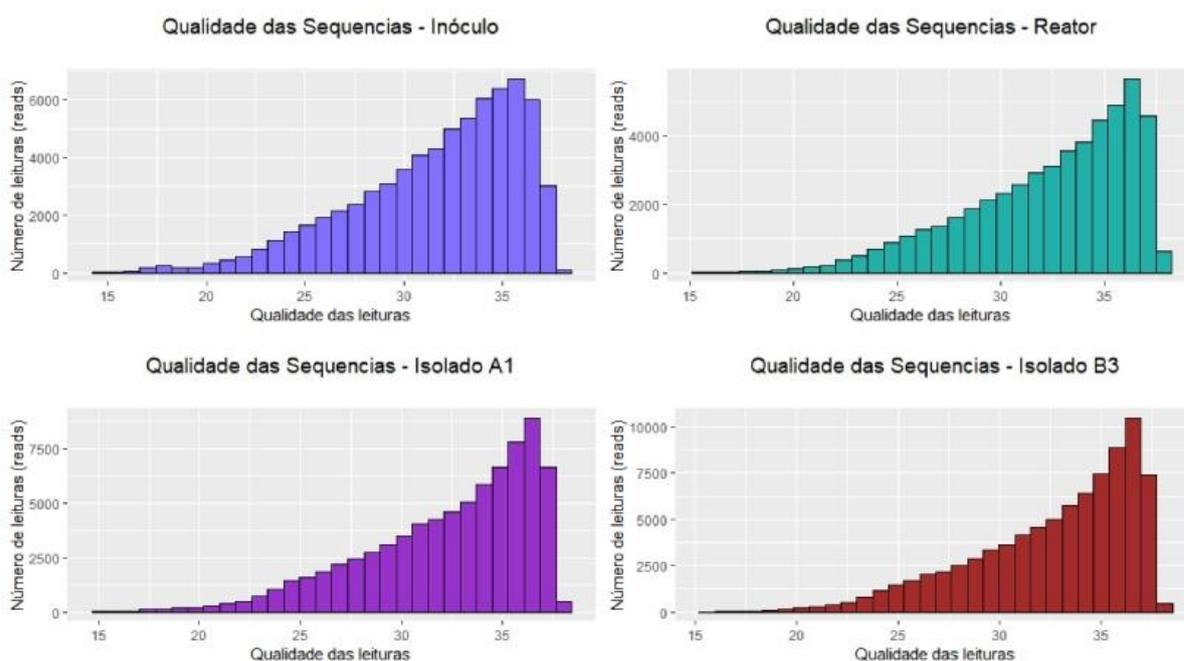


Fonte: O Autor (2022)

5.4.2 ÍNDICE DE PHRED

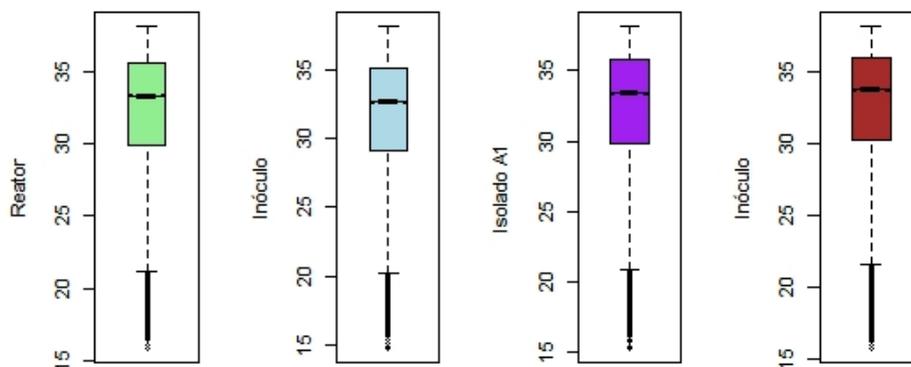
Para a observação da qualidade da amostra, obtivemos o índice de Phred (*phred quality score*) como indicador, sendo maiores valores indicativos de maior número de leituras (*reads*) e maior qualidade da identificação. A Figura 15 e Figura 16 nos mostram a predominância desse índice em valores no intervalo do índice entre 30 e 35.

Figura 15 – Distribuição da qualidade das leituras com base no número de *reads* das amostras do reator, inóculo, A1 e B3.



Fonte: O Autor (2022)

Figura 16 – *Boxplot* da distribuição da qualidade das leituras com base no número de *reads* das amostras do reator, inóculo, A1 e B3.

