



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

VITÓRIA RÉGIA GONÇALVES DE SOUSA

**PROSPECÇÃO NA COMUNIDADE BACTERIANA DEGRADADORA DE
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM SEDIMENTO MARINHO COSTEIRO
SUBMERSO NO LITORAL DO CEARÁ**

FORTALEZA

2024

VITÓRIA RÉGIA GONÇALVES DE SOUSA

PROSPECÇÃO NA COMUNIDADE BACTERIANA DEGRADADORA DE
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM SEDIMENTO MARINHO COSTEIRO
SUBMERSO NO LITORAL DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Ciência, Tecnologia e Gestão Costeira e Oceânica.

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientador: Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante.

FORTALEZA

2024

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)

S698p Sousa, Vitória Régia Gonçalves de.

PROSPECÇÃO NA COMUNIDADE BACTERIANA DEGRADADORA DE HIDROCARBONETOS DE
PETRÓLEO EM SEDIMENTO MARINHO COSTEIRO SUBMERSO NO LITORAL DO CEARÁ /

Vitória Régia Gonçalves de Sousa. – 2024.

84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientação: Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante.

1. petróleo . 2. contaminação. 3. bactérias hidrocarbonoclásticas. 4. degradação bacteriana. I. Título.

CDD 551.46

VITÓRIA RÉGIA GONÇALVES DE SOUSA

PROSPECÇÃO NA COMUNIDADE BACTERIANA DEGRADADORA DE
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM SEDIMENTO MARINHO COSTEIRO
SUBMERSO NO LITORAL DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Ciência, Tecnologia e Gestão Costeira e Oceânica.

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientador: Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante.

Aprovada em: 27/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Oscarina Viana de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Karla Maria Catter

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)

Dr. André Henrique Barbosa de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui e por colocar na minha vida pessoas maravilhosas com quem posso contar.

Aos meus amados pais, Lucileide Gonçalves e Luis Gonsaga, por todo o amor e suporte dado ao longo da minha jornada. Ao meu irmão, Vitor Bahia, pelo carinho e pela torcida. Aos meus primos, Fernando Alves e Jéssica Souza, por toda ajuda, momentos de escuta e descontração.

Aos meus amigos Álef Vasconcelos, Débora Carvalho, Eliziane Sena, Lucas Nobre e Régia Oliveira por seguirem comigo desde a graduação. Vocês são “meus feijões mágicos”!

Em especial, quero agradecer ao meu querido amigo Rafael Santos, por toda a ajuda ao longo da minha trajetória na UFC. Se teve uma pessoa que me ajudou em todos os meus pedidos de socorro e mais um pouco, foi ele. Obrigada, Rafael, você também é “meu feijão mágico”!

As minhas companheiras de mestrado, Régia Oliveira e Yasmin Girão pelo apoio e por todos os momentos que vivenciamos juntas ao longo desse caminho. Conseguimos!

A minha orientadora prof^a. Dr^a. Oscarina Viana por ter aceitado, mais uma vez, me orientar. Obrigada pelo carinho, pela paciência e pelas palavras de encorajamento e crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador prof. Dr. Rivelino Cavalcante por ter aceitado o convite de me orientar e disponibilizar o Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos (LACOr) em uma das etapas da minha pesquisa.

Aos membros da banca, Dr^a Karla Catter e Dr. André Oliveira por terem aceitado fazer parte desse momento e contribuir com meu trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) por toda a ajuda nos experimentos, pelas palavras de conforto, pelos momentos de descontração e por todo o auxílio ao longo do meu período de mestrado. Todos vocês, de alguma forma, fizeram parte deste trabalho.

Aos membros do LACOr, em especial, ao Rafael Santos, a Adriana Nascimento e a técnica de laboratório, Viviane Lemos, pelo suporte dado ao longo das análises.

Ao Laboratório de Oceanografia Geológica (LOG), em especial, a Jaqueline Aquino, técnica de laboratório, por ter sido tão gentil e solícita durante as análises.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por fomentar minha bolsa ao longo desse percurso.

A todos que me ajudaram de alguma forma a concluir essa etapa da minha vida. E a você, leitor, que está aqui por sua própria e espontânea vontade (espero), torço para que o conteúdo deste trabalho agregue algo em sua vida. Obrigada!

“Não é o que o mundo reserva para você, mas o que você traz para o mundo.”

Anne de Green Gables

RESUMO

Ambientes costeiros são rotineiramente impactados por atividades humanas e, em especial, ligados à indústria petroquímica. No Brasil, entre os eventos dramáticos registrados relacionados a derramamento de petróleo no mar, em 2019, consta o que foi considerado o mais grave desastre ambiental em águas tropicais que afetou principalmente a costa da região nordeste. O petróleo, além de outros compostos, é constituído por hidrocarbonetos que podem ser considerados poluentes que persistem no ambiente, que se acumulam em sedimento e solo, possuem baixa solubilidade, são hidrofóbicos e por terem essas características, são difíceis de serem biodegradados. Entretanto, existem microrganismos, como as bactérias hidrocarbonoclásticas, capazes de degradar os hidrocarbonetos de forma eficiente, sendo estudadas como potenciais agentes biorremediadores em áreas afetadas por derramamento de óleo. Considerando essa capacidade bacteriana, o objetivo geral desta pesquisa foi analisar a microbiota degradadora de hidrocarbonetos no sedimento marinho em áreas afetadas pelo derramamento de óleo de 2019 na costa cearense. A metodologia aplicada consistiu em coletar sedimento marinho submerso em áreas afetadas pelo derramamento de óleo de 2019 para o isolamento e cultivo de cepas bacterianas, seleção de estirpes com potencial de degradar hidrocarbonetos (teste do colapso da gota e antagonismo), teste de eficiência de consórcios livres bacterianos, inóculo de isolados bacterianos em microcosmos para acompanhamento da degradação do óleo por meio de cromatografia e identificação genotípica de bactérias hidrocarbonoclásticas isoladas do sedimento na costa cearense. Como resultado, 180 cepas foram isoladas, 26 consórcios foram montados e 4 foram aplicados no teste de eficiência. No teste de degradação de hidrocarbonetos, 2 consórcios foram utilizados e constatou-se uma diminuição da concentração de hidrocarbonetos alifáticos totais de 42% a 97% ao longo de 15 dias. Em contrapartida, também foi observado aumento da concentração de alcanos alifáticos de baixo peso molecular. Por meio de biologia molecular, foi possível constatar que os isolados utilizados nos consórcios fazem parte do grupo de bactérias hidrocarbonoclástica. Portanto, os consórcios livres bacterianos montados a partir da microbiota isolada de sedimento marinho impactado por petróleo foi capaz de degradar hidrocarbonetos alifáticos de petróleo e possuem um potencial de biorremediação de áreas impactadas por compostos hidrofóbicos.

