



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS NATURAIS**

LUZIA GABRIELLE ZEFERINO DE CASTRO

**CONSÓRCIO MICROBIANO ISOLADO A PARTIR DO ÓLEO DERRAMADO NO
NORDESTE BRASILEIRO: BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS**

**FORTALEZA
2023**

LUZIA GABRIELLE ZEFERINO DE CASTRO

CONSÓRCIO MICROBIANO ISOLADO A PARTIR DO ÓLEO DERRAMADO NO
NORDESTE BRASILEIRO: BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

FORTALEZA
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C351c Castro, Luzia Gabrielle Zeferino de.

Consórcio microbiano isolado a partir do óleo derramado no nordeste brasileiro : biorremediação de áreas contaminadas / Luzia Gabrielle Zeferino de Castro. – 2023.
64 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Bioaugmentação autóctone. 2. 2,6 Diclorofenolindofenol. 3. Alcanivorax sp. 4. Acinetobacter sp. I. Título.
CDD 660.6

LUZIA GABRIELLE ZEFERINO DE CASTRO

CONSÓRCIO MICROBIANO ISOLADO A PARTIR DO ÓLEO DERRAMADO NO
NORDESTE BRASILEIRO: BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia.

Aprovada em: 27/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Denise Cavalcante Hissa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Soli Deo gloria

AGRADECIMENTOS

Quanto mais tempo passo na ciência, mais percebo que a quantidade de pessoas a agradecer só aumenta. A verdade é que nada na ciência é feito de forma individual ou visando um único objetivo. Por isso, a minha lista de agradecimentos não tinha como ser diferente. Começo agradecendo a **Deus** por me fazer sonhar com a finalização do mestrado mesmo quando nem mesmo eu acreditava.

Agradeço também pela minha família, principalmente, a **minha mãe e irmã** que sempre mandavam mensagens perguntando como estava indo a escrita e faziam o que podiam para dividir os fardos comigo e me manter focada. Sem vocês, nenhuma palavra teria sido escrita.

Sou também imensamente grata pela **Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo**, que me deu todo o suporte e a paciência necessária para finalizar o trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Muito obrigada.

Queria também registrar a minha gratidão pela banca examinadora composta de pessoas que impactaram bastante a minha caminhada científica. A **Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa** que acreditou em mim quando eu era apenas uma menina cheia de sonhos. É sempre um prazer aprender com a senhora. A **Doutora Talita Camila** que eu considero como um exemplo de pessoa e cientista. Obrigada por me incentivar a buscar meus sonhos e por acreditar no meu potencial.

Agradeço a família **Lembiotech/Largen** com quem tive o prazer de dividir os dias e que hoje estando longe deles, sinto falta. Em especial a **Dra. Francisca Andréa Oliveira, Dra. Cristiane Rabelo, Saulo, Igor e Livia** que moveram o impossível para ver esse trabalho finalizado. Obrigada por doar tantas horas do tempo de vocês e por confiar em mim. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Projeto Entremares. Agradeço o financiamento e contribuição para a minha formação durante esses 2 anos.

RESUMO

Ecossistemas costeiros do Nordeste foram atingidos por um derramamento de óleo pesado em agosto de 2019, sendo esse considerado o maior desastre de óleo em extensão dos últimos 30 anos no Brasil. Considerando-se a diversidade de ambientes afetados, pode-se afirmar que não existe uma solução de mitigação universal dos impactos, mas é possível hipotetizar que a limpeza de alguns ambientes pode ser acelerada pela tecnologia de biorremediação por bioaugmentação. Esse estudo tem por objetivo isolar, caracterizar e avaliar a microbiota cultivável associada ao óleo pesado, visando a seleção de um consórcio customizado para acelerar a degradação de hidrocarbonetos. Para o isolamento bacteriano, foi empregada a técnica de enriquecimento em meio Bushnell Haas + 3% m/v NaCl e 1% m/v de óleo proveniente de amostras coletadas em três praias do Ceará: Fortim (FOR), Flexeiras (FLE) e Icarai de Amontada (AMO). Os isolados foram identificados a partir da análise das sequências do gene 16S rRNA por sequenciamento Sanger. O potencial de biodegradação de frações do petróleo foi avaliado pelo método do indicador 2,6-Diclorofenolindofenol (DCPIP), utilizando seis frações de hidrocarbonetos como a única fonte de carbono. Além disso, também foi avaliada a prospecção de biossurfactantes através do ensaio de emulsificação de querosene, redução de tensão superficial e dispersão de óleo. A biocompatibilidade entre os isolados foi avaliada pela técnica de antibiose. A capacidade de degradação dos isolados combinados foi atestada por DCPIP, elencando-se os microrganismos mais promissores. Foram identificadas 24 estirpes de bactérias, de 14 gêneros diferentes, pertencentes aos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes. Dentre essas, as estirpes de *Acinetobacter* sp., *Alcanivorax* sp. e *Marteella* sp. se destacaram pela capacidade de degradar o maior número de hidrocarbonetos, despontando como os mais promissores para compor o consórcio. Os sobrenadantes das culturas de *Alcanivorax* sp. FOR1501 e *Acinetobacter* sp. AMO1502 promoveram a emulsificação de querosene, sendo candidatas para a possível produção de biossurfactantes. O ensaio de degradação com os consórcios demonstrou que *Acinetobacter* sp. FLE1503 foi a melhor estirpe para a degradação de alcanos (C₄-C₂₅), enquanto *Alcanivorax* sp. FOR1501 e *Marteella* sp. FOR1507 combinadas apresentaram degradação de hidrocarbonetos aromáticos superior. Por isso, esse estudo é o primeiro registro de isolados microbianos associados ao “óleo misterioso”, apontando um consórcio customizado para alcanos e hidrocarbonetos aromáticos como uma abordagem promissora para acelerar a limpeza dos ambientes afetados.

Palavras-chave: bioaugmentação autóctone; 2,6-diclorofenolindofenol; *Alcanivorax* sp; *Acinetobacter* sp.

ABSTRACT

August 2019, a mysterious oil spill affected coastal ecosystems in the Northeast of Brazil, considered the largest oil disaster in the last 30 years. The diversity of affected environments made it clear that there is no universal impact mitigation solution. However, one promising approach is the use of bioremediation technology by bioaugmentation. This study aimed to isolate, characterize, and evaluate cultivable microbiota associated with heavy oil, with the goal of selecting a customized consortium to accelerate the degradation of hydrocarbons. The bacterial isolation process used the enrichment technique on Bushnell Haas medium with +3% m/v NaCl and 1% m/v from oiled samples collected on beaches in Ceará. The isolates were then identified from the analysis of the 16S rRNA gene sequences by Sanger sequencing. The biodegradation potential of oil fractions from each isolate was evaluated by the 2,6-Dichlorophenolindophenol indicator method (DCPIP), using six hydrocarbon fractions as the sole carbon source. In addition, the prospection of biosurfactants was also evaluated through the kerosene emulsification index, surface tension reduction and oil dispersion. The biocompatibility between the isolates was evaluated using the antibiosis technique. After the evaluation process, 24 strains of bacteria were isolated and identified, from 14 different genera, belonging to the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, and Bacteroidetes. Among these, the strains of *Acinetobacter* sp., *Alcanivorax* sp. and *Martellella* sp. stood out for their ability to degrade the largest number of hydrocarbons, emerging as the most promising to compose the consortium. Culture supernatants of *Alcanivorax* sp. FOR1501 and *Acinetobacter* sp. AMO1502 promoted kerosene emulsification, being candidates for the possible production of biosurfactants. The degradation assay with the consortia demonstrated that *Acinetobacter* sp. FLE1503 was the best strain for the degradation of alkanes (C4-C25), while *Alcanivorax* sp. FOR1501 and *Martellella* sp. FOR1507 combined showed superior aromatic hydrocarbon degradation. Therefore, this study is the first record of microbial isolates associated with the oil spill, pointing to a customized consortium for alkanes and aromatic hydrocarbons as a promising approach to accelerate the cleaning of affected environments. The results of this study can be used to develop more effective and sustainable strategies for the management of oil spills in the future.

Keywords: autochthonous bioaugmentation; 2,6-dichlorophenolindophenol; *Alcanivorax* sp; *Acinetobacter* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Óleo recolhido por voluntários nas praias de Pernambuco e Alagoas, respectivamente.....	13
Figura 2	- Via aeróbica de degradação dos alcanos.....	16
Figura 3	- Os 16 HPAs classificados como poluentes orgânicos prioritários.....	17
Figura 4	- Avaliação da biodegradação hidrocarbonetos por bactérias, empregando coloração de DCPIP em microplacas de 24 poços. O primeiro poço indica a cor do DCPIP oxidado, o segundo poço a sua redução parcial (rosa) e o terceiro poço mostra sua completa redução(incolor).....	19
Figura 5	- Amostras do óleo de Amontada antes (A) e após 210 dias de enriquecimento (B).....	30
Figura 6	- Morfotipos de bactérias isoladas a partir do enriquecimento de amostras de areias contaminadas com o óleo derramado no Nordeste.....	31
Figura 7	- Abundância relativa de gêneros de bactérias isoladas a partir do enriquecimento de 15 dias de areias de praias do Ceará - Brasil, contaminadas com o óleo pesado.....	34
Figura 8	- Comparação da riqueza e abundância relativa de gêneros de bactérias das culturas de enriquecimento de Amontada com 15 e 210 dias.....	35
Figura 9	- Árvore filogenética utilizando KimuraNei e bootstrap (1000) construída com as sequências do gene rRNA 16S dos morfotipos. identificados como <i>Acinetobacter</i> sp. AMO1501, AMO1502 e FLE1503. As setas vermelhas indicam os microrganismos isolados nesse estudo.....	36
Figura 10	- Árvore filogenética utilizando KimuraNei e bootstrap (1000) construída com as sequências do gene rRNA 16S dos morfotipos FOR1501 e FOR1505 identificadas como <i>Alcanivorax</i> sp. As setas vermelhas indicam os microrganismos isolados nesse estudo.....	37

Figura 11	- Mapa de calor indicativo da degradação de hidrocarbonetos por morfotipos de bactérias isolados de amostras de areias de praias do Ceará – Brasil, contaminadas com óleo pesado. Mapa de calor: quanto mais vermelho mais eficiente a degradação.....	38
Figura 12	- Índice de emulsificação (IE24%) promovido pelo sobrenadante de culturas de 24 h em meio mineral contendo 1% de óleo lubrificante como fonte de carbono. Os isolados indicados pelas barras de coloração azul claro e setas vermelhas apresentaram IE24% maior ou igual a 50%.....	39
Figura 13	- Emulsificação de mistura água-querosene promovida pelos sobrenadantes das culturas AMO1502 e FOR1501 (em duplicata)	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Contagem bacteriana a partir dos diferentes enriquecimentos.....	30
Tabela 2	- Identificação molecular dos isolados obtidos nas culturas de enriquecimento de amostras de areias de praia do Ceará - Brasil, impregnadas com o óleo pesado.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATGE	Agar, Triptona, Glicose e Extrato de Levedura
BH	Bushnell Haas
CDA	Chirosanase Detection Agar
CoA	Acil-Coenzima
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CTAB	Brometo de Cetiltrimetil Amônio
DCPIP	2,6-Diclorofenolindofenol
E24	Índice de Emulsão
HMA	Hidrocarbonetos Monocíclicos Aromáticos
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
ITS	Internal transcribed spacer
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDA	Potato Dextrose Agar
TGE	Triptona, Glicose e Extrato de levedura
TS	Tensão Superficial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	12
2.1	Derramamento de óleo nas praias do Nordeste brasileiro em 2019.....	12
2.2	Estratégias de mitigação de impactos causados por hidrocarbonetos do petróleo.....	13
2.3	Efeitos do derramamento de óleo na comunidade microbiana.....	19
2.4	Biossurfactantes.....	22
3	PERGUNTA DE PARTIDA.....	23
4	HIPÓTESE.....	24
5	OBJETIVOS.....	25
5.1	Objetivo geral.....	25
5.2	Objetivos específicos.....	25
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
6.1	Coleta.....	26
6.2	Cultura de enriquecimento.....	26
6.3	Isolamento de microrganismos.....	26
6.4	Extração de DNA e sequenciamento pelo método de SANGER.....	27
6.5	Avaliação da compatibilidade entre os isolados.....	28
6.6	Biodegradação de hidrocarbonetos.....	28
6.7	Prospecção de biossurfactantes.....	28
6.8	Escolha do consórcio microbiano utilizando DCPIP.....	29
7	RESULTADOS.....	29
7.1	Isolamento de microrganismos associados às areias contaminadas com óleo pesado.....	29
7.2	Identificação molecular da coleção microbiana.....	31
7.3	Biodegradação de hidrocarbonetos.....	37
7.4	Produção de biossurfactante.....	38
7.5	Escolha do consórcio microbiano.....	40
8	DISCUSSÃO.....	42
9	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1.INTRODUÇÃO

O derramamento de óleo ocorrido em 2019 atingiu 4.334 km da costa brasileira (57,8%) e gerou sérios impactos ambientais, econômicos e sociais. Essa problemática foi agravada pela ausência de planos de contingenciamento para àquele tipo de óleo e/ou falha nas medidas emergenciais ditadas pelo Governo Federal, o que tornou esse desastre único (SOARES et al., 2020).

O óleo derramado causou danos a biota e gerou impactos socioeconômicos para a pesca e o turismo das regiões afetadas (MISHRA et al., 2012; VALENTIM, 2021). Felizmente, sabe-se que ecossistemas atingidos por derramamentos de óleo possuem uma microbiota potencialmente capaz de mitigar os impactos, uma vez que microrganismos degradadores de hidrocarbonetos já foram isolados a partir desses ambientes (NEWTON *et al.*, 2013).

A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo envolve uma série de mudanças estruturais na comunidade da microbiota, conforme as diferentes frações do petróleo são degradadas, onde gêneros específicos são se tornam mais abundantes proporcionalmente à classe de hidrocarboneto presente (MILLER et al., 2020). Por isso, se faz necessário o uso de microrganismos capazes de utilizar diferentes processos enzimáticos e/ou de produzir biossurfactantes, que ajudam na acessibilidade e solubilidade dessa fonte de carbono (BRZESZCZ; KASZYCKI, 2018; GURAV et al., 2017; MOHAPATRA; PHALE, 2021). Microrganismos que se utilizam dessas e outras estratégias para consumir hidrocarbonetos são alvos ideais para compor consórcios para biorremediação. Sugere-se selecionar microrganismos com capacidade de degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos, sendo uma das formas de garantir a otimização da biodegradação de misturas complexas como o óleo pesado (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

Dessa forma, esse estudo explora a comunidade bacteriana associada ao óleo derramado na região da costa cearense em 2019, com o intuito de identificar potencial degradadores para mitigar os impactos causados por esse óleo.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Derramamento de óleo nas praias do Nordeste brasileiro em 2019

O derramamento de óleo pesado, que atingiu 4.334 km da zona costeira do Nordeste brasileiro em 2019, impactou de diferentes formas os ecossistemas e as comunidades ribeirinhas. Esse desastre foi considerado o de maior extensão nos últimos 30 anos e trouxe impactos sem precedentes aos ecossistemas costeiros, tendo sido recolhidos mais de 3000 toneladas de material oleoso provenientes de 724 ambientes costeiros (ESCOBAR, 2019; IBAMA, 2020; PENA et al., 2020).

A nível socioeconômico, o setor de turismo foi o mais atingido (CÂMARA et al., 2021; RIBEIRO et al., 2020). Além disso, os pescadores artesanais foram atingidos pela queda nas vendas de pescado, resultando na falta de recursos financeiros para subsidiar sua sobrevivência (ARAÚJO; RAMALHO; MELO, 2020). Dessa forma, não há como dissociar os impactos ao meio ambiente das implicações negativas para a subsistência das comunidades pesqueiras artesanais, bem como para o setor de turismo.

O óleo que atingiu a costa foi caracterizado como pesado e muito intemperizado, ou seja, sofreu a ação de diferentes processos químicos, físicos e biológicos que foram evidenciados pelas seguintes características: alta viscosidade, alta densidade e baixas concentrações de compostos voláteis. Com essas características, entende-se por que o óleo trafegou submerso na coluna d'água e presume-se maior persistência dos constituintes não voláteis no meio ambiente (DISNER; TORRES, 2020; IBAMA, 2019).

Análises cromatográficas e isotópicas mostraram que o perfil do óleo presente nas praias brasileiras possuía características geoquímicas compatíveis com petróleo venezuelano (OLIVEIRA et al., 2020). As amostras apresentaram perfis dos isoprenóides pristano e fitano e os compostos mais abundantes eram hidrocarbonetos alifáticos de n-C24 a n-C27, seguidos por hidrocarbonetos leves (n-C8 a n-C13) (Lourenço et al., 2020b). Oliveira et al. (2020) também relataram abundância de hidrocarbonetos alifáticos (n-C23), mas reportaram ausência de hidrocarbonetos leves. A presença de agregados de parafina de cadeia longa (n-C14 a n-C35) foi relatada nos dois artigos. Além disso, análises mais detalhadas do óleo realizada por Reddy et al. (2022) mostraram ausência de frações de C20, o que indica a remoção por destilação ou evaporação. Essa evidência aponta que o óleo que impactou a costa brasileira não era somente um óleo pesado, mas um óleo refinado, ou seja, que foi processado em refinaria.