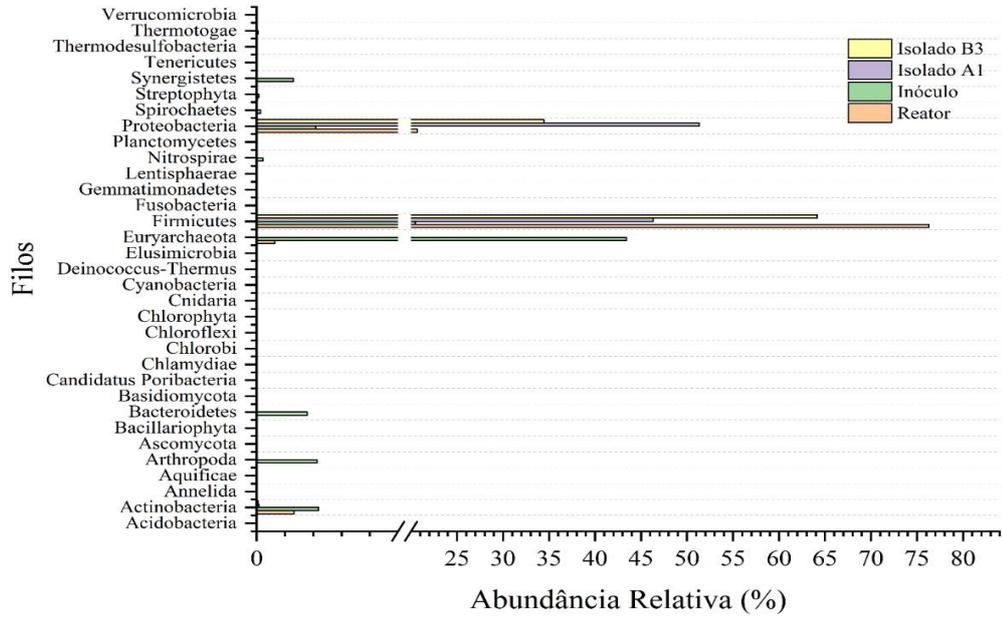


Fonte: O Autor (2022)

5.4.1 COMPARAÇÃO DO FASTA E FASTQ NO MG-RAST

A partir dos dados obtidos pela comparação dos nucleotídeos presentes nas amostras, foi possível fazer análise dos filis presentes em cada como é apresentado na Figura 18. Também conseguimos fazer análise do crescimento de cada gênero bacteriano a partir do *chord diagram* presente na Figura 19.

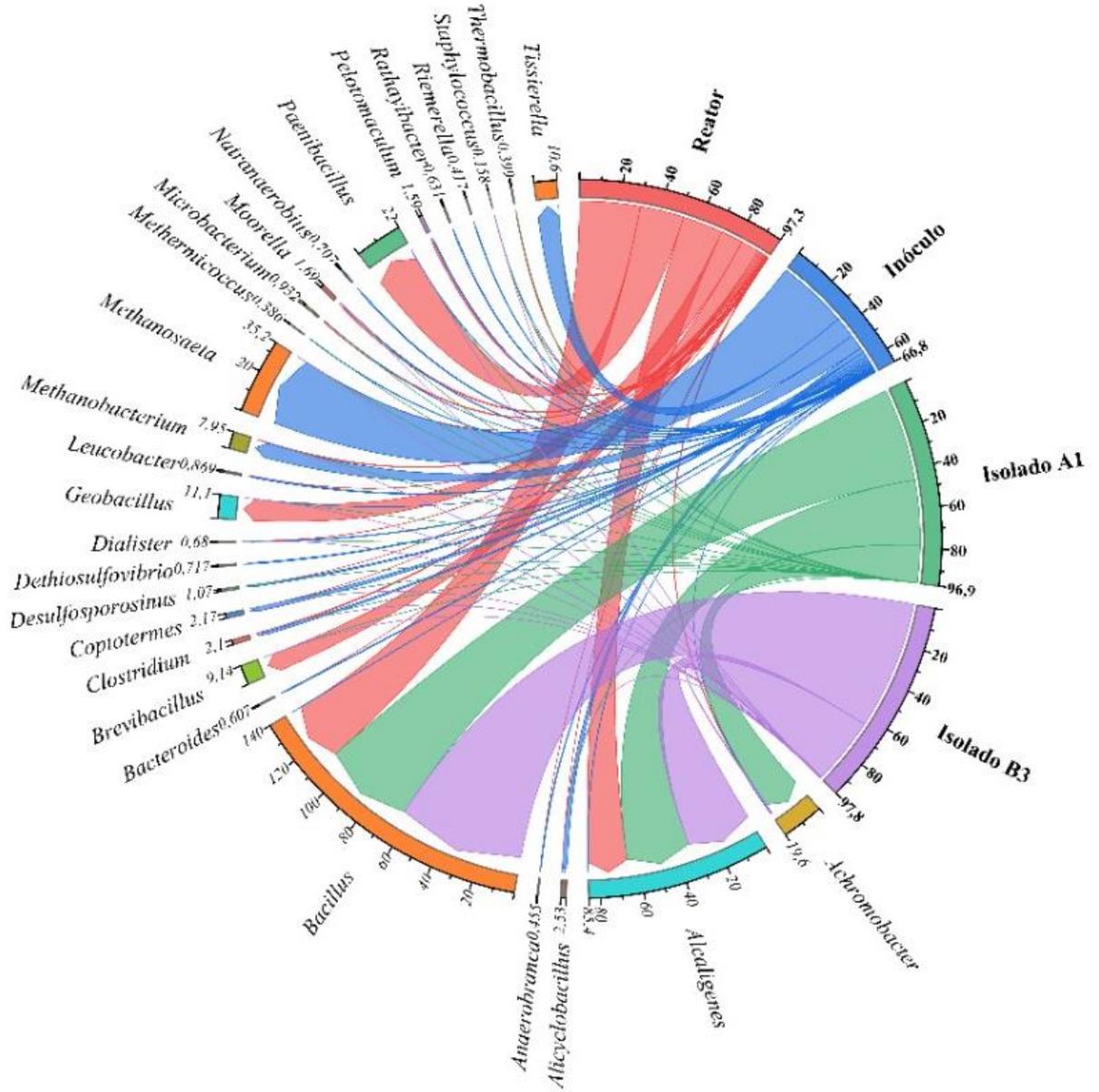
Figura 17 – Abundância Relativa entre os filos sequenciados das cepas do Reator, Inóculo, A1