Palavras-chave: petróleo; contaminação; bactérias hidrocarbonoclásticas; degradação bacteriana.

ABSTRACT

Coastal environments are routinely impacted by human activities and, in particular, those linked to the petrochemical industry. In Brazil, among the dramatic events recorded related to oil spills at sea in 2019, there was what was considered the most serious environmental disaster in tropical waters that mainly affected the coast of the northeast region. Petroleum, in addition to other compounds, is made up of hydrocarbons that can be considered pollutants that persist in the environment, which accumulate in sediments and soil, have low solubility, are hydrophobic and, because they have these characteristics, are difficult to biodegrade. However, there are microorganisms, such as hydrocarbonoclastic bacteria, capable of efficiently degrading hydrocarbons, being studied as potential bioremediation agents in areas affected by oil spills. Considering this bacterial capacity, the general objective of this research was to analyze the hydrocarbon-degrading microbiota in the marine sediment in areas affected by the 2019 oil spill on the coast of Ceará. The methodology applied consisted of collecting submerged marine sediment in areas affected by the 2019 oil spill for the isolation and cultivation of bacterial strains, selection of strains with the potential to degrade hydrocarbons (drop collapse and antagonism test), consortium efficiency test free bacteria, inoculum of bacterial isolates in microcosms to monitor oil degradation through chromatography and genotypic identification of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from the sediment on the coast of Ceará. As a result, 180 strains were isolated, 26 consortia were assembled and 4 were applied to the efficiency test. In the hydrocarbon degradation test, 2 consortia were used and a decrease in the concentration of total aliphatic hydrocarbons was found from 42% to 97% over 15 days. On the other hand, an increase in the concentration of low molecular weight aliphatic alkanes was also observed. Using molecular biology, it was possible to verify that the isolates used in the consortia are part of the hydrocarbonoclastic group of bacteria. Therefore, free bacterial consortia assembled from microbiota isolated from marine sediment impacted by oil were capable of degrading aliphatic petroleum hydrocarbons and have a potential for bioremediation of areas impacted by hydrophobic compounds.

Keywords: oil; contamination; hydrocarbonoclastic bacteria; bacterial degradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Acidentes envolvendo o petróleo em alguns lugares do mundo	12
Figura 2 - Composição do petróleo.....	13
Figura 3 - Distribuição de BHC0 no mundo	16
Figura 4 - Esquema representativo de uma célula bacteriana produtora de biossurfactante ...	17
Figura 5 - Representação do caminho de degradação de <i>n</i> -alcano pela bactéria <i>A. Borkumensis</i>	19
Figura 6 - Localização dos pontos de coleta de sedimento marinho nas praias de Icaraí de Amontada e Sabiaguaba, Ceará, Brasil.....	8
Figura 7 - Esquema do teste de antagonismo por estrias cruzadas (cross-streak)	10
Figura 8 - Composição dos microcosmos dos consórcios A.C e S.C	11
Figura 9 - Esquematização dos microcosmos para o teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo.....	12
Figura 10 - Etapa de extração líquido-líquido dos hidrocarbonetos presentes nos microcosmos	13
Figura 11 - Etapa de <i>clean up</i> das amostras de hidrocarbonetos extraídas.....	14
Figura 12 - Resultado do teste de antagonismo referente ao isolados bacterianos da Praia de Icaraí de Amontada.....	23
Figura 13 - Resultado do teste de antagonismo referente aos isolados bacterianos da Praia de Sabiaguaba	25
Figura 14 - Imagem de leitura do teste de antagonismo entre as bactérias potencialmente degradadoras de petróleo isoladas em praias na costa do Ceará afetados pelo derrame de petróleo de 2019.....	27
Figura 15 - Crescimento bacteriano dos consórcios montados com isolados na Praia de Icaraí de Amontada ao longo de seis dias inoculados em meio com querosene.....	30
Figura 16 - Crescimento bacteriano dos consórcios montados com isolados da Praia de Sabiaguaba ao longo de seis dias inoculados em meio com querosene.....	31
Figura 17 - Esquematização dos microcosmos para o teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo pelos consórcios A.C1 e S.C2.....	33
Figura 18 - Concentração de <i>n</i> -alcanos de alta massa molecular (C21 a C35) ao longo do tempo pelo consórcio A.C1 e pelo controle óleo	34

Figura 19 - Biodegradação de <i>n</i> -alcanos (C8-C40) ao longo do teste de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio A.C1	35
Figura 20 - Concentração de alcanos de alta massa molecular (AMM) e baixa massa molecular (BMM) ao longo do teste de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio A.C1	36
Figura 21 - Variação diária da concentração de <i>n</i> -alcanos ao longo de 15 dias pelo consórcio A.C1	37
Figura 22 - Concentração de <i>n</i> -alcanos de alta massa molecular (C23 a C39) ao longo do tempo pelo consórcio S.C2	38
Figura 23 - Biodegradação de <i>n</i> -alcanos (C8-C40) ao longo do teste de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio S.C2	39
Figura 24 - Concentração de alcanos de alta massa molecular (AMM) e baixa massa molecular (BMM) ao longo do teste de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio S.C2	39
Figura 25 - Variação diária da concentração de <i>n</i> -alcanos ao longo do tempo pelo consórcio S.C2.....	40
Figura 26 - Quantidade do material sólido (mistura óleo/sedimento) presente nos microcosmos após filtragem na etapa de extração dos hidrocarbonetos referentes aos consórcios A.C1 e S.C2	42
Figura 27 - Produto da amplificação por PCR de cepas bacterianas utilizadas no teste de eficiência e no teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem padrão em placa dos isolados bacterianos da Praia de Icaraí de Amontada e Praia de Sabiaguaba e granulometria do sedimento marinho.....	17
Tabela 2 - Resultado da coloração de Gram dos isolados bacterianos da Praia de Icaraí de Amontada e Praia de Sabiaguaba.....	19
Tabela 3 - Resultados do teste do colapso da gota dos isolados bacterianos das Praias de Icaraí de Amontada e Praia de Sabiaguaba.....	20
Tabela 4 - Características dos consórcios montados a partir de isolados bacterianos das praias de Icaraí de Amontada e Sabiaguaba	28
Tabela 5 - Características dos consórcios escolhidos das praias de Icaraí de Amontada e Sabiaguaba para o teste de eficiência.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACL	Comprimento Médio da Cadeia
AMM	Alta Massa Molecular
BHCb	Bactérias Hidrocarbonoclásticas
BMM	Baixa Massa Molecular
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
CPP	Contagem Padrão em Placa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTp	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Dr.	Doutor
Dr. ^a .	Doutora
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
GC-FID	Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização por Chama
H ₂ O	Água
HA	Hidrocarboneto Alifático
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IPC	Índice de Preferência de Carbono
LACOR	Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar

LOG	Laboratório de Oceanografia Geológica
LB	Luria Bertani
O	Oeste
PCA	Ágar para Contagem em Placa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Prof.	Professor
Prof ^ª .	Professora
RNA	Ácido Ribonucleico
S	Sul
UCM	Mistura Complexa Não Resolvida
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNEP	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
UOL	Universo Online
THAs	Hidrocarbonetos Alifáticos Totais

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
g	Gramma
h	Hora
km	Quilômetro
mL	Mililitro
m ³	Metro cúbico
<i>p</i>	Nível de significância
pb	Pares de base
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotação por minuto
V/cm ³	Volt/centímetro cúbico
β	Beta
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
%	Porcentagem
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. Geral	10
2.2. Específicos	10
3. REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1. O ambiente marinho e o “mar negro”	11
3.2. Hidrocarbonetos de petróleo	13
3.3. Bactérias Hidrocarbonoclásticas Obrigatórias (BHCO)	15
3.4. Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e os biossurfactantes	16
3.5. Rotas de degradação de hidrocarbonetos por bactérias	18
4. DESENHO METODOLÓGICO	20
4.1. Amostragem de sedimento marinho	20
4.2. Processamento das amostras	8
4.3. Estratégia de cultivo e isolamento de bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo	8
4.3.1. <i>Cultivo dos microrganismos</i>	8
4.3.2. <i>Isolamento e identificação morfológica</i>	8
4.4. Estratégias de seleção de bactérias com potencial de degradar hidrocarbonetos de petróleo	9
4.4.1. <i>Teste do colapso da gota</i>	9
4.4.2. <i>Teste de antagonismo pelo método de estrias cruzadas (cross-streak)</i>	9
4.5. Seleção dos consórcios bacterianos e teste de eficiência	10
4.6. Avaliação da competência dos consórcios na degradação de hidrocarbonetos de petróleo (teste de degradação)	11
4.6.1. <i>Seleção de consórcios e montagem do microcosmo</i>	11
4.6.2. <i>Extração e clean up dos hidrocarbonetos de petróleo dos microcosmos</i>	12
4.7. Extração do material genético dos consórcios bacterianos	14
4.7.1. <i>Extração do DNA total</i>	14
4.7.2. <i>Amplificação do produto da extração</i>	15
4.8. Análise granulométrica do sedimento marinho	16
4.9. Análise estatística	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1. Abundância bacteriana e granulometria do sedimento	17

5.2.	Características morfológicas das colônias isoladas	19
5.3.	Teste do colapso da gota	20
5.4.	Teste de antagonismo e montagem dos consórcios.....	22
5.5.	Teste de eficiência.....	29
5.6.	Teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo	32
5.7.	Detecção de gene precursor de enzimas relacionadas à degradação de hidrocarbonetos de petróleo	43
6.	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A.....	59
	APÊNDICE B	60

1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho, com ênfase nas regiões costeiras, exerce uma grande influência nas mais diversas atividades humanas. O Brasil, um país de dimensões continentais, possui um vasto litoral altamente explorado pelo homem e, com isso, muito suscetível aos mais diversos impactos tanto de atividades exercidas no continente quanto exercidas em mar aberto.

Em agosto de 2019, esse vasto litoral passou por um grande desastre ambiental considerado o mais severo, dado a sua extensão e impactos, ocorrido em águas costeiras tropicais (Soares *et al.*, 2020a). Manchas de óleo começaram a surgir no litoral do estado da Paraíba atingindo todo o litoral nordestino nos meses seguintes e também os litorais dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro (IBAMA, 2020a). O óleo atingiu mais de 1000 localidades ao longo da zona costeira brasileira até janeiro de 2020 (IBAMA, 2020a) causando prejuízos aos ecossistemas costeiros e marinhos.

Diversas hipóteses foram levantadas pelos órgãos governamentais competentes e em 2021 a Polícia Federal brasileira chegou a concluir que um navio petroleiro de bandeira grega havia sido o responsável (Soares *et al.*, 2022). Entretanto, a insuficiência de provas e contradições levantadas por um grupo investigativo acerca desse ocorrido, sugerem que o indiciamento dado pela Polícia Federal não se sustenta (Uol, 2023). Em 2022, também de origem desconhecida até o presente momento (2023), novas manchas de óleo voltaram a surgir no litoral nordestino.

Ferramentas ligadas à ciência do petróleo ou Petroleômica, têm sido úteis para se conhecer a origem desses compostos e monitorá-los na natureza em casos de derramamentos, entre outras aplicações. Por exemplo, foi a partir dessas ferramentas que se constatou que as amostras de óleo coletadas em 2019 e 2022 são de origem diferentes e possuem características distintas (Azevedo *et al.*, 2022).

Por sua vez, o petróleo ou óleo cru é uma complexa mistura orgânica que tem como um dos principais componentes os hidrocarbonetos (90% a 95% da constituição do petróleo) representados pelas classes químicas de hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, além de uma parcela de compostos orgânicos voláteis (COVs) (Cavalcante *et al.*, 2023). Quando dispostos no ambiente, os hidrocarbonetos de petróleo podem impactar de forma negativa os ecossistemas e trazer danos para os organismos que ali vivem e aos próprios seres humanos (Kuppusamy *et al.*, 2019).