A fim de minimizar os impactos causados pelo derramamento do óleo, instituições de proteção ambiental se reuniram e aplicaram estratégias de remoção manual nas localidades atingidas (Figura 1). Contudo, essa prática trouxe alguns riscos para os voluntários envolvidos na coleta, tendo em vista que foram relatados diversos casos de intoxicação por inalação de compostos voláteis tóxicos, ocasionando sintomas como dores de cabeça e vômitos. Esses compostos também podem resultar em efeitos a longo prazo, devido ao seu potencial carcinogênico ou por causar danos ao sistema nervoso central de diferentes organismos (DISNER; TORRES, 2020; IARC, 2020). Vale ressaltar que as micropartículas de hidrocarbonetos são imperceptíveis e portanto, incapazes de serem coletadas. Além disso, podem se difundir pela superfície das guelras e membranas celulares de peixes e outros seres vivos, afetando a saúde da biota e causando bioacumulação na cadeia alimentar (SOARES et al., 2020).

Figura 1 – Recolhimento de óleo por voluntários em praias de Pernambuco e Alagoas



Fonte: San Costa/TV Globo e Teresa Maia/Reuters

Após a remoção do óleo, cada estado determinou uma finalidade específica para esse resíduo. Em Pernambuco, esse material foi destinado para a produção de combustíveis. Já na Bahia, foi utilizado como matéria prima para a produção de carvão e no Ceará, para a fabricação de cimento (OTSUKA, 2019). Assim, mesmo após todas as estratégias para mitigar os impactos agudos provocados pelo derramamento do óleo, muito ainda necessita ser realizado para tratar os impactos crônicos, que podem perdurar por anos.

2.2 Estratégias de mitigação de impactos causados por hidrocarbonetos do petróleo

A remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos do petróleo precisa levar em consideração diversos fatores como, por exemplo, a composição do contaminante, a quantidade, a fonte de poluição e o tipo de ambiente. Normalmente, mais de um método de remediação podem ser combinados na descontaminação. Dentre os métodos de descontaminação ambiental, a remediação biológica (bioestimulação e bioaumentação) tem mostrado notável sucesso, pois é capaz de reduzir hidrocarbonetos em substâncias menos complexas e não tóxicas, sem quaisquer efeitos adversos (OSSAI et al., 2020; SHARMA et al., 2022).

Uma das maiores dificuldades quando se utiliza a bioaumentação é garantir que os microrganismos sobreviverão às condições ambientais adversas e que a capacidade de degradação permaneça a mesma da testada em laboratório. Fatores abióticos, toxicidade dos contaminantes e competição por nutrientes podem afetar negativamente a bioaumentação (TAO et al., 2019). Por isso, o uso combinado da bioestimulação e bioaumentação pode favorecer a microbiota e diminuir a toxicidade dos hidrocarbonetos (RAHMATI et al., 2022). Outro fator importante na bioaumentação é o uso de microrganismos autóctones (HOSOKAWA et al., 2009; LI et al., 2020). A seleção desses microrganismos é realizada por meio da técnica de enriquecimento, de preferência utilizando as mesmas condições ambientais na qual a sua capacidade de degradação será validada (HOSOKAWA et al., 2009). Essa estratégia diminui a perda de efetividade da biorremediação causada por fatores ambientais (RAHMATI et al., 2022).

A seleção de microrganismos hidrocarbonoclasticos precisa levar em consideração a composição de hidrocarbonetos presentes na contaminação. O petróleo é uma mistura de diferentes hidrocarbonetos: alcanos; moléculas alifáticas não-cíclicas de cadeia longa com comprimento de até 40 ou mais carbonos; hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (HMA) com apenas um anel benzeno, como fenol e seus derivados; e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) com dois ou mais anéis benzênicos fundidos (NZILA, 2018). Os compostos alifáticos e os HPAs são os principais alvos dos microrganismos (RAHMATI et al., 2022). Dentre esses, os compostos alifáticos são mais susceptíveis à biodegradação do que os compostos aromáticos, pois a presença de estruturas cíclicas, principalmente os anéis aromáticos, torna mais difícil a biodegradação de hidrocarbonetos.

Os alcanos são extremamente versáteis e utilizados nas indústrias de combustíveis (propano, hexadecano e butanol), produção de lubrificantes, ceras e parafinas e produção de gás natural (metanol e etanol) (DONG, 2021). Já os ciclos alcanos são os principais constituintes dos óleos crus, respondendo por 20-40% das frações totais dos hidrocarbonetos, destinados para a produção de diesel

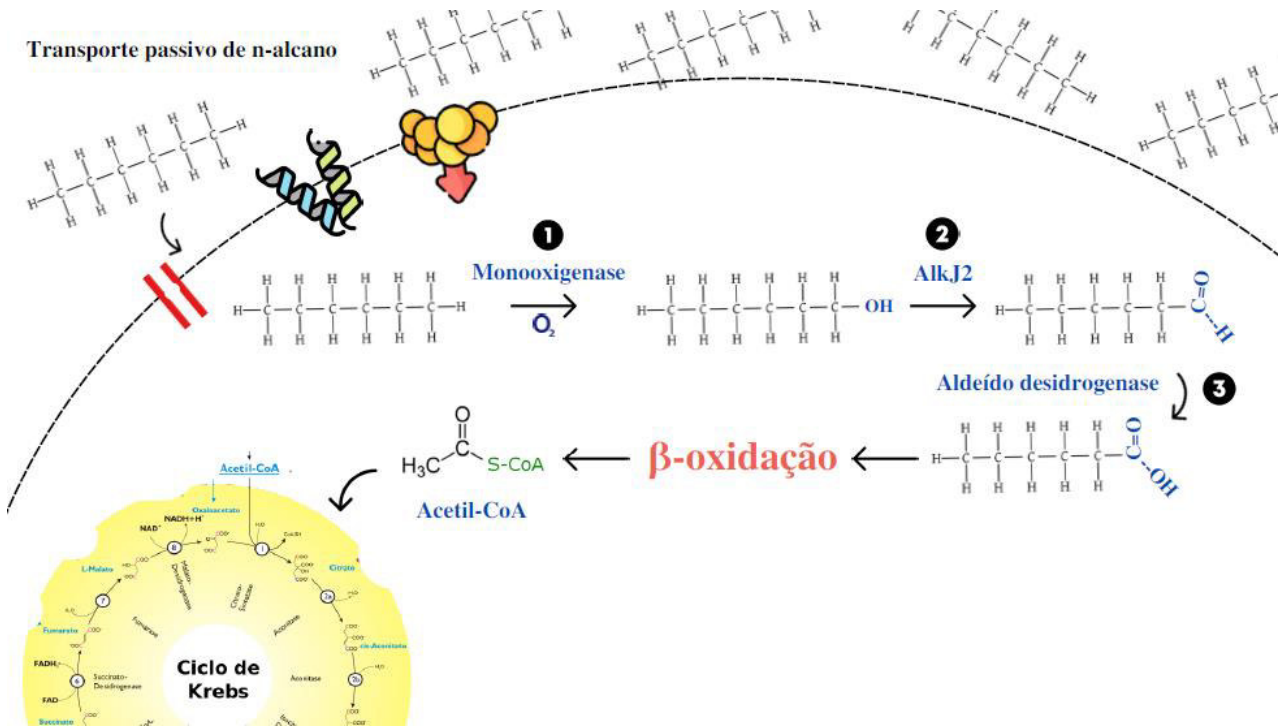
e querosene (DAGAUT; CATHONNET, 2006; TISSOT; WELTE, 1984; WANG et al., 2019). Esses alcanos podem ser degradados por duas vias metabólicas distintas. Onde a disponibilidade de oxigênio é um fator decisivo no encaminhamento de qual via será utilizada pelos microrganismos, podendo ser anaeróbica ou aeróbica (RAHMATI et al., 2022).

Na via aeróbica de biodegradação os n-alcanos são susceptíveis a degradação através de reações de oxidação com ataque inicial no grupo metil terminal, sendo transformados em álcool primário por monooxigenases ou dioxigenases (Figura 2.1). Em seguida, o álcool é transformado em aldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase AlkJ2 (Figura 2.2). Os aldeídos, por sua vez, são convertidos em ácidos graxos pela ação de aldeído desidrogenases (Figura 2.3). Por fim, são gradualmente metabolizados em acetil-CoA pela via β de oxidação e redirecionados para o ciclo de Krebs, onde eventualmente são transformados em CO₂ e H₂O (GANESAN et al., 2022; SINGH, 2006; XUE et al., 2015) (Figura 2).

Os principais genes envolvidos nessa via metabólica são responsáveis por codificar as enzimas chaves desse metabolismo. A família de genes *alkB* e Citocromo P450 codificam alcano hidroxilase, dentre elas monooxigenases capazes de oxidar alcanos de C₅-C₁₁ (ABBASIAN et al., 2015; VAN BEILEN; WUBBOLTS; WITHOLT, 1994; ZADJELOVIC et al., 2020a). Ademais, outros genes também codificam outras monooxigenases capazes de catalisar hidrocarbonetos de cadeia longa, como o gene *almB* (WANG; SHAO, 2012b). Além disso, alguns transportadores de membrana para alcanos de cadeia longa (>C₁₈) são codificados pelo gene *fadL*. As proteínas codificadas por esses genes são responsáveis pelo transporte passivo de compostos hidrofóbicos através da membrana externa bacteriana (GREGSON et al., 2018).

O primeiro microrganismo isolado capaz de degradar n-alcanos foi a bactéria *Geobacillus thermodenitrificans*, utilizando a via de oxidação terminal (LI et al., 2008). Outras vias de degradação também podem ser utilizadas, como a oxidação subterminal realizadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Gordonia* sp. (FORNEY' AND; MARKOVETZ, 1970; KOTANI et al., 2007). As bactérias *Acinetobacter* sp., *Desulfatibacillum aliphaticivorans*, *Methylococcus capsulatus*, *Oceanospirillales* sp., *Pseudomonas oleovorans*, *Dietzia* sp., *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* e *Alcanivorax dieselolei* são conhecidos por degradarem alcanos e cicloalcanos (JAEKEL et al., 2015; JI et al., 2013)

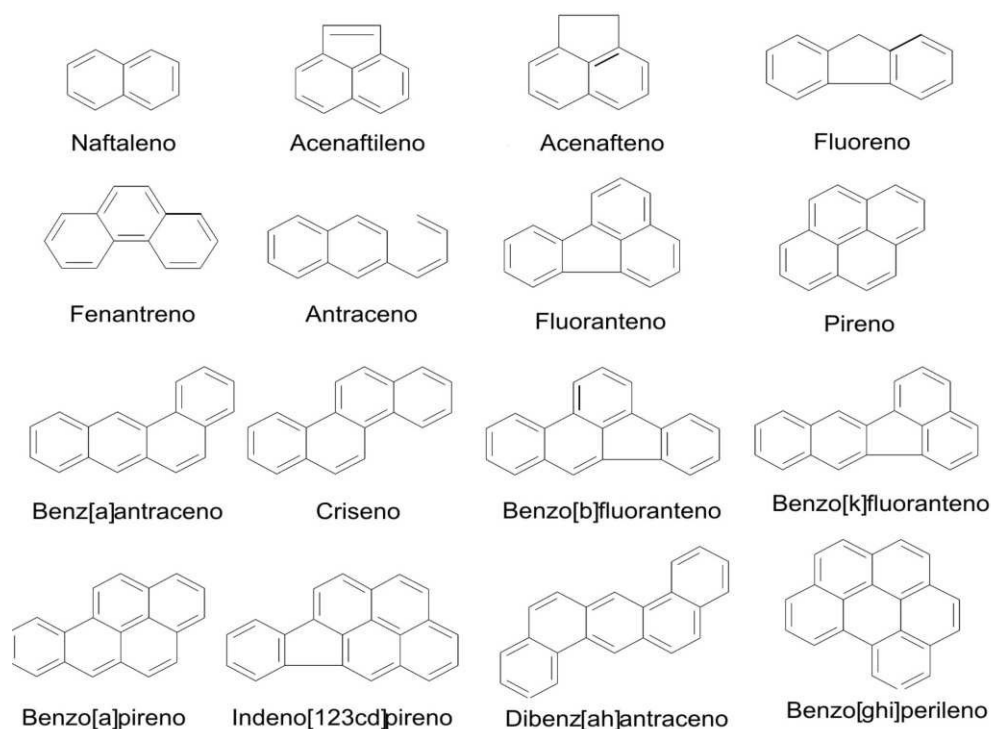
Figura 2 – Via aeróbica de degradação dos alcanos



Fonte: Elaborado pelo autor. Referências: XUE et al., 2015 e GANESAN et al., 2022.

Os Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são amplamente distribuídos no meio ambiente, oriundo de atividades antrópicas, como derramamentos de petróleo e derivados, deposição atmosférica de compostos formados pela queima de combustíveis fósseis. São amplamente utilizados para a produção de pesticidas, fungicidas e naftalinas. Esses compostos possuem alta toxicidade e propriedades mutagênicas/carcinogênicas para os seres vivos, incluindo o homem (SAMANTA; SINGH; JAIN, 2002). São altamente lipossolúveis e, portanto, são prontamente absorvidos pelo trato gastrointestinal dos mamíferos (CERNIGLIA, 1984), conseqüentemente, suas características recalcitrantes contribuem para que sejam considerados poluentes prioritários em estudos de monitoramento ambiental (Figura 3).

Figura 3 – Os 16 HPAs classificados como poluentes orgânicos prioritários



Fonte: (MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007).

A primeira etapa de biodegradação dos HPAs envolve as dioxigenases, enzimas que incorporam átomos de oxigênio em dois átomos de carbono de um anel de benzeno, resultando na formação de cis-dihidrodiol. Esse composto sofre re-aromatização pela ação de desidrogenases para formar os intermediários dihidroxilados, que subsequentemente, sofrem clivagem do anel e formam os intermediários do ciclo de Krebs (KANALY; HARAYAMA, 2000).

Os fungos podem utilizar diferentes vias de degradação, na qual os HPAs são envolvidos em uma reação de oxidação por uma monooxigenase no citocromo P450, produzindo óxido de areno e água. Porém, o intermediário óxido de areno é altamente instável, então, é hidratado por uma epóxido hidrolase para formar um trans-di-hidrodiol ou é reorganizado de forma não enzimática para formar um fenol, que serão metilados ou convertidos a sulfatos, glicosídeos, glicuronídeos ou xilosídeos (CAPOTORTI et al., 2005; CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001).

Vários microrganismos já foram relatados pela capacidade de degradação dessas substâncias complexas, por exemplo: *Alcaligenes denitrificans*, *Aeromonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *P. cepacia*, *Rhodococcus* sp.,

Cycloclasticus sp., *Corynebacterium venale*, *Bacillus cereus*, *Moraxella* sp., *Streptomyces* sp., *Gordonia* sp., *Vibrio* sp., *Burkholderia cepacia*, *Cycloclasticus* sp., *Acremonium murorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Penicillium brevicompactum* e *Oxyporus* sp. (CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2010; GALLEGO et al., 2014; KASAI; KISHIRA; HARAYAMA, 2002; SAMANTA; SINGH; JAIN, 2002).

A utilização de consórcios microbianos capazes de degradar várias classes de hidrocarbonetos em alcanos menores, ou até a completa oxidação do óleo em CO₂ e H₂O, se destaca como uma das estratégias mais promissoras de biorremediação (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003). A combinação de diferentes microrganismos pode oferecer uma maior estabilidade ao consórcio, ampla capacidade de adaptação e grande potencial de degradação de petróleo pesado (RAHMATI et al., 2022). A comprovação da eficiência desses consórcios pode ser avaliada por análises químicas, como a cromatografia gasosa (CG). O uso de CG fornece alta seletividade e a capacidade de acoplamento a outras técnicas, como espectrometria de massas (MS) (WANG; FINGAS, 1995). O uso conjunto de CG e MS pode ser utilizado para identificar quais frações de hidrocarbonetos foram degradadas e estimar a porcentagem de degradação promovida por um consórcio microbiano (DAI et al., 2020). Por exemplo, PODDAR; SARKAR; SARKAR, 2019 avaliaram a degradação de um consórcio formado por estirpes de *Klebsiella* sp., *Pantoea* sp. e *Enterobacter* sp. utilizando CG/MS, e determinaram a eficiência de remoção de 9.18% de naftaleno, 6.04% de benzeno, 19,53% de ácidos alifáticos e 25% de compostos cíclicos.

Outra abordagem rápida de avaliação do potencial de biodegradação de hidrocarbonetos é a colorimetria usando o indicador redox 2,6-Diclorofenol indofenol (DCPIP) (HANSON; DESAI; DESAI, 1993). DCPIP é um indicador que atua como receptor de elétrons em reações químicas. Essa técnica consiste na observação indireta da oxidação microbiana de uma fonte de carbono onde elétrons são transferidos para a extração de energia de compostos orgânicos até aceptores como o oxigênio, nitrato e sulfato, avaliando-se a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP no meio de azul, forma oxidada, a incolor, forma reduzida (KUBOTA et al., 2008; LIMA et al., 2020). As variações de coloração azul para rosa, quando ocorre, envolve a adição de apenas um elétron (formando DCPIPH), a completa redução do corante é evidenciada pela ausência de cor (formando DCPIPH₂) (Figura 5). Por isso, nesse estudo foi utilizado o corante DCPIP para selecionar os microrganismos mais promissoras para compor o consórcio bacteriano.

Figura 4 – Avaliação da biodegradação hidrocarbonetos por bactérias, empregando coloração de DCPIP em microplacas de 24 poços. O primeiro poço indica a cor do DCPIP oxidado, o segundo poço a sua redução parcial (rosa) e o terceiro poço mostra sua completa redução (incolor).



Fonte: elaborado pelo autor.

2.3 Efeitos do derramamento de óleo na comunidade microbiana

Os microrganismos desempenham papéis ecológicos extremamente importantes no ambiente, construindo redes complexas de interações entre si e com outros seres vivos. Essas comunidades também são capazes de se adaptar a eventos externos que influenciam na disponibilidade de substratos, por exemplo, onde táxons específicos podem ser favorecidos pela presença ou ausência de novos substratos. Além disso, a composição e estrutura dessas comunidades podem sofrer alterações em resposta a alterações ambientais (salinidade, pH, temperatura). Por isso, análises da estrutura da comunidade microbiana permitem avaliar o papel e a importância das populações perante essas mudanças (FRIEDRICH, 2011).