e B3.

Fonte: O Autor (2022)

Figura 18 – *Chord diagram* dos gêneros presentes e suas predominâncias do Reator, Inóculo, A1 e B3.



Fonte: O Autor (2022)

6 CONCLUSÕES

6.1 SEDIMENTO DO MAGUEZAL COMO INÓCULO

A partir da análise da concentração de fenantreno no experimento utilizando sedimento de solo de manguezal atingido pelo derramamento de óleo, conseguimos observar que não houve uma presença de uma possível microbiota capaz de utilizar o fenantreno como fonte de carbono para suas atividades metabólicas, apesar do solo extraído também se encontrar próximo à refinaria de petróleo de Abreu e Lima (RNEST), uma vez que a concentração de fenantreno não diminuiu durante as oito semanas do experimento.

Mesmo assim, o experimento foi importante para entender melhor como a microbiota do sedimento do ecossistema de manguezal se comporta após uma contaminação indevida por derramamento do óleo bruto.

6.2 LODO PETROQUÍMICO COMO INÓCULO

Para entendimento da degradação do fenantreno a partir de microbiota selecionada para realizar esse metabolismo, a adição do inóculos nos microcosmos de enriquecimento foi fundamental. A partir do inóculo foi possível fazer diversas análises de degradação que não haviam sido possíveis com o inóculo de sedimento.

6.3 MÉTODO SPE PARA LEITURA DA CONCENTRAÇÃO

A partir do sucesso das leituras de concentrações realizadas com a extração em fase sólida (SPE) utilizando a coluna C18-E da Merck para introdução da solução final no

cromatógrafo líquido de alta eficiência, conseguimos observar que o procedimento atendeu à necessidade de retenção do fenantreno dentro da coluna.

6.4 PLAQUEAMENTO COMO SELEÇÃO MICROBIANA

O plaqueamento como seleção microbiana se mostrou um método adequado e foi capaz de realizar a seleção de um inóculo de lodo petroquímico em pequenos grupos bacterianos mais homogêneos que se mostraram de maior interesse para a pesquisa.

6.5 PERCENTUAL DE DEGRADAÇÃO DO FENANTRENO

6.5.1 PRINCIPAIS GRUPOS MICROBIANOS

Ao fim do experimento que constitui o sequenciamento do material genético do gene 16S rRNA pelo processo de *metabarcoding*, pode-se observar os filos microbianos encontrados no inóculo petroquímico que foram responsáveis pela degradação do fenantreno. Os filos com material genético sequenciados que obtiveram maior desenvolvimento no ambiente contaminado com o fenantreno foram os Actinobacteria, Bacteroidetes, Euryarchaeota, Firmicutes, Protobacteria e Synergistetes. Também se notou que o filo Firmicutes possui grande importância na degradação de fenantreno pois contempla as principais famílias responsáveis pela degradação deste xenobiótico (*Bacillus*, Clostridiales, Clostridiaceae, etc). A Figura 10 mostra como se comportou a abundância dos filos nas cepas A1 e B3.