Os hidrocarbonetos presentes no óleo cru são poluentes orgânicos persistentes, com baixa solubilidade, elevada hidrofobicidade que se acumulam no solo e no sedimento (Hidalgo *et al.*, 2020). As características físico-químicas desses compostos influenciam na sua biodegradação que tende a seguir a ordem: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > alcanos cíclicos > aromáticos de alto peso molecular (van Hamme; Singh; Ward *et al.*, 2003). Sendo a classe dos hidrocarbonetos alifáticos ou alcanos mais fáceis de serem degradados do que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA).

Apesar da degradação desses compostos hidrofóbicos ser difícil, existe um grupo de bactérias com capacidade quase que exclusiva de usá-los como fonte de carbono e energia. As bactérias hidrocarbonoclásticas (BHCb) têm sido investigadas e identificadas ao longo do tempo e, na sua grande maioria engloba os gêneros *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptumonas*, *Oleiphilus*, *Oleispira* e *Thalassolituus* (Mahjoubi *et al.*, 2021; Berry; Gutiérrez, 2017).

A variedade de hidrocarbonetos e sua baixa disponibilidade influenciou uma evolução de vias bioquímicas das bactérias e estas podem utilizar diversas rotas metabólicas no processo de degradação (Brzeszcz; Kaszycki, 2018). Além disso, elas são capazes de produzir metabólitos que auxiliam a aderência da célula bacteriana no substrato ou disponibilizam compostos orgânicos para a bactéria. Os biosurfactantes são metabólitos produzidos por esses microrganismos capazes de aumentar a solubilidade de moléculas hidrofóbicas, reduzir a tensão superficial ou interfacial de líquidos, emulsionar e dispersar misturas por sua natureza anfipática (Santos *et al.*, 2016) facilitando a biodegradação dos hidrocarbonetos no ambiente.

Tendo em vista os impactos que os hidrocarbonetos do petróleo exercem no meio ambiente e a capacidade de degradação por um grupo de microrganismos especializados na utilização desses compostos, este trabalho propõe verificar a eficiência de degradação de hidrocarbonetos de petróleo por isolados bacterianos oriundos de áreas do litoral do Ceará, Brasil atingidas pelo derramamento de óleo de 2019.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a microbiota degradadora de hidrocarbonetos no sedimento marinho em áreas afetadas pelo derramamento de óleo de 2019 na costa cearense.

2.2. Específicos

- Isolar as bactérias capazes de degradar os componentes do petróleo a partir do sedimento marinho;
- Detectar genotipicamente bactérias pertencentes ao grupo hidrocarbonoclástica entre os isolados;
- Detectar a capacidade de produção de biosurfactante pelas cepas isoladas;
- Estabelecer as interações ecológicas bacterianas individuais através de teste de antagonismo;
- Montar consórcios bacterianos formados a partir dos isolados;
- Testar *in vitro* a eficiência da degradação de hidrocarbonetos de petróleo por consórcios bacterianos por meio de análise cromatográfica (GC-FID) por um período de 15 dias.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. O ambiente marinho e o “mar negro”

A indústria petrolífera tem sido a principal fonte de extração de combustíveis fósseis, dada a dependência do homem por esse recurso natural não renovável ao longo do tempo. Por ser uma atividade complexa, acidentes envolvendo os ecossistemas marinhos e o petróleo podem acontecer, mesmo com legislações mais rígidas em relação aos padrões de extração, estruturas de plataformas e navios petroleiros, por exemplo, o risco ainda é presente.

O emblemático acidente envolvendo o navio petroleiro Exxon Valdez em 1989 despertou ainda mais a necessidade de se compreender os impactos causados pelos hidrocarbonetos de petróleo em ambientes marinhos. Após encalhar em uma região com poucos impactos antropogênicos, ao menos 40,8 milhões de litros de petróleo bruto vazaram do navio por 2,5 dias em uma área de 738 km da costa de Prince William Sound, Alasca, até uma tempestade deslocar esse óleo para mais 2 100 km de costa da Península do Alasca (Barron *et al.*, 2020) aumentando a área contaminada e causando mais efeitos adversos ao ambiente.

Considerado o maior desastre da indústria petrolífera, o derramamento de óleo da plataforma Deepwater Horizon no Golfo do México, Estados Unidos em 2010 expôs o ambiente marinho a mais de 5 milhões de barris de óleo por cerca de 85 dias após a explosão da plataforma. Uma área de 572 milhas da costa ficou encoberta por manchas de óleo. No acidente, 11 colaboradores e milhares de organismos marinhos perderam suas vidas (Barron *et al.*, 2020).

Ainda no Golfo do México, agora na Baía de Campeche, em 1979, após o colapso de um poço, cerca de 3,4 milhões de barris de petróleo fluíram para o oceano por cerca de 9 meses, atingindo uma área de 1.100 milhas² (Soto *et al.*, 2014). Nesse mesmo ano, na costa de Tobago, no Mar do Caribe, dois navios-tanque colidiram após uma tempestade tropical. Relata-se que 88,3 milhões de galões de petróleo foram derramados no mar.

Figura 1 - Acidentes envolvendo o petróleo em alguns lugares do mundo



Fonte: Google Imagens.

Infelizmente, o ambiente marinho não está sujeito apenas a derramamentos acidentais de petróleo. Em 1991, durante a guerra do Golfo, oleodutos e válvulas de poços de petróleo foram abertos por soldados iraquianos, derramando no Golfo Pérsico cerca de 240 milhões de galões de petróleo, dizimando centenas de animais marinhos (Pashaeri *et al.*, 2015). Em 2019, manchas de óleo surgem de forma misteriosa na costa brasileira, atingindo 11 estados, alcançando uma extensão de aproximadamente 3.000 km da costa e mais de 50 unidades de conservação. Um estudo estimou que um volume entre 5 mil e 12 mil m³ de óleo possam ter sido derramados neste, no que foi considerado, o mais severo desastre ambiental em águas tropicais dado a sua extensão (Zacharias; Gama; Fornaro, 2021).