Alterações na composição e estrutura da comunidade microbiana perante derramamentos de óleo tem mostrado que microrganismos menos abundantes e com capacidade de degradar compostos recalcitrantes são enriquecidos (FUHRMAN, 2009). A resposta desses grupos são cruciais para o entendimento da dinâmica e dos mecanismos que controlam o crescimento e a atividade de microrganismos em ambientes contaminados por hidrocarbonetos (HEAD; JONES; RÖLING, 2006).

A investigação dos parâmetros necessários para entender como e por que esses grupos taxonômicos respondem aos contaminantes requer um conhecimento sobre a dinâmica, o

metabolismo e a estrutura dessas comunidades (SHARMA et al., 2022). Para isso, é essencial o uso de técnicas avançadas como metagenômica, metabolômica, fluxômica e meta-transcriptômica (RODRÍGUEZ et al., 2020). Dentre esses métodos, a metagenômica tem sido a mais amplamente explorada por fornecer conhecimento sobre quais táxons cultiváveis e não cultiváveis são comumente enriquecidos na presença de hidrocarbonetos em amostras ambientais.

Os microrganismos presentes no oceano participam de processos biogeoquímicos, como respiração e processamento de nutrientes para os ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre marinho (FUHRMAN, 2009). Recentemente, essa microbiota foi dividida em dois grupos utilizando dados metagenômicos: um grupo que prospera em águas superficiais (pelágicas), ou seja, fotótrofos e heterótrofos especializados na absorção de carbono orgânico dissolvido (COD). O segundo grupo é composto por táxons classificados como assembleia flexível, que é enriquecida por organismos abundantes de águas mais profundas e provavelmente associados a partículas que afundam (SHAN; CORDERO, 2020). Mudanças na abundância relativa do microbioma central estão sujeitas ao gradiente de disponibilidade dos nutrientes, onde as concentrações de nitrato, fosfato e silicato estão positivamente correlacionadas, todas diminuindo à medida que a profundidade, a temperatura e a utilização aparente de oxigênio aumentam (SHAN; CORDERO, 2020).

Em amostras da área da explosão da plataforma *Deepwater Horizon* (2010), foram encontrados microrganismos degradadores de hidrocarbonetos como *Oceanospirillales*, *Colwellia*, *Cycloclasticus*, *Rhodobacterales*, *Pseudoalteromonas* enriquecidos na coluna de água (CHAKRABORTY et al., 2012). Enquanto nas águas quentes superficiais foram registrados a predominância de *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter* e *Alteromonas* (HAZEN et al., 2010; REDMOND; VALENTINE, 2012).

Em contrapartida, a composição da microbiota de áreas de praias pode ser substancialmente diferente das encontradas na água do mar, dependendo da sua proximidade da costa (MOHIUDDIN et al., 2017). Essa microbiota sobrevive às condições inóspitas e apresentam grande diversidade. Ademais, a composição depende da disponibilidade de água e proteção contra insolação, competição, predação e disponibilidade de nutrientes (WHITMAN et al., 2014). Os biofilmes microbianos cobrem as partículas de areia e funcionam como filtros biocatalíticos tridimensionais para a reciclagem de nutrientes ao longo da interface arenosa (NEWTON et al., 2013). Dentre os filos encontrados em praias não contaminadas com óleo, encontram-se Proteobacteria, Planctomycetes e Bacteroidetes como os mais abundantes (GOBET et al., 2012; PIGGOT et al., 2012). Por exemplo, em praias do

Havaí, foi encontrada uma maior diversidade de táxons na região não submersa pela água (*backshore*) do que na região intermediária (*foreshore*) e submersa pela água (*undershore*) (CUI et al., 2013). Os gêneros mais abundantes encontrados em praias contaminadas com óleo são *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Clostridiales*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Hyphomonas*, *Pseudomonas*, *Hyphomonas*, *Parvibaculum*, *Micavibrio* e *Thalassospira* (KASAI et al., 2002; MARQUE; ACOSTA-GONZA, 2016; NEETHU et al., 2019; RODRIGUEZ-R et al., 2015).

A comunidade microbiana presente no óleo sofre variações estruturais conforme os hidrocarbonetos são degradados, isso ocorre devido ao petróleo ser um material complexo composto por diferentes frações. Um estudo realizado por RODRIGUEZ-R et al., (2015) que monitorou durante um ano as alterações na composição da microbiota de amostras de areias contaminadas pelo óleo do derramamento na plataforma *Deepwater Horizon*, observaram que a comunidade inicial era composta pelos gêneros *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Hyphomonas*, *Parvibaculum*, *Marinobacter* e *Micavibrio*. Após um mês do acidente, predominavam *Alcanivorax*, *Borrelia*, *Spirochaeta*, *Micavibrio* e *Bacteroides*. Esses táxons tiveram suas abundâncias reduzidas após cinco meses e foram dificilmente detectadas após um ano. Além disso, a maioria dos gêneros associados ao óleo inicial não se mantiveram abundantes em amostras oleadas após algum tempo, com as notáveis exceções dos gêneros *Marinobacter* e *Parvibaculum* que perduraram ao longo do tempo.

Outros trabalhos relatam Oceanospirillales (Filo Proteobacteria) como a ordem mais dominante durante os primeiros meses após a chegada do petróleo à costa, registrando uma mudança subsequente para os grupos Alphaproteobacteria (*Rhodobacteraceae*) e Gram-positivos (*Bacillus*) (KING et al., 2015). Precisamente as classes do filo Proteobacteria mais abundantes nos primeiros cinco meses, são representadas por Alphaproteobacteria que dominam nos locais impactados, enquanto a classe Gammaproteobacteria e o gênero *Bacillus* dominam em locais cronicamente contaminados (MAHMOUDI et al., 2013), sinalizando a importância de monitorar a diversidade microbiana do local atingido e entender como a dinâmica de alterações da comunidade microbiana varia de acordo com o tempo e a localização do acidente.

Em particular, espécies do gênero *Alcanivorax* são membros significativos das comunidades próximas à costa, por serem degradadores de hidrocarbonetos alifáticos (KING et al., 2015; YAKIMOV; TIMMIS; GOLYSHIN, 2007). Porém, outros degradadores de hidrocarbonetos pertencentes a classe Gammaproteobacteria também foram detectados, incluindo *Acinetobacter*, *Marinobacter* e *Pseudomonas*, que embora estejam menos abundantes no início da degradação, são

metabolicamente mais versáteis do que o *Alcanivorax* e capazes de degradar HPAs, assim como n-alcanos (KOSTKA et al., 2011).

2.4 Biossurfactantes

Além da produção de um sistema enzimático oxidativo, os microrganismos utilizam diversas outras estratégias para biodegradar esses compostos, buscando aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos como a adesão celular e a produção de biossurfactantes (RAHMATI et al., 2022; RODRIGUES et al., 2020b). Os biossurfactantes são moléculas capazes de reduzir a tensão superficial e conseqüentemente aumentar a solubilidade e disponibilidade dos hidrocarbonetos em ambientes contaminados, onde a biorremediação é melhorada pelo aumento da frequência de colisão dos poluentes com os microrganismos (HUA; WANG, 2014; KAPELLOS, 2017). Além de propriedades tensoativas, alguns biossurfactantes possuem atividade antimicrobiana, capacidade de formação e remoção de biofilmes, emulsificação e dispersão. Ademais, apresentam capacidade de agir em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade com baixa toxicidade e ótima biodegradabilidade (DRAKONTIS; AMIN, 2020).

Biossurfactantes são agentes tensoativos eficazes por conterem uma área ativa em ambos os tipos de superfície devido a mistura de constituintes hidrofóbicos e hidrofílicos (NEU, 1996). A sua constituição tem um papel importante na classificação dos tipos de biossurfactantes conhecidos, sendo divididos entre glicolídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos e fosfolipídios para compostos com baixo peso molecular. Enquanto os tensoativos de alto peso molecular incluem tensoativos poliméricos e particulados (SAYYED; EL-ENSHASY; HAMEEDA, 2021).

Muitos microrganismos são conhecidos pela produção de biossurfactantes, como por exemplo: *Pseudomonas aeruginosa* (Ramnolipídeos), *Torulopsis bombicola* (Soforolipídeo), *Candida antarctica* (Manosileritriol), *Bacillus subtilis* (Surfactina, Iturina, Fengicina), *Pseudomonas putida* (Putisolvina), *Serratia marcescens* (Serrawentina), *Acinetobacter calcoaceticus* (Emulsan), *Candida lipolytica* (Liposan), *Pseudomonas aeruginosa* (Proteína PA), e biossurfactantes particulados produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus* (DESAI; BANAT, 1997; MUTHUSAMY et al., 2008).

3. PERGUNTA DE PARTIDA

O microbioma associado a amostras de areias de praias contaminadas com o óleo pesado derramado no litoral do nordeste em 2019 contém degradadores especialistas desse óleo, que podem ser usados para a construção de um consorcio customizado.

4. HIPÓTESE

Microrganismos isolados da areia oleada encontrada nas praias do nordeste são capazes de degradar diferentes frações de hidrocarbonetos e são candidatos ideais para a construção de um consórcio microbiano para biorremediação.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar microrganismos degradadores de óleo a partir de amostras do óleo derramado na zona costeira do Brasil em 2019 que possam vir a ser usados como degradadores modelo de hidrocarbonetos e/ou como indicadores ambientais de contaminação por petróleo pesado.

5.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias hidrocarbonoclásticas a partir de culturas de enriquecimento com o óleo pesado.
- Identificar os isolados ao longo do enriquecimento com o óleo pelo sequenciamento do gene rRNA 16S.
- Avaliar a biodegradação de diferentes classes de hidrocarbonetos.
- Avaliar a produção de biossurfactantes.
- Selecionar e preparar consórcios customizados de bactérias hidrocarbonoclásticas.
- Caracterizar a resposta dos consórcios à contaminação por hidrocarbonetos do petróleo.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coleta

As amostras de material oleoso derramado em praias do Nordeste Brasileiro foram coletadas de forma asséptica, sendo transportadas a temperatura ambiente e preservadas a 8 °C. As coletas ocorreram em Janeiro e Fevereiro de 2020, nas seguintes praias do Ceará: Fortim (4 ° 25 '24,4" S-37 ° 46 '13 .7 "W), Flexeiras (3 ° 13' 08,7" S-39 ° 16 '39 .5 "W) e Icarai de Amontada (3 ° 01 '25 .0 "S-39 ° 38 '47,3" W).

6.2 Cultura de enriquecimento

As amostras foram enriquecidas em caldo Bushnell Haas (BH) (MgSO₄ 0,2 g/L, CaCl₂ 0,02 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, NH₄NO₃ 1 g/L, FeCl₃ 0,05 g/L – pH 7 ± 0,2) (BUSHNELL; HAAS, 1941) autoclavado por 15 min a 110 °C, suplementado com NaCl 3% (m/ v). Foi adicionado 1 g de amostra de óleo para 100 mL de caldo BH, incubado a 30 °C, 150 rpm, por 15 dias. Em seguida, 1 mL da cultura de 15 dias foi inoculado em 100 mL de meio BH e adicionado 1 g de amostra de óleo esterilizado por autoclavação a 121 °C por 30 min. Esse procedimento foi repetido a cada 15 dias até completar 45 dias. Além desses enriquecimentos, também se obteve uma cultura de enriquecimento de 210 dias com a amostra de Amontada seguindo o mesmo procedimento de enriquecimento. Aliquotas dos consórcios de cada período foram preservadas em glicerol estéril a 20% (v/v) e armazenadas a - 80 °C e - 20 °C.

6.3 Isolamento de microrganismos

Os enriquecimentos de Amontada (15 e 210 dias); Fortim (15 dias); e Flexeiras (15 dias) foram usados para o isolamento de bactérias através da técnica de *spread plate*. Para isso, as culturas foram diluídas seriadamente (10⁻¹ até 10⁻⁵) em NaCl 0,9% estéril e alíquotas de 0,1 mL foram espalhadas com alça de Drigalski em placas de Petri de meio ATGE (Ágar (1,5 g/L), Triptona (5 g/L), Glicose (1 g/L) e Extrato de Levedura (2,5 g/L), acrescido de NaCl 3% (m/v). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. As colônias de bactérias com características distintas foram selecionadas e utilizadas para preparação de culturas puras. Em seguida, foram cultivadas em meio

TGE-Salino (Tryptona 5 g/L, Glicose 1 g/L e Extrato de levedura 2,5 g/L, acrescido de 3% de NaCl), e criopreservadas em glicerol 20% (v/v), a - 80 °C e - 20 °C, na coleção do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

6.4 Extração de DNA e sequenciamento pelo método de SANGER

O DNA de cada isolado foi extraído utilizando a técnica de Brometo de Cetiltrimetil Amônio CTAB 2X (WARNER, 1996). Após a verificação da qualidade do DNA em espectrofotômetro, Nanodrop ND100 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA), foi realizada a amplificação do gene rRNA 16S. Para isso, foram utilizados os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1525R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC- 3'). A PCR do gene rRNA 16S foi realizada em reação de 75 µL seguindo os parâmetros: 20 ng de DNA, 1X *GoTag buffer*, 3mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,25mM dos iniciadores e 1U de DNA polimerase GoTaq. As reações de PCR foram incubadas em termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) usando a seguinte programação: 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 72 °C por 10 min. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel a 2% de agarose (m/v). Os produtos de PCR foram purificados utilizando uma solução 3 M de acetato de potássio (pH 5,5) e 2 vezes o volume total da solução de etanol 100%. Após a homogeneização por inversão, a solução foi refrigerada a -80 °C por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g, 4 °C, por 15 min e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* foram ressuspensos em etanol 70% (v/v) gelado e centrifugados a 14.000 x g, 4 °C por 5 min. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram secados em banho seco a 36 °C por 20 min. Após evaporação do álcool, o DNA purificado e precipitado foi resuspendido em 30 µL de água ultrapura livre de DNAsas e RNAsas. As amostras foram sequenciadas pelo método de SANGER em sequenciador SeqStudio (Thermo Fisher Scientific, EUA), na Central Genômica e Bioinformática (CeGenBio) da Universidade Federal do Ceará.

Para a construção da árvore filogenética foram utilizadas sequências de rRNA 16S dos morfotipos classificados dentro do mesmo gênero. As sequências retiradas do banco de dados do NCBI e analisados utilizando o software Geneious versão 2021.2.2 (Cambridge, MA, EUA), utilizando Kimura-Nei (SAITOU; NEI, 1987) e bootstrap com 1000 repetições.

6.5 Avaliação da compatibilidade entre os isolados

A avaliação de compatibilidade entre os isolados foi realizada usando a técnica de estrias cruzadas (WAKSMAN, 1945), onde cada isolado foi inoculado fazendo-se uma estria central no meio da placa (ATGE- Salino) e a placa foi incubada por 48 horas a 35 °C. Após esse período, cada um dos demais isolados foram inoculados perpendicularmente a estria central, e as placas foram incubadas por mais 48 horas. A compatibilidade entre os isolados foi constatada pela inibição do crescimento.

6.6 Biodegradação de hidrocarbonetos

Os isolados foram submetidos a ensaio de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-Diclorofenolindofenol (DCPIP) (HANSON; DESAI; DESAI, 1993). Os hidrocarbonetos utilizados representam diferentes frações do petróleo, com o objetivo de representar a mistura complexa que é o óleo pesado. Foram utilizados um alcano de cadeia simples (Hexadecano), dois hidrocarbonetos aromáticos (Pireno e Naftaleno) e três misturas contendo diferentes alcanos e/ou hidrocarbonetos aromáticos (Querosene, Gasolina e Diesel). Os isolados bacterianos foram crescidos em meio TGE-Salino a 30 °C por até 72 horas, em seguida, as células foram lavadas duas vezes com salina 0,9% NaCl a 10.000 x g por 15 min, a densidade celular foi ajustada para 1,0 a 600 nm.

O ensaio foi realizado em placa de 24 poços de fundo chato (KASVI, Brasil), seguindo a metodologia de (PEIXOTO et al., 2018), com modificações na concentração do inóculo e o meio utilizado. No teste foram adicionados 1,5 mL de BH salino (3% NaCl) contendo 0,1 g/L de DCPIP filtrado por membrana de 0,22 µM, 10 µL de hidrocarboneto e 25 µL de inóculo bacteriano. Como controles negativos foram usados 1,5 mL de BH salino com 0,1 g/L DCPIP e 35 µL BH salino e 1,5 mL de BH salino + DCPIP (0,1 g/L), 10 µL do hidrocarboneto testado e 35 µL BH salino. As placas foram incubadas a 30 °C sob agitação de 60 rpm por 6 dias. A avaliação da degradação foi feita a cada 24 horas através da visualização da oxidação do DCPIP.

6.7 Prospecção de biossurfactantes

Para avaliar a produção de biossurfactantes, os isolados foram cultivados em meio mineral contendo 1% (v/v) de óleo lubrificante autoclavado por 15 min a 110 °C como fonte de carbono, a 30 °C e 150 rpm. Após o crescimento, verificado pela turvação do meio, a cultura foi centrifugada a 11000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios de emulsificação de querosene, redução da tensão superficial (TS) e dispersão de óleo.

