



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOQUÍMICA:  
PETRÓLEO E MEIO AMBIENTE – POSPETRO

LAVÍNIA SILVA CONCEIÇÃO

**EFICIÊNCIA DE CONSÓRCIO MICROBIANO DEGRADADOR DE ALCANO  
DURANTE A BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL COM  
PETRÓLEO**

Salvador  
2020

**LAVÍNIA SILVA CONCEIÇÃO**

**EFICIÊNCIA DE CONSÓRCIO MICROBIANO DEGRADADOR DE ALCANO  
DURANTE A BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL COM  
PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente – Pospetro, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Geoquímica do Petróleo e Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Danúsia Ferreira Lima

Orientador: Prof. Dr. Eddy José Francisco Oliveira

Salvador  
2020

**Lavínia Silva Conceição**

**EFICIÊNCIA DE CONSÓRCIO MICROBIANO DEGRADADOR DE ALCANO  
DURANTE A BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL COM  
PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente – Pospetro, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Geoquímica do Petróleo e Ambiental.

Salvador, 31 de março de 2020.

Banca examinadora

Danúsia Ferreira Lima – Orientadora \_\_\_\_\_  
Doutora em Geologia pela Universidade Federal da Bahia  
Universidade Federal da Bahia



Eddy José Francisco de Oliveira - Orientador \_\_\_\_\_  
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo  
Universidade Estadual de Feira de Santana

Sarah Adriana Rocha Soares \_\_\_\_\_  
Doutora em Química Analítica pela Universidade Federal da Bahia  
Universidade Federal da Bahia

Fábio Alexandre Chinália \_\_\_\_\_  
Doutor em Microbiologia Ambiental pela University of Aberdeen  
Universidade Federal da Bahia

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e ao senhor Jesus, pela minha vida, por tudo o que sou, todas as bênçãos, proteção, livramentos e por sempre ouvir minhas orações.

Aos meus admiráveis orientadores que gosto muito, Danúcia Lima (exemplo de mulher) e Eddy Oliveira, pela oportunidade, confiança, ajuda, incentivo, paciência, conselhos, ensinamentos, que Deus os abençoe sempre!

Aos meus amados pais Maria de Lourdes (Meu exemplo e inspiração) e Antônio Braz (melhor pai do mundo), por acreditaram nos meus sonhos fazendo sempre o possível para torná-los realidade. Dedico todas as minhas conquistas a vocês! Às minhas irmãs Ivanize, Jamile, Juliana e Cláudia e meus sobrinhos lindos Neto, Antônio e Benjamin, que sempre me trouxeram muita alegria.

A minha tia Marina, meu tio Marracho. A Márcio de Jesus, por toda a ajuda, explicações e contribuições para o meu trabalho. A Nadja Maria e Daiane Francisco, pessoas maravilhosas, me ajudaram sempre que precisei.

Aos colegas do grupo Geomicro por toda a ajuda, colaboração, incentivo e amizade. A Isana Barreto, Gisele Moraes, pelo carinho, ajuda e conselhos, são pessoas maravilhosas, cuja amizade foi um presente de Deus.

Aos professores Antônio Fernando, Gisele, Joil, Jerônimo, Juscelino, e a todos os professores do Pospetro, pelas contribuições, aprendi muito com eles!

A banca de qualificação, ao professor Rogério e Ícaro Thiago, pelas contribuições. Aos professores Sara Rocha e Fábio Chinália pelas contribuições durante a defesa deste trabalho.

A Ilene, Cícero, Alex, Ruy e toda a equipe do Lepetro, onde eu pude realizar minhas análises com excelente estrutura, apoio técnico e científico.

Ao Geomicro, pelo aprendizado sobre microbiologia ambiental, metagenômica, proteômica e metabolômica. Ao Pospetro, pela qualidade, melhores professores e disciplinas, nas quais eu obtive conhecimentos de várias áreas do meio ambiente.

A Shell Brasil, pelo financiamento que permitiu a execução do meu trabalho. A Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Quem disse que amor pode só existir dentro de uma relação entre humanos?  
A natureza faz parte do nosso amanhã e devemos preservá-la, amá-la e fazê-  
la sentir, sim, que é um bem querido.*

*Somos parte da terra e ela é parte de nós. As flores perfumosas são nossas  
irmãs; os gamos, os cavalos, a majestosa águia, todos são nossos irmãos.*

*Os picos rochosos, a fragrância dos bosques, a energia vital do pônei e o  
homem, tudo pertence a uma só família.*

*A límpida água que percorre os regatos e rios não é apenas água, mas o  
sangue de nossos ancestrais.*

*A terra não pertence ao homem branco; o homem branco é que pertence à  
terra. Disso temos certeza. Todas as coisas estão relacionadas como o sangue  
que une uma família. Tudo está associado. O que fere a terra fere também os  
filhos da terra. O homem não tece a teia da vida; é antes um de seus fios. O  
que quer que faça a essa teia, faz a si próprio.*

Chefe Seattle (1986)

## RESUMO

Atualmente o derramamento de petróleo é a principal ameaça para os manguezais, uma vez que seus compostos são tóxicos e de difícil degradação. Nesse sentido, foi montado um experimento de biorremediação com sedimento do manguezal do rio São Paulo, Bahia – Brasil, frequentemente afetado pelo derramamento de óleo. Portanto, este trabalho buscou entender a capacidade dos microrganismos desta região em degradar o petróleo da bacia do Recôncavo. A elaboração do experimento se deu através de um planejamento fatorial, e contou com sete biorreatores ligados a bomba de vácuo, simulando o regime de maré a cada 6 horas. Os biorreatores contiveram 400g de sedimento esterilizado, 4g de petróleo bruto e quantidades variáveis de consórcio encapsulado, visando simular o processo de biorremediação em manguezal. O gene *alkB*, descrito como degradador de n-alcano foi quantificado e comparado com o crescimento microbiano e a degradação da fração saturada do petróleo, durante três tempos do experimento (4 , 17 e 30 dias). Foram realizadas análises geoquímicas de nutrientes (carbono orgânico, nitrogênio e fósforo) e hidrocarbonetos totais do petróleo(HTP), análises microbiológicas (enumeração de fungos e bactérias) e análise molecular (amplificação do gene através da técnica de PCR em tempo real-qPCR). Os resultados mostraram que houve correlação positiva entre o número de cópias de *alkB* e a degradação do petróleo, e o planejamento fatorial apontou que o tempo exerce influência na quantidade de consórcio, durante o processo de biorremediação.

**Palavras – chaves:** Gene, Biodegradação, n-alcenos, Biorremediação, Planejamento fatorial.

## ABSTRACT

Currently, oil spills are the main threat to mangroves since their compounds are toxic and difficult to degrade. In this sense, a bioremediation experiment was set up with mangrove sediment from the São Paulo river, Bahia - Brazil, which is often affected by the oil spill. Therefore, this work sought to understand the capacity of microorganisms in this region to degrade oil in the Recôncavo basin. The design of the experiment took place through factorial planning, and included seven reactors connected to the vacuum pump, simulating the tidal regime every 6 hours. The reactors contained 400g of sterile sediment, 4g of crude oil and varying amounts of encapsulated consortium, in order to simulate the mangrove bioremediation process. The *alkB* gene, described as n-alkane degrader, was quantified, and compared with microbial growth and the HTP / UCM ratio during three times of the experiment (4 days, 17 days, and 30 days). Geochemical analyzes of nutrients (organic carbon, nitrogen, and phosphorus) and total oil hydrocarbons (HTP), microbiological analyzes (enumeration of fungi and bacteria) and molecular analysis (Amplification of the gene through the technique of Real-time PCR-qPCR). The results showed that there was a positive correlation between the number of copies of *alkB* and the degradation of oil, and the factorial design pointed out that time influences the amount of intercropping, which showed greater degradation after the seventeenth day of the experiment.

**Keywords:** Gene, Biodegradation, n-alkanes, Bioremediation, Factorial planning.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1	OBJETIVOGERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
4	<b>EFEITO DO TEMPO E DENSIDADE DE MICRORGANISMOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL DE COM PETRÓLEO .....</b>	<b>14</b>
	RESUMO.....	14
	ABSTRACT.....	14
4.1	INTRODUÇÃO.....	15
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.2.1	<b>Amostragem .....</b>	<b>16</b>
4.2.2	<b>Consórcio microbiano.....</b>	<b>17</b>
4.2.3	<b>Planejamento fatorial para processo de biorremediação .....</b>	<b>18</b>
4.2.4	<b>Montagem do experimento para processo de biorremediação .....</b>	<b>19</b>
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.4.1	<b>Otimização multivariada para experimento de biorremediação.....</b>	<b>22</b>
4.5	CONCLUSÃO.....	26
	AGRADECIMENTOS .....	26
5	<b>GENE ALKANO HYDROXYLASE (alkB) EM EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO NO SEDIMENTO DE MANGUEZAL DA BAHIA DE TODOS OS SANTOS, BAHIA –BRASIL.....</b>	<b>28</b>
	RESUMO.....	28
	ABSTRACT.....	28
5.1	INTRODUÇÃO.....	29
5.2	MATERIAIS E MÉTODO .....	33
5.2.1	<b>Amostragem.....</b>	<b>33</b>
5.2.2	<b>Caracterização do sedimento .....</b>	<b>34</b>
5.2.3	<b>Caracterização do petróleo .....</b>	<b>35</b>
5.2.4	<b>Caracterização do consórcio microbiano .....</b>	<b>35</b>
5.2.5	<b>Montagem e monitoramento do experimento.....</b>	<b>36</b>



5.3	RESULTADOS E DICUSSÃO .....	49
5.3.1	<b>Caracterização do petróleo utilizado no experimento para processo de biorremediação .....</b>	<b>50</b>
5.3.2	<b>Monitoramento do experimento para processo de biorremediação .....</b>	<b>50</b>
5.3.3	<b>Avaliação da degradação de n-alcenos no experimento para processo de biorremediação .....</b>	<b>59</b>
5.4	CONCLUSÃO .....	64
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos saturados, aromáticos, compostos polares e heteroátomos como o nitrogênio, enxofre e oxigênio (ZENELI et al., 2019). Este composto é classificado como um poluente prioritário e recalcitrante em decorrência de sua persistência no ambiente (VARJANI, 2017). Desta forma, quando ocorrem acidentes envolvendo o derramamento de petróleo em ambientes costeiros, impactos ambientais são gerados, principalmente para o manguezal, apontado como ecossistema litorâneo extremamente sensível ao óleo (QUEIROZ; CELINO 2008; ARAÚJO et al., 2020).

A depender de sua concentração no sedimento, o poluente poderá acumular-se ao longo da cadeia trófica, causando mutação genética e morte dos organismos, representando desta forma, uma ameaça atual e futura para os manguezais (SANTOS et al., 2018), entretanto, estudos antigos, realizados em 1940 nos Estados Unidos, sobre microbiologia do petróleo, já relatavam o crescimento de microrganismos na presença de hidrocarbonetos, utilizando-os como única fonte de carbono. O carbono é um elemento importante na formação do esqueleto estrutural dos seres vivos, compondo metade do peso seco de uma célula bacteriana e junto ao nitrogênio e o fósforo, promovem o crescimento dos microrganismos (HASSANSHAHIAN et al., 2014; MADIGAN et al., 2016).

Neste contexto, a biorremediação, consiste em uma técnica natural, que aproveita a habilidade dos microrganismos em degradar compostos tóxicos, podendo ser utilizada para limpeza de áreas contaminadas, contudo, sua eficiência depende da disponibilidade dos nutrientes, umidade adequada, pH, concentração de oxigênio e temperatura. A técnica pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*, e possui duas abordagens principais: bioaumentação e bioestimulação, todas apresentam sucesso em locais contaminados por petróleo (HASSANSHAHIAN et al., 2015; TIRALERPANICH et al., 2018; ZENELI et al., 2019).

A bioaumentação consiste no aumento da comunidade microbiana, através da introdução de cepas. Esta estratégia é mais bem sucedida quando as cepas introduzidas são indígenas, pois já são bem-adaptadas ao local e a degradação pode ocorrer imediatamente após a introdução de microrganismos específicos. Já a bioestimulação refere-se a adição de nutrientes como N e P, essenciais para o

crescimento dos microrganismos, que necessitam de uma proporção de C: 120, N: 10 e P: 1, para realizar suas atividades metabólicas (WU et al., 2016; ZENELI et al., 2019). A biorremediação ainda pode ser acelerada e torna-se mais eficiente, através de estudos sobre biologia microbiana, diversidade e aprofundamento das técnicas moleculares (SANTOS et al., 2011).

Já a bioestimulação refere-se a adição de nutrientes como N e P, essenciais para o crescimento dos microrganismos, que necessitam de uma proporção de C: 120, N: 10 e P: 1, para realizar suas atividades metabólicas (WU et al., 2016; ZENELI et al., 2019). A biorremediação ainda pode ser acelerada e torna-se mais eficiente, através de estudos sobre biologia microbiana, diversidade e aprofundamento das técnicas moleculares (SANTOS et al., 2011).

Os genes degradadores de hidrocarbonetos trazem informações sobre a resposta da comunidade microbiana indígena ao óleo residual (SHAHI et al., 2016), portanto, sua quantificação a partir do metagenoma do ambiente contaminado é um passo importante na compreensão de muitos processos ecológicos, podendo ser utilizados como marcadores genéticos, no monitoramento de locais contaminados, e identificar microrganismos não cultiváveis (HASSANSHAHIAN et al., 2014; SOUZA et al., 2020).

Os principais genes envolvidos na degradação de *n*-alcanos são relacionados a microrganismos mesofílicos (TOUROVA et al., 2018), cuja temperatura ótima é entorno de 20 e 45° C (MANAHAN, 2013). Atualmente acredita-se que o gene *alkB*, integrante do sistema enzimático funcional denominado enzimas monooxigenase e alcano hidroxilase, é envolvido na degradação de alcanos, uma vez que, codifica as enzimas que desempenham o primeiro passo no processo de degradação do alcano (GUERRA, 2018).

Desse modo, o gene *alkB* é um importante marcador molecular para a identificação de microrganismos produtores destas enzimas, que através do controle genético atuam especificamente na degradação de cada tipo de composto (NNADI, 2019). Experimentos de biorremediação controlado em laboratório, permite avaliar o processo e realizar melhorias necessárias para a aplicação na área.

O planejamento fatorial, é uma ferramenta quimiométrica que pode contribuir positivamente para a otimização de experimentos de biorremediação, pois não necessita de programas estatísticos para avaliar os dados, estabelecem modelos matemáticos passíveis de interpretação e validação.

À vista disso, o presente trabalho, buscou quantificar o gene *alkB*, através da técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) em experimento de biorremediação de sedimento de manguezal do rio São Paulo, BA. O experimento foi desenvolvido a partir de um planejamento fatorial  $2^2$  com o objetivo de identificar as melhores condições para a degradação do petróleo e contou com a adição de um consórcio microbiano indígena, avaliado em proporções e tempos variados. Desta forma, a relevância deste trabalho consiste no aprofundamento da técnica de biorremediação a nível molecular, aliada a estatística, para obter informações que contribuam para o processo de biorremediação em sedimento de manguezal.

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos foram divididos em geral e específicos, conforme descrito a seguir.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo de biorremediação utilizando consórcio microbiano em sedimento de manguezal contaminado com petróleo da bacia do Recôncavo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar experimento para tratamento de sedimento de manguezal com petróleo;
- correlacionar o crescimento dos microrganismos com os parâmetros físicos, químicos, geoquímicos e molecular através do monitoramento de um sistema de biorreator;
- determinar as variáveis significativas de um processo de biorremediação controlado, utilizando um planejamento fatorial;
- detectar a presença do gene *alkB* e sua abundância em diferentes quantidades de consórcio microbiano ao longo do tempo, de experimento;
- comparar o número de cópias dos genes *alkB*, com a degradação de n-alcenos durante o experimento.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira etapa deste trabalho, consistiu em um levantamento bibliográfico através de livros, teses e dissertações ligadas ao tema, foi realizada prospecção de artigos científicos, por meio do portal de periódico da CAPES utilizando as seguintes palavras chaves: **planejamento fatorial, biorremediação, biodegradação, bactérias, fungos, petróleo, manguezal, gene *alkB*, gene 16s, microrganismos, consórcio**. Em seguida, os artigos foram selecionados de acordo com o Qualis da revista, optando pelos níveis mais altos em geociências e dando preferência as publicações mais recentes. Além disso, professores e pesquisadores foram consultados, para o direcionamento das atividades e elaboração deste trabalho.

Foi realizado trabalho de campo, no manguezal do rio São Paulo, localizado na cidade de Candeias, Bahia, Brasil. Onde foram coletadas amostras de sedimento de manguezal e água do rio, para montagem de um experimento visando simular o processo de biorremediação de sedimento de manguezal com petróleo. Após a coleta em campo, o experimento foi montado no Laboratório LEPETRO – Excelência em Geoquímica Petróleo, Energia e Meio Ambiente, do Instituto de Geociências (IGEO) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Foi realizado o monitoramento do experimento durante 30 dias, a coleta ocorreu em três tempos. Após as análises, o tratamento dos dados obtidos e interpretação dos resultados foram realizados a partir da produção de gráficos e tabelas utilizando a estatística descritiva., os resultados são apresentados em dois artigos intitulados:

- Efeito do tempo e densidade de microrganismos na biorremediação de sedimento de manguezal com petróleo
- Gene Alcano Hydroxylase (*alkB*) em experimentos de biodegradação no sedimento de manguezal da Baía de Todos os Santos, Bahia –Brasil

A metodologia desenvolvida nos trabalhos está descrita nos capítulos referentes a cada artigo.

#### **4 EFEITO DO TEMPO E DENSIDADE DE MICRORGANISMOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL DE COM PETRÓLEO**

##### **RESUMO**

Os manguezais são ecossistemas sensíveis ao derramamento de petróleo, entretanto, são frequentemente afetados pelo óleo. O emprego da biorremediação nestes ambientes vem crescendo, necessitando desta forma de estudos de otimização do processo. Este trabalho teve por objetivos de avaliar o fator que exercem maior influência no processo de biorremediação; e correlacionar a variável tempo com a percentual de consórcio para a degradação do petróleo através do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>. Para isso foi montado um experimento para simulação de biorremediação em ambiente de manguezal, constituído de 7 biorreatores contendo sedimento autoclavado, petróleo e quantidades variadas de consórcio microbiano encapsulado com polímeros naturais. O número de biorreatores está associado com os fatores percentual de consórcio e tempo. A coleta do sedimento foi realizada com 4, 17 e 30 dias, para análise de hidrocarbonetos do petróleo (HTP). A resposta deste processo foi obtida através da razão HTP/UCM. Os resultados, mostraram que o tempo exerce influência significativa no processo. O R<sup>2</sup> para o modelo proposto foi de 0,934, explicando 93,4% dos dados do processo de biorremediação.

Palavras chaves: Biodegradação, Petróleo, Planejamento estatístico, Consórcio microbiano.

##### **ABSTRACT**

Mangroves are ecosystems sensitive to oil spills, however, they are often affected by oil. The use of bioremediation in these environments has been growing, thus requiring studies to optimize the process. This study aimed to assess the factor that has the greatest influence on the bioremediation process; and correlate the time variable with the percentage of consortium for the degradation of oil through factorial planning 2<sup>2</sup>. For this purpose, an experiment was carried out to simulate bioremediation in a mangrove environment, consisting of 7 bioreactors containing autoclaved sediment, oil, and varied amounts of consortium. microbial encapsulated with natural polymers. The number of bioreactors is associated with the percentage of pooling and time factors. The sediment collection was performed at 4, 17 and 30 days, for the analysis of petroleum hydrocarbons (HTP). The answer to this process was obtained using the HTP / UCM ratio. The results showed that time has a significant influence on the process. The R<sup>2</sup> for the proposed model was 0.934, explaining 93.4% of the data from the bioremediation process.