Em 2022, novas manchas voltaram a surgir no litoral do Ceará, nordeste do Brasil. Cerca de 11,6 m³ de óleo atingiram uma área de 342 km entre os litorais leste e oeste cearense (Soares *et al.*, 2023). Até o momento, a origem desse óleo é desconhecida, mas sabe-se que se trata de um material diferente do encontrado em 2019 (Azevedo *et al.*, 2022).

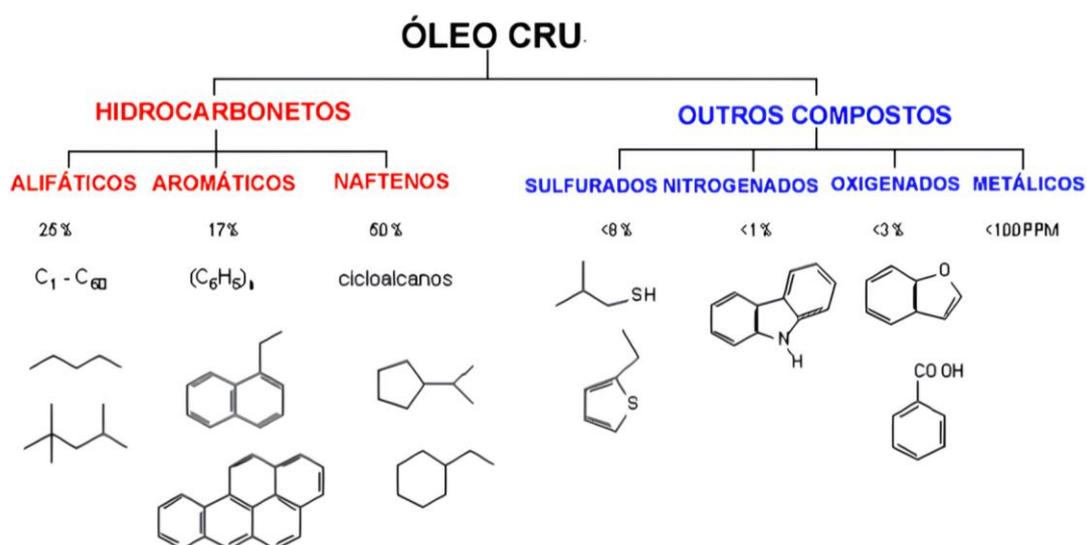
Em todos esses casos, milhões de volume de petróleo chegaram em águas oceânicas dizimando milhares de organismos e, conseqüentemente, mudando a dinâmica daquele ecossistema. Além disso, outras matrizes ambientais também foram afetadas pela presença de óleo cru, não limitando a contaminação às águas marinhas e aos organismos que vivem nela.

3.2. Hidrocarbonetos de petróleo

Conhecida como “a ciência do petróleo”, a Petroleômica se utiliza de ferramentas analíticas como a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa para compreender a composição do petróleo (Prince; Walter, 2021). Com isso, é possível conhecer a origem e destino do petróleo na natureza em derramamentos, por exemplo, avaliar a qualidade ambiental dos ecossistemas marinhos, aquáticos e terrestres e, mesmo desenvolver técnicas para melhor aproveitá-lo, uma vez que o ser humano ainda é tão dependente dele (Azevedo *et al.*, 2022).

O petróleo ou óleo cru é uma complexa mistura de hidrocarbonetos, heteroátomos e isômeros distintos (Heshka, 2021) e a concentração de hidrocarbonetos no óleo pode classificá-lo em: óleo leve, que geralmente apresenta uma maior concentração de hidrocarbonetos alifáticos e, óleo pesado, constituídos principalmente por hidrocarbonetos aromáticos (Cavalcante *et al.*, 2023). Os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos são os mais abundantes e também os mais investigados na identificação de fontes de hidrocarbonetos no ambiente e em avaliações de impactos ambientais, junto com os biomarcadores de petróleo (Fernandes *et al.*, 2022).

Figura 2 - Composição média do petróleo ou óleo cru



Fonte: Dickneider (2024).

Os hidrocarbonetos alifáticos (AH) ou saturados que compõem o óleo cru podem ser subdivididos em: lineares, ramificados e naftalenos. Eles possuem cadeias de carbono de C₆ a C₄₀ e podem ser indicadores de fonte antropogênica e naturais de hidrocarbonetos em sedimento marinho, podendo permanecer por um longo período de tempo no ambiente e serem tóxicos em altas concentrações (Jafarabadi *et al.*, 2019). Podem ser mensurados em: alcanos resolvidos, misturas complexas não resolvidas (UCM) ou hidrocarbonetos alifáticos totais (THAs) (Azevedo *et al.*, 2022).

Nos alcanos resolvidos, os *n*-alcanos são compostos de cadeia aberta e que constituem uma série homóloga sem ramificação e podem estar presentes no ambiente de forma natural através de microrganismos como bactérias e fitoplâncton, plantas superiores e ressurgência natural do petróleo, assim como podem ser encontradas de forma não natural como em derramamentos de petróleo (Gao *et al.*, 2021). Além disso, *n*-alcanos de baixa massa molecular (BMM) ($\leq n\text{-C}_{20}$) tendem a serem degradados mais rapidamente do que os *n*-alcanos de alta massa molecular (AMM) ($\geq n\text{-C}_{21}$). Existem também os alcanos isoprenóides, de cadeias abertas e ramificadas, precursores de pristano e fitano. Esses hidrocarbonetos são mais resistentes à degradação do que os *n*-alcanos e que podem ser usados como indicadores da contaminação por petróleo (Gadelha *et al.*, 2019). Quanto às misturas complexas não resolvidas (UCM), constituídas por hidrocarbonetos de cadeia aberta, embora não possam ser resolvidas por cromatografias unidimensionais, as UCMs surgem como um aumento das linhas de base, indicando assim a contaminação por óleo (Gao *et al.*, 2021; García-Bautista *et al.*, 2021).