O índice de emulsificação (E24%) foi determinado misturando-se 2 mL do sobrenadante da cultura com 2 mL de querosene (Natrielli, Brasil). Os tubos foram agitados por 2 minutos em vórtex (Labnet, EUA) e após 24 horas a camada emulsificada foi aferida. A capacidade de redução da tensão superficial da água foi medida em tensiômetro modelo K20 (Kruss, Alemanha), pelo método do Anel Du Nöuy (DU NÖUY, 1925). Para cada amostra foram utilizados 10 mL de sobrenadante. O tensiômetro foi calibrado com água e meio BH salino. Cada amostra foi medida duas vezes. O ensaio de dispersão de óleo foi feito em placas de Petri de 10 mm de diâmetro, em duplicata, contendo 10 mL de água do mar sintética (pH 7,8; salinidade 20) e aproximadamente 40 µL de petróleo. Em seguida, as placas foram agitadas manualmente até a formação de uma película de óleo uniforme na superfície da água. Foram aplicados 100 µL de sobrenadante e observado a dispersão pela abertura da camada de óleo imediatamente após aplicação da amostra teste e 24 horas depois (QUINTELA, 2018).

6.8 Escolha do consórcio microbiano utilizando DCPIP

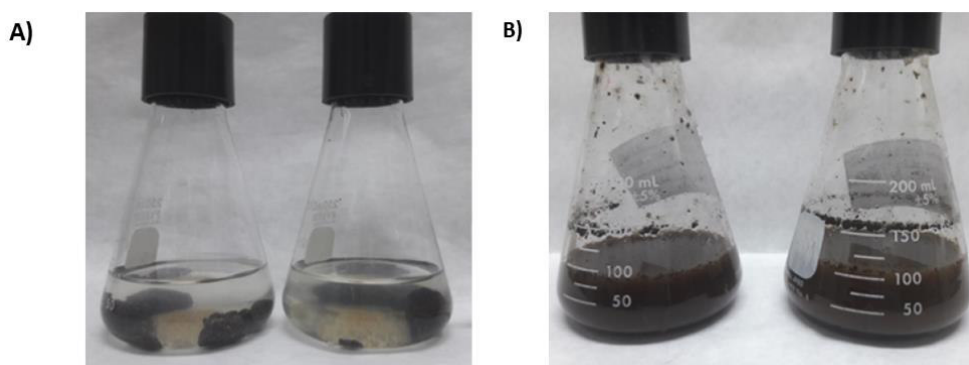
Os microrganismos mais promissores nos ensaios de degradação foram escolhidos para compor o consórcio, então selecionados por meio de novos ensaios utilizando DCPIP (0,1 g/L m/v), seguindo as mesmas condições experimentais descritas anteriormente. Para isso, os índices de degradação das combinações entre as cepas selecionadas e das cepas isoladamente foram determinados pela quantificação final de DCPIP reduzido. Uma alíquota de cada condição foi centrifugada a 10000 g por 15 min para a obtenção do sobrenadante livre de células, em seguida foi lida a absorbância a 600 nm (PEIXOTO et al., 2018). Para a construção da curva de calibração do DCPIP, a concentração inicial de 0,1 g/L (m/v) foi diluída até a solução apresentar-se incolor (0,00312 g/L m/v). Por fim, a montagem do consórcio final foi decidida com base nos índices de degradação, avaliando qual combinação entre as cepas seria capaz de degradar diferentes frações do petróleo.

7. RESULTADOS

7.1 Isolamento de microrganismos associados às areias contaminadas com óleo pesado

As culturas de enriquecimento favoreceram o crescimento de bactérias capazes de degradar o óleo pesado como fonte de carbono. Na figura 6 é possível perceber a transformação da amostra original durante o enriquecimento através das características visuais. Na figura 6.A o óleo pesado se encontrava totalmente insolúvel no meio. Entretanto, após 210 dias (figura 6.B) o óleo se encontrava totalmente solubilizado no meio mineral e separado das partículas de areia, decantadas no fundo do Erlenmeyer.

Figura 5 - Amostras do óleo de Amontada antes (A) e após 210 dias de enriquecimento (B).



Fonte: elaborado pelos autores.

A Tabela 2 apresenta os resultados das contagens de células viáveis presentes nas culturas de enriquecimento. Apesar das amostras de areia terem sido coletadas em praias diferentes, as culturas de 15 dias apresentaram mesma densidade celular. Com 210 dias, observou-se um aumento significativo na densidade celular, que passou de 2 milhões para 20 milhões de UFC/ml. Todavia, esse aumento no número de células não foi acompanhado do aumento da diversidade de isolados.

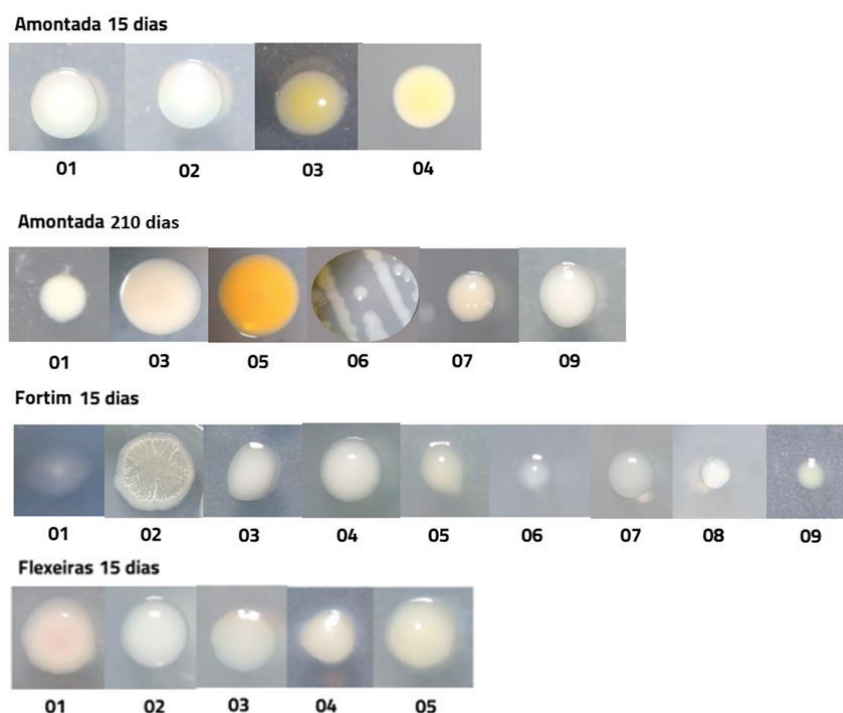
Tabela 1 – Contagem de viáveis nas culturas de enriquecimento preparadas em meio mineral contendo o 1% de óleo como única fonte de carbono.

Origem da amostra	Tempo de enriquecimento	Contagem de viáveis (UFC/mL)	Riqueza de morfotipos
Flexeiras	15 dias	$1,8 \times 10^6$	5
Fortim	15 dias	$1,9 \times 10^6$	9
Amontada	15 dias	$1,8 \times 10^6$	4
Amontada	210 dias	$2,3 \times 10^7$	6

Fonte: elaborado pelos autores.

Foram obtidos 24 isolados a partir das amostras oriundas das três praias. Durante o enriquecimento com amostra da praia de Amontada, foi possível observar que outros microrganismos conseguiram se desenvolver conforme as frações do óleo foram sendo degradadas, uma vez que mais morfotipos foram isolados com 210 dias (Figura 7).

Figura 6 – Morfotipos de bactérias isoladas a partir do enriquecimento de amostras de areias contaminadas com o óleo derramado no Nordeste.



Fonte: Elaborado pelo autor

7.2 Identificação molecular da coleção microbiana

Os morfotipos foram identificados a partir da análise da sequência do gene rRNA 16S em relação a sequências depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os isolados foram classificados como representantes dos filos Proteobacteria (63,6%) (bactérias Gram-negativas), Bacteroidetes (18,2%) (bactérias Gram-negativas) e Actinobacteria (18,2%) (bactérias Gram-positivas), pertencentes a 14 gêneros diferentes (Tabela 3). Os gêneros mais abundantes foram *Acinetobacter* (13,6%), *Marteella* (13,6%), *Sinomicrobium* (13,6%), *Alcanivorax* (9%), *Corynebacterium* (9%), *Idiomarina* (9%), *Aquamicrobium* (4,5%), *Dietzia* (4,5%), *Shewanella* (4,5%), *Pseudomonas* (4,5%), *Brucella* (4,5%), *Tistrella* (4,5%) e *Demequina* (4,5%).

As amostras compartilharam poucos gêneros entre si, sendo Fortim disparadamente a que apresentou a maior riqueza (Figura 8).

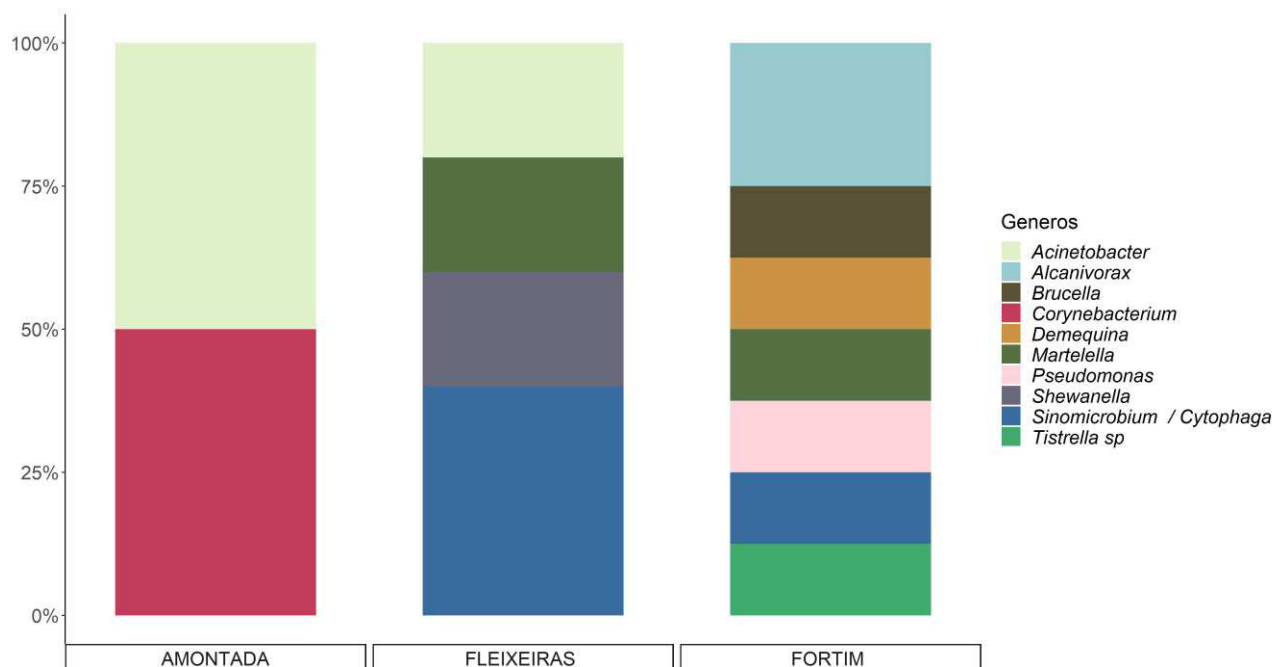
Tabela 2 – Identificação molecular dos isolados obtidos nas culturas de enriquecimento de amostras de areias de praia do Ceará - Brasil, impregnadas com o óleo pesado.

Praia	Código de identificação do isolado	Filo	Identificação	Identidade	Cobertura	Número de Acesso do hit com maior identidade
Amontada	AMO1501	Proteobacteria	<i>Acinetobacter venetianus</i>	100%	100%	MT478042.1
Amontada	AMO1502	Proteobacteria	<i>Acinetobacter venetianus</i>	100%	100%	MT478042.1
Amontada	AMO1503	Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i> sp.	100%	100%	GU968487.1
Amontada	AMO1504	Actinobacteria	<i>Corynebacterium glyciniphilum</i>	99,2%	100%	MT533936.1
Amontada	AMO21001	Proteobacteria	<i>Idiomarina</i> sp.	99,6%	100%	KC200266.1
			<i>Oricola</i> sp. /	99,8%		KX809757.1
Amontada	AMO21003	Proteobacteria	<i>Aquamicrobium</i> sp. / <i>Hoeflea</i> sp.	97,0% 96,8%	100%	MT457451.1 KC469092.1

Amontada	AMO21005	Bacteriodetes	<i>Psychroflexus halocasei</i>	97,0%	99%	NR_108506.1
Amontada	AMO21006	Proteobacteria	<i>Idiomarina</i> sp.	99,8%	99%	KY770530.1
Amontada	AMO21007	Actinobacteria	<i>Dietzia</i> sp.	99,8%	100%	KJ396270.2
Amontada	AMO21009	Proteobacteria	<i>Martelevella</i> sp.	100%	100%	KY770423.1
Flexeiras	FLE1501	Proteobacteria	<i>Shewanella</i> sp.	100%	100%	MT515370.1
Flexeiras	FLE1502	Proteobacteria	<i>Martelevella</i> sp.	100%	100%	KX989258.1
Flexeiras	FLE1503	Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> sp.	100%	100%	MT581440.1
Flexeiras	FLE1504	Bacteriodetes	<i>Sinomicrobium</i> sp. / <i>Cytophaga</i> sp.	99,8%	100%	KJ754140.1 JQ658409.1
Flexeiras	FLE1505	Bacteriodetes	<i>Sinomicrobium</i> sp. / <i>Cytophaga</i> sp.	99,8%	100%	KJ754140.1 JQ658409.1
Fortim	FOR1501	Proteobacteria	<i>Alcanivorax</i> sp.	100%	100%	MK503537.1
Fortim	FOR1502	Proteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%	100%	MT261835.1
Fortim	FOR1503	Proteobacteria	<i>Brucella</i> sp.	100%	100%	KR632646.1
Fortim	FOR1505	Bacteriodetes	<i>Sinomicrobium</i> sp. / <i>Cytophaga</i> sp.	99,8%	100%	KJ754140.1 JQ658409.1
Fortim	FOR1506	Proteobacteria	<i>Alcanivorax</i> sp.	100%	100%	KP178166.1
Fortim	FOR1507	Proteobacteria	<i>Martelevella</i> sp.	100%	100%	MH169335.1
Fortim	FOR1508	Proteobacteria	<i>Tistrella</i> sp.	100%	100%	AM403200.1
Fortim	FOR1509	Actinobacteria	<i>Demequina</i> sp.	100%	100%	LC203066.1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7- Abundância relativa de gêneros de bactérias isoladas a partir do enriquecimento de 15 dias de areias de praias do Ceará - Brasil, contaminadas com o óleo pesado.

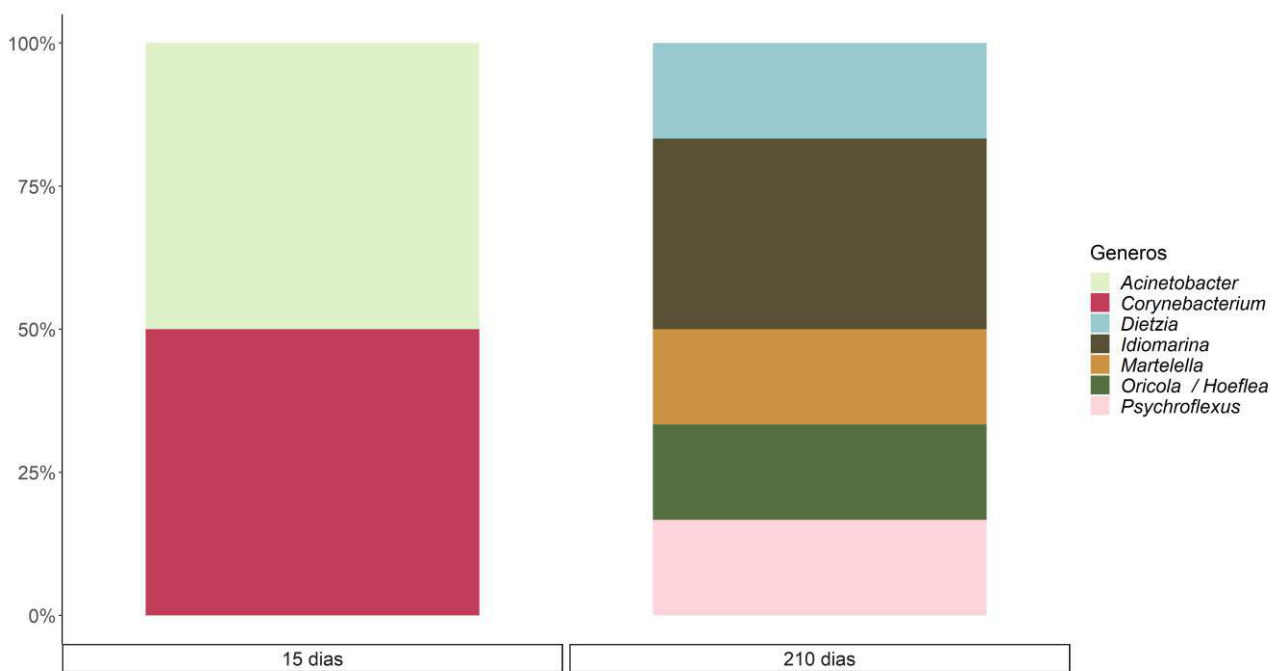


Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras das praias apresentaram perfil de bactérias cultiváveis diferentes entre si (figura 8), sendo possível atribuir essas diferenças a fatores ambientais locais, além da data de coleta e do grau de intemperismo das amostras, que contribuem para a seleção dos microrganismos. Entretanto, também foi possível observar o compartilhamento de isolados de mesmo gênero, como *Acinetobacter* que foi encontrado no enriquecimento de Amontada 15 dias e Flexeiras.

Podemos evidenciar o impacto da data de coleta dos óleos nas culturas de enriquecimento de Amontada 15 dias e 210 dias, que apresentaram riqueza e diversidade diferentes (Figura 9). É possível observar uma clara substituição de táxons ao longo da degradação do óleo. Essas mudanças são explicadas pela utilização de diferentes frações do petróleo no intervalo de tempo.