Keywords: Biodegradation, Oil, Statistical planning, Microbial consortium.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são áreas de transição entre o ambiente marinho e terrestre, exercendo papel fundamental na regulação do clima, proteção da região costeira e reprodução de espécies da fauna marinha (QUEIROZ; CELINO, 2008). O derramamento de petróleo nesses ecossistemas gera significativos impactos para o meio ambiente e saúde humana, devido à presença de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP), com cadeias de 5 a 40 carbonos, considerados poluentes orgânicos persistentes (ZENELI et al., 2019).

Além dos HTP, há também compostos tóxicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que contém anel benzênico, a exemplo (pireno, criseno, benzeno, antraceno), resistentes a degradação microbiana, persistem no ambiente e acumulam-se na cadeia alimentar (GAO et. al., 2019; KOSHLAF et. al., 2019; ZENELI et al., 2019). Atualmente, o aumento da contaminação destes compostos em sedimento de manguezal vem causando o desaparecimento de florestas de mangue, afetando os microrganismos presentes no sedimento.

Os fungos e bactérias presentes nesses ambientes, exercem um papel fundamental na ciclagem de nutrientes como o carbono, nitrogênio e fósforo, e são indicadores sensíveis de mudanças ambientais (YINGDONG et al., 2019; GONG et al., 2019), entretanto, estudos apontam mudanças na composição e diversidade microbiana devido a contaminação por petróleo (GAO et. al., 2019). Nessa situação, a biorremediação constitui uma técnica ecológica e economicamente viável para restauração de ambientes contaminados, pois acelera o processo de degradação natural realizado pelos microrganismos, podendo ser aplicada em áreas costeiras que sofreram derramamento de petróleo (KUMARI et al., 2019; HASSAINE; BORDJIBA, 2019).

O emprego do planejamento fatorial no processo de biorremediação em experimento laboratorial, contribui significativamente para a aplicação da técnica *in situ*. De modo que, a partir das informações obtidas, os fatores que não influenciam no processo, poderão ser eliminados diminuindo assim, tempo e custo.

O planejamento fatorial trata-se de uma importante ferramenta analítica para determinação de variáveis significativas de um sistema, podendo ser aplicada em amostras de natureza diversa, pois, reduz a quantidade de ensaios e mantém a



qualidade da informação e precisão dos dados (SILVEIRA et al., 2017; COSTA et al., 2006).

A biorremediação em experimento controlado pode avaliar a eficiência das duas principais abordagens da técnica, que pode ser aplicada por meio do bioaumento e do bioestímulo. O bioaumento, consiste na adição de cepas de comunidade microbiana especializada no ambiente, visando acelerar a degradação do poluente, entretanto o método é mais eficaz quando os microrganismos são indígenas, ou seja, retirados da área que será remediada (CAVALCANTI et al., 2019; PACWA-PLOCICZAK et al., 2019; ZENELI et al., 2019).

Além do bioaumento, pode-se utilizar o bioestímulo. Isto é, adição de nutrientes, como C, N e P, que são essenciais para o crescimento dos microrganismos, estimulando o aumento da população microbiana (CAVALCANTI et al., 2019; PACWA-PLOCICZAK et al., 2019). O uso de consórcio microbiano composto por espécies variadas de fungos e bactérias durante a biorremediação contribui positivamente para a biodegradação, visto que, cada espécie de microrganismo possui preferência por frações diferentes dos hidrocarbonetos (CAVALCANTI et al., 2019).

Tendo em vista, o fato de o manguezal do rio São Paulo, localizado na Baía de Todos os Santos apresentar contaminação crônica por hidrocarbonetos de petróleo, e levando-se em consideração a relevância da biorremediação para descontaminação de áreas com essas características, este trabalho utilizou um planejamento fatorial com os objetivos de avaliar o fator que exercem maior influência no processo de biorremediação; e correlacionar a variável tempo com a percentual de consórcio para a degradação do petróleo através do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, primeiramente foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre os trabalhos de biorremediação realizados no manguezal do rio São Paulo, em seguida buscou-se artigos relacionados a biorremediação de petróleo em sedimento de manguezal. Foi feito um planejamento para a coleta do sedimento na área e montagem do experimento de biorremediação, logo foi definida as análises a serem realizadas e as metodologias adequadas.

#### 4.2.1 Amostragem

A coleta de sedimento e água foi realizada no estuário do rio São Paulo, situado entre os municípios de São Francisco do Conde e Candeias, nas coordenadas  $12^{\circ}43'04.2''\text{S}$  e  $38^{\circ}32'50.4''\text{W}$  (Figura 1). Amostras de sedimento foram coletadas a 10 cm da superfície com o auxílio de um testemunhador de aço inoxidável, homogeneizado em uma bacia de alumínio e armazenado em marmitas de alumínio e acondicionado em caixa térmica a  $4^{\circ}\text{C}$ . A água foi coleta no leito do rio, com uma garrafa plástica de 20 litros.

**Figura 1** – Mapa de localização da área de coleta no estuário do rio São Paulo, Candeias – Bahia, Brasil



Fonte: Oliveira (2019), adaptado de Google (2020) e Conder (2010).

#### 4.2.2 Consórcio microbiano

O consórcio microbiano utilizado para bioaugmentação, foi composto por fungos e bactérias (Figura 2), que possuem a capacidade de degradar petróleo, tais microrganismos foram anteriormente isolados do sedimento de manguezal do rio São Paulo, estudado por Lima (2010) e Dantas (2016). O encapsulamento dos microrganismos (Figura 2) foi a base de polímeros naturais, conforme a metodologia de Lima (2010).

**Figura 2** - Microrganismos encapsulados a base de dois substratos naturais



Fonte: Lima (2014).

A imobilização microbiana, ou seja, o processo de encapsulamento teve por finalidade, aumentar a eficácia dos microrganismos no ambiente contaminado, fornecendo-lhes um suporte físico para a formação de biofilme e liberação lenta de células microbianas no meio circundante. O resultado consiste em uma maior capacidade de suporte a fatores ambientais estressantes e diminuição do dano na membrana celular (LIMA, 2014).

#### 4.2.3 Planejamento fatorial para processo de biorremediação

O planejamento fatorial  $2^2$ , foi realizado para avaliar os fatores percentual de consórcio e tempo em um experimento de biorremediação de sedimento de manguezal com petróleo. No quadro 1 estão demonstrados os fatores de controle do processo de biorremediação com seus respectivos níveis inferior (-1), superior (+1) e ponto central em triplicata (0) com valores reais e codificados.

**Quadro 1** - Fatores e níveis utilizados para o planejamento fatorial  $2^2$ , no estudo da degradação de HTP no sedimento de manguezal. Os valores -1, 0 e +1 representam os níveis codificados

FATORES	-1	0	+1
CONSÓRCIO (%)	(3%)	(6%)	(9%)
TEMPO (DIAS)	(4)	(17)	(30)

Fonte: Autora, 2020.

#### 4.2.4 Montagem do experimento para processo de biorremediação

A partir do delineamento experimental expresso (Quadro1), foi montado um experimento de biorremediação (Figura 5). A matriz de planejamento proposto foi avaliada no software livre R versão 3.6.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019) com a interface Rstudio na versão 1.1.463 (RSTUDIO TEAM, 2015) utilizando o pacote qualityTools (ROTH, 2016). A interpretação dos dados e a construção do gráfico de Pareto foram realizadas com o mesmo pacote.

O experimento foi composto por 7 biorreatores denominados, biorreator 1 (R1), biorreator 2 (R2), biorreator 3 (R3), biorreator 4 (R4), biorreator 5 (R5), biorreator 6 (R6), biorreator 7 (R7) e um biorreator controle. O sedimento e a água coletada foram autoclavado a 121°C, visando sua esterilização completa. O biorreator (B) conteve 400 g de sedimento de manguezal autoclavado + 4 g de petróleo + consórcio microbiano (Figura 7), já os biorreatores (A) contiveram água do rio autoclavada (Figura 6).

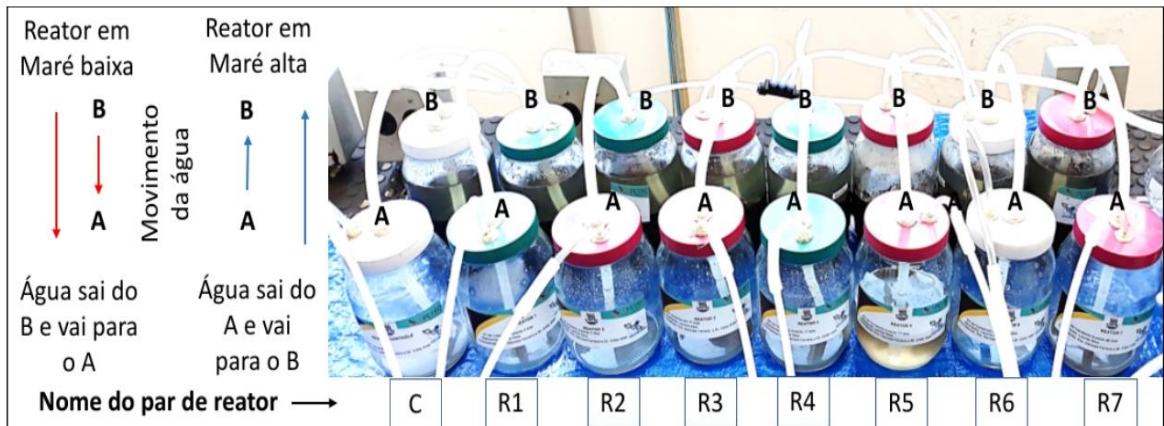
Duas bombas a vácuo (Figura 8) foram utilizadas para mover a água de um par de biorreator para o outro, a cada 6 horas sob o controle de um time temporizador digital (Figura 3), a bomba permanecia ligada por 1 minuto, fazendo borbulhamento ao atingir o sedimento. O movimento da água teve por objetivo simular o regime de subida e descida da maré.

**Figura 3** - Time temporizador digital, liga e desliga a bomba Á vácuo a cada 6 horas, promovendo o movimento da água de um reator para o outro simulando o sistema de maré



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 4** - Descrição do movimento de subida e descida da maré no experimento de biorremediação de sedimento de manguezal com petróleo



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 5** - Reator em maré baixa, a água sai do reator B, e vai para o reator A



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 6** - Reator em maré alta, a água sai do reator A e vai para o reator B cobrindo o sedimento com água



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 7-** Experimento de biorremediação de sedimento de manguezal com petróleo



Fonte: Autora, 2020.

#### 4.2.4.1 Coleta do experimento

A coleta foi realizada nos tempos (4 dias, biorreator1 e 2), (17 dias, biorreator 3, 4 e 5), (30 dias, biorreator 6 e 7). O procedimento foi realizado na capela de fluxo laminar, com o auxílio de uma colher inox. Posteriormente o sedimento foi armazenado em potes de vidro previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos, e descontaminados com diclorometano (DCM). Os parâmetros físico-químicos foram determinados no momento da coleta em cada biorreator.

Para quantificação de HTPs, inicialmente o sedimento foi liofilizado, desagregado e peneirado a 80 *mesh*. A extração sólido/líquido foi executada através do equipamento DIONEX ASE 350, marca Thermo Scientific. Sob temperatura de 150 °C, por 2 ciclos de 5 minutos, utilizando o solvente diclorometano (DCM, marca merck). O óleo foi filtrado em balão volumétrico, com o auxílio de um funil contendo sulfato de sódio calcinado (marca Merck), posteriormente o solvente foi evaporado em Evaporador Rotativo (R-200 Rotary Evaporator, BUCHI), em seguida o óleo foi levado ao cromatógrafo. A análise de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP), foi realizada através do método “*whole oil*” adaptado pelo LEPETRO/UFBA, utilizando um detector de ionização de chama (CG/FID, modelo 7890B, Agilent Technologies, Califórnia, USA), com as seguintes condições: Coluna cromatográfica capilar modelo DB 1 (1% de fenil-polimetilsiloxano, 15 m x 0,25 mm , 0,25 µm); vazão da fase móvel (He): 1,0 mL/min; razão de divisão do injetor (split) 20/1, volume injetado de 1 µL. As

temperaturas de operação foram: injetor a 300 °C, detector a 300 °C e coluna em temperatura programada, iniciando-se em 40 °C por 2 minutos, seguida de elevação de 10 °C/min até 300 °C, permanecendo durante 12 minutos nessa temperatura final.

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises realizadas neste trabalho são discutidos através da interpretação de gráficos e tabelas, cuja elaboração teve por objetivo facilitar a visualização e compreensão dos dados obtidos.

##### 4.4.1 Otimização multivariada para experimento de processo de biorremediação

Para otimizar a metodologia para a degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) no processo de biorremediação simulado para um ambiente de manguezal utilizou-se o planejamento fatorial  $2^3$  de dois níveis com triplicata no ponto central. Foram avaliados os fatores percentuais de consórcio (3%, 6% e 9%) e tempo (4, 17, 30). Os níveis inferiores, superiores e a razão HTP/UCM (sinal analítico do processo) foram expressos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Níveis codificados, valores reais e razão HTP/UCM obtida no planejamento fatorial  $2^2$ , com triplicata do ponto central, para avaliação da degradação de HTP no processo de biorremediação simulado para ambiente de manguezal

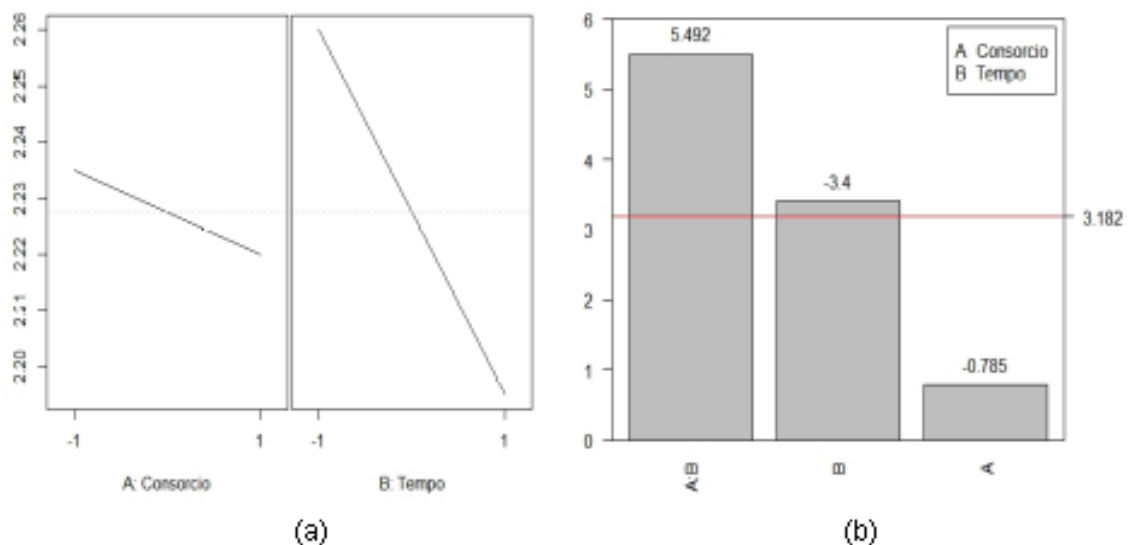
Biorreator	Consorcio (%)	Tempo (dias)	HTP/UCM
<b>Biorreator 1 (R1)</b>	-1 (3)	-1 (4)	2,32
<b>Biorreator 2 (R2)</b>	1 (9)	-1 (4)	2,20
<b>Biorreator 3 (R3)</b>	0 (6)	0 (17)	2,21
<b>Biorreator 4 (R4)</b>	0 (6)	0 (17)	2,21
<b>Biorreator 5 (R5)</b>	0 (6)	0 (17)	2,25
<b>Biorreator 6 (R6)</b>	-1 (3)	1 (30)	2,20
<b>Biorreator 7 (R7)</b>	1 (9)	1 (30)	2,24

Fonte: Autora, 2020.

UCM é o nome dado para a mistura complexa não resolvida, ou seja, trata-se dos compostos que não podem ser detectados pelo método de cromatografia gasosa.

A razão HTP/UCM é utilizada para avaliar a degradação do petróleo por microrganismos, de modo que, conforme essa razão aumenta significa que há presença de mais hidrocarbonetos, porém, a diminuição no valor dessa razão indica que a quantidade de UCM é maior que a quantidade de hidrocarbonetos, portanto está havendo remoção de HTP. O gráfico de efeitos é utilizado para avaliar a influência dos fatores no processo de otimização. De acordo com esta Figura 4a o fator tempo tem uma influência negativa em relação a biodegradação.

**Figura 8** - Gráfico de Efeito (a) e Pareto (b) para relação percentual de consórcio e tempo



Fonte: Autora, 2020.

A quantidade de consórcio é influenciada pelo tempo, uma vez que, o menor percentual de consórcio (3%), requer maior tempo para a biodegradação (30 dias), conforme mostra a tabela 1. Da mesma forma, a maior quantidade de consórcio (9%), requer menor tempo (4 dias) para a degradação do petróleo em sedimento de manguezal. A Tabela 2 corrobora com esta afirmação, pois os experimentos (R2, R3, R4, R6), apresentaram a menor razão HTP/UCM, indicando maior degradação. Com a análise do gráfico de Pareto foi possível evidenciar que a interação dos fatores (consórcio e tempo) é significativa com efeito positivo, como também o fator tempo foi mais significativo com efeito negativo exercendo maior influência no processo de biorremediação, apresentando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). A análise de variância (ANOVA) (Tabela 3), foi utilizada para verificar a significância dos fatores e do modelo linear a um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) para o planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.



**Tabela 2** - Análise de variância para o modelo linear ajustado a resposta múltipla para um nível de confiança de 95%

Parâmetros	G.L.	Sq	Mq	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	p-valor
A	1	0,0002	0,0002	0,62	10,13	0,49
B	1	0,0042	0,0042	11,56	10,13	0,04
A:B	1	0,011	0,011	30,17	10,13	0,01
Resíduos	3	0,001	0			
Regressão Linear						
A, B	2	0,004	0,002	0,73	6,94	0,54
Resíduos	4	0,012	0,003			
Falta de ajuste	2	0,011	0,006	10,36	19,00	0,09
Erro puro	2	0,001	0,001			

Através da A = Consorcio, B = Tempo, G.L. = número de graus de liberdade, Sq = soma quadrática, Mq = média quadrática, F<sub>calc</sub> = valor do teste F calculado, F<sub>tab</sub> = valor do teste F tabelado.

Através da Tabela 2 observou-se que o fator tempo e a interação dos fatores foram significativos para o processo de biorremediação corroborando, assim, com o gráfico de Pareto. A ANOVA também apontou que não houve falta de ajuste para o modelo de regressão proposto no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> a um nível de significância de 95%. Com o objetivo de mensurar a contribuição de cada fator e a interação deles para descrever a simulação do processo de biorremediação foi construído um modelo linear (Tabela 3).

**Tabela 3** - Coeficiente do modelo de regressão linear para o conjunto de ensaios do planejamento 2<sup>2</sup>

Parâmetros	Coeficiente	Erro Padrão	p-valor
Intercepto	2,23	0,01	7,55x10 <sup>-8</sup>
A	-0,01	0,01	0,49
B	-0,03	0,01	0,04
A:B	0,05	0,01	0,01

Fonte: Autora, 2020.

O modelo de regressão tem a função de investigar a relação entre variáveis aleatórias de interesse (variável resposta,  $Y_i$ ,  $i = 1, 2, \dots, n$ ) com um conjunto de variáveis explicativas ou exploratórias ( $x_i$ ,  $i = 1, 2, \dots, n$ ). Desse modo, é possível prever valores para a variável de interesse, como também avaliar a influência de variáveis

exploratórias na variável resposta. Para isso ocorrer o modelo de regressão deve apresentar um bom ajuste, sendo assim, o  $R^2$  indica o melhor ajuste para o modelo, pois quanto mais próximo de um for esse valor melhor será o ajuste do modelo. Desse modo o  $R^2$  para o modelo proposto foi de 0,934, ou seja, o modelo explica 93,4% dos dados do processo de biorremediação. O planejamento fatorial vem sendo aplicado com sucesso para otimizar o processo de biodegradação de petróleo e derivados de petróleo. O trabalho realizado por Almeida (et al., 2017), teve por objetivo determinar as condições mais favoráveis para a biodegradação de um combustível marítimo por um consórcio microbiano, através de um experimento de biorremediação. Um planejamento fatorial completo  $2^3$  foi aplicado para determinar as melhores condições. Ao final do experimento os resultados mostraram que o consórcio utilizado degradou um total de 93,5% dos hidrocarbonetos no projeto experimental e alcançou níveis de degradação otimizados em teste no biorreator para os constituintes do combustível, podendo ser usado como agente de biorremediação de ambientes poluídos por esse combustível.