Os hidrocarbonetos aromáticos possuem estruturas condensadas e insaturadas, anéis insaturados adicionais e grupo alquila (Prince; Walters, 2022). Os também conhecidos como HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), possuem dois ou mais anéis aromáticos e podem estar dispostos na natureza através de fontes naturais (atividade vulcânica, incêndios e infiltrações naturais) ou antropogênicas. Esta última se divide em processos pirolíticos (queima incompleta de matéria orgânica) e petrogênicos (petróleo e seus derivados) (Nelson *et al.*, 2016).

Além das classes dos alifáticos e aromáticos, existem outras classes como, hopanos, esteranos, sesquiterpanos e diamantóides que são utilizados como biomarcadores de petróleo em investigações forenses ambientais (Bulbul *et al.*, 2022). Usando técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massa é possível descobrir a origem do petróleo e o estado de intemperismo desse material (Chen *et al.*, 2018).

A identificação de fontes e padrões de distribuição temporal e espacial de hidrocarbonetos no ambiente também tem sido possível através de razões e índices de diagnóstico como: razão Pristano/Fitano (Pri/Phy), razão Terrígena/Aquática (TAR), índice de preferência de carbono (IPC), comprimento médio da cadeia (ACL) e HPAs de baixo peso molecular/alto peso molecular (LMW/HMW) (Azevedo *et al.*, 2022; Araújo *et al.*, 2020; Gadelha *et al.*, 2019). Tais ferramentas têm sido cruciais na compreensão dos impactos dos hidrocarbonetos de petróleo e no auxílio na tomada de decisões frente aos acidentes ou incidentes envolvendo esses compostos.

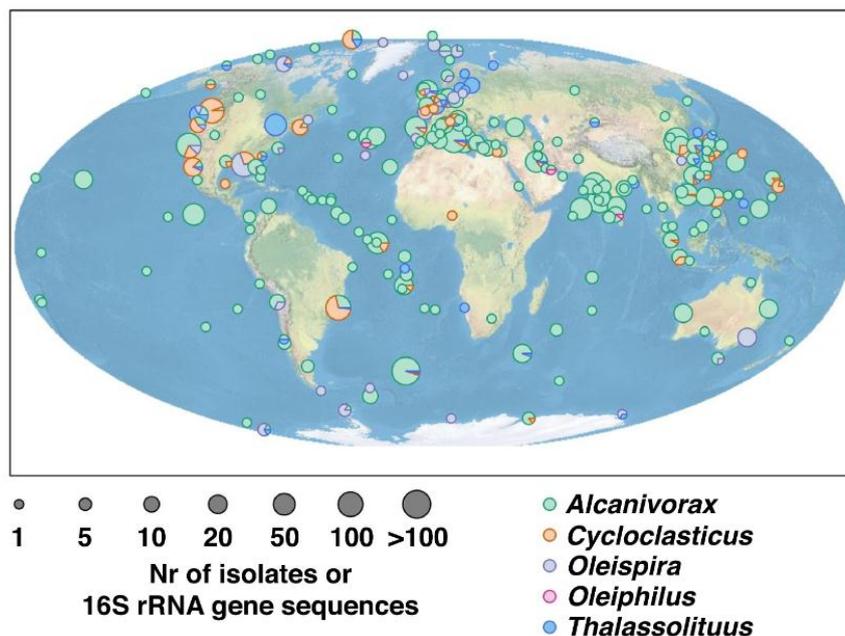
3.3. Bactérias Hidrocarbonoclásticas Obrigatórias (BHCO)

Embora os ecossistemas marinhos sejam negativamente impactados pelo petróleo e seus derivados em decorrência de atividades cotidianas ou acidentes, forçando a adaptação dos organismos que ali vivem, existem um grupo de microrganismos que ocorre de forma natural e que são especialistas em degradar o principal constituinte desses poluentes. Esse grupo é o das Bactérias Hidrocarbonoclásticas Obrigatórias (BHCO).

As BHCO vem sendo descritas e se tornando um pouco mais conhecidas ao longo dos anos, principalmente, após os inúmeros acidentes envolvendo derramamentos de óleo no ambiente marinho. Essas bactérias são capazes de utilizar, quase que de forma exclusiva, hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, exercendo um importante papel ecológico para a biodegradação desses poluentes do ambiente (Yakimov; Bargiela; Golyshin, 2022).

A maioria das BHCO podem ser encontradas na classe Gammaproteobacteria e inclui tanto os gêneros de hidrocarbonoclásticas obrigatórias (*Alcanivorax*, *Thalassolituus*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Cycloclasticus* e *Marinobacter*) quanto as não obrigatórias (*Pseudomonas*) (Mahjoubi *et al.*, 2021). As bactérias do gênero *Alcanivorax* e *Cycloclasticus*, por exemplo, são especialistas em utilizar os hidrocarbonetos do petróleo como fonte limitada de carbono e podem vir a ser indicadores de contaminação por este composto no ambiente (Harayama; Kasai; Hara, 2004). As do gênero *Pseudomonas*, por sua vez, podem ser capazes de utilizar tanto os hidrocarbonetos alifáticos quanto os aromáticos, diferente de outros gêneros que são capazes de utilizar apenas um dos dois na degradação (Whyte; Bourbonniere; Greer, 1997).

Figura 3 - Distribuição de BHCO no mundo



Fonte: Yakimov, Bargiela, Golyshin (2022).

Além dos gêneros já citados, é possível encontrar as hidrocarbonoclasticas no gênero *Planomicrobium* e espécie *Planococcus alkanoclasticus* (Engelhardt; Daly; Swannel, 2001) *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1 (Rodrigues *et al.*, 2020), espécies *Bacillus flexus*, *B. metilotrophyus*, *B. aquimares* *B. horikoshii* e *B. thioparans* dentro do gênero *Bacillus* (Syakti *et al.* 2019)

As BHCO estão presentes em todas as regiões do globo e, diferente do que se possa imaginar, essas bactérias não são encontradas apenas em lugares com a presença de hidrocarbonetos de petróleo. BHCO foram encontradas em amostras de água e sedimento coletados em regiões remotas do Ártico e da Antártica. A existência das hidrocarbonoclasticas em ambientes, teoricamente, não contaminados pode ter como fonte microalgas, cianobactérias e fitoplâncton (Gutierrez, 2019).