Foi possível verificar, também, a percentagem de microrganismos em comum entre todas as condições estudadas, dessa forma foi possível confirmar o enriquecimento microbiano das bactérias degradadoras de fenantreno. Esses grupos microbianos podem estar envolvidos

diretamente na degradação do fenantreno ou possuírem sintrofismo metabólico necessário para sobreviver à presença do hidrocarboneto, assim como às condições ambientais aplicadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BP. Statistical Review of World Energy 2022. 2022. Disponível em: <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2022-full-report.pdf>. Acesso em agosto 2023

ALMEIDA, Felipe Filgueiras de. Biorremediação anaeróbia de sedimento de manguezal contaminado por fenantreno. 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

Aislabie, J., Saul, D.J., Foght, J.M., 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10, 171–179.

APHA-AWWA-WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541.

Atlas, R.M., 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 35, 317–327.

Babaev, E.R., Mamedov, P.S., Adygezalova, V.A., Eivazova, I.M., Poletaeva, O.Y., 2019. Transformation of Heavy Balakhani Oil Hydrocarbons in the Course of Oil Biodegradation in Soil. *Solid Fuel Chem.* 53, 90–95.

Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–D145.

Mahjoubi, M., Cappello, S., Souissi, Y., Jaouani, A., Cherif, A., 2018. Microbial Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon– Contaminated Marine Environments, in: *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering*. InTech.

Mockaitis, G., Rodrigues, J.A.D., Foresti, E., Zaiat, M., 2012. Toxic effects of cadmium (Cd²⁺) on anaerobic biomass: Kinetic and metabolic implications. *J. Environ. Manage.* 106, 75–84.

Motteran, F., Braga, J.K., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2014. Methanogenic potential of an anaerobic sludge in the presence of anionic and nonionic surfactants. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 96, 198–204. doi:10.1016/j.ibiod.2014.10.001

Mulabagal, V., Yin, F., John, G.F., Hayworth, J.S., Clement, T.P., 2013. Chemical fingerprinting of petroleum biomarkers in Deepwater Horizon oil spill samples collected from Alabama shoreline. *Mar. Pollut. Bull.* 70, 147–154.

Oliveira, E., Manzano, F., 2020. Manchas de óleo chegam a mais de 1 mil pontos do litoral do Nordeste e estados do Sudeste. [WWW Document]. *O Globo*, Rio Janeiro, 24 jan. 2020.

Peters, K.E., Peters, K.E., Walters, C.C., Moldowan, J.M., 2005. *The Biomarker Guide*, Volume 2. ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Reyes, C.Y., Moreira, ícaro T.A., Oliveira, D.A.F., Medeiros, N.C., Almeida, M., Wandega, F., Soares, S.A.R., Oliveira, O.M.C. de, 2014. Weathering of Petroleum Biomarkers: Review in Tropical Marine Environment Impacts. *OALib* 01, 1–13.

Siniscalchi, L.A.B., Vale, I.C.C., Antunes, J.D., Chernicharo, C.A. de L., Araújo, J.C. de, 2016. Enriquecimento de microrganismos metanotróficos a partir de lodo de reator UASB tratando esgotos domésticos. *Eng. Sanit. e Ambient.* 21, 109–122.

Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. et al. In Situ Bioremediation Potential of an Oily Sludge-Degrading Bacterial Consortium. *Curr Microbiol* 43, 328–335 (2001).

Mishra, B., Varjani, S., Kumar, G., Awasthi, M. K., Awasthi, S. K., Sindhu, R., Binod, P., Rene, E. R., & Zhang, Z. (2021). Microbial approaches for remediation of pollutants: Innovations, future outlook, and challenges. *Energy & Environment*, 32(6), 1029–1058

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

Eldon R. Rene, Mi Seon Jo, Soo Hong Kim, Hung Suck Park.(2006). Batch studies for the biodegradation of BTEX mixtures under aerobic conditions.

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

Houjin Li, Wenjian Lan, Chuanghua Cai, Yipin Zhou, Yongcheng Lin, Biotransformation of Limonene by Marine Bacteria, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, Volume 34, Issue 7, 2006

Di Toro, D.M., McGrath, J.A. and Hansen, D.J. (2000), Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 1951-1970. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190803>

Arfin Imam, Sunil Kumar Suman, Pankaj K. Kanaujia, Anjan Ray, Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review, *Bioresource Technology*

Edoardo Puglisi, Fabrizio Cappa, George Fragoulis, Marco Trevisan, Attilio A.M. Del Re, Bioavailability and degradation of phenanthrene in compost amended soils, *Chemosphere*

Agnieszka Mroziak, Zofia Piotrowska-Seget, Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds, *Microbiological Research*

Rainer U. Meckenstock, Matthias Boll, Housna Mouttaki, Janina S. Koelschbach, Paola Cunha Tarouco, Philip Weyrauch, Xiyang Dong, Anne M. Himmelberg; Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1 March 2016; 26 (1-3): 92–118. <https://doi.org/10.1159/000441358>