Aparício (et al., 2018), utilizou o planejamento fatorial completo  $2^4$  em um experimento de biorremediação de solo contaminado com cromo e lindano para avaliar quatro fatores (temperatura, umidade, concentração inicial de Cr (VI) e lindano), cada um em dois níveis, mais um ponto central. As respostas avaliadas foram as concentrações finais de lindano e Cr. De acordo com o otimizador de resposta, o nível ideal de umidade foi de 30% para todos os processos de biorremediação. O planejamento fatorial, permitiu prever com grande precisão o resultado da atividade do consórcio durante a biorremediação de solos contaminados, conhecendo as condições iniciais do sistema.

O trabalho de (SILVA; ALMEIDA, 2013), aplicou o planejamento fatorial fracionado, para determinar a capacidade de um fungo filamentosos, isolado de solo, em utilizar óleo Diesel como fonte de carbono para produção da enzima lignina peroxidase. As variáveis avaliadas foram: concentração de ferro, concentração de glicose, concentração de inóculo e concentração de óleo Diesel. Como resultado, a variável 'glicose' foi o único fator que influenciou estatisticamente na produção da enzima em estudo, embora o óleo Diesel também tenha servido como fonte de carbono e como substrato indutor. Indicando que, o microrganismo e a enzima lignina peroxidase podem ser utilizados para compor novas tecnologias nos tratamentos de resíduos recalcitrantes, tais como o óleo Diesel.

O trabalho com experimento de biorremediação realizado por Silva (et al., 2015), utilizou o delineamento fatorial experimental com 3 fatores e dois níveis ( $2^3$ ), para avaliar os efeitos da concentração de nitrogênio no meio, a temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$  ou  $35^{\circ}\text{C}$ ), e as condições da razão C: N mais favoráveis à biodegradação. Como resultado, o planejamento fatorial mostrou que a relação C: N e temperatura foram os fatores que apresentaram efeito significativo no bioprocesso. O aumento da razão C: N e a quantidade de inóculo produziram um efeito positivo, enquanto o aumento da temperatura causou um efeito negativo na biodegradação. Desse modo, os trabalhos citados comprovam que o planejamento estatístico, é uma ferramenta útil para avaliar as melhores condições em experimentos diversos, inclusive de biorremediação, reduzindo o tempo e melhorando o rendimento. Neste trabalho, verificou-se a significância estatística das variáveis tempo e consórcio durante o experimento de biorremediação, obtendo a resposta com rapidez, a um nível de confiança de 95%.

#### 4.5 CONCLUSÃO

O planejamento fatorial constitui uma ferramenta útil para experimentos de biorremediação, neste trabalho se mostrou satisfatório para avaliação das variáveis tempo e quantidade de consórcio, explicando 93,4% dos dados, mostrando como resultado que o tempo exerce maior influência que o percentual de consórcio no processo de biorremediação. A relação entre tempo e percentual de consórcio foi significativa, à medida que, com o aumento do percentual de consórcio a degradação do petróleo ocorre em menor tempo.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao patrocinador Shell Brasil sob a taxa de P&D em ANP como “Compromisso de Investimentos com Pesquisa e Desenvolvimento”, ao LEPETRO – Excelência em Geoquímica Petróleo, Energia e Meio Ambiente, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

### 3 GENE ALKANO HYDROXYLASE (ALKB) EM EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO NO SEDIMENTO DE MANGUEZAL DA BAIÁ DE TODOS OS SANTOS, BAHIA –BRASIL

#### RESUMO

Diante dos frequentes acidentes envolvendo derramamento de petróleo na região norte da Baía de Todos os Santos, a informação sobre a quantidade do gene *alkB* durante a biorremediação é essencial para avaliar a degradação dos n-alcenos. Este processo bioquímico é realizado através da enzima alceno hidroxilase, podendo-se utilizar o gene como biomarcador no acompanhamento da eficiência da biorremediação. Neste trabalho o gene *alkB* foi quantificado através da técnica de PCR em tempo real (qPCR), para isso, foi montado um experimento, através de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, composto por 7 biorreatores contendo 400g de sedimento esterilizado, 4g de petróleo bruto e quantidades variáveis de consórcio microbiano encapsulado, visando simular o processo de biorremediação em manguezal com petróleo. A coleta de sedimento foi realizada em 4, 17 e 30 dias, no momento, os parâmetros físico químicos foram medidos. Realizou-se análise físico-química, geoquímica, microbiológicas e de biologia molecular. Os resultados mostraram correlação entre o gene *alkB* e a degradação da fração saturada do petróleo.

Palavras chave: DNA, PCR em tempo real (qPCR), Microrganismos, Petróleo.

#### ABSTRACT

Given the frequent accidents involving oil spills in the northern region of the Todos os Santos Bay, information on the amount of the *alkB* gene during bioremediation is essential to assess the degradation of n-alkanes. This biochemical process is carried out using the enzyme alkane hydroxylase, and the gene can be used as a biomarker to monitor the efficiency of bioremediation. In this work, the *alkB* gene was quantified using the real-time PCR (qPCR) technique, for this purpose, an experiment was set up, through a 2<sup>2</sup> factorial design, composed of 7 bioreactors containing 400g of sterile sediment, 4g of crude oil and quantities variables of encapsulated microbial consortium, aiming to simulate the mangrove bioremediation process with oil. The sediment collection was carried out in 4, 17 and 30 days, at the moment, the physical chemical parameters were measured. Physical-chemical, geochemical, microbiological and molecular biology analysis was performed. The results showed a correlation between the *alkB* gene and the degradation of the saturated fraction of oil.

Keywords: DNA, Real-time PCR (qPCR), Microorganisms, Petroleum.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O petróleo é um combustível fóssil responsável pela movimentação econômica mundial, aplicado como matéria prima para a produção de combustíveis (LOGESHWARAN et al., 2018; GARCIA et al., 2020). É constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos saturados, aromáticos, compostos polares e heteroátomos como o nitrogênio, hidrogênio, enxofre e oxigênio, denominados compostos NSO (ZENELI et al., 2019; CHICIUDEANA et al., 2017).

Os hidrocarbonetos saturados, possuem ligações simples e cadeias lineares, sendo representados pelos alcanos de cadeias abertas ou cíclicas com o máximo de 40 átomos de carbono. (PAISSE et al., 2011). Já os hidrocarbonetos aromáticos, contém anel benzênico na arquitetura linear, angular ou cluster, persistem no ambiente e são mutagênicos para microrganismos, plantas, animais e seres humanos podendo a bioacumula-se na cadeia alimentar (KOSHLAF et al., 2019).

Os heteroátomos nitrogênio, enxofre e oxigênio, denominados compostos NSO, compõem 5% do petróleo e são encontrados nas frações com alto ponto de ebulição, asfáltica, resinas e aromáticas (PEREIRA, 2012). As variações extremas nas moléculas precursoras, justifica as diferenças na composição física e química do petróleo (LOGESHWARAN et al., 2018), que é um poluente recalcitrante e quimicamente inerte (LONG et al., 2017), causando impactos significativos quando são derramados no ambiente.

Em geral, os acidentes envolvendo derramamento de petróleo ocorrem durante o transporte, manipulação, exploração, queima de resíduos e atividades de perfuração. Na Baía de Todos os Santos (BTS), a maioria dos acidentes ocorrem na região norte, principalmente na extensão dos rios São Paulo e Subaé, devido à existência de uma das maiores reservas de petróleo *on shore* do Brasil, onde abriga indústrias petroquímicas, de exploração e refino, destacando-se a Refinaria Landulpho Alves-Mataripe (RLAM). O manguezal do rio São Paulo é atingido em maior número, pelo óleo, isto devido a sua proximidade à refinaria. Desse modo, a região norte da BTS, vem sendo investigada desde a década de 1990, para determinação do seu grau de contaminação (QUEIROZ; CELINO 2008).

Além de ser um ecossistema essencial para a manutenção do clima, os manguezais, são ricos em matéria orgânica, protegem a costa contra erosão, são importantes para a reprodução da fauna marinha e considerados pontos críticos da

biodiversidade para microrganismos (SANTOS, et al., 2011; TIRALERDPANICH et al., 2018), porém, quando são atingidos pelo petróleo, os impactos dependem da extensão do derramamento, toxicidade, padrão de deposição, clima, regime de marés, bioquímica do substrato e tempo de permanência do composto (SANTOS et al., 2011).

Compreende-se que, os minerais silte, argila e hidróxido de magnésio, junto com a matéria orgânica favorecem a adsorção dos hidrocarbonetos, no entanto, sedimentos de manguezal possuem diferentes níveis de contaminação que depende do grau de perturbação humana. Por isso, são utilizados como indicadores do histórico de contaminação, uma vez que, são fundamentais na biodisponibilidade de vários compostos químicos, devido ao acúmulo de contaminantes que recebem ao longo dos anos (DA PAIXÃO, 2010; BARGIELA, et. al, 2015; SANTOS et al., 2018).

As técnicas de limpeza dos manguezais contaminados por petróleo ainda são limitadas. O jateamento a baixa pressão com água do mar remove o óleo da vegetação quando a cobertura vegetal é estável e podem contaminar áreas adjacentes. Não obstante, o jateamento a alta pressão pode causar erosão e maximizar os danos ao ecossistema. Materiais absorventes podem ser levados pela maré ou ficar aprisionados entre as raízes do mangue dificultando sua remoção (CETESB, 2007).

O uso de dispersante químico é proibido no Brasil, pois causa efeito ainda mais tóxico que o petróleo para as espécies de mangue, necessitando de experimentos para testar sua toxicidade e eficiência. Já o bombeamento a vácuo, as esteiras recolhedoras, os skimmers e o recolhimento manual, podem causar danos mecânicos, remoção de organismos e revolvimento do substrato (CETESB, 2007).

Desse modo, a biorremediação apresenta menos impactos aos manguezais, tornando-se a abordagem mais apropriada, porém sua limitação versa em baixos níveis de oxigênio, nutrientes e competição, concentração de hidrocarbonetos do petróleo e a toxicidade do sedimento (CETESB, 2007; SANTOS et al., 2011).

A biorremediação consiste na utilização de microrganismos para reabilitação de locais contaminados por compostos químicos tóxicos ou outros poluentes ambientais, inclusive, pode ser definida como um processo biotecnológico ao qual se emprega a estimulação das atividades de microrganismos nativos, empregando seu metabolismo para a eliminação de poluentes (MADIGAN et al., 2016).

A princípio os microrganismos indígenas, metabolizam o composto químico como fonte de energia para crescer e se reproduzir, utilizando enzimas, que quebram

as toxinas e as transformam em substâncias menos nocivas (GUARINO et al., 2016). A biodegradação é controlada principalmente por interações complexas entre a comunidade microbiana e a complexidade ambiental local, como a biodisponibilidade do óleo residual, temperatura, nutrientes e presença de oxigênio (ZHANG et al., 2017).

A biorremediação pode ser empregada através da bioaumentação e bioestimulação. A bioaumentação envolve a inoculação de microrganismos degradadores no local contaminado e a bioestimulação consiste na adição de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, que estimulam o metabolismo e crescimento dos microrganismos, acelerando as taxas de biodegradação. O oxigênio, pH, temperatura e umidade, contribuem para o processo (SHAHI et al., 2016).

A biorremediação utilizando consórcio microbiano contribui positivamente para o processo, pois, diferentes bactérias podem transferir genes degradadores de hidrocarbonetos (SHAHI, 2015; SHAHI et al., 2016), assim como, a inclusão de fungos e bactérias favorece a degradação de uma gama mais ampla de contaminantes do petróleo (SANTOS, et al., 2011).

O consórcio encapsulado fornece um suporte físico para a formação de biofilme e liberação lenta de células microbianas no meio circundante, resultando em uma maior capacidade de suporte a fatores ambientais estressantes, diminuindo o dano na membrana celular, e protegendo os microrganismos da predação e competição. Ademais contribui para reduzir a liberação dos esporos fúngicos de uma única vez, impedindo que eles se desintegrem, promovendo resistência, fornecendo melhor distribuição e padronização se comparados a biorremediação realizada por células livres (LIMA, 2014; DELLAGNEZZE et al., 2016).

Os fungos são mais tolerantes a altos níveis de contaminantes do que as bactérias, incorporando-se facilmente ao solo e crescendo em condições mínimas de pH, umidade e nutrientes (SHAHI et al., 2016), bactérias como *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia* e *Gordonia*, são descritas como degradadores de hidrocarbonetos e são encontradas em sedimento de manguezal.

É preciso realizar estudos de ecologia molecular, para verificar os efeitos da contaminação do petróleo sobre as comunidades microbianas (SANTOS, et al., 2011). Contudo, considera-se que, para cada fração do petróleo, existem microrganismos específicos para promover a degradação (BARGIELA, et al., 2015), esta, é mediada

por enzimas, que controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material necessário à síntese de novas células microbianas (GUERRA, 2018).

A biorremediação pode ocorrer *in situ* ou *ex situ*, porém, é importante analisar a resposta dos microrganismos à poluição por petróleo, a nível genético e metabólico (HASSANSHAHIAN et al., 2015). A descoberta dos genes 16S rRNA, encontrados em todas as bactérias e o 18S rRNA em todos os fungos, permitiu caracterizar filogeneticamente os microrganismos e determinar as espécies. Desta forma, vários microrganismos que nunca haviam sido relacionados com a degradação de hidrocarbonetos passaram a ser conhecidos e relacionados à biorremediação de áreas contaminadas (ABBASIAN et al., 2016; SILVA, 2010).

Os genes são segmentos do DNA, que contém a informação genética para produzir uma proteína, que desempenham funções específicas dentro da célula (MADIGAN et al., 2016). São os genes que codificam enzimas que degradam os hidrocarbonetos e são excelentes biomarcadores para o acompanhamento da eficiência dos microrganismos em degradar hidrocarbonetos (SHAHI et al., 2015).

A capacidade de quantificar com precisão os genes funcionais no ambiente é um passo extremamente importante para a compreensão de muitos processos ecológicos (HASSANSHAHIAN et al., 2014). Os genes de bactérias são organizados em operon, ou seja, conjunto de genes que possuem funções relacionadas, sob controle de um único promotor e expressos em apenas um RNA mensageiro (ABBASIAN et al., 2015; MADIGAN et al., 2016).

Além do operon, bactérias contêm plasmídeos, que são moléculas de DNA circular, com a capacidade de produzir cópias do DNA, independente do DNA cromossômico, podendo conter genes com variadas funções. Os plasmídeos que possuem genes degradadores de hidrocarbonetos são divididos em três grupos: degradador de alcano (plasmídeo OCT), degradador de naftaleno (plasmídeo NAH) e oxidantes de tolueno, denominado plasmídeo TOL (ABBASIAN et al., 2015). As bactérias promovem a transferência horizontal de genes, quando são submetidas a condições ambientais adequadas, podendo trocar genes degradadores de petróleo, através da transformação, transdução ou conjugação (MADIGAN et al., 2016; SHAHI et al., 2016).

Os principais genes envolvidos na biodegradação de *n*-alcanos são relacionados a microrganismos mesofílicos. A degradação do *n*-alcano é intermediada por alcano hidroxilase, que constitui em um sistema enzimático de três componentes



cujo elemento principal é o alcano monooxigenase (TOUROVA et al., 2018). O gene *alkB* promove a degradação de alcano na presença de oxigênio. Várias enzimas produzidas por esses genes foram identificadas e categorizadas com base em seus substratos (NIE et al., 2014).

As enzimas monooxigenase de metano solúvel, propano monooxigenas e butano monooxigenase, são especializadas em alcanos gasosos de cadeia pequena, metano, propano e butano. As enzimas alcano hidroxilase e alcano monooxigenase, desempenham o primeiro passo no processo de degradação do alcano, estando envolvidas na etapa inicial de ativação do metabolismo microbiano para degradação de hidrocarbonetos alifáticos (GUERRA, 2018). A monooxygenase degrada os *n*-alcanos catalisando a oxidação terminal ou subterminal, transformando-os em álcoois primários ou secundários (NIE et al., 2014).

Em síntese, a biodegradação se inicia com a oxidação do hidrocarboneto pelo sistema monooxygenase, que depende de um transportador de elétrons para converter os hidrocarbonetos em álcool. Após esta conversão, o álcool é oxidado e decomposto em moléculas menores, que poderão ser utilizadas pelas células para efetuar suas reações metabólicas (ABBASIAN et al., 2016). Os diferentes conjuntos de genes *alkB* codificam enzimas com diferentes faixas de substrato (GIEBLER et al., 2014), e são utilizados como biomarcadores em estudos sobre a diversidade de bactérias degradadoras de petróleo bruto (LONG et al., 2017).

Neste contexto, os objetivos deste artigo foram: detectar o gene *alkB* no consórcio microbiano utilizado no experimento de biorremediação; comparar o número de cópias do gene *alkB* com a percentual de microrganismos nos tempos 4, 17 e 30; Comparar o número de cópias do gene *alkB* com a degradação da fração saturada do petróleo em experimento de biorremediação;; enumerar a população bacteriana e compará-la com o número de cópias do gene 16S rRNA durante o processo de biorremediação.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODO

A área de estudo (Figura 9), trata-se do manguezal localizado no estuário do rio São Paulo, nas coordenadas 12°43'04.2"S e 38°32'50.4" W situado entre os municípios de São Francisco do Conde e Candeias. Próximo ao rio encontra-se a

refinaria Landulpho Alves de Mataripe (RLAM), onde atividades ligadas à indústria petrolífera, como campos de exploração, produção e refinaria foram desenvolvidas durante mais de cinquenta anos.

**Figura 9** - Mapa de localização da área de coleta no estuário do rio São Paulo, Candeias - Bahia, Brasil



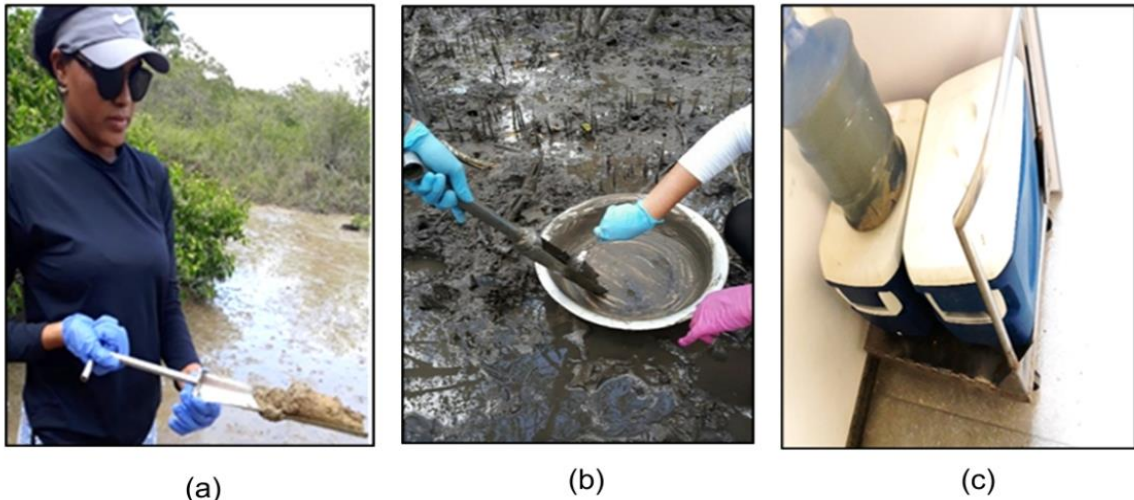
Fonte: Oliveira (2019), adaptado de Google (2020) e Conder (2010).