3.4. Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e os biossurfactantes

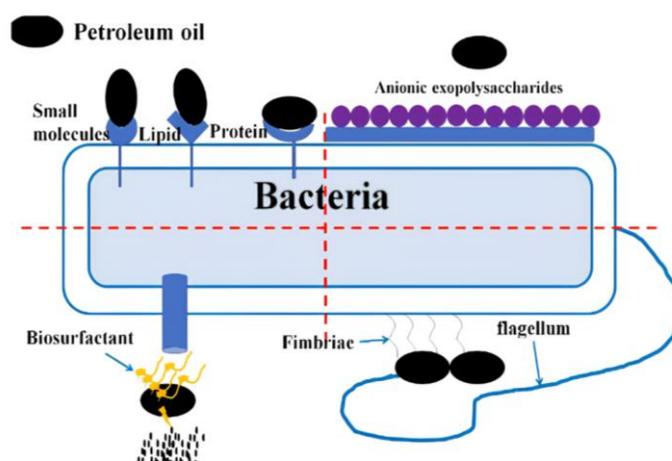
Surfactantes são compostos químicos que possuem em sua estrutura porções hidrofílicas e hidrofóbicas, conferindo-os a capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais entre as interfaces óleo/água e ar/água criando microemulsões e, assim,

facilitando a solubilização de compostos hidrofóbicos em água e vice-versa (Sarubbo *et al.*, 2022; Farias *et al.*, 2021). Podem ser obtidos através da indústria petroquímica (surfactantes sintéticos), matéria-prima vegetal ou animal e processos biológicos (biocatálise ou fermentação).

No processo de degradação, subprodutos podem ser formados e, no caso das bactérias que degradam os hidrocarbonetos, o biossurfactante é o produto metabólico mais associado a esse processo e descrito em vários trabalhos (Pourfadakari *et al.*, 2021; Xiu *et al.*, 2020). Xu *et al.* (2020) caracterizaram a bactéria marinha *Paracoccus* sp. MJ9 como produtora de biossurfactante ao degradar até 80% de óleo diesel presente em sistemas contaminados por óleo. Pourfadakari *et al.* (2021) aplicaram o biossurfactante produzido pela cepa *Pseudomonas aeruginosa* (AHV-KH10) em um experimento com sedimento contaminado com óleo diesel.

Esses subprodutos possuem as mesmas propriedades dos surfactantes sintéticos e, portanto, podem facilitar o processo de disponibilização e degradação dos hidrocarbonetos, além de possuírem um viés biotecnológico. O biossurfactante produzido pela cepa *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 é utilizado na recuperação microbiana aprimorada em reservatórios de petróleo (Mujumdar *et al.*, 2019). Ramnolipídeos (um tipo de biossurfactante) produzidos por espécies de *Pseudomonas* também podem ser usados em reservatórios de petróleo e na biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos (Liu *et al.*, 2018; Amani, 2015).

Figura 4 - Esquema representativo de uma célula bacteriana produtora de biossurfactante



Fonte: Xu *et al.* (2018).

Muitos são os trabalhos que relatam a produção de diversos tipos de biossurfactantes por cepas bacterianas. Hentati *et al.* (2021) investigaram a degradação de hidrocarbonetos nas condições de alta salinidade pela bactéria *Staphylococcus pasteurii*, uma bactéria marinha halotolerante, e constataram a produção de lipopeptídicos. Altas salinidades podem dificultar a degradação de hidrocarbonetos (Truskewycz *et al.*, 2019), portanto, a prospecção de bactérias halotolerantes pode vir a ser uma alternativa para a biorremediação de ambientes impactados por esses compostos hidrofóbicos.

Guo *et al.* (2022) isolaram e caracterizaram a cepa *Planococcus* sp. XW-1 de ambiente marinho de águas frias. A cepa foi capaz de utilizar o petróleo como única fonte de carbono a 4°C e produzir biossurfactante do tipo glicolipídeo. Wu *et al.* (2019) identificaram cepas do gênero *Planomicrobium* sp., *Aneurinibacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. como produtoras de biossurfactantes, sendo *Aneurinibacillus* sp. a que melhor produziu lipopeptídicos. Em outro estudo, os pesquisadores identificaram a produção de monorhamnolipídio e dirhamnolipídio pelas cepas *Bacillus algicola*, *Rhodococcus soli*, *Isoptericola chiayiensis* e *Pseudoalteromonas agarivorans* isoladas a partir de uma área com histórico de derramamento de petróleo (Lee *et al.*, 2018).

3.5. Rotas de degradação de hidrocarbonetos por bactérias

Ao degradar os hidrocarbonetos de petróleo para obter carbono e energia, os microrganismos podem utilizar esses compostos de três formas: (1) fototrófica, anoxigênica; (2) quimiotrófica, aeróbia e (3) quimiotrófica, anaeróbia (Ganesan *et al.*, 2022). Esse processo é impulsionado pela presença de várias enzimas (citocromo P450, peroxidases, lacases e oxigenases) (Kadri *et al.*, 2017; Fuchs *et al.*, 2011). Na degradação aeróbia, os hidrocarbonetos de petróleo podem ser degradados por várias vias de oxidação (terminal, subterminal, β -oxidação) (Abassian *et al.*, 2015). Outros mecanismos também estão envolvidos nesse processo como, a fixação das células aos substratos e a produção de biossurfactantes, bioemulsificantes, biopolímeros, solventes, gases e ácidos (Varjani, 2017). Além disso, os hidrocarbonetos podem ser degradados por microrganismos especializados ou por consórcios (Varjani *et al.*, 2015).

No início da degradação do hidrocarboneto, o alcano é degradado através da oxidação do grupo metil, resultando na formação de um álcool que se torna ácido carboxílico por meio de desidrogenação do aldeído e finalmente metabolizado por β -oxidação de ácidos

4. DESENHO METODOLÓGICO

4.1. Amostragem de sedimento marinho

Amostras de sedimento marinho submerso (submerso a aproximadamente 15 cm) foram coletadas em três pontos em cada praia analisada (Icaraí de Amontada e Sabiaguaba), localizadas nos litorais leste e oeste da costa do Ceará, Brasil. Ambas foram atingidas pelas manchas de óleo em 2019 e tiveram um maior número de localidades (área de 1 km ao longo da costa) afetadas em relação as demais praias cearenses (IBAMA, 2020b).