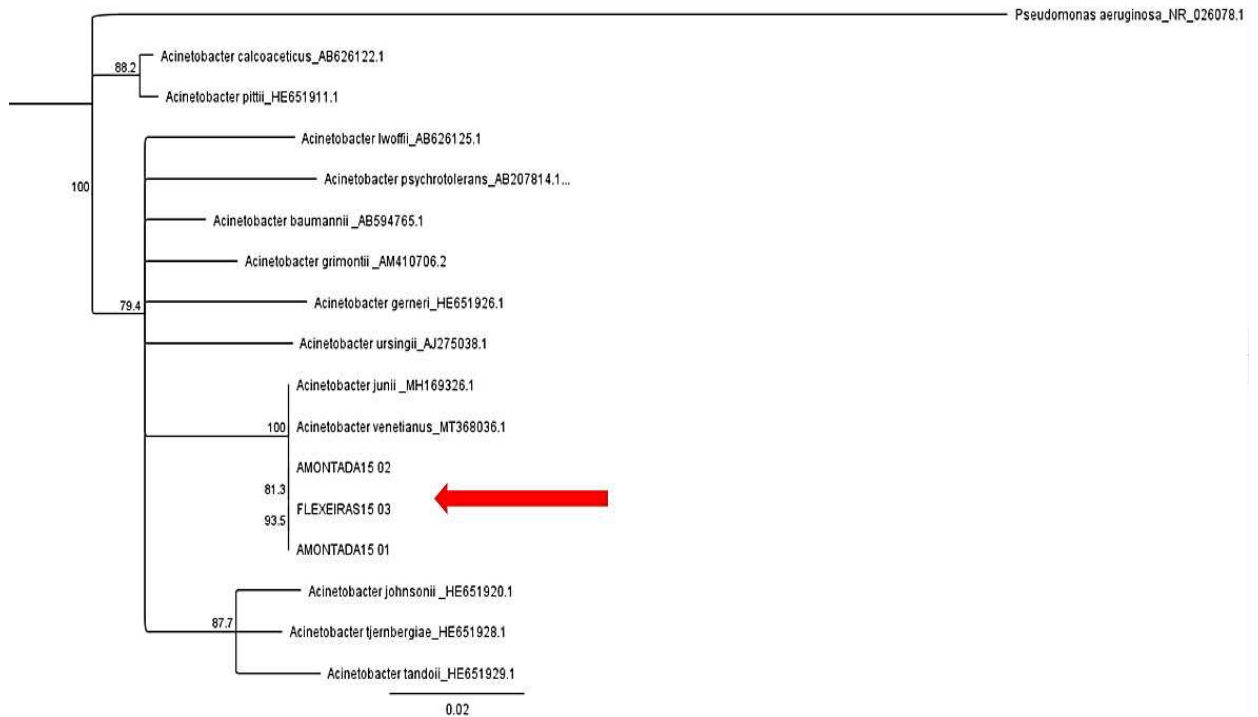
Figura 8 - Comparação da riqueza e abundância relativa de gêneros de bactérias das culturas de enriquecimento de Amontada com 15 e 210 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As sequências de rRNA 16S dos morfotipos classificados dentro do mesmo gênero foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas. Os gêneros encontrados foram agrupados juntamente com sequências retiradas do banco de dados do NCBI e analisados utilizando o software Geneious versão 2021.2.2 (Cambridge, MA, EUA), utilizando Kimura-Nei (SAITOU; NEI, 1987) e bootstrap com 1000 repetições. Os isolados identificados como *Acinetobacter* (AMO1501; AMO1502 e FLE1503) agruparam no mesmo clado com as espécies *Acinetobacter junii* e *Acinetobacter venetianus* (Figura 10).

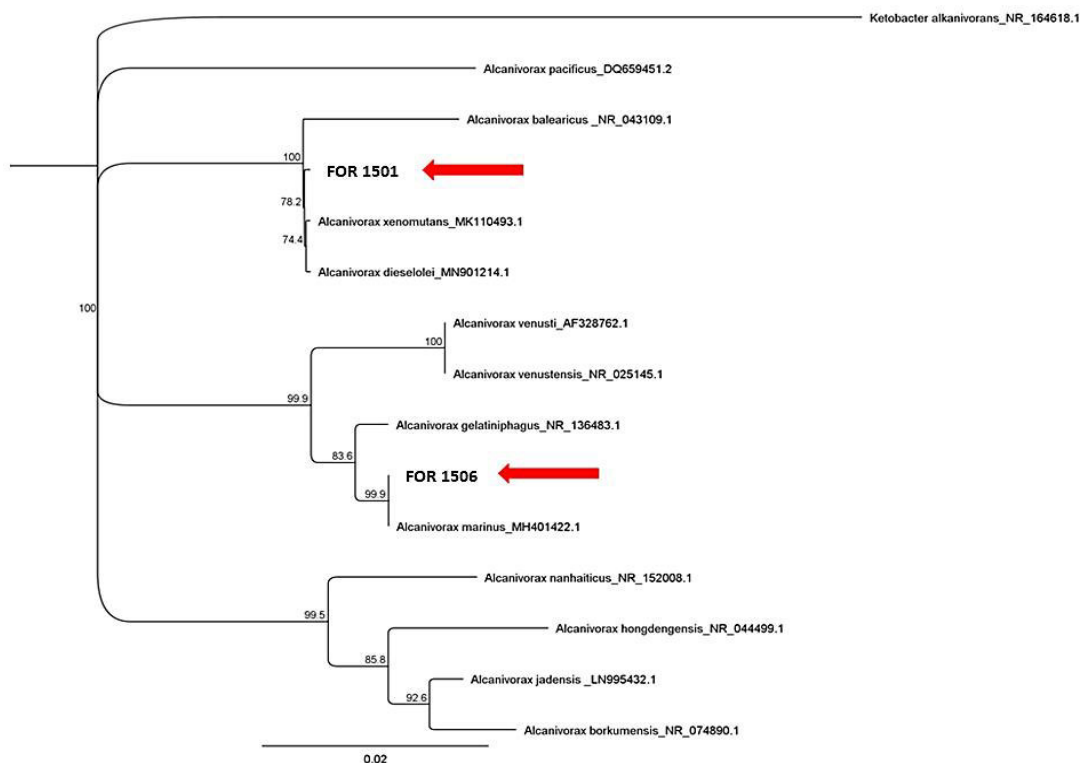
Figura 9 – Árvore filogenética utilizando Kimura-Nei e bootstrap (1000) construída com as sequências do gene rRNA 16S dos morfotipos. identificados como *Acinetobacter* sp. AMO1501, AMO1502 e FLE1503. As setas vermelhas indicam os microrganismos isolados nesse estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O morfotipo FOR1501 foi agrupado em um mesmo clado com as espécies *Alcanivorax balearicus*, *Alcanivorax xeneomutans* e *Alcanivorax dieselolei*, enquanto FOR1506 agrupou com 99,9% de similaridade com *Alcanivorax marinus* (Figura 11).

Figura 10 - Árvore filogenética utilizando Kimura-Nei e bootstrap (1000) construída com as sequências do gene rRNA 16S dos morfotipos FOR1501 e FOR1505 identificadas como *Alcanivorax* sp. As setas vermelhas indicam os microrganismos isolados nesse estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

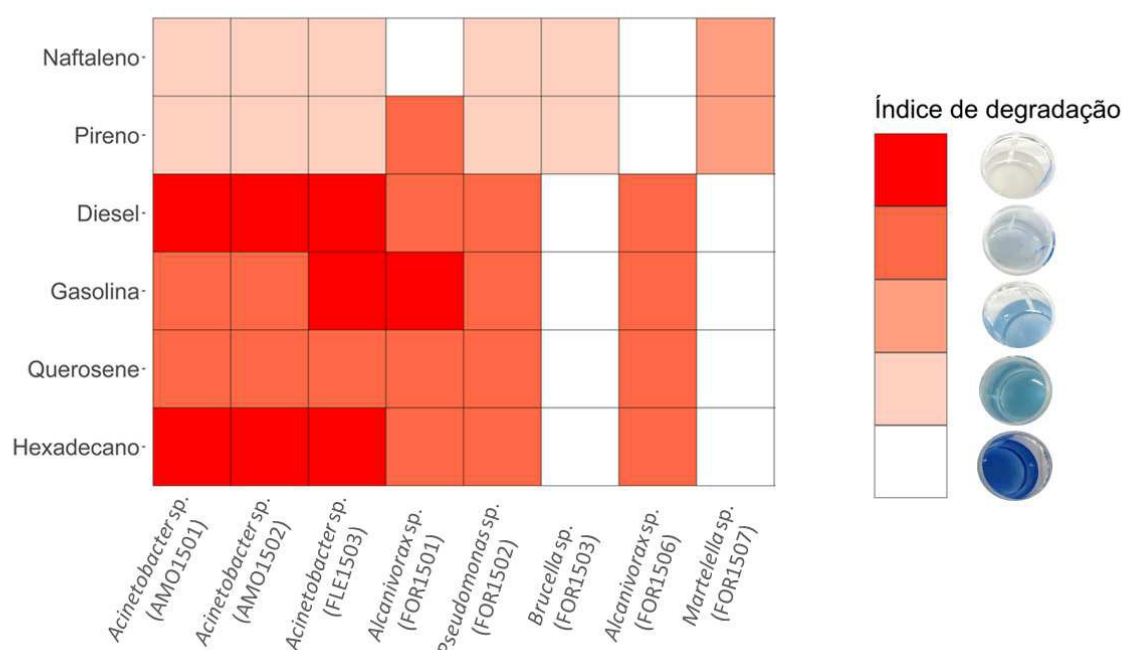
7.3. Biodegradação de hidrocarbonetos

Dentre os 24 isolados obtidos, apenas oito se revelaram hidrocarbonoclasticos. Além disso, de acordo com resultados de biodegradação compilados *heatmap* (Figura 13), é possível deduzir que, exceto pelas estirpes AMO1501 e AMO1502, que apresentaram perfis de degradação idênticos, as demais estirpes possuem perfis metabólicos distintos, o que sugere uma riqueza de genes e rotas de biodegradação de óleo. Vale destacar que a metodologia foi capaz de discriminar estirpes de mesmo gênero como FLE1503, também identificada como *Acinetobacter* sp., assim como FOR1501 e FOR1506, identificadas como *Alcanivorax* sp.

As estirpes AMO1501, AMO1502 e FLE1503, todas *Acinetobacter* sp., foram capazes de degradar todos os hidrocarbonetos testados. Entretanto, AMO1501 e AMO1502 foram mais eficientes para hexadecano e diesel, enquanto FLE1503, além de degradar hexadecano e diesel também se mostrou bom degradador de gasolina. Os isolados FOR1501 (*Alcanivorax* sp.), FOR1502 (*Pseudomonas* sp.), FOR1503 (*Brucella* sp.), FOR1506 (*Alcanivorax* sp.) e FOR1507 (*Marteella* sp.) mostraram perfis distintos de degradação. FOR1502 foi a única capaz de degradar todas as

classes de hidrocarbonetos, enquanto FOR1503 e FOR1507 mostraram especificidade para pireno e naftaleno, com atividades distintas como revelado pelo mapa de calor. Esse conjunto, esses resultados ressaltam o grande potencial biotecnológico desse patrimônio genético para o desenvolvimento de biorremediadores customizados.

Figura 11 – Mapa de calor indicativo da degradação de hidrocarbonetos por morfotipos de bactérias isolados de amostras de areias de praias do Ceará – Brasil, contaminadas com óleo pesado. Mapa de calor: quanto mais vermelho mais eficiente a degradação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4 Produção de biossurfactante

Os isolados AMO1501 (*Acinetobacter* sp.), AMO1502 (*Acinetobacter* sp.), FLE1503 (*Acinetobacter* sp.), FOR1501 (*Alcanivorax* sp.) e FOR1506 (*Alcanivorax* sp.) quando cultivadas em meio mineral contendo óleo lubrificante produziram biossurfactantes, como revelado pela atividade emulsificante promovida pelos sobrenadantes dessas culturas (Figuras 12 e 13), com destaque para a maior atividade de FOR1501. Os sobrenadantes brutos das culturas positivas para atividade emulsificante não apresentaram atividade de redução da tensão superficial, nem atividade de dispersão de óleo.

Figura 12 - Índice de emulsificação (IE24%) promovido pelo sobrenadante de culturas de 24 h em meio mineral contendo 1% de óleo lubrificante como fonte de carbono. Os isolados indicados pelas barras de coloração azul claro e setas vermelhas apresentaram IE24% maior ou igual a 50%.

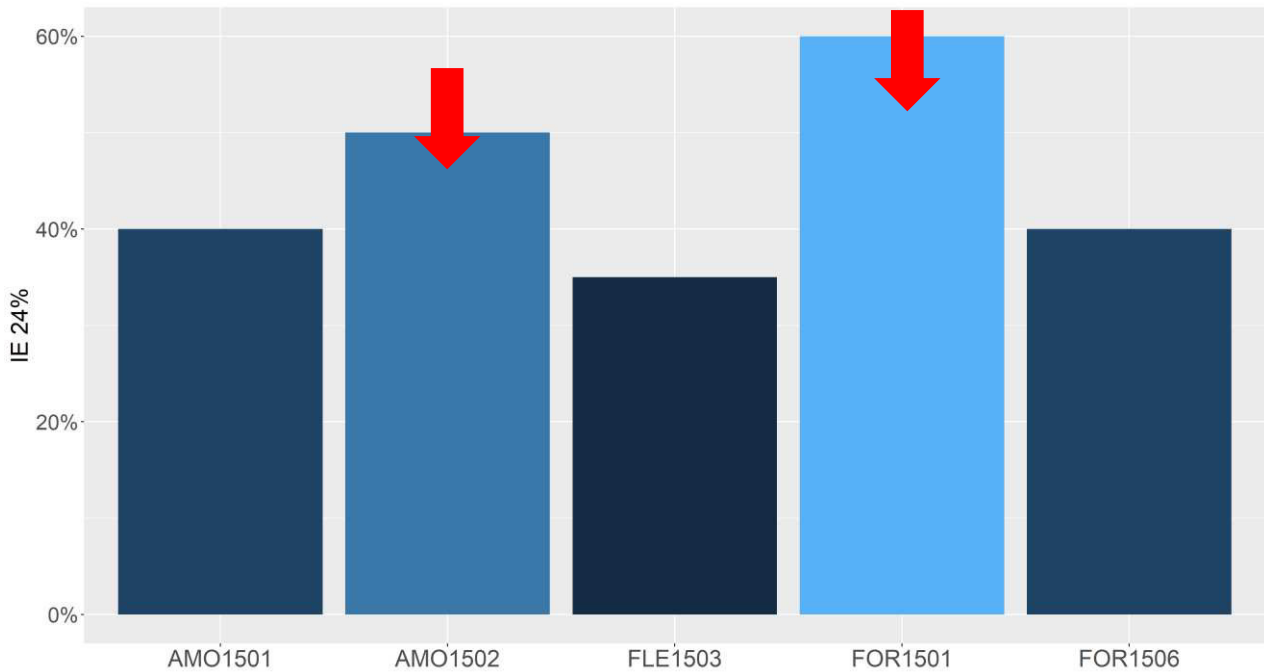
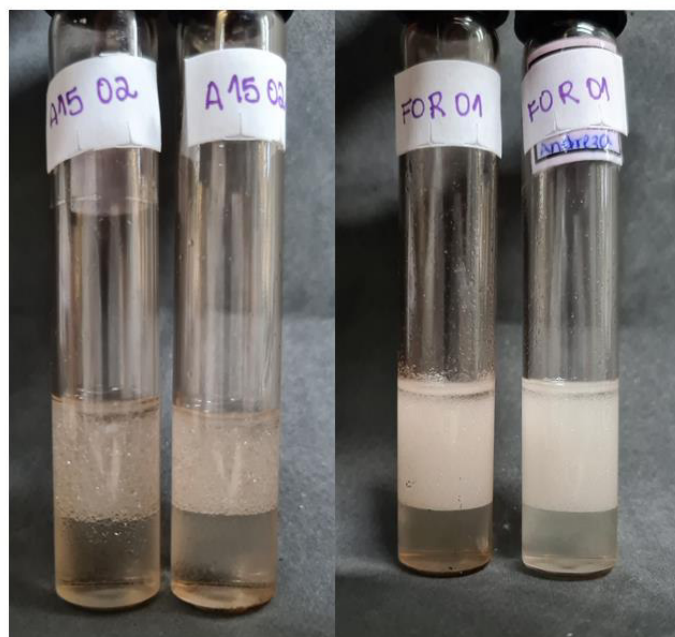


Figura 13 – Emulsificação de mistura água-querosene promovida pelos sobrenadantes das culturas AMO1502 e FOR1501 (em duplicata).



Fonte: Elaborado pelo autor.