Para alcançar os objetivos propostos por este trabalho, foi montado um experimento no Laboratório de Excelência em Geoquímica Petróleo, Energia e Meio Ambiente (LEPETRO), localizado no Instituto de Geociências, na Universidade Federal da Bahia. A coleta do sedimento e da água ocorreu no manguezal do rio São Paulo. As etapas de coleta em campo, montagem do experimento, monitoramento e análises são descritas nos próximos tópicos.

### 5.2.1 Amostragem

O trabalho em campo ocorreu no dia 23 de janeiro de 2019. O sedimento foi coletado à 10 cm da superfície, uma vez que, o gene *alkB* é encontrado em microrganismos aeróbios. Para a coleta foi utilizado um testemunhador de aço inoxidável em forma de tubo, em seguida, o sedimento foi homogeneizado em recipiente de alumínio e armazenado em marmitas de alumínio devidamente identificadas. As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas, conforme mostra a Figura 10.

**Figura 10** - Ponto de coleta das amostras de sedimento e água no manguezal do rio São Paulo-BA. Coleta do sedimento (a), Homogeneização do sedimento (b), Armazenamento do sedimento e água (c)



Fonte: Autora, 2020.

A coleta da água foi realizada através da imersão de um garrafão de polietileno de 20 litros no leito do rio. Os parâmetros físico-químicos foram mensurados através de uma sonda multiparâmetro da marca Horiba d-54. Ao chegar no laboratório as amostras de sedimentos permaneceram guardadas em um freezer e a água manteve-se em temperatura ambiente. Antes da montagem do experimento, o sedimento e a água foram autoclavado durante 2 h a 120 °C, após esse processo, efetuou-se a caracterização do sedimento e do petróleo visando compreender sua constituição.

### 5.2.2 Caracterização do sedimento

O reator controle foi utilizado para caracterização do sedimento em cada tempo de experimento (4 dias, 17 dias e 30 dias), portanto foram realizadas análises de granulometria, análise dos nutrientes: carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo total; análise de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP); análise microbiológica: enumeração de fungos e bactérias; análise molecular: extração de DNA e quantificação de genes, e os parâmetros físicos químicos forma medidos por sonda multiparâmetro durante cada tempo de coleta do experimento. A descrição das respectivas metodologias encontra-se nos próximos tópicos e os resultados da granulometria e dos demais parâmetros são expressos através de gráficos.

### 5.2.3 Caracterização do petróleo

A amostra de óleo utilizada nos experimentos foi cedida pela operadora independente de exploração e produção de petróleo e gás *onshore* Petrorecôncavo. O óleo foi analisado para a determinação dos parâmetros e do perfil cromatográfico dos HTPs através do método “*whole oil*” adaptado no LEPETRO/UFBA, utilizando um detector de ionização de chama (CG/FID, modelo 7890B, Agilent Technologies, Califórnia, USA).

O cromatógrafo utilizou as seguintes condições: Coluna cromatográfica capilar modelo DB 1 (1% de fenil-polimetilsiloxano, 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm); vazão da fase móvel (He): 1,0 mL/min; razão de divisão do injetor (split) 20/1, volume injetado de 1 µL. As temperaturas de operação foram: injetor a 300 °C, detector a 300 °C e coluna em temperatura programada, iniciando-se em 40 °C por 2 minutos, seguida de elevação de 10 °C/min até 300 °C, permanecendo durante 12 minutos nessa temperatura final.

### 5.2.4 Caracterização do consórcio microbiano

O consórcio microbiano (fungos e bactérias) utilizado no experimento, foi coletado na área de estudo deste trabalho, por Lima (2014) e Dantas (2016). Após o isolamento em laboratório, esses microrganismos foram testados quanto ao potencial de biodegradação do petróleo, passando por testes de oxidação.

Esse consórcio foi encapsulado com polímeros naturais (Figura 11), a base de dois substratos, cuja constituição fornece nutrientes essenciais para os microrganismos, além de fornecer suporte físico, protegendo-os contra o ressecamento, predação e competição. O encapsulamento foi segundo a metodologia de Lima (2014).

**Figura 11-** Consórcio microbiano encapsulado a base de dois substratos naturais



Fonte: Lima (2014).

### **5.2.5 Montagem e monitoramento do experimento para processo de biorremediação**

O experimento foi composto por 7 pares de biorreatores e 1 controle, todos interligados a mangueiras de silicone e acoplados a bomba de vácuo controlada por um time temporizador digital, para assemelhar o sistema de marés. O conteúdo do biorreator consistiu em sedimento de manguezal, água do rio São Paulo, petróleo e consórcio microbiano encapsulado.

O experimento foi inspirado no modelo de protótipo de biorreator de imersão temporária desenvolvido por Lima (2014) e no protótipo de biorreator de imersão temporária adaptado por Dantas (2016). As principais modificações realizadas no experimento atual de biorreator foi a automatização do sistema através de um time temporizador digita (Figura 12) que controla o movimento da água a cada 6 horas de um biorreator para o outro, e um delineamento experimental por planejamento fatorial  $2^2$ .

**Figura 12** - Time temporizador digital, liga e desliga a bomba Á vácuo a cada 6 horas, promovendo o movimento da água de um reator para o outro simulando o sistema de maré



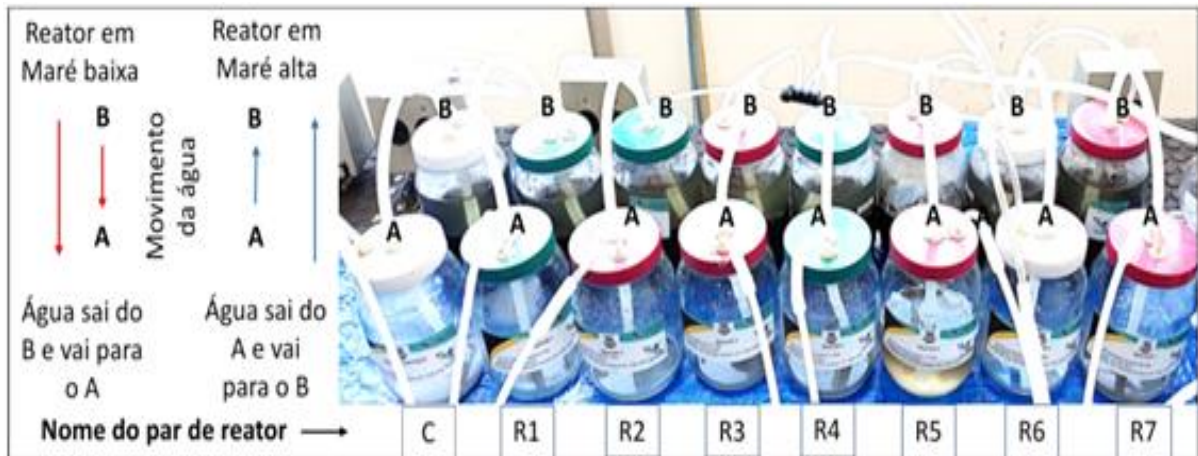
Fonte: Autora, 2020.

O trabalho de Lima (2014), recomendou o aprofundamento de estudos em trabalhos futuros, para que o protótipo pudesse ser utilizado com intuito de obter a degradação dos componentes do petróleo (Saturados, Aromáticos e NSO), na sua totalidade. Desta forma, este trabalho segue uma das recomendações de Lima (2014), uma vez que, visa obter as melhores condições para a degradação da fração saturada do petróleo.

O experimento foi composto por 7 biorreatores (Figura 13) denominados, biorreator 1 (R1), biorreator 2 (R2), biorreator 3 (R3), biorreator 4 (R4), biorreator 5 (R5), biorreator 6 (R6), biorreator 7 (R7) e um biorreator controle. O sedimento e a água coletada foram autoclavados a 121°C, visando sua esterilização completa. O biorreator (B) conteve 400 g de sedimento de manguezal autoclavado + 4 g de petróleo + consórcio microbiano (Figura 15), já os biorreatores (A) contiveram água do rio autoclavada (Figura 14).

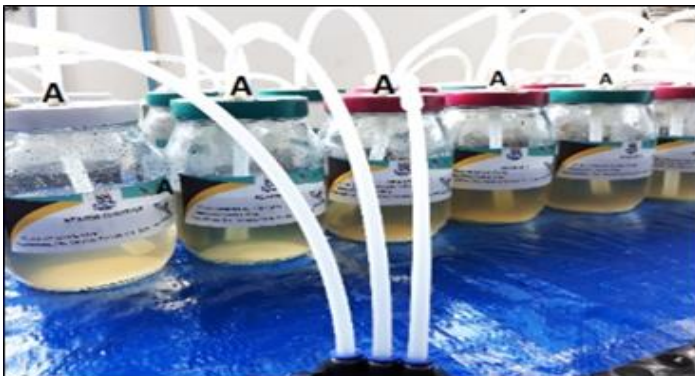
Duas bombas a vácuo (Figura 16) foram utilizadas para mover a água de um par de biorreator para o outro, a cada 6 horas sob o controle de um time temporizador digital, a bomba permanecia ligada por 1 minuto, fazendo borbulhamento ao atingir o sedimento. O movimento da água teve por objetivo simular o regime de subida e descida da maré.

**Figura 13** - Descrição do experimento de biorremediação de sedimento de manguezal com petróleo



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 14** - Reator em maré baixa, a água sai do reator B e vai para o reator A



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 15** - Reator em maré alta, a água sai do reator A e vai para o reator B cobrindo o sedimento com a água



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 16** - Experimento de biorremediação de sedimento de manguezal com petróleo



Fonte: Autora, 2020.

### 5.2.5.1 Coleta do experimento

A coleta foi realizada nos tempos (4 dias, biorreator R1 e R2), (17 dias, biorreator R3, R4 e R5), (30 dias, biorreator R6 e R7). A escolha dos tempos se deu através de um planejamento fatorial  $2^2$ , com triplicata do ponto central. Cada biorreator conteve diferentes quantidades de consórcio microbiano, conforme o Quadro 2.

**Quadro 2** - Descrição da quantidade de sedimento, petróleo e consórcio contidos nos biorreatores e o tempo de permanência no sistema

Tempo	Biorreator	Sedimento	Petróleo bruto	Consórcio
4	Biorreator 1 (R1)	400 g	4 g = 1% do sedimento	12 g = 3% do sedimento
4	Biorreator 2 (R2)	400 g	4 g = 1% do sedimento	36 g = 9% do sedimento
17	Biorreator 3 (R3)	400 g	4 g = 1% do sedimento	24 g = 6% do sedimento
17	Biorreator 4 (R4)	400 g	4 g = 1% do sedimento	24 g = 6% do sedimento
17	Biorreator 5 (R5)	400 g	4 g = 1% do sedimento	24 g = 6% do sedimento
30	Biorreator 6 (R6)	400 g	4 g = 1% do sedimento	12 g = 3% do sedimento
30	Biorreator 7 (R7)	400 g	4 g = 1% do sedimento	36 g = 9% do sedimento
-	Controle	400g	-	-

Fonte: Autora, 2020.



O procedimento para a coleta foi realizado na capela de fluxo laminar, com o auxílio de uma colher inox, o sedimento foi homogeneizado e adicionado em frascos de vidro previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos, e descontaminados com diclorometano (DCM). Os parâmetros físico-químicos da água, como temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica, salinidade e oxigênio dissolvido (O.D), foram medidos através de uma sonda multiparâmetro da marca Horiba d-54, no momento da coleta em cada biorreator.

#### 5.2.5.2 Nutrientes: Carbono orgânico, nitrogênio total e fósforo

As análises de carbono orgânico e nitrogênio total, foram realizadas pelo analisador LECO e o fósforo pelo Espectrofotômetro. Para análise de carbono orgânico foi utilizando o método EPA-NCEA-C1282 (2002). O sedimento foi pesado em cadinho de tungstênio em balança analítica para a descarbonatação do carbono. Em seguida a amostra foi depositada no carrossel dispensador e levada ao forno de combustão do analisador elementar. Uma alíquota de 10ml dos gases produzidos é transportada pelo gás vetor hélio até um detector infravermelho não dispersivo (NDIR).

O nitrogênio total foi analisado através do método EPA-NCEA-C1282 (2002), o qual transforma os gases NO<sub>x</sub> em N<sub>2</sub> e remove o excesso de oxigênio, em seguida o N<sub>2</sub> é analisado por uma célula de condutividade térmica (TC). O limite de detecção do método para carbono orgânico total é de 0, 04% e para o nitrogênio total é de 0, 10%, e os resultados foram expressos em porcentagem (%).

A análise de fósforo foi realizada pelo método *Aspila*. Inicialmente o sedimento foi desagregado e 0,4 g da amostra foi adicionada em um tubo de ensaio de 50ml, 10 ml de HCl foi inserido no tubo, e permaneceu em mesa agitadora durante 16 h. A amostra foi então centrifugada por 15 minutos a 3000 RPM, e uma alíquota de 1ml foi retirada. Foi inserido 0,8 ml de solução ácida de molibdato e tartarato, 10, 00 ml de água deionizada, 0,2 ml de ácido ascórbico. Após 10 minutos, a amostra foi levada ao Espectrofotômetro (Agilent Cary 60) em 880 nm.

#### 5.2.5.3 Análises dos Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP)

Após a liofilização, as amostras foram moídas a 80 mesh e armazenadas em potes de vidro com tampa de alumínio. As amostras foram pesadas em balança analítica para determinação da massa utilizada.

A extração sólido/líquido foi executada através do equipamento DIONEX ASE 350 (Thermo Scientific), sob temperatura de 150 °C, por 2 ciclos de 5 minutos, utilizando o solvente diclorometano (DCM). 10 gramas da amostra foi acondicionada numa cela aço inoxidável com terra de diatomácea através do qual o solvente é percolado durante a extração.

O extrato foi recolhido em garrafas de vidro contendo fios de cobre ativados para remoção de enxofre presente na amostra. O extrato concentrado foi filtrado com algodão e sulfato de sódio em balão de fundo redondo de 250ml, com o auxílio de um funil, para retirar toda a umidade da amostra. Ao final do procedimento, somente o extrato concentrado permaneceu no balão, que em seguida passaram pelo equipamento Evaporador Rotativo (R-200 Rotary Evaporator, BUCHI).

O óleo foi armazenado em vials, pesado para obter o valor da massa do extrato e levado ao cromatógrafo movido a gás, com coluna capilar DB 5 e detector de ionização de chama (CG/FID, modelo 7890B, Agilent Technologies, Califórnia, USA) para detecção dos HTPs, o cromatógrafo apresentou as seguintes condições: Coluna cromatográfica capilar modelo DB 1 (1% de fenil-polimetilsiloxano, 15 m x 0,25 mm , 0,25 µm); vazão da fase móvel (He): 1,0 mL/min; razão de divisão do injetor (split) 20/1, volume injetado de 1 µL. As temperaturas de operação foram: injetor a 300 °C, detector a 300 °C e coluna em temperatura programada, iniciando-se em 40 °C por 2 minutos, seguida de elevação de 10 °C/min até 300 °C, permanecendo durante 12 minutos nessa temperatura final.

#### 5.2.5.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram executadas para verificar o número de células microbianas presentes em cada reator do experimento ao longo do tempo, para isso os fungos foram extraídos pelo método de diluição seriada até  $10^{-5}$  (GERBA, et al. 2004) e as bactérias por diluição seriada  $10^{-8}$  (ROMEIRO, 2013) , 24h depois a contagem de bactérias foi iniciada.

Um erlenmeyer contendo 10 g de sedimento, 250 mL de solução salina (0,95 g de NaCl e 95mL de água), 1mL da diluição foi transferida para vials contendo 9 mL da solução. O procedimento foi repetido até a diluição  $10^{-5}$ . Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para uma placa de petri correspondente, em seguida, o meio de cultivo Ágar Sabouraud Dextrose 4% foi adicionada em cima da diluição

somado a 0,1 g cloranfenicol diluído em 10 mL de etanol. As placas contendo as alíquotas das diluições foram incubadas a 30 °C durante 5 a 7 dias, após esse período o crescimento os fungos foram verificados.

Para a enumeração de UFCs de bactérias, 25 g de sedimento foi inserido em um Erlenmeyer de 250 mL contendo solução salina na proporção de 2,25 g de NaCl e 750µL de Tween 80, o conteúdo foi homogeneizado com um bastão de vidro. Posteriormente, 0,1mL da diluição foi transferida para microtubos contendo 0,9mL da solução que solução, este passo foi repetido até a diluição 10<sup>-8</sup>. 0,1mL foi retirada de cada diluição e transferida para placas de petri contendo meio de cultivo Ágar Nutriente (Acumedia). As placas foram armazenadas na incubadora sob temperatura de 30 °C durante 24 horas. Após esse tempo realizou-se a contagem das UFCs a olho nu.

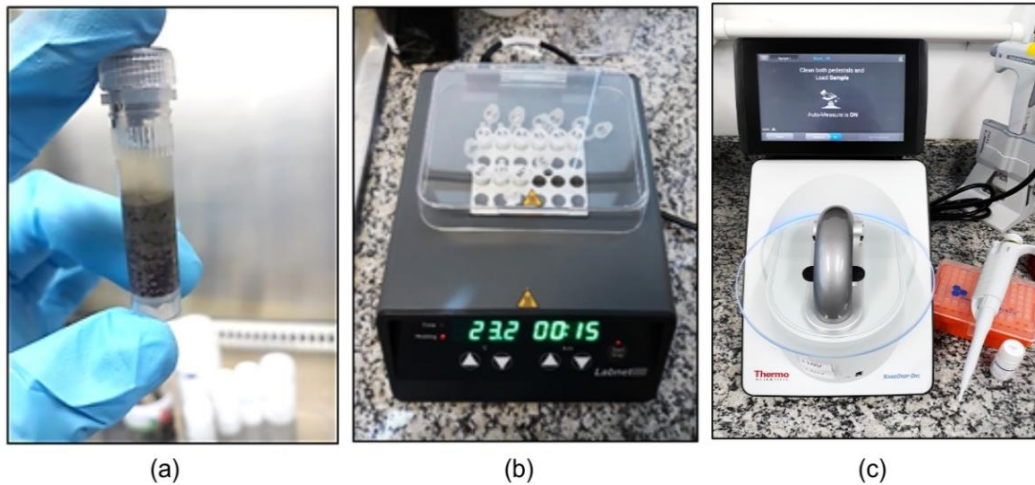
#### 5.2.5.5 Análises moleculares

A análise de biologia molecular teve por objetivo extrair o DNA do sedimento de manguezal, para amplificar os genes 16S rRNA e *alkB* presente nos microrganismos encapsulados. Para cada biorreator do experimento foi realizada análise em triplicata.

##### 5.2.5.5.1 Extração de DNA a partir do sedimento dos experimentos para processo de biorremediação

O material genético foi extraído com o kit específico para extração de DNA em solos, denominado: PowerSoil (QIAGEN), conforme protocolo do fabricante. A quantificação do DNA foi efetuada através do espectrofotômetro Nanodrop One® (Thermo Fisher) (Figura 18), A qualidade do DNA foi avaliada por medida da absorbância a 230, 260 e 280 nm respectivamente, essa proporção é um indicador preciso da pureza do DNA. A razão  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  indica pureza do DNA. Após esse procedimento, o material genético foi armazenado no freezer a -20°C, até a reação de qPCR.

**Figura 17** - Tubo de extração Power bid com sedimento (a), Amostra de DNA em banho maria (b), Quantificação do DNA extraído (c)



Fonte: Autora, 2020.

#### 5.2.5.5.2 PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação absoluta de genes através da técnica de qPCR é baseada na quantificação de padrões. Assim, a partir do sequenciamento de um fragmento do gene 16S rRNA (V4-V5, 411 pb) de um isolado do consórcio de amostras do GEOMICRO (Amostra PD7, bactéria *Pseudomonas sp*, a ser depositada no GenBank-NCBI), foi sintetizado um fragmento do gene *Integrated DNA Technology*® (IDT) gBlocks™ e utilizado para estabelecer a curva padrão para os ensaios de PCR em tempo real.