7.5 Escolha do consórcio microbiano

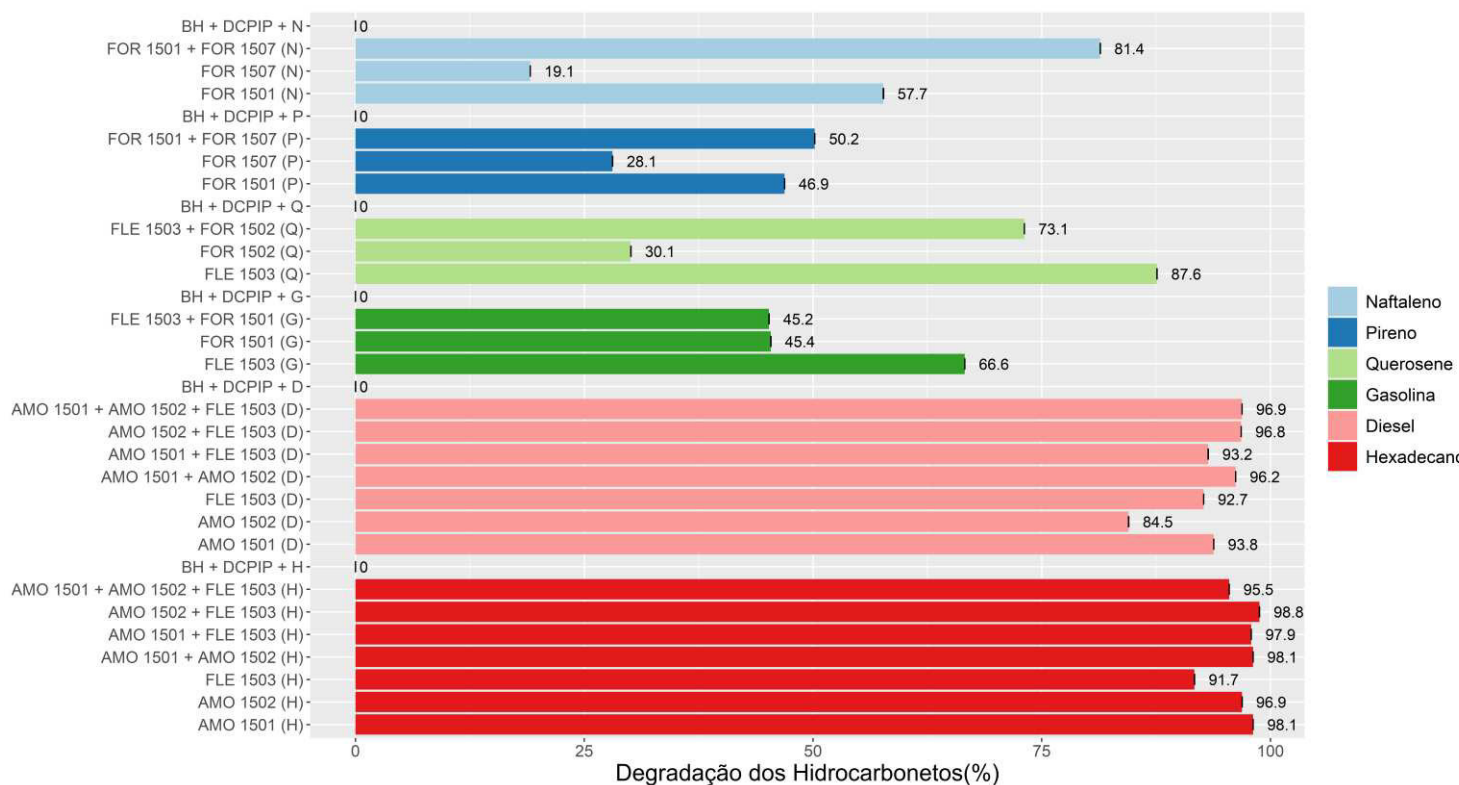
Nenhum dos isolados selecionados apresentou incompatibilidade entre si, sendo, portanto, potenciais candidatos para compor um consórcio. A seleção inicial levou em consideração a degradação de hidrocarbonetos do petróleo, revelado pelo indicador redox do DCPIP, e a atividade emulsificante demonstrada por FLE1503 (*Acinetobacter* sp.) e FOR1501 (*Alcanivorax* sp.).

FLE1503 promoveu a redução total do DCPIP na presença de Gasolina, Diesel e Hexadecano, e a redução parcial na presença de Naftaleno, Pireno e Querosene. FOR1501 degradou parcialmente Diesel, Hexadecano, Pireno e Querosene, e totalmente a Gasolina. Além disso, produziu 60% de emulsão da mistura água-querosene. FOR1502 (*Pseudomonas* sp.) degradou parcialmente os seis hidrocarbonetos testados (Gasolina, Diesel, Hexadecano, Querosene, Pireno e Naftaleno). FOR1506 (*Alcanivorax* sp.) degradou parcialmente quatro hidrocarbonetos (Gasolina, Diesel, Hexadecano, Querosene) e FOR1507 (*Martella* sp.) mostrou especificidade para os hidrocarbonetos aromáticos, Pireno e Naftaleno. AMO1501 e AMO1502 se destacaram por suas atividades frente a Hexadecano e Diesel. Analisando esse conjunto de resultados decidiu-se testar em diferentes combinações frente aos diferentes hidrocarbonetos.

A Figura 14 compila os resultados obtidos. Analisando a performance dos isolados sozinhos e combinados, tem-se que FOR1501 (*Alcanivorax* sp.) e FOR1507 (*Martella* sp.) consorciados são melhores do que isoladamente. Juntos eles atingem 81,4% de degradação do Naftaleno, contra 57,7% e 19,1%, respectivamente, quando isoladamente. De forma semelhante, juntos eles também são melhores para degradar pireno, atingindo mais de 50% de degradação. FLE1503 (*Acinetobacter* sp.) mostrou melhor desempenho quando aplicado sozinho para degradar querosene ou gasolina. O consórcio com FORT1501 ou com FORT1502 influenciou negativamente a atividade de FLE1501, provando a ausência de sinergismo metabólico entre eles. FLE1503 demonstra excelente capacidade para degradar gasolina (66,6%), diesel (92,7%) e hexadecano (91,7%). Entretanto, a atividade frente a hexadecano e diesel pode chegar próximo a 100% quando consorciado com AMO1501 e AMO1502.

A partir do conjunto de resultados é possível vislumbrar dois consórcios customizados para degradação de diferentes frações de óleo pesado. O 1º consórcio constituído por AMO1501, AMO1502 e FLE1501 (*Acinetobacter* spp.) para degradar alcanos e misturas de alcanos e aromáticos, e o 2º consórcio constituído por FOR1501 (*Alcanivorax* sp.) e FORT1507 (*Martella* sp.) para degradar hidrocarbonetos poliaromáticos. Além disso, FLE1501 desponta como candidato para degradar alcanos simples, além de misturas de alcanos e aromáticos, como aqueles presentes na gasolina e no diesel.

Figura 14 – Capacidade de degradação dos hidrocarbonetos pelas combinações dos microrganismos selecionados após 6 dias de ensaio com o corante DCPIP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

8. DISCUSSÃO

Os desastres ambientais envolvendo hidrocarbonetos podem impactar permanentemente os ecossistemas quando medidas de remediação não são efetivadas. Por isso, nos últimos anos buscou-se o desenvolvimento de diversas tecnologias de biorremediação que fossem capazes de mitigar esses danos. Dentre os principais fatores limitantes atuais para o sucesso da remediação está a adaptação dos microrganismos às condições ambientais dos ecossistemas contaminados. Dessa forma, no presente estudo foi selecionado um consórcio de bactérias nativas, isoladas de areias contaminadas pelo óleo misterioso que chegou à zona costeira do nordeste brasileiro em 2019, visando o desenvolvimento de um produto para mitigar os danos ambientais crônicos provocados por esse desastre.

As culturas de enriquecimento de amostras de óleo coletadas em três praias do Ceará apresentaram riqueza e diversidade diferente, apesar do óleo que impactou toda a costa nordestina ser comprovadamente da mesma origem (REDDY et al., 2022). As manchas de óleo chegaram em pulsos a partir de agosto de 2019 se estendendo pelo ano de 2020. Portanto, as diferenças podem ser atribuídas as diferentes datas de coleta, as características do local de coleta, aos fatores ambientais aos quais as amostras foram expostas e ao grau de intemperismo do óleo. No momento da coleta era visível que algumas amostras eram mais líquidas enquanto outras eram mais sólidas, com aspecto de piche. Além disso, a microbiota pode ter sido alterada pela quantidade e classes de hidrocarbonetos predominantes nas amostras de óleo. GENG et al., 2022 correlacionaram a quantidade de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) com o número de cópias do gene ribossomal 16S, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), em amostras de solos contaminados. Os resultados mostraram uma correlação direta entre a quantidade de hidrocarbonetos com a composição da microbiota. Foi possível observar que a abundância de microrganismos é proporcional ao aumento de HTP e que a sua lixiviação do óleo reduz a riqueza e diversidade de bactérias no solo (KIM et al., 2021; SUTTON et al., 2013). O gênero *Acinetobacter* foi relatado em solos com diferentes HTP, com abundância relativa de 5 a 41% em solos com uma variação de 14 a 285,28 mg/g de

hidrocarbonetos totais, enquanto o gênero *Alcanivorax* foi observado com baixa abundância (5%) apenas em solos com média de 58,67 mg/g de hidrocarbonetos totais (ABED; AL-KINDI; AL-KHARUSI, 2015).

Apesar dos gêneros *Acinetobacter* e *Alcanivorax* serem ótimos degradadores de alcanos de cadeia longa, o gênero *Alcanivorax* foi detectado apenas nas amostras da praia de Fortim, enquanto o gênero *Acinetobacter* foi detectado nas amostras de Amontada e Flexeiras. Fortim apresentou maior riqueza de espécies do que Amontada e Flexeiras, sugerindo relação com as características do óleo no momento da coleta, a área oleada de Fortim apresentava um aspecto mais pedregoso enquanto a areia oleada de Amontada era mais viscosa (CAI et al., 2021; WANG; SHAO, 2012a).

Quando se comparou as comunidades de bactérias das culturas de enriquecimento do óleo coletado na praia de Amontada, com 15 dias e 210 dias, observou-se um aumento significativo na diversidade microbiana aos 210 dias. Isso sugere uma sucessão ecológica de organismos com diferentes propriedades metabólicas com respeito à degradação do óleo, como respostas rápidas a constituintes de óleo facilmente degradáveis, como os alifáticos, organismos especializados na degradação de compostos aromáticos e frações recalcitrantes, e organismos generalistas de degradação de óleo. O monitoramento da comunidade microbiana de praias do Golfo do México atingidas pelo óleo derramando em consequência da explosão da plataforma *Deepwater Horizon* em 2010 mostrou alterações da comunidade microbiana ao longo do tempo. Logo após a chegada do óleo observou-se o enriquecimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos alifáticos, e após três meses esses degradadores primários foram sendo substituídos por populações de degradadores de hidrocarbonetos aromáticos. No início os gêneros mais abundantes eram *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Hyphomonas*, *Parvibaculum*, *Marinobacter* e *Micavibrio*. Espécies de *Alcanivorax* são membros significativos de comunidades próximas à costa, por serem degradadores de hidrocarbonetos alifáticos (KING et al., 2015; YAKIMOV; TIMMIS; GOLYSHIN, 2007). Porém, outros degradadores de hidrocarbonetos pertencentes a classe Gammaproteobacteria também foram detectados, incluindo *Acinetobacter*, *Marinobacter* e *Pseudomonas*, que embora estejam menos abundantes no início da degradação, são metabolicamente mais versáteis do que o *Alcanivorax* e capazes de degradar HPAs, assim como n-alcanos (KOSTKA et al., 2011). Após um mês do acidente no Golfo do México, *Alcanivorax* e *Micavibrio* continuavam predominando, embora a estrutura da comunidade tivesse mudado, com o enriquecimento dos gêneros *Borrelia*, *Spirochaeta* e *Bacteroides*.

Esses táxons tiveram suas abundâncias reduzidas após cinco meses e dificilmente foram detectadas após um ano. Além disso, a maioria dos gêneros associados ao óleo inicial não manteve sua abundância constante ao longo de um a cinco meses, com exceção dos gêneros *Marinobacter* e *Parvibaculum* (RODRIGUEZ-R et al., 2015).

Como reportado, as parafinas são os hidrocarbonetos mais abundantes no óleo misterioso e já foi reportado que esses hidrocarbonetos são efetivamente degradados por espécies de *Acinetobacter* (KOMA et al., 2000; LOURENÇO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020), assim como representantes do gênero *Corynebacterium*, como confirmado nesse estudo. Ademais, também degradam n-alcenos (C₁₆ e C₁₈) (MAO et al., 2022; RAHMAN et al., 2002; VARJANI, 2017; ZHANG et al., 2016). Esses dois gêneros são responsáveis pelo consumo de hidrocarbonetos de cadeia longa, além de produção de biossurfactantes (CHEN et al., 2012; DWIVEDI; KUMAR; BHAT, 2019).

Aos 210 dias, as fontes de carbono iniciais se encontram escassas ou inexistentes, dando espaço para o enriquecimento de outras espécies. Os gêneros encontrados aos 210 dias foram *Idiomarina*, *Oricola*, *Aquamicrobium*, *Hoeflea*, *Psychroflexus*, *Dietzia* e *Martelella*. O gênero com mais representantes, *Idiomarina* (33% - 2 representantes), é descrito na literatura pela sua capacidade de degradação de hidrocarbonetos aromáticos, sendo comumente detectado em solos contaminados, como ambientes salinos, florestas do golfo do México e em regiões de frequentes incidentes com óleo pesado (FAKHRZADEGAN et al., 2019; NZILA et al., 2018). O gênero *Martelella* não foi detectado no início do enriquecimento da amostra de Amontada, mas foi encontrado nos enriquecimentos das amostras de Flexeiras e Fortim, o que pode ser resultado da sua capacidade de degradação de hidrocarbonetos aromáticos, resultantes do seu acervo genético rico em genes codificadores de desidrogenases (Citocromo P450) (CHEN et al., 2020; NZILA et al., 2018). A presença desse gênero em estágios mais tardios de degradação também foi observada por Jiménez et al., 2011, após 17 meses de enriquecimento, confirmando a relevância desse gênero em ambientes contaminados com hidrocarbonetos e o seu papel de degradação de diferentes frações.

As estirpes pertencentes ao gênero *Acinetobacter* provenientes dos enriquecimentos de Amontada e Flexeiras (AMO1501, AMO1502 e FLE1503) agruparam dentro do mesmo clado, estando mais próximas de *Acinetobacter junii* e *Acinetobacter venetianus* com similaridade de 100%. Portanto, para resolver a qual espécie pertencem essas estirpes faz-se necessário o emprego de outros genes, além do gene 16S rRNA, ou até mesmo o sequenciamento completo do genoma. *Acinetobacter*

junii é relatada na literatura por possuir um alto valor agregado no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos, esgotos ou metais pesados, devido a sua capacidade de degradar alcanos (C₈-C₂₈) e produzir biossurfactantes em condições alcalinas, realizar nitrificação heterotrófica-desnitrificação aeróbica e apresentar resistência a metais pesados pela formação de biofilmes na presença de íons de níquel, cádmio e mercúrio (OHADI et al., 2017, 2020; SARKAR; CHAKRABORTY, 2008; YANG et al., 2015).

Já a espécie *Acinetobacter venetianus* se destaca pelo seu papel na biodegradação de alcanos de cadeia média e longa (C₁₀-C₃₈), produção de emulsificantes, expressão de hidrolases codificadas por *alkMa*, *alkMb* e *almA* e pela degradação de Diesel (C₁₀-C₂₅), sendo essa degradação otimizada quando a bactéria encontra-se imobilizada (CHEN et al., 2016; LIN et al., 2015; LIU et al., 2021; LUCKARIFT et al., 2011).

Os isolados FOR1501 e FOR1506 foram identificados como *Alcanivorax* e agrupados em diferentes clados. FOR1501 mostrou 74,4% de similaridade com *A. xeneomutans* e 78,2% com *A. dieselolei*. Essas espécies são oriundas de ambientes marinhos e estão envolvidas na degradação de alcanos (C₈-C₃₆), entretanto apenas *A. dieselolei* possui relatos na literatura da produção de biossurfactantes e degradação de haloalcanos (FU et al., 2018; LI; SHAO, 2014; MAHIDHARA; CH; CH, 2017; QIAO; SHAO, 2010; WANG; SHAO, 2014). Nesse estudo foi possível observar a produção de emulsificante pela estirpe FOR1501 podendo ser uma pista para sua classificação como *A. dieselolei*. A estirpe FOR1506 compartilha 99,9% de similaridade com *A. marinus*, espécie conhecida pela produção de monooxigenases, além de possuir três cópias do gene *alkB* e duas do citocromo P450, sendo capaz de degradar hidrocarbonetos de cadeia curta e longa, assim como formação de biofilmes na interface óleo-água (JAGTAP et al., 2021; LAI et al., 2013).

O potencial de biodegradação das estirpes de bactérias isoladas nesse estudo foi atestado utilizando hidrocarbonetos de diferentes frações de óleos refinados tais como Hexadecano (C₁₆), Diesel (C₁₀-C₂₅), Querosene (C₁₀-C₁₆), Gasolina (C₄-C₁₂), Naftaleno (dois anéis aromáticos) e Pireno (quatro anéis aromáticos), levando em consideração as frações mais abundantes de hidrocarbonetos encontradas no óleo derramado, revelado por análises cromatográficas. O óleo era constituído majoritariamente por hidrocarbonetos alifáticos (C₂₄-C₂₇), hidrocarbonetos leves (C₈-C₁₃) e hidrocarbonetos aromáticos (LOURENÇO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020; REDDY et al., 2022).

As estirpes de *Acinetobacter* (AMO1501, AMO1502 e FLE1503) se destacaram na degradação do diesel, hexadecano e gasolina. Comparadas a outras estirpes de *Acinetobacter* reportadas na literatura, essas três apresentaram melhores desempenhos, promovendo mais de 90% de degradação desses hidrocarbonetos dentro de 6 dias. Balseiro-Romero et al. (2017), evidenciaram 90% da degradação de diesel, mas com 10 dias, enquanto a degradação de hexadecano reportada por Okoye; Chikere; Okpokwasili (2020), só ocorreu após 12 dias.

Quanto ao consumo de hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno e pireno) e gasolina os resultados foram negativos. De mesma forma, KUBOTA et al., 2008b, também não evidenciaram a degradação de hidrocarbonetos de cadeia curta (C₁₀), presentes na Gasolina, por *Acinetobacter*. Porém, já foi demonstrado que espécies de *Acinetobacter* são capazes de degradar naftaleno e pireno sob diferentes condições e de possuir cópias de genes codificadores de naftaleno desoxigenases (*ndoB*) (JIANG; QI; ZHANG, 2018; OMRANI et al., 2018).