Para a síntese do gBlock™ do fragmento do gene *alkB*, utilizou-se um fragmento de 134pb da sequência de *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida* P1 alkane degradation genes (*alkB* FGHIJKL and *alkST*) and flanking DNA – AJ233397) adquirido do banco de dados Genbank no site do *National Center for Biotechnology Information* em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) usando número de acesso a partir de Smith et al. (1999) (Quadro 3). Foram realizadas sete diluições seriadas ( $10^1$  a  $10^{-6}$ ) dos fragmentos (16S e *alkB*) para a geração da curva padrão. Os padrões foram usados em triplicata para cada diluição. Os primers utilizados estão descritos no Quadro 4.

**Quadro 3** - Fragmentos de genes sintetizados em gBlock correspondente, usados para estabelecer a curva padrão da PCR em tempo real

Gene	Organismo	Número GenBank-NCBI
<b>16S rRNA</b>	<i>Pseudomonas sp.</i>	A INSERIR
GTCTCTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGGG GCTGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGG AGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAAT AAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGT AAGTTGGAT		
<b><i>alkB</i></b>	<i>Pseudomonas putida</i>	AJ233397
GATGGCTTTCGGGTGGTGGCAGTTAACAAGCGCGAACTACATTGAACAC TACGGTTTGCTGCGTGAAAAATGGCCGATGGACGATATGAACATCAA AGCCACATCACTCGTGGAACAGTAACCACATCGTGT		

Fonte: Autora, 2020.

**Quadro 4** — Primer (16S rRNA e *alkB*) usados para os ensaios de PCR em tempo real

Gene	Primer	Sequência	Fragmento	Temp. anelamento °C
<b>16S rRNA</b>	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA <sup>1</sup>	411	54
	926R	CCGYCAATTYMTTTRAGTTT <sup>2</sup>		
<b><i>alkB</i></b>	<i>alkB</i> Fd	AACTACMTCGARCAYTACGG <sup>3</sup>	100	50
	<i>alkB</i> Rd	TGAAGATGTGGTTGCTGTTCC		

Fonte: (CAPORASO et al., 2015), (PARADA et al., 2016) (POWELL et al., 2006).

#### 5.2.5.5.3 Reação para o gene 16S rRNA

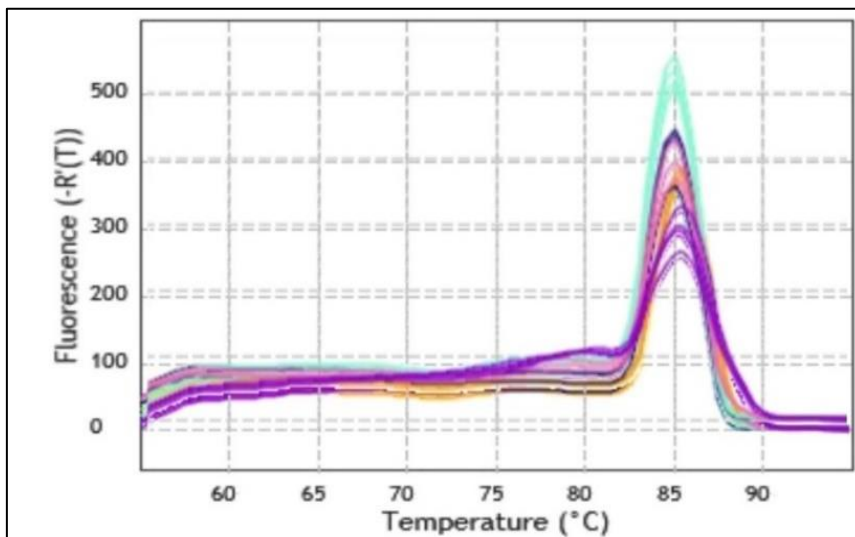
Para o mix da reação de qPCR, foram utilizadas as amostras de DNA extraído e diluído do experimento de biorremediação de cada reator (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, C4, C17, C30) e amostra padrão PD7 ( 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, com 8ng/μL de DNA diluído para 10<sup>1</sup> até 10<sup>2</sup>), a fim de minimizar a inibição da PCR e adquirir um sinal dentro do padrão da curva. Foi realizado um mix de reação para 69 amostras (1,

2,3,4,5,6,7, em quadruplicata +10 amostras de DNA do experimento em quadruplicata + 1 Branco), utilizando 24.15µL de primer forward, e 24.15µL de primer reverse, 690µL de mix Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green (Agilent) e 586,5µL de água livre de nuclease de grau PCR.

Foi dado um vórtex na amostra e 76.8µL foi adicionado em ependorf de 6µL correspondente a cada amostra. Foi inserido 3.2µL de DNA correspondente a cada amostra (0,8µL de DNA), no ependorf com os 76.8µL, totalizando 80µL. Foi dado um vórtex em cada mistura e para cada amostra foi adicionado um volume total de 20µL em cada poço da placa de PCR, três vezes, ou seja, em triplicata. A amostra foi levada ao equipamento Termociclador AriaMx Real-Time PCR System (Agilent©).

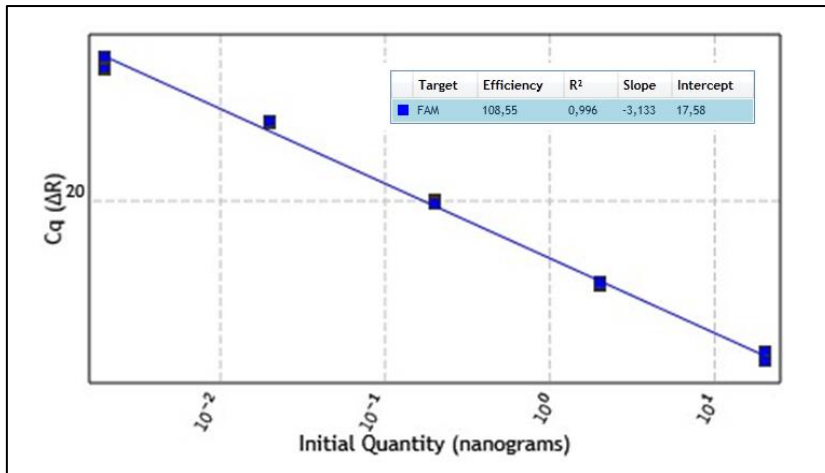
A qPCR foi realizada nas seguintes condições: 5 min a 95°C, para desnaturação; 40 ciclos de 10s a 95°C, 30s a 57°C, 30s a 72 °C, 10s 80°C para o anelamento; 30s a 95°C, 30s a 57°C, 30s a 95°C para a polimerização. A análise da curva de *melt* (Figura 19) foi realizada no final de cada reação para verificar a pureza do produto amplificado, detecção de produtos de PCR inespecíficos, como dímeros primários (Wang et al., 2010). A reação alcançou a eficiência de 109,18, R<sup>2</sup> 0,996 e Slope-3,12 (Figura 20).

**Figura 18** - Curva de fusão (Melt curve) dos amplicons do gene 16S rRNA durante qPCR, todos com o mesmo pico e sem dímeros primário



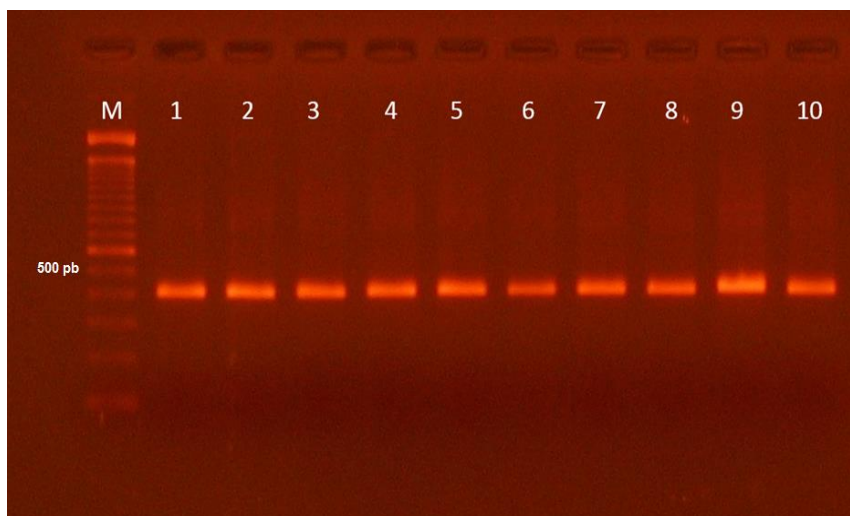
Fonte: Autora, 2020.

**Figura 19** - Gráfico Curva padrão gerada a partir do gene 16S rRNA para quantificação do número de cópias (diluições 10<sup>-1</sup> - 10<sup>-5</sup>)



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 20** - Gel de eletroforese em agarose do fragmento do gene 16S rRNA de aproximadamente 412 pb



O *ladder* de 100 pares de bases (M) mostra o gene 16S rRNA a aproximadamente 412 pb; que corresponde ao tamanho esperado do produto. A amostra 1 é a colônia padrão do consórcio (PD7); as linhas de 2 a 8 são produtos de PCR do gene 16S rRNA dos tratamentos R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, respectivamente.

Fonte: Autora, 2020.

#### 5.2.5.5.4 Reação para o gene *alkB*

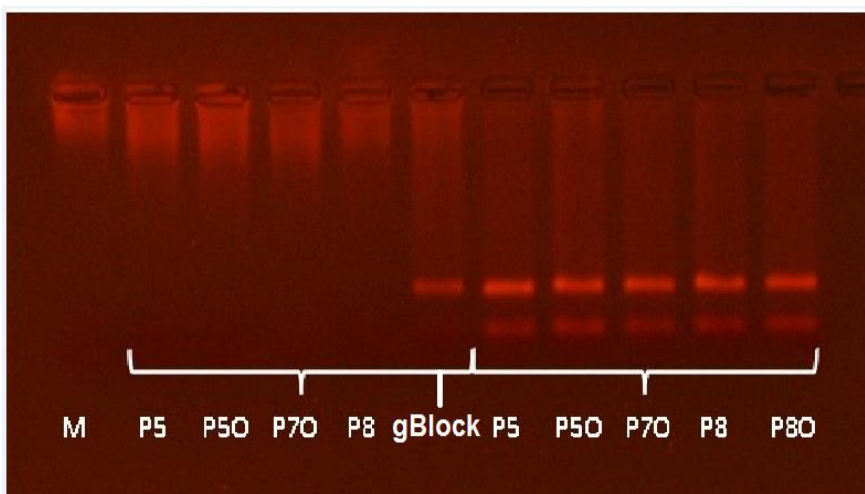
Para o mix da reação de qPCR, foram utilizadas amostras de DNA extraído do experimento de biorremediação de cada reator ( R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, C4, C17, C30) e amostra padrão PD7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, com 8ng/μL de DNA diluído para 10<sup>1</sup>

até  $10^2$ ), a fim de minimizar a inibição da PCR e adquirir um sinal dentro do padrão curva. Foi realizado um mix de reação para 71 amostras (pd8 1, 2,3,4,5,6,7, em quadruplicada +10 amostras de DNA do experimento em quadruplicada + 2 Branco= 72), utilizando 14,4  $\mu$ L de primer forward, e 14,4  $\mu$ L de primer reverse, 350,4  $\mu$ L de mix Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green (Agilent) e 277,4  $\mu$ L de água livre de nuclease de grau PCR. Foi dado um vórtex na amostra e 36  $\mu$ L foi adicionado em ependorf de 6  $\mu$ L correspondente a cada amostra.

Foi inserido 4  $\mu$ L de DNA correspondente a cada amostra (1  $\mu$ L de DNA), no ependorf com os 36  $\mu$ L, totalizando 40  $\mu$ L. Foi dado um vórtex em cada mistura e para cada amostra foi adicionado um volume total de 10  $\mu$ L em cada poço da placa de PCR, três vezes, ou seja, em triplicata. A amostra foi levada ao equipamento Termociclador AriaMx Real-Time PCR System (Agilent®).

A qPCR foi realizada nas seguintes condições: 5 min a 95°C, para desnaturação; 40 ciclos de 10s a 95°C, 30s a 51°C, 30s a 72°C para o anelamento; 30s a 95°C, 30s a 51°C, 30s a 95°C para a polimerização. A análise da curva de *melt* foi realizada no final de cada reação para verificar a pureza do produto amplificado, detecção de produtos de PCR inespecíficos, como dímeros primários (Wang et al., 2011). Fragmento gBlock diluído e amostras utilizadas do consórcio para confirmação do gene. Foram detectadas bandas únicas para cada amostra, mostrando a especificidade dos pares de iniciadores (Figura 22).

**Figura 21** - Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos de amplificação por PCR para o gene *alkB*



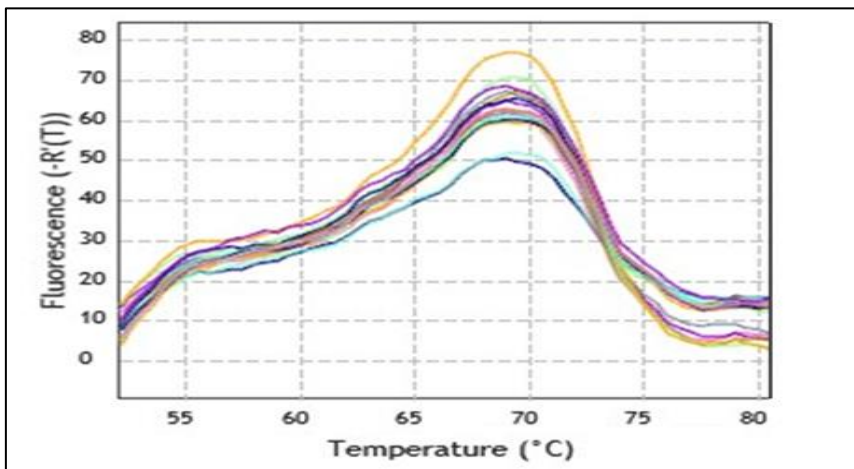
M: Marcador de peso molecular 100pb.

Fonte: Autora, 2020.



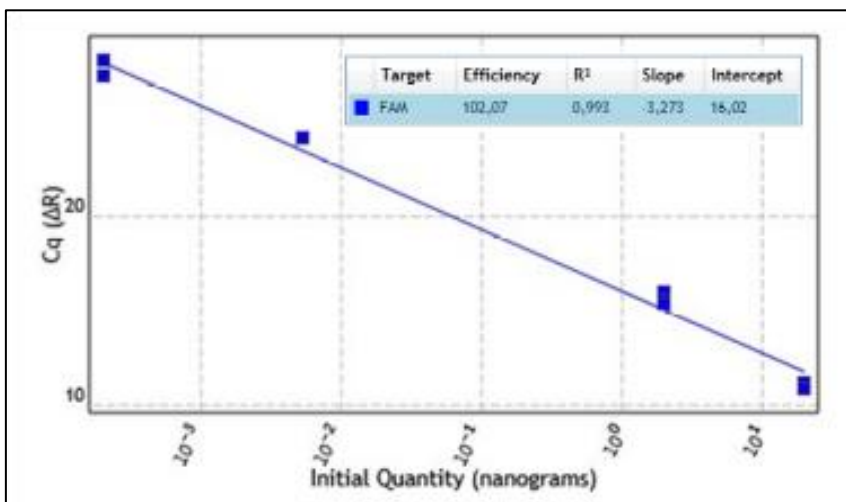
O produto foi extraído do gel foi purificado e utilizado para uma curva padrão e a (Figura 23), mostra a curva de *melt* dos padrões após o ensaio qPCR, enquanto a (Figura 24) mostra a curva padrão. A curva de fusão mostra apenas um pico correspondente a cerca de 70 graus, sem dímeros primários indicando a pureza e especificidade do produto de PCR. A curva padrão para o gene *alkB* mostraram eficiência que variou 97 a 104,3, inclinação (Slope) de -3,32 a -3,37 e  $R^2 = 0.99$ .

**Figura 22** - Curva de fusão (Melt curve) dos amplicons do gene *alkB* durante a qPCR, todos com o mesmo pico e sem dímeros primários



Fonte: Autora, 2020.

**Figura 23** - Curva padrão gerada a partir do gene *alkB* para quantificação do número de cópias



Fonte: Autora, 2020.

#### 5.2.5.5.5 Cálculo de quantidades de genes

Para quantificar cópias dos genes 16S rRNA e *alkB* nas amostras de DNA, as curvas padrão de qPCR tiveram que ser estabelecidas com precisão. Os fragmentos dos genes para as curvas padrão foram encomendados e enviados a partir do gBlock™(IDT) em quantidades de 200 ng e depois reidratados com tampão TE. O número dos genes em uma alíquota foi calculado usando a massa (m) dos fragmentos em um determinado volume e o peso molecular (W<sub>m</sub>) usando a seguinte equação:

$$\text{Cópias } \mu\text{l}^{-1} = (m \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}) / W_m.$$

A solução estoque foi usada para criar uma diluição seriada (sete diluições) e a concentração das cópias dos genes foram calculadas no Software AriaMx Real-Time PCR System V.1.7 (Agilent©). A partir dos ensaios de qPCR, os dados coletados foram baseados em uma curva padrão já estabelecida com uma eficiência de 85-105% e R<sup>2</sup> > 0,99 e réplicas de padrões individuais com um desvio padrão do ciclo de limiar inferior a 0,5 ciclos. Nenhum modelo de controle negativo (NTCs) foram incluídos e não resultaram em outros produtos além do dímero primário.

#### 5.2.5.6 Análise estatística

O resultado do número de cópias passou por tratamento estatístico e foram apresentados em gráficos com as médias. A média e o desvio padrão foram calculados através do Microsoft Excel 2016.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As discussões dos resultados obtidos ao longo de cada experimento de biorremediação, análises físicas, químicas, geoquímicas microbiológica e molecular estão apresentadas a seguir.

### 5.3.1 Caracterização do petróleo utilizado no experimento para processo de biorremediação

Os óleos provenientes do Campo: Norte Fazenda Caruaçu – Bacia do Recôncavo, profundidade: 1064,0 m, são considerados leves, uma vez que, apresentam o grau °API @ 20 °C: 37,36 e densidade @ 20 °C: 0,8371, do tipo parafínico (>presença de n 35 alcanos) e baixa quantidade de compostos NSO. Este óleo é de origem lacustre de água doce, e apresenta as seguintes características (Tabela 4).

**Tabela 4** - Caracterização do petróleo utilizado no experimento- Campo: Norte Fazenda Caruaçu- Bacia do Recôncavo

Alcano	Concentração	Concentração	LQM (ppm)
	mg/Kg= ppm	µg/Kg = ppb	
PRISTANO	3,61	3606,84	1,15
FITANO	2,12	2119,09	1,45
HTP	406,41	406410,59	N.A.
UCM	67,21	67210,34	N.A.
PRISTANO/FITANO	1,7		N.A.
PRISTANO/n-C17	0,21		N.A.
FITANO/n-C18	0,15		N.A.

Fonte: Autora, 2020.

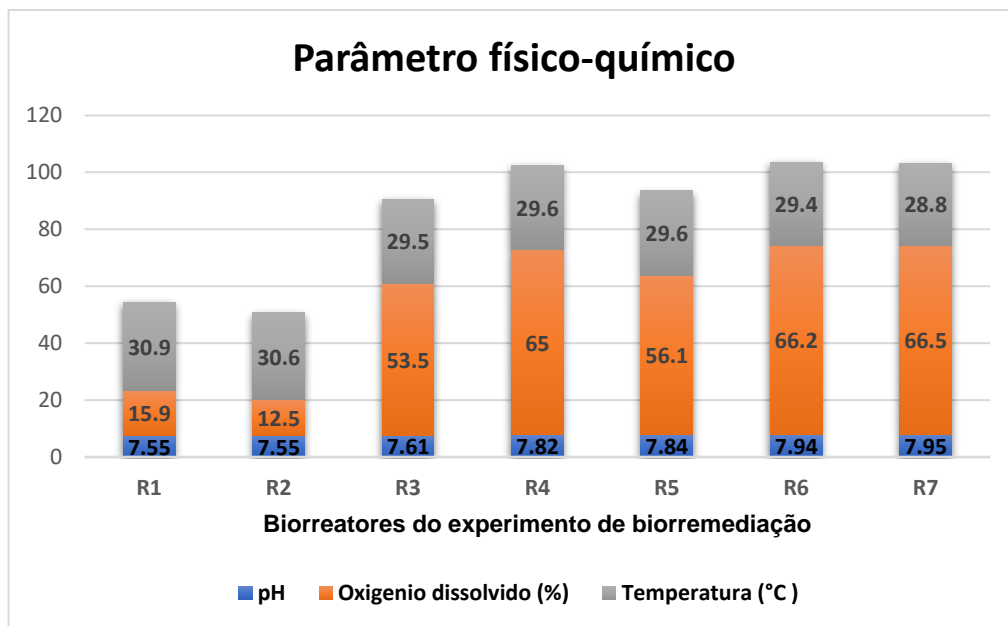
Foi realizado o fracionamento do óleo, e, o perfil óleo da Bacia de Recôncavo possui uma distribuição bimodal das *n*-parafinas, que pode ser visualizada nos tempos de retenção entre 8 e 30 minutos, com maiores abundâncias nos picos (*n*C14-*n*C17) e (*n*C24-*n*C27), é classificado como óleo leve (°API superior a 29,5), do tipo parafínico (>presença de *n*-alcanos), com baixa proporção de compostos NSO.

### 5.3.2 Monitoramento do experimento para processo de biorremediação

Os manguezais apresentam grandes variações de pH e temperatura, detém grande aporte de matéria orgânica com alta produtividade primária, riqueza e diversidade microbiana para realização da ciclagem de nutrientes no ecossistema. Entretanto, para que aconteça a biorremediação de manguezal com petróleo, os

microrganismos dependem de fatores ambientais favoráveis ao processo, como temperatura adequada, pH, aceitador de elétrons, salinidade, oxigênio, genes degradadores e biodisponibilidade do petróleo e de nutrientes como fósforo e nitrogênio para os microrganismos. Experimentos de biorremediação, em condições semelhantes ao ambiente natural, permitem demonstrar a capacidade de degradação de xenobióticos, ou seja, de substâncias estranhas ao ambiente, a exemplo do petróleo e seus componentes, portanto os biorreatores são importantes, pois possibilitam o controle das variáveis químicas, físicas e biológicas, permitindo a avaliação de diferentes respostas microbianas aos ambientes poluídos (DELLAGNEZZE et al., 2016).

**Figura 24** - Variação dos parâmetros físico-químicos encontrados no experimento de biorremediação



Fonte: Autora, 2020.

Conforme mostras Figura 25, os fatores que mais variaram no processo. A temperatura, apresentou valor mínimo de 28, 8°C no R7 e o valor máximo de 30, 9°C no R1, este parâmetro exerce forte influência na biorremediação, uma vez que, acelera as reações químicas e enzimáticas dos microrganismos, fazendo-os crescer rapidamente. A temperatura ideal para biodegradação é de 15 a 30 °C para processos aeróbicos e 25 a 35 °C para processos anaeróbicos (SANTOS, et al., 2011). Portanto a temperatura manteve-se adequada ao processo de biorremediação.

A salinidade variou pouco apresentando o percentual mínimo de 38% no R3 e o percentual máximo de 43% no R6. Esta baixa variação da salinidade pode ter relação com a temperatura, que se manteve praticamente constante, ou pelo fato de o sistema de biorreator fechado reduzir a evaporação, considerando que o aumento da temperatura favorece o processo de evaporação da água, tornando-a mais salina. Em ambiente natural a salinidade depende do comportamento das marés, e pode afetar a degradação de compostos oleosos em alguns manguezais (SANTOS, et al., 2011). O oxigênio dissolvido oscilou significativamente, apresentando o menor percentual em torno de 12,5% no R2, e 66,5% no R7, o oxigênio é um aceitador final de elétrons no metabolismo microbiano, participando das principais vias de degradação de hidrocarbonetos, e sua limitação é uma das razões para a redução da biodegradação de óleo nos manguezais (SANTOS, et al., 2011).

O valor mínimo de condutividade elétrica foi de aproximadamente 66,0 m's no R5, e o valor máximo foi de 67,0 m's no R3. O pH se manteve em torno de 7, em todos os biorreatores, valores inferiores ao encontrado, são referidos como ácidos, acima disso são considerados alcalinos (MADIGAN et al., 2016), este parâmetro determina bioquimicamente a prevalência de degradação da molécula influenciando a atividade microbiana, desta forma, dependendo do valor de pH do meio, haverá ou não atividade microbiana atuando sobre a degradação do petróleo.

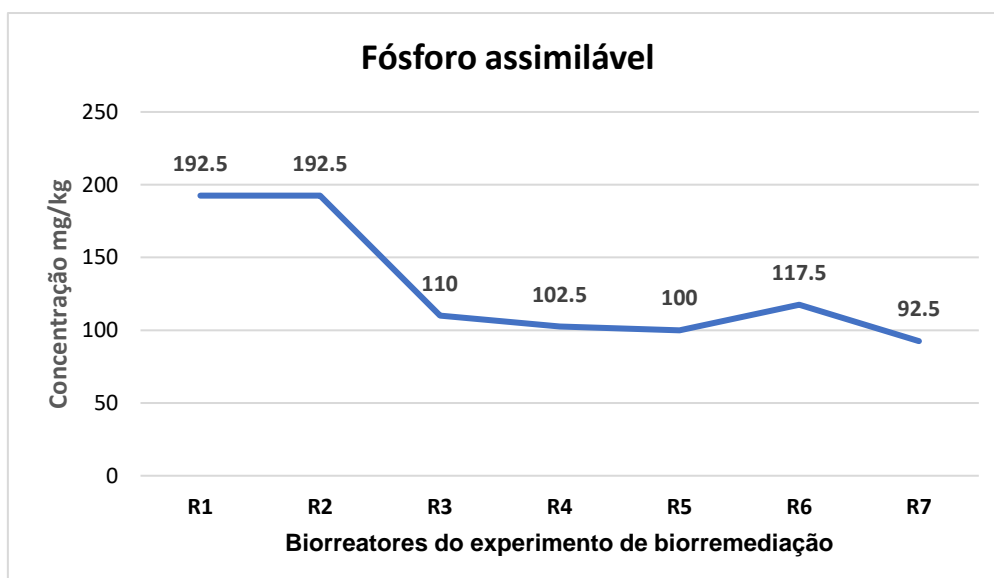
O carbono, fósforo e nitrogênio são macronutrientes importantes para manter as células microbianas. Ao contrário das bactérias autótrofas, as bactérias heterotrofas, não conseguem sintetizar suas próprias estruturas celulares a partir de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) atmosférico, precisam retirar carbono de variadas estruturas orgânicas como ácidos graxos, bases nitrogenadas, compostos aromáticos e hidrocarbonetos. Outros nutrientes como o hidrogênio, oxigênio, enxofre, potássio, sódio, cálcio e magnésios são requeridos em quantidades menores para a síntese de ácidos nucleicos, vitaminas, proteínas e crescimento celular (MADIGAN et al., 2016).

Portanto, a biorremediação pode ser melhorada se esses nutrientes forem fornecidos às bactérias residentes, tendo em vista que o petróleo é um composto deficiente em nitrogênio e fósforo (SHAHI et al., 2016). Neste estudo o carbono orgânico em torno de 2,59% no quarto dia e 2,18% no trigésimo dia. O nitrogênio é um macronutriente muito importante para qualquer célula microbiana e geralmente os procariotos utilizam a amônia como fonte de nitrogênio. O  $\text{N}_2$  só consegue ser utilizado como fonte de nitrogênio, por bactérias fixadoras (MADIGAN et al., 2016), tal

elemento é utilizado pelas bactérias, para formação de proteínas e componentes básicos da biomassa (ESTEVES, 1998). Neste trabalho, os valores de nitrogênio se apresentaram abaixo do limite de detecção do equipamento Leco ( $<0,10$ ), portanto não foi possível avaliar se houve consumo desse elemento pelo consórcio, entretanto, considerando que o crescimento dos microrganismos depende da presença do nitrogênio (MADIGAN et al., 2016), houve crescimento microbiano, isso pode ser explicado pelo uso da folha de manguezal como nutriente.

Outra explicação para que consigamos avaliar a presença desse nutriente seria através da determinação do nitrato e amônia, entretanto estas não foram as formas de nitrogênio analisadas. O fósforo é um elemento fundamental para o metabolismo dos microrganismos, uma vez que, participa da estruturação da membrana celular, por meio dos fosfolipídios (ESTEVES, 1998). Conforme mostra a Figura 26, houve uma diminuição da concentração de fósforo no sedimento ao longo do tempo, apresentando valores entre 100 e 110 mg/kg com 6% de consórcio no décimo sétimo dia, 117,5 mg/kg com 3% de consórcio e 92,5 mg/kg no trigésimo dia com 9% de consórcio, desta forma, o consumo desse elemento relaciona-se proporcionalmente com o tempo e o percentual de microrganismos adicionados.

**Figura 25** - Valores da concentração de fósforo (mg/kg) durante o tempo de experimento

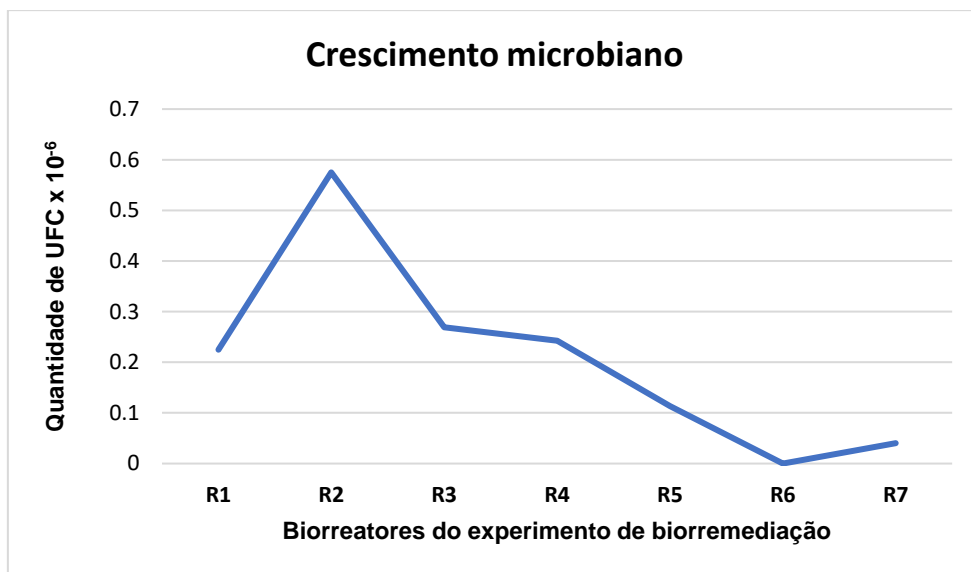


Fonte: Autora, 2020.

O crescimento microbiano refere-se ao aumento no número de células, que na maioria das bactérias, ocorre por divisão binária. Quando inoculada em meio de

cultura, as bactérias passam por três fases, denominadas fase lag, cujo crescimento é iniciado após um período de tempo; fase exponencial, quando a população duplica-se em intervalos regulares por um curto ou longo período de tempo e fase estacionária quando há uma limitação no crescimento e morte da população, devido à escassez de nutrientes essenciais (MADIGAN et al., 2016).

**Figura 26** - Crescimento microbiano ao longo do tempo do experimento de biorremediação



Fonte: Autora, 2020.

A maior quantidade de UFCs ocorreu no quarto dia, com 9% de consórcio, corroborando para o sucesso do bioaumento, entretanto, no trigésimo dia com 9% de consórcio houve pouco crescimento, isto pode ter relação com a biodisponibilidade dos nutrientes ao longo do tempo limitando o crescimento populacional (Figura 27). Além disso, tratando-se de microrganismos diferentes pode haver exigências nutricionais diferentes, sendo necessário oferecer os nutrientes adequados e em concentrações adequadas (MADIGAN et al., 2016).

No décimo sétimo dia, houve um declínio de microrganismo ao longo do tempo, no trigésimo dia houve uma diminuição no crescimento dos microrganismos (R7), se comparados aos biorreatores do quarto dia com a mesma quantidade de consórcio. Isso pode ter relação a biodisponibilidade do nutriente fósforo, que inicialmente apresentava a concentração de 192,5 mg/Kg no R4 e diminuiu para 117,50 mg/Kg R6, e 92,50 mg/Kg no R7 e com a biodisponibilidade do petróleo, que nos primeiros dias de experimento esteve mais acessível aos microrganismos.

Isto porque conforme o passar do tempo, o petróleo é adsorvido no mineral argila presente no sedimento, dificultando o acesso dos microrganismos ao petróleo. Segundo DANTAS (2016), para melhor entendimento a respeito da biodegradação por este consórcio, é necessário identificá-lo a nível molecular e isolar as enzimas responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos, trabalho que vem sendo realizado pelo grupo de pesquisa GEOMICRO, no Instituto de geociências da Universidade Federal da Bahia.

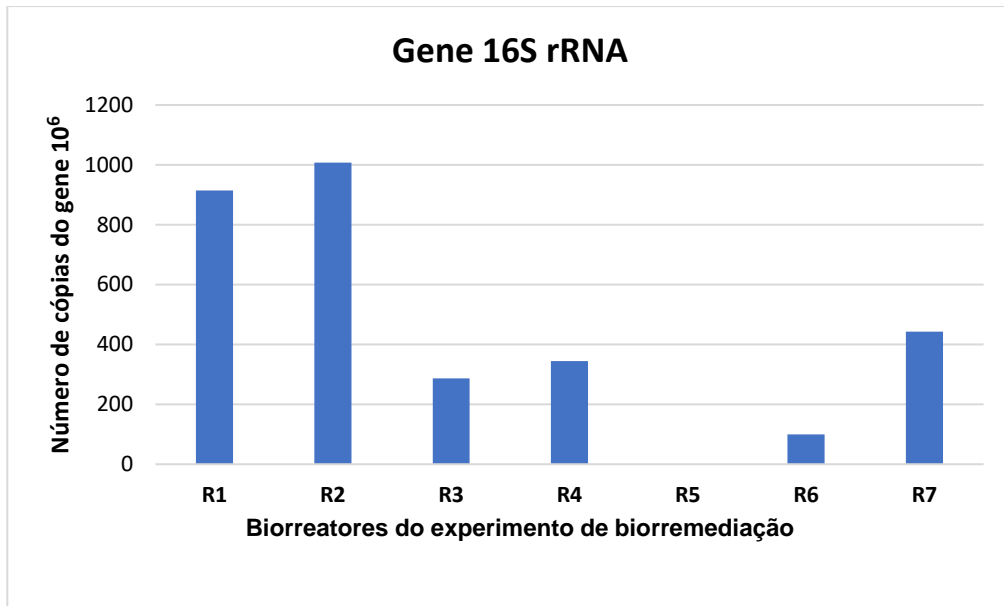
O monitoramento da abundância de genes de degradação de hidrocarbonetos é essencial para compreender o potencial catabólico da comunidade microbiana degradante em um ambiente. Esse conhecimento pode ser aproveitado para aumentar a eficiência da biorremediação; pois, entender o comportamento das populações microbianas hidrocarbonoclásticas é um pré-requisito para um processo de implementação de biorremediação bem-sucedido (BAEK et al., 2009).

A pesquisa do GEOMICRO sobre o sequenciamento de DNA do consórcio utilizado neste experimento, constatou que das 10 cepas de bactérias 7 possuem o gene Alkane hydroxylase (*alkB*), que produz enzimas degradadoras de *n*-alcanos. A quantificação de genes degradadores de hidrocarbonetos traz informações sobre a resposta da comunidade microbiana indígena ao óleo residual, constituindo um passo importante na compreensão de muitos processos ecológicos (HASSANSHAHIAN et al., 2014; SHAHI et al., 2016).

O gene 16s rRNA, compõem regiões do ribossomo de bactérias que sofreram poucas variações durante a evolução, por isso é utilizado para reconstrução filogenética, avaliação da diversidade e presença ou ausência de microrganismos, em amostras ambientais. O maior número de cópias desse gene foi encontrado R2 ( $1.008 \pm 350$ )  $\times 10^6$  seguido do R1 ( $915 \pm 350$ )  $\times 10^6$ , R7 ( $443 \pm 310$ )  $\times 10^6$ , R4 ( $345 \pm 143$ )  $\times 10^6$ , R3 ( $287 \pm 112$ )  $\times 10^6$ . O maior número de cópias no R2, relaciona-se positivamente com a bioaugmentação e o alto número de UFC, visto no gráfico abaixo:



**Figura 27** - Número de cópias do gene 16SrRNA durante o tempo de experimento de biorremediação



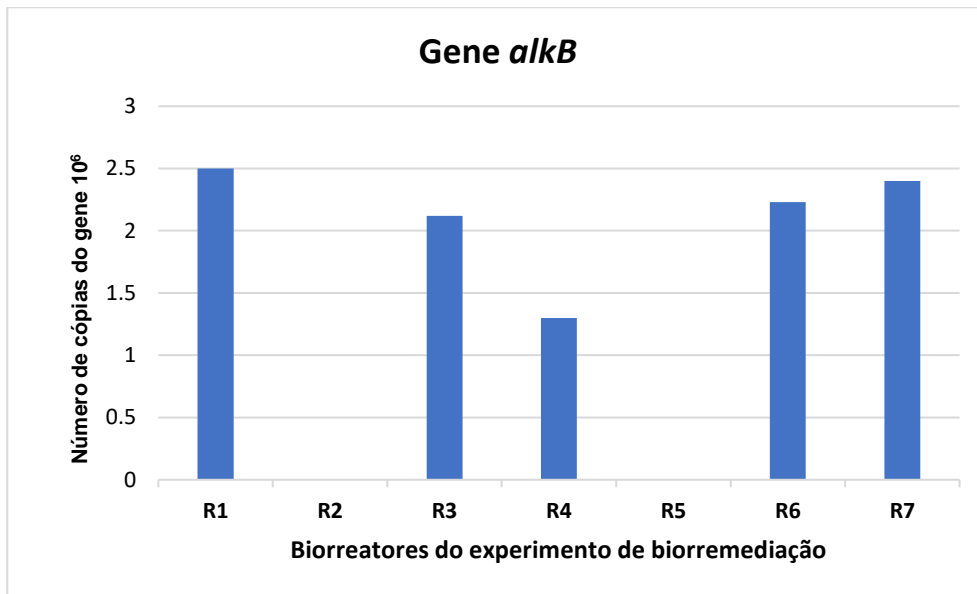
Fonte: Autora, 2020.

O gene *alkB* possui a principal enzima de degradação de alcanos em bactérias, suas hidroxilases alcalinas (AHs) são amplamente encontradas em bactérias gram positivas e gram negativas (NIE et al., 2014). Conforme mostra a Figura 28, o maior número de cópias do gene *alkB* ocorreu no R1 (3% de consórcio) seguido do R6 (3% de consórcio), R3 (6% de consórcio), entretanto esperava-se encontrar maiores números de cópias no R2 e R7, com as maiores porcentagens de consórcio (9%).

A quantificação do *alkB* nos biorreatores R2 e R5 não foi possível, provavelmente devido à dificuldade de limpeza da extração de DNA do sedimento, as substâncias húmicas presentes na amostra consistem em inibidores de PCR, impedindo a amplificação do gene.

Foi observado, que o número de cópias (gene/solo) do gene *alkB* apresentou os seguintes valores em cada biorreator: R1  $(2.5 \pm 0.8) \times 10^6$ , R3  $(2.12 \pm 1.5) \times 10^6$ , R4  $(1.3 \pm 1.2) \times 10^6$ , R6  $(2.23 \pm 1.6) \times 10^6$  e R7  $(2.4 \pm 0.6) \times 10^6$ , todos inferiores ao número de cópias do gene 16S rRNA encontrado nos mesmos biorreatores R1  $(915 \pm 350) \times 10^6$ , R2  $(1.008 \pm 350) \times 10^6$ , R3  $(287 \pm 112) \times 10^6$ , R4  $(345 \pm 143) \times 10^6$ , R6  $(100 \pm 87) \times 10^6$  e R7  $(443 \pm 310) \times 10^6$ , isto devido ao fato do 16SrRNA estar presente em todas as bactérias, enquanto o gene *alkB* encontra-se apenas em bactérias hidrocarbonoclasticas.