A estirpe FOR1502, identificada como *Pseudomonas* sp., demonstrou capacidade de degradação de diesel de forma parcial, assim como relatado em outros estudos que mostraram cerca de 14% de degradação por *Pseudomonas stutzeri* (CHIKERE; TEKERE; ADELEKE, 2019; LAXMI; GAYATHRI, 2019). Todavia, a capacidade de degradação de hidrocarbonetos aromáticos só foi relatada após 72 dias de incubação por Rabodonirina et al. (2019; VEERAPAGU et al., 2019).

O gênero *Alcanivorax*, aqui representado por duas estirpes (FOR1501 e FOR1506), é composto por espécies encontradas em ambientes marinhos e é reconhecido pela sua capacidade de degradar alcanos de cadeia curta (C₅-C₁₁) e média/longa (C₁₀-C₃₆) devido a presença dos genes *alkB*, *almA*, Citocromo P450 e transportadores de alcanos de cadeia longa *fadL* (FU et al., 2018; ZADJELOVIC et al., 2020b). Esse gênero é bastante abundante durante períodos de alta degradação, sendo considerado um indicador para estágios iniciais de degradação (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019; URIBE-FLORES et al., 2019). As espécies *Alcanivorax dieselolei* e *A. xenomutans* possuem cerca de três cópias de alcano monooxigenases, dois homólogos a CYP153 (Citocromo P450) e uma monooxigenases da família de ligação à flavina (*almA*), justificando a capacidade de degradação de cinco dos hidrocarbonetos testados nesse estudo pela estirpe FOR1501 (BARBATO et al., 2015; FU et al., 2018; LAI; LI; SHAO, 2012). Diversas espécies de *Alcanivorax* são capazes de sobreviver utilizando apenas hexadecano como fonte de carbono, justamente pela sua capacidade de redução de alcanos que varia de 57,7 a 70% em óleos pesados (C₁₃-C₂₈). Além disso, o gênero é enriquecido na

presença de hidrocarbonetos poli aromáticos como naftaleno, pireno e fenantreno (DELL'ANNO et al., 2023; SINHA; KRISHNAN; KURIAN, 2021; UGOCHUKWU; FIALIPS, 2017; URIBE-FLORES et al., 2019; WARR et al., 2018).

As estirpes FOR1503 e FOR1507, correspondentes a *Brucella* sp. e *Martelella* sp. foram capazes de degradar pireno (quatro anéis aromáticos) e naftaleno (dois anéis aromáticos). Esses gêneros são reconhecidos como bons degradadores de hidrocarbonetos aromáticos de três anéis aromáticos como fenantreno e antraceno (ACER et al., 2021; CUI et al., 2014). Em geral, a degradação desses hidrocarbonetos necessita de períodos longos de incubação, sendo relatado a degradação de 80% de fenantreno com 15 dias de incubação, enquanto outro estudo reportou 93% de degradação após 90 dias (ACER et al., 2021; WANG et al., 2022). A via de degradação do fenantreno já foi elucidada e inicializa-se com a ação da enzima 1-hidroxi-2-naftóico e finaliza com a entrada dos compostos resultantes no ciclo do ácido cítrico (CHEN et al., 2020).

Nenhuma das estirpes do enriquecimento da amostra de Amontada de 210 dias demonstrou degradação para os hidrocarbonetos testados utilizando DCPIP. Considerando que houve crescimento bacteriano é razoável supor que ou a biodegradação não envolveu transferência de prótons para reduzir o DCPIP, ou seria necessário um período maior de tempo para a reação ocorrer (OBI; ATAGANA; ADELEKE, 2016) ou se trata de uma comunidade bacteriana especializada para as frações mais recalcitrantes. De acordo com a literatura, apenas três dos seis gêneros (*Dietza*, *Idiomarina* e *Martelella*) possuem relatos de degradação de hidrocarbonetos avaliada por diferentes métodos. *Dietza* conseguiu utilizar hexadecano e óleo pesado com apenas cinco dias de incubação, além de codificar alcanos hidrolases pela presença de genes homólogos a *alkB* e cit. P450, metabolizando preferencialmente alcanos de cadeia carbônica menor que C₂₅ (ALONSO-GUTIÉRREZ et al., 2011; GHARIBZAHEDI; RAZAVI; MOUSAVI, 2014; WANG et al., 2011, 2014). Além disso, *Dietza* sp. também é descrita pela sua capacidade de degradação de hidrocarbonetos aromáticos como tolueno e xileno (BØDTKER et al., 2009; WANG et al., 2014). O gênero *Idiomarina* se destaca por degradar os hidrocarbonetos aromáticos fenantreno e pireno, através de genes codificadores para degradação de hidrocarbonetos aromáticos (NZILA et al., 2018; WANG et al., 2014). Ademais, já foram reportados a degradação de 63% de óleo pesado e a produção de emulsificantes (BAYAT; HASSANSHAHIAN; HESNI, 2016). O gênero *Martelella* é conhecido por

degradar hidrocarbonetos aromáticos, tanto em estudos citados na literatura (FENG et al., 2012), quanto nesse estudo com a estirpe FOR1507 (Figura 11).

A combinação de microrganismos compatíveis em consórcio tem como objetivo explorar atividades metabólicas complementares pela capacidade de degradação de alcanos de cadeia curta/média (C_5 - C_{11}), média/longa (C_{10} - C_{20}), longa ($>C_{18}$) e hidrocarbonetos aromáticos (RODRIGUES et al., 2020a; ZADJELOVIC et al., 2020b). Além disso, a adição de um microrganismo não degradador de alcano pode melhorar as taxas de degradação de alcano dos microrganismos que degradam alcano, como foi evidenciado por Hu et al. (2020), com a junção de uma estirpe de *Pseudomonas* sp. não degradadora de alcanos e uma estirpe de *Dietza* sp. capaz de degradar, promovendo uma depleção de C_{16} . SATHISHKUMAR et al. (2008) evidenciaram o aumento das taxas de degradação quando diferentes microrganismos foram combinados, no qual o consórcio degradou 77% do petróleo pesado, enquanto os espécimes isolados degradaram menos (*Pseudomonas* sp. BPS1-8 69%; *Bacillus* sp. IOS1-7 64%; *Pseudomonas* sp. HPS2-5 45%; e *Corynebacterium* sp. BPS2-6 41%).

A avaliação das estirpes de bactérias hidrocarbonoclasticas mostrou que para a degradação de hexadecano (C_{16}) e diesel (C_{10} - C_{25}) as estirpes de *Acinetobacter* sp. não mostraram diferenças significativas quando reunidas em consórcio em comparação com as estirpes isoladamente. A degradação de gasolina (C_4 - C_{12}) e querosene (C_{10} - C_{16}) pelo consórcio formado foi menor do que com a estirpe FLE1503 sozinha. Por isso, FLE1503 foi selecionada para degradar alcanos de C_4 a C_{25} no consórcio.

Entretanto, para os hidrocarbonetos aromáticos, pireno e naftaleno, FOR1501 (*Alcanivorax* sp.) e FOR1507 (*Marteella* sp.) combinados foram mais eficientes do que sozinhos, por isso os dois representantes foram escolhidos para compor o consórcio.

Assim, chegou-se aos seguintes consórcios customizados para frações específicas de hidrocarbonetos. Consórcio formado por AMO1501, AMO1502 e FLE1501, todas do gênero *Acinetobacter*, para degradar alcanos e misturas de alcanos e aromáticos, e o consórcio formado por FOR1501 (*Alcanivorax* sp.) e FORT1507 (*Marteella* sp.) para degradar hidrocarbonetos poliaromáticos.

Esses consórcios além de serem potenciais candidatos para o desenvolvimento de biorremediadores de óleos pesados, com as características daquele que impactou principalmente o nordeste em 2019, podem também ser usados como bioindicadores de contaminação.

A análise da diversidade microbiana de sedimentos poluídos por óleo com o objetivo de estabelecer características comuns da comunidade microbiana pode ser uma ferramenta valiosa para avaliar a presença, o tipo de poluição e o potencial de biorremediação intrínseca. A estrutura da comunidade bacteriana pode ser usada como um índice de exposição a hidrocarbonetos em sedimentos, assim como a presença, abundância e diversidade de genes de degradação de hidrocarbonetos (ACOSTA-GONZÁLEZ; MARQUÉS, 2016).

No presente estudo, a mudança na composição da comunidade de bactérias cultiváveis nas culturas de enriquecimento de 15 dias e 210 dias ficou bem evidente. Caso tivesse sido possível identificar os contaminantes presentes nessas culturas, os dados poderiam ser usados para fazer uma análise de correlação entre esses contaminantes e a composição taxonômica da comunidade bacteriana e/ou genes de degradação presentes, identificando os principais bioindicadores. Essa abordagem pode ser usada para o monitoramento do passivo ambiental deixado pelo óleo pesado nos ecossistemas atingidos.

9. CONCLUSÃO

A caracterização da comunidade de bactérias cultiváveis associadas a amostras do óleo pesado que contaminou as praias de Amontada, Flexeiras e Fortim, no litoral cearense em 2019, levou a seleção de 24 isolados de bactérias, pertencentes aos filos, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes, compreendendo morfotipos de 14 gêneros distintos. As estirpes de *Acinetobacter* (AMO1502; AMO1501 e FLE1503), *Alcanivorax* (FOR1501 e FOR1506), *Pseudomonas* sp. (FOR1502), *Brucella* (FOR1503) e *Martelella* sp. (FOR1507), se destacaram pela capacidade de degradar pelo menos dois dos seis hidrocarbonetos testados (Hexadecano (C₁₆), Diesel (C₁₀-C₂₅), Querosene (C₁₀-C₁₆), Gasolina (C₄-C₁₂), Pireno (quatro anéis aromáticos) e Naftaleno (dois anéis aromáticos)). Os resultados das análises de biodegradação mostraram que as estirpes AMO1502; AMO1501 e FLE1503 (*Acinetobacter* sp.) são melhores degradadoras de alcanos, misturas de alcanos e aromáticos quando reunidas em consórcio, do que isoladamente. O consórcio formado pelas estirpes FOR1501 (*Alcanivorax* sp.) e FORT1507 (*Martelella* sp.) é um excelente candidato a ser explorado tecnologicamente para degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos. As estirpes AMO1502 (*Acinetobacter* sp.) FOR1501 (*Alcanivorax* sp.) foram as únicas a produzir emulsificantes, despontando como boas candidatas (>50% de emulsificação de mistura água-óleo) a serem exploradas para essa finalidade. A bacterioteca reunindo 24 morfotipos distintos, derivada desse trabalho, constitui o primeiro registro de procariotos cultiváveis associados ao óleo misterioso. Esse patrimônio genético guarda grande potencial biotecnológico e pode ser explorado para mitigar o passivo ambiental crônico provocado por esse desastre.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, F. et al. **A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press Inc., 24 jun. 2015.
- ABED, R. M. M.; AL-KINDI, S.; AL-KHARUSI, S. Diversity of Bacterial Communities Along a Petroleum Contamination Gradient in Desert Soils. *Microbial Ecology*, [s.i.], v. 69, n. 1, p. 95–105, 1 jan. 2015.
- ACER, Ö. et al. Evaluating degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) potential by indigenous bacteria isolated from highly contaminated riverbank sediments. *Environmental Earth Sciences*, v. 80, n. 23, 1 dez. 2021.
- ACOSTA-GONZÁLEZ, A.; MARQUÉS, S. Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 38, p. 24–32, abr. 2016.
- ALONSO-GUTIÉRREZ, J. et al. Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. H0B, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *Journal of Applied Microbiology*, v. 111, n. 4, p. 800–810, out. 2011.
- ARAÚJO, M. E. DE; RAMALHO, C. W. N.; MELO, P. W. DE. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 36, n. 1, 2020.
- AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 11, p. 180, 16 nov. 2016.
- BALSEIRO-ROMERO, M. et al. Characterization and degradation potential of diesel-degrading bacterial strains for application in bioremediation. *International Journal of Phytoremediation*, v. 19, n. 10, p. 955–963, 3 out. 2017.
- BARBATO, M. et al. Draft genome sequence of the hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* KS-293 isolated from surface seawater in the Eastern Mediterranean Sea. *Genome Announcements*, v. 3, n. 6, 2015.
- BAYAT, Z.; HASSANSHAHIAN, M.; HESNI, M. A. Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Macoma stultorum* collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, v. 105, n. 1, p. 120–124, 15 abr. 2016.
- BØDTKER, G. et al. Hydrocarbon degradation by *Dietzia* sp. A14101 isolated from an oil reservoir model column. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 96, n. 4, p. 459–469, nov. 2009.
- BÔTO, M. L. et al. Harnessing the Potential of Native Microbial Communities for Bioremediation of Oil Spills in the Iberian Peninsula NW Coast. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 23 abr. 2021.

BRZESZCZ, J.; KASZYCKI, P. **Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility.** **Biodegradation** Springer Netherlands, , 1 ago. 2018.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms 1. **Journal of Bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653–673, 1941.

CAI, Y. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons using acinetobacter sp. SCYY-5 isolated from contaminated oil sludge: Strategy and effectiveness study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2, p. 1–14, 2 jan. 2021.

CÂMARA, S. F. et al. Socioeconomic vulnerability of communities on the Brazilian coast to the largest oil spill (2019–2020) in tropical oceans. **Ocean & Coastal Management**, v. 202, p. 105506, mar. 2021.

CAPOTORTI, G. et al. Formation of sulfate conjugates metabolites in the degradation of phenanthrene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene by the ascomycete aspergillus terreus. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 25, n. 3, p. 197–213, jun. 2005.

CERNIGLIA, C. E. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Em: [s.l.: s.n.]. p. 31–71.

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. Em: **Fungi in Bioremediation**. Cambridge University Press, 2001. p. 136–187.

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. Em: **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 2079–2110.

CHAKRABORTY, R. et al. Microbial response to the MC-252 oil and Corexit 9500 in the Gulf of Mexico. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. OCT, p. 1–6, 2012.

CHEN, J. et al. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by Acinetobacter sp. from petroleum-contaminated soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 660–671, abr. 2012.

CHEN, X. et al. Insights from comparative proteomic analysis into degradation of phenanthrene and salt tolerance by the halophilic Martelella strain AD-3. **Ecotoxicology**, 2020.

CHEN, Y. et al. Simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized Acinetobacter venetianus on porous material. **Chemical Engineering Journal**, v. 289, p. 463–470, 1 abr. 2016.

CHIKERE, C. B.; TEKERE, M.; ADELEKE, R. Enhanced microbial hydrocarbon biodegradation as stimulated during field-scale landfarming of crude oil-impacted soil. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 14, 1 dez. 2019.

CUI, C. et al. Genome Sequence of *Marteella* sp. Strain AD-3, a Moderately Halophilic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, 27 fev. 2014.

CUI, H. et al. Spatial and temporal variation in enterococcal abundance and its relationship to the microbial community in hawaii beach sand and water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3601–3609, 2013.

DAGAUT, P.; CATHONNET, M. The ignition, oxidation, and combustion of kerosene: A review of experimental and kinetic modeling. **Progress in Energy and Combustion Science**, 2006.

DAI, X. et al. Heavy oil biodegradation by mixed bacterial consortium of biosurfactant-producing and heavy oil-degrading bacteria. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 30, n. 1, p. 71–80, 2020.

DELL'ANNO, F. et al. Microbiome enrichment from contaminated marine sediments unveils novel bacterial strains for petroleum hydrocarbon and heavy metal bioremediation. **Environmental Pollution**, v. 317, p. 120772, jan. 2023.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, mar. 1997.

DISNER, G. R.; TORRES, M. The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 7, n. 15, p. 241–255, 2020.

DONG, A. A Brief Note on Alkanes and its Applications. **Journal of Physical Chemistry & Biophysics**, v. 11, n. 4, 2021.

DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid and Interface*. **Science**. Elsevier Ltd, , 1 ago. 2020.

DU NÖUY, L. P. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, v. 521, p. 1922–1925, 1925.

DWIVEDI, A.; KUMAR, A.; BHAT, J. L. Production and Characterization of Biosurfactant from *Corynebacterium* Species and Its Effect on the Growth of Petroleum Degrading Bacteria. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 88, n. 1, p. 87–93, 1 jan. 2019.

ESCOBAR, H. Mystery oil spill threatens marine sanctuary in Brazil. **Science**, v. 366, n. 6466, p. 672, 2019.

FAKHRZADEGAN, I. et al. A study of crude oil-degrading bacteria from mangrove forests in the Persian Gulf. **Marine Ecology**, v. 40, n. 2, 29 abr. 2019.

FENG, T. -C. et al. Phenanthrene biodegradation by halophilic *Marteella* sp. AD-3. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 4, p. 779–789, out. 2012.

FORNEY' AND, F. W.; MARKOVETZ, A. J. Subterminal Oxidation of Aliphatic Hydrocarbons. **Journal of Bacteriology**, p. 281–282, 1970.