**Figura 28** - Número de cópias do gene *alkB* ao longo do tempo de experimento



Fonte: Autora, 2020.

Conjuntos diferentes deste gene codificam enzimas com faixas de substratos distintas, podendo mineralizar alcanos de cadeia mais longa (C30-C40) (LIU et al., 2015), além disso, enzimas hidroxilases de actinomicetos quando são fundidas com a proteína rubredoxina pode promover a degradação de *n*-alcanos com comprimento até C32 (GIEBLER et al., 2014; NIE et al., 2014).

Sabe-se que após a degradação pelo *alkB*, outros genes atuam na degradação das cadeias maiores de *n*-alcanos, entretanto, o gene *alkB* é o marcador genético funcional mais adequado para monitorar a degradação de *n*-alcanos no ecossistema, se comparados com marcadores genéticos filogenéticos, presentes em microrganismos que exercem outras funções (GIEBLER et al., 2014).

Desta forma, a análise metagenoma dos ambientes contaminados por petróleo é a abordagem que permite uma melhor avaliação das comunidades microbianas, pois traz informações sobre todos os genes funcionais envolvidos na degradação de hidrocarbonetos alifáticos e ainda de hidrocarbonetos aromáticos (ABBASIAN et al., 2016).

### 5.3.3 Avaliação da degradação de n-alcenos no experimento para processo de biorremediação

A baixa biodisponibilidade do petróleo para os microrganismos é uma das principais razões para a limitação da biodegradação do óleo. isto acontece, devido a interação dos hidrocarbonetos com os componentes do solo ou sedimento, formando agregados óleo mais solo, difíceis de serem removidos.

**Tabela 5** - Granulometria do sedimento de manguezal utilizado no experimento

<b>Granulometria</b>	<b>Concentração kg<sup>-1</sup></b>
<b>Areia grossa</b>	10,03g
<b>Areia fina</b>	2,69g
<b>Areia muito fina</b>	18,73g
<b>Silte</b>	59,99g
<b>Argila</b>	8,57g

Fonte: Autora, 2020.

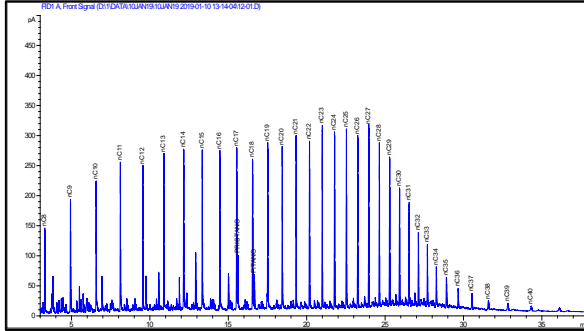
Como mostrado na Tabela 5, a granulometria do sedimento de manguezal utilizado neste trabalho, é constituída majoritariamente por silte (60%) e areia muito fina (19%), desta forma, considera-se que a granulometria, quantidade de matéria orgânica, porosidade, densidade da partícula e composição mineralógica, são fatores que facilitam a entrada do óleo no solo ou sedimento (SANTOS et al., 2014).

Os constituintes do petróleo podem ser retidos pelos sólidos do solo, por infiltração e retenção nos poros, ou por adsorção à superfície das partículas. Em sedimentos com muita matéria orgânica, a adsorção ocorre por troca de cátions (moléculas orgânicas carregadas positivamente), formação de pontes de hidrogênio, interação de Van der Waals, troca de ligantes, transferência de cargas e formação de ligações covalentes (ANDRADE et al., 2007).

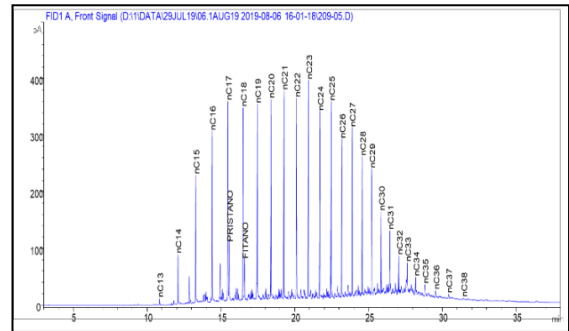
O petróleo utilizado no experimento é do tipo parafínico (> presença de n 35 alcanos) e baixa quantidade de compostos NSO (ANDRADE et al., 2007). Conforme mostra a Figura 30, houve uma diminuição nos picos de n-alcenos durante os tempos de experimento, com diferentes quantidades de consórcio microbiano.

**Figura 30-** Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C8 a n- C40) do óleo do Campo: Norte Fazenda Caruaçu- Bacia do Recôncavo, adicionado no experimento de biorremediação. O eixo X representa o tempo de retenção em minutos e o eixo Y refere-se a abundância

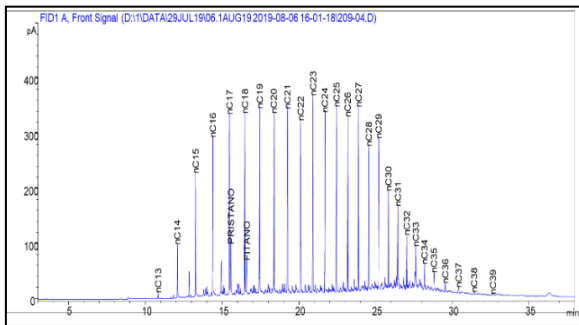
**Concentração inicial**



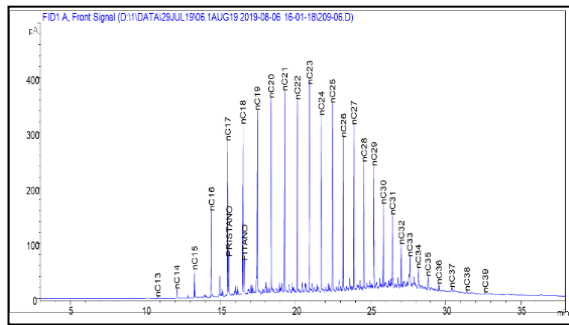
**R1(4 dias e 3% de consórcio).**



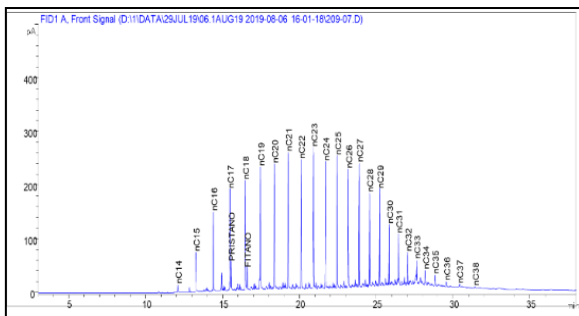
**R2 (4 dias e 9% de consórcio).**



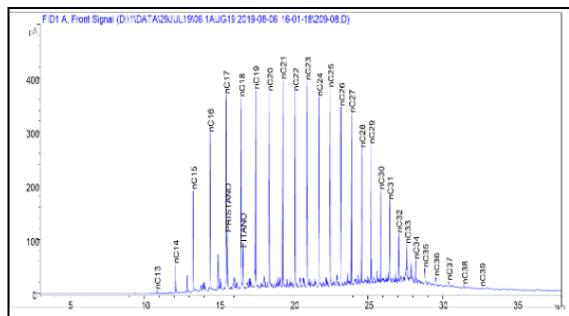
**R3 (17 dias e 6% de consórcio).**



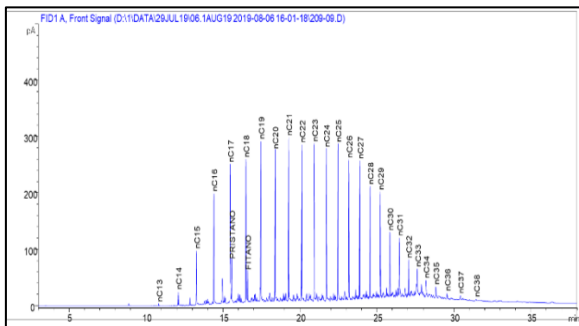
**R4 (17 dias e 6% de consórcio)**



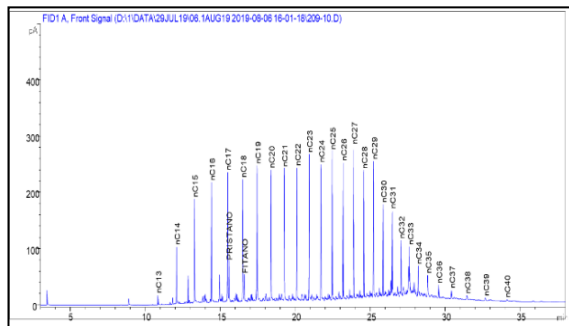
**R5 (17 dias e 6% de consórcio)**



**R6 (30 dias e 3% de consórcio)**

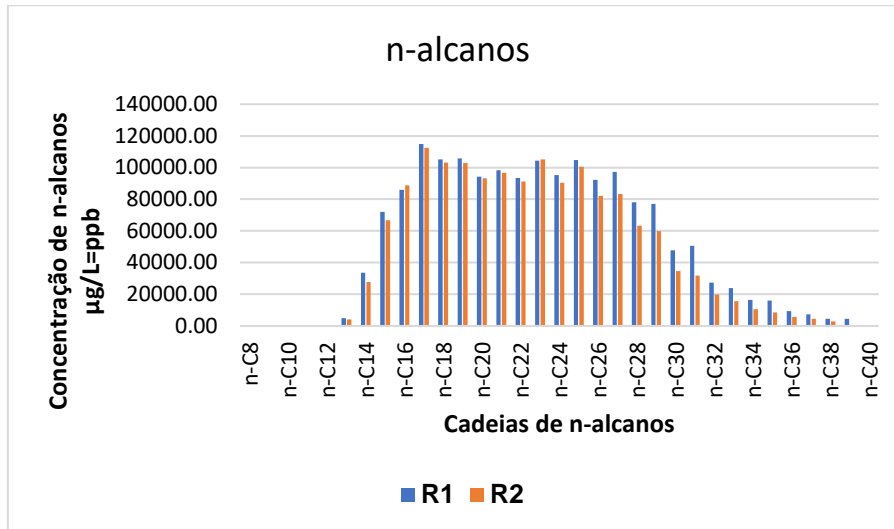


**R7 (30 dias e 9% de consórcio)**



Conforme mostra a Figura 31, quatro dias após a adição do petróleo no experimento de biorremediação com sedimento de manguezal e consórcio microbiano, foi realizada a primeira coleta do experimento e após a análise de HTP, foi possível observar uma grande redução dos n-alcenos (n-C8 a n-C16).

**Figura 31** - Cromatograma com os picos de n-alcenos dos biorreatores (R1) e (R2), do quarto dia de experimento



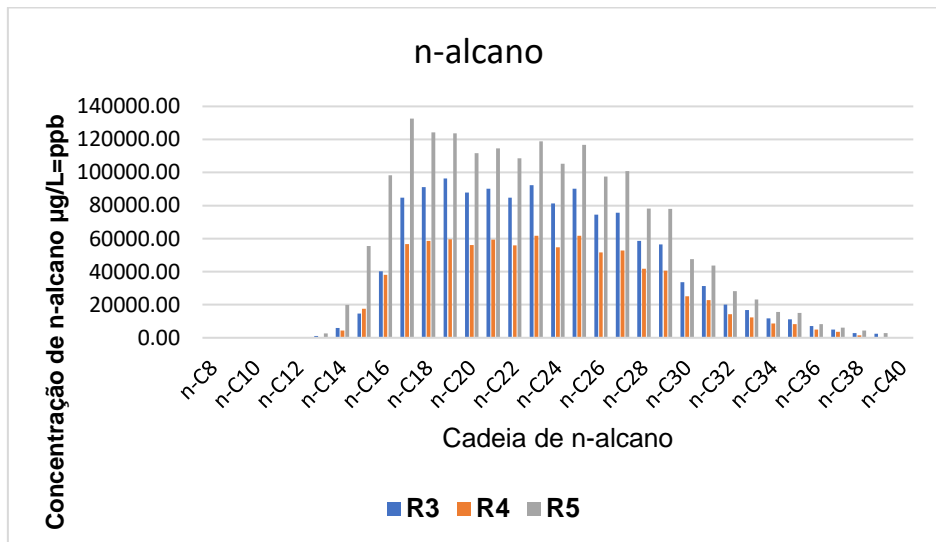
Fonte: Autora, 2020.

Observando o cromatograma do quarto dia de experimento, pode-se perceber uma maior diminuição nos picos de n-alcenos (n-C24 ao n-C38), no biorreator R2 com 9% de consórcio microbiano, nestes dias iniciais, o óleo esteve mais biodisponível para os microrganismos que provavelmente começaram a atingir o crescimento exponencial, visto na Figura 27(crescimento microbiano) e na Figura 29 (número de cópias do gene *alkB*, degradador de n-alceno).

No cromatograma do décimo sétimo dia de experimento, observa-se grande redução nos picos de n-alcenos, se comparados com o quarto dia. Entretanto, analisando os três cromatogramas do ponto central em triplicata do experimento, verifica-se que apesar de ambos possuírem a mesma quantidade de consórcio microbiano, submetidos a mesma quantidade de dias, há diferenças nas taxas de degradação e no número de cópias do gene *alkB* (Figura 29). Isto porque mesmo

submetidos as mesmas condições os microrganismos respondem de maneiras diferentes.

**Figura 32** - Cromatograma com os picos de n-alcenos dos biorreatores (R3), (R4) e (R5), do décimo sétimo dia de experimento



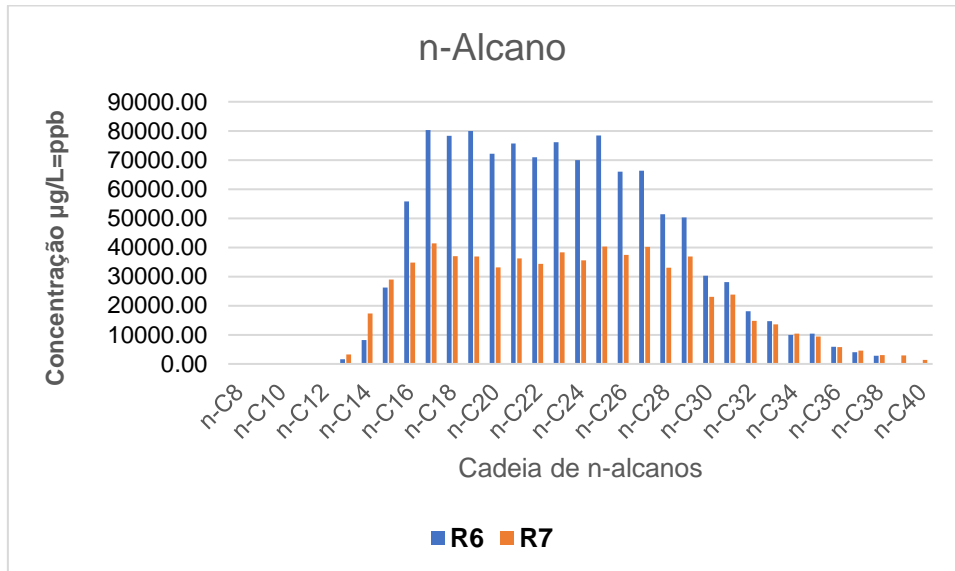
Fonte: Autora, 2020.

Além disso, foi utilizado um consórcio microbiano composto por microrganismos que provavelmente degradam diferentes frações do óleo. Isto é positivo, uma vez que a biodegradação pode ser acelerada com a utilização de consórcio, pois a cooperação das atividades metabólicas dos membros do consórcio aprimoram o processo, de forma que, alguns membros podem utilizar os compostos intermediários oriundos da degradação de compostos maiores, aumentando a taxa de biodegradação (WANAPAIAN et al., 2018).

O cromatograma do trigésimo dia, mostra grande redução dos picos de n-alcenos no biorreator R7, com 9% de consórcio e aumento no número de cópias do gene *alkB* (Figura 29), corroborando com a eficiência da bioaugmentação. Portanto, comparando-se os mesmos tempos de experimento com diferentes quantidades de

consórcio, a biodegradação é muito mais eficiente quando há um maior percentual de microrganismo.

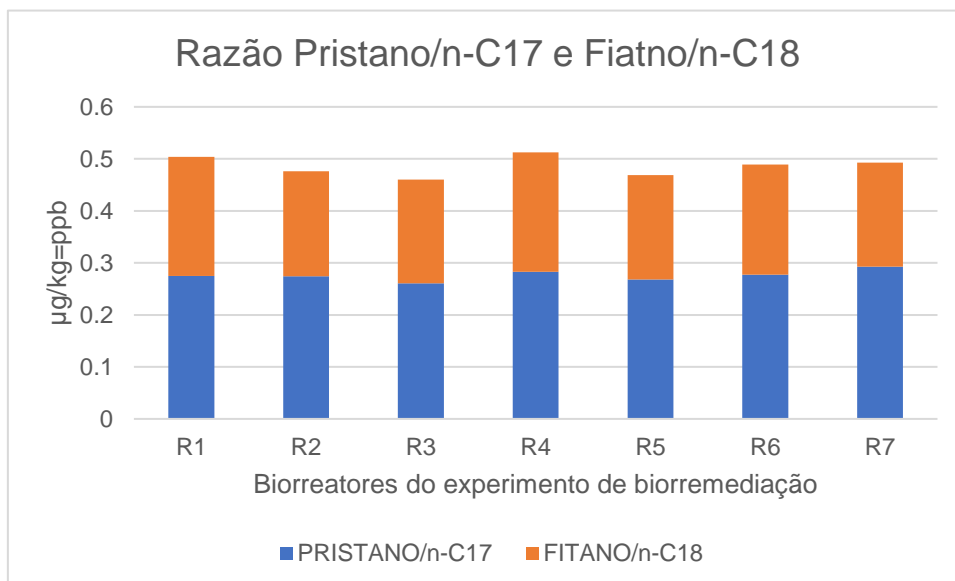
**Figura 33** - Cromatograma com os picos de n-alcenos dos biorreatores (R6) e (R7), do trigésimo dia de experimento



Fonte: Autora, 2020.

As razões n-C17/Pristano e nC18/Fitano apresentaram valores baixos (<1), indicando a presença de resíduos de óleo degradado, dando indícios de que o sedimento coletado do manguezal possui contaminação antiga por petróleo.

**Figura 34** - Razão Pristano/n-C17 e Fitano/n-C18



Fonte: Autora, 2020.

## 5.4 CONCLUSÃO

Através do monitoramento dos parâmetros físico-químicos, microbiológico, geoquímico e molecular, foi possível observar que o experimento de biorremediação apresentou condições ideais para a biodegradação de n-alcenos. A correlação entre a abundâncias do gene *alkB* e a degradação de n-alcenos é um método válido para entender a biorremediação em sedimento de manguezais contaminados com petróleo. O número de cópias do gene *alkB* foi proporcional a redução dos picos de n-alcenos, de modo que, nos biorreatores que apresentaram maiores degradações, foram encontradas maiores quantidades de gene *alkB*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao patrocinador Shell Brasil sob a taxa de P&D em ANP como “Compromisso de Investimentos com Pesquisa e Desenvolvimento”. Ao LEPETRO – Excelência em Geoquímica Petróleo, Energia e Meio Ambiente. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O planejamento fatorial aplicado no experimento de biorremediação explicou 93,4% dos dados e indicou a variável tempo, como a que exerce maior influência na biorremediação, corroborando com os resultados dos cromatogramas, sendo possível verificar a significância estatística das variáveis tempo e porcentagem de consórcio a um nível de 95% de confiabilidade;

Através do monitoramento dos parâmetros físico-químicos, foi constatado que o experimento de biorremediação montado apresentou condições ideais para a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo;

Não foi possível monitorar as concentrações de nitrogênio ao longo do tempo de experimento, pois esteve abaixo do limite de detecção do equipamento ao qual a análise foi realizada;

O monitoramento dos nutrientes mostrou que, o fósforo esteve disponível para os microrganismos e foi consumido ao longo do tempo, entretanto, houve pouca variação de carbono orgânico;

A abundância do gene *alkB* e do gene 16S rRNA variou ao longo do tempo de experimento; houve correlação entre o número de cópias do gene *alkB* e a degradação da fração saturada do petróleo;

Houve relação entre o número de cópias do gene 16srRNA e a contagem de microrganismos ao longo do tempo de experimento; apesar de a contagem de microrganismos ser um método considerado impreciso;

A partir dos resultados obtidos, recomenda-se para trabalhos futuros que o consórcio microbiano seja bioestimulado durante a biorremediação com adição de nitrato e amônia, que constituem a principal fonte de nitrogênio assimilável para os microrganismos;

Entender a proporção de nutrientes presente nas cápsulas microbianas, bem como, a quantidade exata de microrganismos e utilização biossurfactante para melhorar a biodisponibilidade do petróleo para os microrganismos;

Monitorar genes que possuem apenas uma única cópia em bactérias, para inferir a quantidade exata desses microrganismos no consórcio e monitorar seu crescimento ao longo do tempo com maior refino e confiança;

Otimizar a técnica de extração e purificação de DNA em amostras de sedimento de manguezal e quantificar os genes degradadores de compostos aromáticos presentes no petróleo.

## REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, F; LOCKINGTON, R; MEGHARAJ, M; NAIDU, R. A Review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation. **Applied biochemistry and biotechnology**. Austrália, p. 224-250, oct. 2015.
- ABBASIAN, F; PALANISAMI, T; MEGHARAJ, M; NAIDU, R. Microbial diversity and hydrocarbon degrading gene capacity of a crude oil field soil as determined by metagenomics analysis. **Biotechnology progress**. Austrália, v. 32, n. 3, mar. 2016.
- ALMEIDA, G. A; SILVA, M.G.C; BARBOSA, G.N; SILVA, D.S.P; SILVA, R.O; LIMA, G.M.S; GUSMAO,N.B;SOUZA,M.F.V. Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil. **International biodeterioration & biodegradation**, Brasil, n. 116, p. 73-82, 2017.
- APARÍCIO, J. D; Rimondo, E. M; GIL, R. A; BENIMELI, C. S; POLTI, M. A. Actinobacteria consortium as an efficient biotechnological tool for mixed polluted soil reclamation: Experimental factorial design for bioremediation process optimization. **Journal of hazardous materials**, Argentina, n. 342, p.408-417, 2018.
- ARAÚJO, M. P; HAMACHER, C; FARIAS, C. O; MARTINHO, P; CHAVES, F. O; SOARES, M. L. G. Assessment of brazilian mangroves hydrocarbon contamination from a latitudinal perspective. **Marine pollution bulletin**, v. 150, p. 1-12, 2020.
- BAEK, K. H; YOON, B. D; CHO, D. H; KIM, B. H; OH, H. M; KIM, H. S. Monitoring bacterial population dynamics using real-time pcr during the bioremediation of crude-oil-contaminated soil. **Journal microbiology miotechnology**, v. 4, n. 19, p. 339-345, jan. 2009.
- BAPTISTA, S. J. **Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel**. 2007. 162f. Tese (Doutorado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- BARGIELA, R; MAPELLI, F; ROJO, D; CHOUAIA, B. Bacterial population and biodegradation potential in chronically crude oil-contaminated marine sediments are strongly linked to temperature. **Scientific reports**, n. 5, p.1-15, jun. 2015.
- BARRETO, I. S. **Capacidade de biodegradação do petróleo da bacia do recôncavo em sedimento de manguezal por consórcios microbianos encapsulados**. 2018. 82f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do petróleo e ambiental) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.
- CAPORASO, J. G; LAUBER, C. L. WALTERS, W. A; BERG-LYOUNS, D; LOZUPONE, C.A; TURNBAUGH, P.J; FIERER, N. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Applied biochemistry and biotechnology**, n. 108, p. 1 - 9, mar. 2015.

CAVALCANTI, T. G, et al. Use of Agro-Industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. **Waste and biomass valorization**, v. 10, p. 205-214, 2019.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Ambientes costeiros contaminados por petróleo, procedimentos de limpeza: manual de orientação**. São Paulo: CETESB, 2007. 120 p.

CHICIUDEANA, L; NIEA, Y; TANASEB, A. M; STOICAB, I; WUA, X. L. Complete genome sequence of tsukamurella sp. MH1: A wide-chain length alkane-degrading actinomycete. **Academia journal of biotechnology**. China, v. 268, p. 1-5, dec. 2017.

COSTA, L. M; GRAÇAS, M.A; CASTRO, J.T. Planejamento fatorial aplicado à digestão de amostras de feijão assistida por radiação micro-ondas. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 149-152, 2006.

DA PAIXÃO, J. F. **Avaliação da qualidade dos sedimentos de manguezais da baía de Camamu- Bahia/ Brasil**. 2010. 41f. Tese (Doutorado em Geologia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

DANTAS, C. P. **Utilização de protótipo de biorreator de imersão temporária na biodegradação de petróleo em sedimento de manguezal**. 2016. 107f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do petróleo e ambiental) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

DELLAGNEZZE, B. M; VASCONCELLOS, S. P; ANGELIM, A. B; MELO, V. M. M; SANTISI, S; CAPPELLO, S; OLIVEIRA, V. M. Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale. **Marine pollution bulletin**. Brasil, v. 107, p.107–117, may. 2016.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 226 p.

FAJARDO, T. V.M; VANNI, M. F; OSMAR, N. Quantificação absoluta de vírus por RT-PCR TaqMan em tempo real em videiras / Quantificação absoluta de vírus por RT-PCR em tempo real (TaqMan) em videiras. **Ciência rural**, v. 47, n. 6, jul. 2017.

GAO, S; LIANG, J; TENG, T; ZHANG, M. Petroleum contamination evaluation and bacterial community distribution in a historic oilfield located in loess plateau in china. **Applied soil ecology**, China, v. 136, p. 30-42, 2019.

GARCIA, D. C; MALDONADO, J. Q. G; MACEDO, L. A; CRUZA, U. G. A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. **Marine pollution bulletin**, v 150, p.1-9, 2020.

GIEBLER, J; WICK, L; HARMS, H; CHATZINOTAS, A. Evaluating T-RFLP protocols to sensitively analyze the genetic diversity and community changes of soil alkane degrading bacteria. **European journal of soil biology**, n. 65, p. 107-113, apr. 2014.

GONG, B; CAO, H; PENG, C; PERCULIJA, V; TONG, G; FANG, H; WEI, X; OUYANG, S. High-throughput sequencing and analysis of microbial communities in the mangrove swamps along the coast of Beibu Gulf in Guangxi, China. **Scientific reports**, v. 9, p. 1-10, 2019.

GUARINO, C; SPADA, V; SCIARRILLO, R. Assessment of three approaches of bioremediation (Natural attenuation, landfarming and bioaugmentation e assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. **Chemosphere**, v. 170, p. 10-16, dec. 2016.

GUERRA, A. B. **Metagenômica de consórcios microbianos para biorremediação de resíduos de perfuração**. 2018. 103f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018

HASSAINE, A; BORDJIBA, O. Removal of hydrocarbons from liquid media by *Aspergillus niger* van Tieghem. **Acta ecologica sinica**, v. 39, p. 300-305, 2019.

HASSANSHAHIAN, M; BAYAT, Z; CAPPELLO, S; SMEDILE, F; YAKIMOV, M. Comparison the effects of bioaugmentation versus biostimulation on marine microbial community by PCR–DGGE: A mesocosm scale. **Journal of environmental sciences**, v. 43, p. 136-146, dec. 2015.

HASSANSHAHIAN, M; YAKIMOV, M. M; DENARO, R; GENOVESE, M; CAPELLO, S. Using real-time PCR to assess changes in the crude oil degrading microbial community in contaminated seawater mesocosms. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 93, p. 241-248, jun. 2014.

KOCH, D. J; CHEN, M. M; VAN BEILEN, J. B; ARNOLD, F.H. In Vivo Evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases *alkB* and *cyp153A6*. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, p. 337-344, jan. 2009.

KOSHLAF, E; SHAHSAVARI, E; HALEYUR N; OSBORN, A.M; BALL, A.S. Effect of biostimulation on the distribution and composition of the microbial Community of apolycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated landfill soil during bioremediation. **Geoderma**, n. 338, p 216-225, 2019.

KUMARI, S; REGAR, R. K; MANICKAM, N. Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. **Bioresource technology**, India, v. 254, p. 174-179, 2019.

LEE, C. M; YU, S; LEE, J.H; PARK, S; PARK, H; OH, T. J; LEE, A. H. Crystal structure of a putative cytochrome P450 Alkane hydroxylase (CYP153D17) from *Sphingomonas* sp. PAMC 26605 and its conformational substrate binding. **International journal of molecular sciences**, v. 17, p. 1-12, dec 2016.

LIMA, D. F. **Avaliação de processos geoquímicos e da eficiência de consórcios fúngicos em testes de simulação da biorremediação em sedimentos de manguezal contaminados com óleo**. 2014. 230f. Tese (Doutorado em Geologia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

LIMA, D. F. **Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na baía de todos os santos, Bahia: Avaliação da degradação de hidrocarbonetos saturados**. 2010. 234f. Dissertação (Mestrado em Geologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

LOGESHWARAN, P; MEGHARAJ, M; CHADALAVADA, S; BOWMAN, M; NAIDU, R. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation, and risk-based remediation approaches. **Environmental technology & innovation**, Austrália, v. 10, p. 175-193, feb. 2018.

LONG, H; WANG, Y; CHANG, W; LIU, G; CHEN, T; HUO, G; ZHANG, W; WU, X; TAI, X; SUN, L; ZHANG, B. Diversity of crude oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes from the qinghai-tibet plateau. **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, p.116-130, feb. 2017.

MADIGAN, M. T. MARTINKO, J.M; DUNLAP, P. V; CLARK, D.P. **Microbiologia de brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1032p.

MANAHAN, S. E. **Química ambiental**. 9. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. 912p.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162f. Tese (Doutorado em Geociências e meio ambiente) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARTINS, C. A. P. **Quantificação de DNA por PCR em tempo real em diferentes amostras forenses**. 2016. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Forenses) – Universidade do Porto, Porto, 2016.

MOREIRA, I. T. A; OLIVEIRA, O. M. C; AZWELL, T; QUEIROZ, A. F. S; NANO, R. M.W; SOUZA, E. S; ANJOS, J. A; ASSUNÇÃO, R. V; GUIMARÃES, L. M. Estratégias de biorremediação para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo na presença de metais em manguezais simulados. **Solo, ar, água**, Salvador, v. 44, ed.6, 2016.

NIE, Y; CHI, C. Q; FANG, H; LIANG, J. L; LU, S. L; LAI, G. L; TANG, Y. Q; WU, X. L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. **Scientific reports**, China, v. 4, p. 1-11, may. 2014.

NNADI, M. O. **Bacterial community dynamics during the bioremediation of diesel contaminated soil using brewery spent grain**. 2019. 230f. tese (Doutorado em Filosofia) - University of Sunderland, Sunderland, 2019.

OLIVEIRA, L. M. L. **Influência de nutrientes na biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (htp) dispersados pela formação de agregados óleo- MPS (OSAs)**. 2018. 55f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do petróleo e ambiental) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

OLIVEIRA, S. D. **Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**. 2008. 158f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PACWA-PLOCICZAK, M, et al. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 169, p. 615-622, 2019.

PAISSE, S; DURAN, R; COULON, F; URRIZA, G. Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 92. p. 835-844, jun. 2011.

PARADA, A. E; NEEDHAM, D.M; FUHRMAN, J. A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 5, n. 18, p 403-414, may. 2016.

PEREIRA, A. R. B; FREITAS, D. A. F. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental**, Minas Gerais, v. 6, n. 6, p. 975-1006. 2012.

POWELL, S; FERGUSON, S; BOWMAN, J; SNAOE, I. Using real-time pcr to assess changes in the hydrocarbon degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. **Microbial ecology**, n. 52, p. 523-532, 2006.

QUEIROZ, A. F. S; CELINO, J. J. Impacto ambiental da indústria petrolífera em manguezais da região norte da baía de todos os santos (Bahia, Brasil). **Boletim paranaense de geociências**, n. 63, p. 23-34, 2008.

RAMONA. K; BOLLMANN. J; KRAHL. K; BRYANT. I.M; MARTIENSSEN. M. Comparasion of tem different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples. **Journal of microbiological methods**, v 143, p 78-86, oct. 2017.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de bacteriologia de plantas. Disciplina FIP-640. Bactérias fitopatogênicas. Roteiro das aulas práticas, 2013.

SAADOUN, I; ALAWAWDEH, M; JARADAT, Z; ABABNEH, Q. Growth of *Streptomyces* spp. from hydrocarbon-polluted soil on diesel and their analysis for the presence of alkane hydroxylase gene (*alkB*) by PCR. **World microbiol biotechnol**, v. 24, p. 2191-2198, apr. 2008.

SANTOS, H. F; CARMO, F. L; PAES, J. E. S; ROSADO, A. S; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, air, & soil pollution**, v. 216, p. 329-350, 2011.

SANTOS, L. M. M; SOUZA, R. C; ANUNCIAÇÃO, D. S; MOREIRA, I. A; SANTOS, V. L. C. S; VIANA, Z. C. V. Avaliação do teor de elementos químicos em manguezais da ilha de itaparica, bahia, brasil. **Acta brasiliensis**, v 2, n.1, p. 15-20, jan. 2018.

SANTOS, R.G; ROSA, P.T.V; MARCONDELLI, A.C; HENRIQUES, C.M.T; MERLI, I.D; CAMARGO, M.G.B; MOURA, T.V. Remediação de solos: remoção de hidrocarbonetos aromáticos. **Química e derivados**, p 1-4, nov, 2014.

SCHMITZ, B. Quantifying environmental microorganisms and viruses using qPCR. **Jove**, Cambridge, MA, 2018. Disponível em:<https://www.jove.com/science-education/10186/quantifying-environmental-microorganisms-and-viruses-using-qpcr>. Acesso em: 29 oct. 2018.

SHAHI, A; AYDIN, S; INCE, B; I, O. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. **Ecotoxicology and environmental safety**. Turkey, v.125, p. 153-160, dec. 2015.

SHAHI, A; AYDIN, S; INCE, B; INCE, O. Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. **Chemical engineering journal**. Turquia, v. 306, p. 60-66, jul. 2016.

SHAHI, A; AYDIN, S; INCE, B; INCE, O. The effects of white-rot fungi *trametes versicolor* and *bjerkandera adusta* on microbial community structure and functional genes during the bioaugmentation process following biostimulation practice of petroleum contaminated soil. **International biodeterioration & biodegradation**, Turkey, v. 114, p. 67-74, jun. 2016.

SHAHSAVARI, E; MEDINA, A. A; TAHA, M; BALL, A. S. A quantitative PCR approach for quantification of functional genes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. **MethodsX**, Austrália, v. 3, p. 205-2011, feb. 2016.

SILVA, L. P. **Estudos fisiológicos e moleculares da estirpe degradadora de hidrocarbonetos do petróleo dietzia cinnamea P4**. 2010. 185f. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, M. G. C; ALMEIDA, D, G. Integração entre produção de enzima e biodegradação de óleo diesel para biorremediação de locais impactados. **ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE**, v. 1. 2013. p. 1-4.

SILVA, M. G. C; ALMEIDA, D, G. Integração entre produção de enzima e biodegradação de óleo diesel para biorremediação de locais impactados. **Anais do congresso brasileiro de gestão ambiental e sustentabilidade**, v.1, p. 341-344, 2013.

SILVA, D. S. P; CAVALCANTI, D. L; MELO, E. J. V; SANTOS, P. N. F; LUZ, E. L. P; GUSMAO; N. B; SOUZA, M. F. V. Q. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. **International biodeterioration & biodegradation**, n. 97, p. 85-89, 2015.



SILVEIRA, M. S; LOPES, J. T; ROSA, G. R. N-arilação do imidazol via Cul: um tutorial para otimização de um sistema catalítico através do planejamento experimental. **Educación química**, v. 28, p. 44-50, 2017.

SOUZA, L. G. R; MIRANDA, A. C; MEDEIROS, H. B. Impacto ambiental e socioeconômico do derramamento de óleo na baía de Guanabara. **Fórum ambiental**. Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 94-108, 2013.

SOUZA, S. T, P; CABRAL, L; JÚNIOR, G. V, L; NORONHA, M. F; OTTONI, J. R; SARTORATTO, A; OLIVEIRA, V. M. Exploring the genetic potential of a fosmid metagenomic library from an oil impacted mangrove sediment for metabolism of aromatic compounds. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 189, p. 322-329, 2020.

SUJA, F; RAHIM, F; TAHA, M. R; HAMBALI, N; RAZALI, R; KHALID, A; HAMZAH, A. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 90, p. 115-122, mar. 2014.

TIRALERDPANICH, P; SONTHIPHAND, P; LUEPROMCHAI, E; PINYAKONG, O; POKETHITIYOOK. Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis. **Marine pollution bulletin**, v. 133, p. 595–605, 2018.

TOUROVA, T. P; SOKOLOVA, D. S; SEMENOVA, E. M; POLTARAUSB, A. B; NAZINA, T. N. Diversity of the *alkB* genes of n-alkane biodegradation in thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the genera geobacillus, parageobacillus, and aeribacillus. **Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 301-306, dec. 2018.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, n. 223, p. 277-286, jan. 2017

WU, M; LI, W; DICK, W.A; YE, X; CHEN, K; KOST, D; CHEN, L. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum - contaminated soil and microbial population and activity determination. **Chemosphere**, v. 169, p. 124-130, nov. 2016.

WU, M; YE, X; CHEN, K; LI, W; YUAN, J; JIANG, X. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. **Environmental pollution**, China, v. 223, p. 657- 664, feb. 2017.

XU, X; LAI, Y; YANA, R; HUA, Z. Evaluation of mycoplasma removal reagentes using qPCR-based quantification. **Analytical biochemistry**. China, p. 88- 95, oct. 2018.

XU, X; ZHAI, Z; LI, H; WANG, Q; HAN, X; YU, H. Synergetic effect of bio-photocatalytic hybrid system: g-c3n4 and acinetobacter sp. JLS1 for enhanced degradation of C16 alkane. **Chemical engineering journal**. China, v. 323, p. 520–529, may. 2018.

YINGDONG, L. et al. Comparative metagenomics study reveals pollution induced changes of microbial genes in mangrove sediments. **Scientific reports**, v. 9, p. 1-11 2019.

ZENELI, A; KASTANAKI, E; SIMANTIRAKI, F; GIDARAKOS, E. Monitoring the biodegradation of TPH and PAHs in refinery solid waste by biostimulation and bioaugmentation. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 7, p.195-208, 2019.

ZHANG, K; SUN, Y; CUI, Z; YU, D; ZHENG, LI; LIU, P; LV, Z. Periodically spilled-oil input as a trigger to stimulate the development of hydrocarbondegrading consortia in a beach ecosystem. **Scientific reports**, v. 7, p.129-141, sep. 2017.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias  
Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

C744 Conceição, Lavínia Silva  
Eficiência de consórcio microbiano degradador de alcano durante a biorremediação de sedimento de manguezal com petróleo / Lavínia Silva Conceição. – Salvador, 20200720.  
75f.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Danúcia Ferreira Lima  
  
Co-orientador: Prof. Dr Eddy José Francisco de Oliveira  
  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Geociências, 2020.  
1. Biorremediação. 2. Biodegradação. 3. Manguezal. 4. Petróleo. I Lima, Danúcia Ferreira. II Oliveira, Eddy José Francisco. Universidade Federal da Bahia. III. Título.  
CDU 550.4