- FRIEDRICH, M. H. Microbial Communities, Structure, and Function. Em: REITNE, J.; THIEL, V. (Eds.). **Encyclopedia of Earth Sciences Series**. 2011. Springer, 2011. p. 558–563.
- FU, X. et al. Complete genome sequence of *Alcanivorax xenomutans* P40, an alkane-degrading bacterium isolated from deep seawater. **Marine Genomics**, v. 38, p. 1–4, abr. 2018.
- FUHRMAN, J. A. Microbial community structure and its functional implications. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 193–199, 2009.
- GALLEGO, S. et al. Community structure and PAH ring-hydroxylating dioxygenase genes of a marine pyrene-degrading microbial consortium. **Biodegradation**, v. 25, n. 4, p. 543–556, 2014.
- GANESAN, M. et al. Bioremediation by oil degrading marine bacteria: An overview of supplements and pathways in key processes. **Chemosphere**, v. 303, 1 set. 2022.
- GENG, P. et al. Interaction and spatio-taxonomic patterns of the soil microbiome around oil production wells impacted by petroleum hydrocarbons. **Environmental Pollution**, v. 307, 15 ago. 2022.
- GHARIBZAHEDI, S. M. T.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, M. Potential applications and emerging trends of species of the genus *Dietzia*: A review. **Annals of Microbiology**. Springer Heidelberg, , 2014.
- GOBET, A. et al. Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands. **ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 542–553, 2012.
- GREGSON, B. H. et al. Differential Protein Expression During Growth on Medium Versus Long-Chain Alkanes in the Obligate Marine Hydrocarbon-Degrading Bacterium *Thalassolituus oleivorans* MIL-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 29 mar. 2018.
- GURAV, R. et al. Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 12, p. 11392–11403, 1 abr. 2017.
- HANSON, K.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 1, p. 745–748, 1993.
- HAZEN, T. C. et al. Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 204–208, 8 out. 2010.
- HEAD, I. M.; JONES, D. M.; RÖLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 173–182, 2006.
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, E. L. et al. Detection of *Alcanivorax* spp., *Cycloclasticus* spp., and *Methanomicrobiales* in water column and sediment samples in the Gulf of Mexico by qPCR. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 34, p. 35131–35139, 1 dez. 2019.
- HOSOKAWA, R. et al. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1519–1528, 24 set. 2009.

HU, B. et al. Metabolic exchange with non-alkane-consuming pseudomonas stutzeri SLG510A3-8 improves n-alkane biodegradation by the alkane degrader dietzia sp. strain DQ12-45-1b. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 8, 1 abr. 2020.

HUA, F.; WANG, H. Q. Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**. Diagnosis Press Limited., , 2014.

IARC. International Agency for Research on Cancer - IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. p. 1–12, 2020.

IBAMA. Orientação Técnica : Vistoria De Acompanhamento E Limpeza Do Litoral. 2019.

IBAMA. Boletim | fauna | 12/02/2020 1. v. 3, 2020.

JAEKEL, U. et al. Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sediments. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 20 fev. 2015.

JAGTAP, C. B. et al. Genome sequence of an obligate hydrocarbonoclastic bacterium Alcanivorax marinus NMRL4 isolated from oil polluted seawater of the Arabian Sea. **Marine Genomics**, v. 60, 1 dez. 2021.

JI, Y. et al. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.

JIANG, Y.; QI, H.; ZHANG, X. M. Co-biodegradation of anthracene and naphthalene by the bacterium Acinetobacter johnsonii. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 53, n. 5, p. 448–456, 16 abr. 2018.

JIMÉNEZ, N. et al. Polyphasic approach for assessing changes in an autochthonous marine bacterial community in the presence of Prestige fuel oil and its biodegradation potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 823–834, ago. 2011.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology**. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jb>. Acesso em: 10 de jan. 2023.

KAPELLOS, G. E. Microbial Strategies for Oil Biodegradation. Em: **Modeling of Microscale Transport in Biological Processes**. Elsevier Inc., 2017. p. 19–39.

KASAI, Y. et al. Predominant growth of Alcanivorax strains in oil- contaminated and nutrient-supplemented sea water. v. 4, p. 141–147, 2002.

KASAI, Y.; KISHIRA, H.; HARAYAMA, S. Bacteria belonging to the genus Cycloclasticus play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5625–5633, 1 nov. 2002.

KIM, J. W. et al. Metagenomic analysis for evaluating change in bacterial diversity in tph-contaminated soil after soil remediation. **Toxics**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2021.

- KING, G. M. et al. Microbial responses to the deepwater Horizon Oil spill: From Coastal Wetlands to the Deep Sea. **Annual Review of Marine Science**, v. 7, n. September, p. 377–401, 2015.
- KOMA, D. et al. Biodegradation of Long-Chain n-Paraffins from Waste Oil of Car Engine by *Acinetobacter* sp. **Jornal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 94-96, 2000.
- KOSTKA, J. E. et al. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7962–7974, 2011.
- KOTANI, T. et al. Novel Acetone Metabolism in a Propane-Utilizing Bacterium, *Gordonia* sp. Strain TY-5. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 886–893, fev. 2007.
- KUBOTA, K. et al. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, v. 19, n. 5, p. 749–757, set. 2008.
- LAI, Q. et al. *Alcanivorax marinus* sp. nov., isolated from deep-sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 12, p. 4428–4432, dez. 2013.
- LAI, Q.; LI, W.; SHAO, Z. Complete genome sequence of *Alcanivorax dieselolei* type strain B5. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 6674-6674 dez. 2012.
- LAXMI, D.; GAYATHRI, C. Biodegradation of hydrocarbons by halophilic bacteria isolated from the salt pans of Thoothukudi district, India. **Novel Research in Microbiology Journal**, v. 3, n. 1, p. 252–257, 1 fev. 2019.
- LI, A.; SHAO, Z. Biochemical characterization of a haloalkane dehalogenase DadB from *alcanivorax dieselolei* B-5. **Plos One**, v. 9, n. 2, 28 fev. 2014.
- LI, J. et al. Autochthonous bioaugmentation with non-direct degraders: A new strategy to enhance wastewater bioremediation performance. **Environment International**, v. 136, p. 105473, mar. 2020.
- LI, L. et al. Crystal Structure of Long-Chain Alkane Monooxygenase (LadA) in Complex with Coenzyme FMN: Unveiling the Long-Chain Alkane Hydroxylase. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 2, p. 453–465, fev. 2008.
- LIMA, S. D. et al. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 354–361, 1 abr. 2020.
- LIN, J. et al. Biodegradation of tetradecane using *Acinetobacter venetianus* immobilized on bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 100, p. 76–82, 5 ago. 2015.
- LIU, J. et al. Enhanced degradation of different crude oils by defined engineered consortia of *Acinetobacter venetianus* RAG-1 mutants based on their alkane metabolism. **Bioresource Technology**, v. 327, 1 maio 2021.

- LOURENÇO, R. A. et al. Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. **Marine Pollution Bulletin**, v. 156, n. May, p. 111219, 2020.
- LUCKARIFT, H. R. et al. Biodegradation of medium chain hydrocarbons by *Acinetobacter venetianus* 2AW immobilized to hair-based adsorbent mats. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 6, p. 1580–1587, nov. 2011.
- MAHIDHARA, G.; CH, S.; CH, V. R. Comparative metabolomic studies of *Alkanivorax xenomutans* showing differential power output in a three chambered microbial fuel cell. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, 1 jun. 2017.
- MAHMOUDI, N. et al. Rapid degradation of deepwater horizon spilled oil by indigenous microbial communities in Louisiana saltmarsh sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 23, p. 13303–13312, 2013.
- MAO, N. et al. Crude oil degradation in oilfield produced water by immobilized microbes and oil recovery improvement after its reinjection. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 173, 1 set. 2022.
- MAPELLI, F. et al. Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 860–870, set. 2017.
- MARQUE, S.; ACOSTA-GONZA, A. Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 24–32, 2016.
- MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecol. Bras.** p. 188–201, 2007.
- MILLER, J. I. et al. Microbial communities across global marine basins show important compositional similarities by depth. **mBio**, v. 11, n. 4, p. 1–12, 2020.
- MISHRA, D. R. et al. Post-spill state of the marsh: Remote estimation of the ecological impact of the Gulf of Mexico oil spill on Louisiana Salt Marshes. **Remote Sensing of Environment**, v. 118, p. 176–185, 15 mar. 2012.
- MOHAPATRA, B.; PHALE, P. S. Microbial Degradation of Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. Frontiers Media S.A., , 9 mar. 2021.
- MOHIUDDIN, M. M. et al. Shotgun metagenomic sequencing reveals freshwater beach sands as reservoir of bacterial pathogens. **Water Research**, v. 115, p. 360–369, 2017.
- MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736–747, 2008.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Oil in the Sea III**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2003.

- NEETHU, C. S. et al. Oil-Spill Triggered Shift in Indigenous Microbial Structure and Functional Dynamics in Different Marine Environmental Matrices. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- NEU, T. R. Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 151–166, 1996.
- NEWTON, R. J. et al. Shifts in the Microbial Community Composition of Gulf Coast Beaches Following Beach Oiling. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. 1–13, 2013.
- NZILA, A. et al. Complete genome sequence of the polycyclic aromatic hydrocarbons biodegrading bacterium *Idiomarina piscisalsi* strain 10PY1A isolated from oil-contaminated soil. **Korean Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 289–292, 1 set. 2018a.
- NZILA, A. et al. Complete genome sequence of the polycyclic aromatic hydrocarbons biodegrading bacterium *Idiomarina piscisalsi* strain 10PY1A isolated from oil-contaminated soil. **Korean Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 289–292, 1 set. 2018b.
- NZILA, A. Current status of the degradation of aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons by thermophilic microbes and future perspectives. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 1 dez. 2018.
- OBI, L. U.; ATAGANA, H. I.; ADELEKE, R. A. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 1 dez. 2016.
- OHADI, M. et al. Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 1–9, 1 out. 2017.
- OHADI, M. et al. Antimicrobial, anti-biofilm, and anti-proliferative activities of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, 1 jan. 2020.
- OKOYE, A. U.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Isolation and Characterization of Hexadecane Degrading Bacteria from Oil- polluted soil in Gio Community, Niger Delta, Nigeria. **Scientific African**, v. 9, 1 set. 2020.
- OLIVEIRA, O. M. C. et al. Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, n. September, p. 111597, 2020.
- OMRANI, R. et al. Modulation of microbial consortia enriched from different polluted environments during petroleum biodegradation. **Biodegradation**, v. 29, 2018.
- OSSAI, I. C. et al. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. **Environmental Technology and Innovation**, v. 17, 2020.
- OTSUKA, P. **Saiba o que cada estado do NE está fazendo com óleo recolhido**. Disponível em: <https://noticias.r7.com/brasil/saiba-o-que-cada-estado-do-ne-esta-fazendo-com-oleo-recolhido-1112019>. Acesso em: 22 nov. 2021.

PEIXOTO, F. B. S. et al. Assessment of petroleum biodegradation for *Bacillus toyonensis* by the using redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 40, n. 1, 2018.

PENA, P. G. L. et al. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. **Cadernos de saude publica**, v. 36, n. 2, p. e00231019, 2020.

PIGGOT, A. M. et al. Relationship between enterococcal levels and sediment biofilms at recreational beaches in South Florida. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 5973–5982, 2012.

PODDAR, K.; SARKAR, D.; SARKAR, A. Construction of potential bacterial consortia for efficient hydrocarbon degradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 144, 1 out. 2019.

QIAO, N.; SHAO, Z. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 4, p. 1207–1216, abr. 2010.

QUINTELA, B. C. S. F. **Biotecnologia aplicada à recuperação avançada de petróleo: Potencial de biosurfactantes lipopeptídeos para injeção em reservatórios carbonáticos**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2018.

RABODONIRINA, S. et al. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 1–7, fev. 2019.

RAHMAN, K. S. M. et al. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 284–291, 2002.

RAHMATI, F. et al. A Review on Biotechnological Approaches Applied for Marine Hydrocarbon Spills Remediation. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1289, 25 jun. 2022.

REDDY, C. M. et al. Synergy of Analytical Approaches Enables a Robust Assessment of the Brazil Mystery Oil Spill. **Energy & Fuels**, 21 jul. 2022.

REDMOND, M. C.; VALENTINE, D. L. Natural gas and temperature structured a microbial community response to the Deepwater Horizon oil spill. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. 20292–20297, 11 dez. 2012.

RODRIGUES, E. M. et al. Hydrocarbonoclastic bacterial species growing on hexadecane: Implications for bioaugmentation in marine ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115579, dez. 2020a.

RODRIGUES, E. M. et al. Hydrocarbonoclastic bacterial species growing on hexadecane: Implications for bioaugmentation in marine ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 267, 1 dez. 2020b.

RODRÍGUEZ, A. et al. Omics Approaches to Pesticide Biodegradation. **Current Microbiology**. Springer. Acesso em: 1 abr. 2020.

RODRIGUEZ-R, L. M. et al. Microbial community successional patterns in beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. **The ISME Journal**, v. 9, n. 9, p. 1928–1940, 2015.

SAITOU, N.; NEI, M. **The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees**. Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/article/4/4/406/1029664>. Acesso em: 20 de out. de 2022.

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 243–248, jun. 2002.

SARKAR, S.; CHAKRABORTY, R. Quorum sensing in metal tolerance of *Acinetobacter junii* BB1A is associated with biofilm production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, n. 2, p. 160–165, maio 2008.

SATHISHKUMAR, M. et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 36, n. 1, p. 92–96, jan. 2008.

SAYYED, R. Z.; EL-ENSHASY, H. A.; HAMEEDA, B. **Microbial Surfactants: Volume I: Production and Applications**. CRC Press, 2021.

SHAN, X.; CORDERO, O. X. Deconstructing the association between abiotic factors and species assemblages in the global ocean microbiome. **bioRxiv**, p. 1–21, 2020.

SHARMA, P. et al. Omics approaches in bioremediation of environmental contaminants: An integrated approach for environmental safety and sustainability. **Environmental Research**, v. 211, 1 ago. 2022.

SINGH, H. **Mycoremediation: Fungal Bioremediation**. John Wiley & Sons ed. New Jersey: Wiley, 2006.

SINHA, R. K.; KRISHNAN, K. P.; KURIAN, P. J. Complete genome sequence and comparative genome analysis of *Alcanivorax* sp. IO_7, a marine alkane-degrading bacterium isolated from hydrothermally-influenced deep seawater of southwest Indian ridge. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 884–891, 1 jan. 2021.

SOARES, M. DE O. et al. Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, v. 115, n. February, 2020.

SUTTON, N. B. et al. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 619–630, jan. 2013.

TAO, K. et al. Response of soil bacterial community to bioaugmentation with a plant residue-immobilized bacterial consortium for crude oil removal. **Chemosphere**, v. 222, p. 831–838, maio 2019.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H. **Petroleum Formation and Occurrence**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1984.

UGOCHUKWU, U. C.; FIALIPS, C. I. Crude oil polycyclic aromatic hydrocarbons removal via clay-microbe-oil interactions: Effect of acid activated clay minerals. **Chemosphere**, v. 178, p. 65–72, jul. 2017.

URIBE-FLORES, M. M. et al. Bacterial succession and co-occurrence patterns of an enriched marine microbial community during light crude oil degradation in a batch reactor. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 2, p. 495–507, 1 ago. 2019.

VALENTIM, L. **Impacto do derramamento de petróleo na vida dos pescadores foi potencializado pela omissão do Poder Público e abordagem da grande mídia**. Disponível em: <https://tinyurl.com/46h8etxt> . Acesso em: 30 nov. 2021.

VAN BEILEN, J. B.; WUBBOLTS, M. G.; WITHOLT, B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. **Biodegradation**, v. 5, n. 3–4, p. 161–174, dez. 1994.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*. **Elsevier Ltd**, 1 jan. 2017.

VEERAPAGU, M. et al. Screening of hydrocarbon degrading bacteria isolated from oil contaminated soil. **The Pharma Innovation Journal**, v. 8, n. 6, p. 69–72, 2019.

WAKSMAN, S. A. Microbiological antagonism and antibiotic substances. New York, The Commonwealth fund, 1945.

WANG, W. et al. Synthesis of diesel and jet fuel range cycloalkanes with cyclopentanone and furfural. **Catalysts**, v. 9, n. 11, 1 nov. 2019.

WANG, W.; SHAO, Z. Genes involved in alkane degradation in the *alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 437–448, abr. 2012a.

WANG, W.; SHAO, Z. Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 523–533, jun. 2012b.

WANG, W.; SHAO, Z. The long-chain alkane metabolism network of *Alcanivorax dieselolei*. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

WANG, X. B. et al. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7755–7761, set. 2011.

WANG, X. X. et al. **Diversity of culturable hydrocarbons-degrading bacteria in petroleum-contaminated saltern**. Advanced Materials Research. **Anais...**Trans Tech Publications Ltd, 2014.

WANG, Y. et al. Halophilic *Marteella* sp. AD-3 enhanced phenanthrene degradation in a bioaugmented activated sludge system through syntrophic interaction. **Water Research**, v. 218, p. 118432, jun. 2022.

WANG, Z.; FINGAS, M. Differentiation of the source of spilled oil and monitoring of the oil weathering process using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 321-342, 1995.

- WARNER, S. A. J. Genomic DNA isolation and lambda library construction. **Plant Gene Isolation: Principles and Practice**, p. 51–53, 1996.
- WARR, L. N. et al. Nontronite-enhanced biodegradation of Deepwater Horizon crude oil by *Alcanivorax borkumensis*. **Applied Clay Science**, v. 158, p. 11–20, 15 jun. 2018.
- WHITMAN, R. L. et al. Microbes in beach sands: Integrating environment, ecology and public health. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, p. 329-368, 2014.
- XUE, J. et al. Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. **Current Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 220–228, 1 ago. 2015.
- YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Obligate oil-degrading marine bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 257–266, 2007.
- YANG, L. et al. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 227–233, 1 out. 2015.
- ZADJELOVIC, V. et al. Genome of *Alcanivorax* sp. 24: A hydrocarbon degrading bacterium isolated from marine plastic debris. **Marine Genomics**, v. 49, 1 fev. 2020.
- ZHANG, H. et al. A novel bioremediation strategy for petroleum hydrocarbon pollutants using salt tolerant *Corynebacterium variabile* HRJ4 and biochar. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 47, p. 7–13, 1 set. 2016.