Os pontos foram escolhidos com a finalidade de contemplar uma maior área atingida pelo óleo em ambas as praias e as coordenadas desses pontos estão dispostas no quadro 1.

Quadro 1 – Coordenadas dos pontos de coleta de sedimento marinho nas praias de Icaraí de Amontada e Sabiaguaba

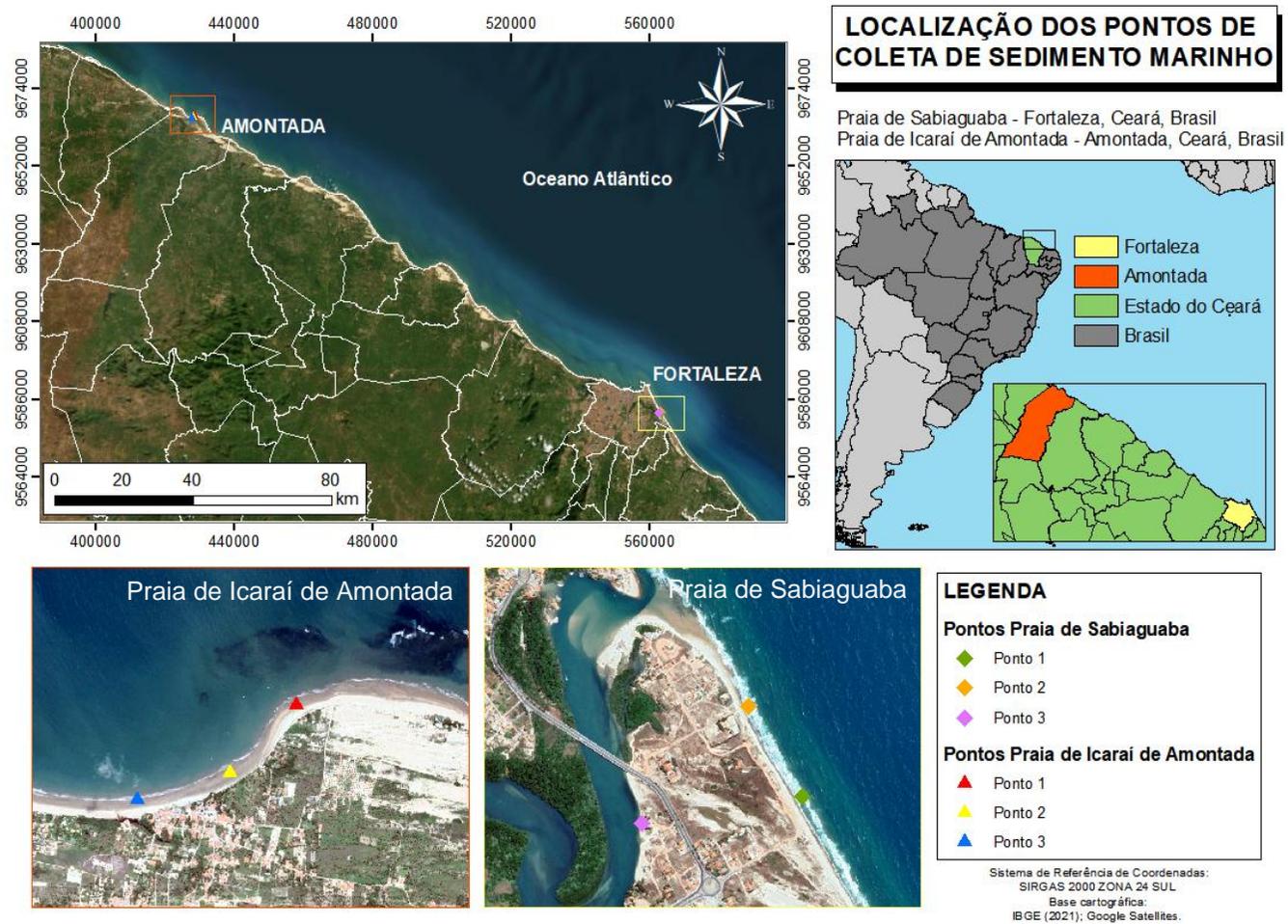
	Praia de Icaraí de Amontada	Praia de Sabiaguaba
Ponto 1	3°1'12" S 39°38'35" O	3°46'37" S 38°25'50" O
Ponto 2	3°1'22" S 39°38'45" O	3°46'27" S 38°25'56" O
Ponto 3	3°1'26" S 39°38'59" O	3°46'40" S 38°26'8" O

Fonte: elaborada pela autora (2024).

As amostras foram coletadas em setembro de 2022 na Praia de Icaraí de Amontada (maré baixa-mar) e em dezembro de 2022 na Praia de Sabiaguaba (maré baixa-mar). Nesse período, manchas de óleo voltaram a surgir no litoral cearense, contudo das áreas amostradas nesta pesquisa, somente na Praia de Sabiaguaba foram detectadas manchas nesse segundo evento (Soares *et al.*, 2023).

A figura 6 traz o mapa da localização dos pontos de coleta do sedimento.

Figura 6 - Localização dos pontos de coleta de sedimento marinho nas praias de Icarai de Amontada e Sabiaguaba, Ceará, Brasil



Fonte: elaborada pela autora.

4.2. Processamento das amostras

As amostras coletadas foram armazenadas em embalagens isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR/UFC) para posterior processamento.

4.3. Estratégia de cultivo e isolamento de bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo

4.3.1. Cultivo dos microrganismos

Uma quantidade de 25 g de sedimento marinho foi adicionada à 225 mL de meio de cultura de enriquecimento seletivo para degradadoras de hidrocarbonetos (200 mL de caldo mineral Bushnell-Haas acrescido com 25 mL de uma emulsão de óleo), incubado em estufa a 35 °C por 48 horas. Transcorrido esse tempo, diluições seriadas foram feitas usando como diluente água do mar com salinidade ajustada para 10 ppm. Pela técnica de Pour Plate (Madigan *et al.*, 2016), foram feitos plaqueamentos em triplicata de todas as diluições (10^{-1} a 10^{-4}) em meio ágar não seletivo com óleo.

A emulsão de óleo utilizada nos meios de cultura foi preparada com 5 g do óleo bruto (não esterilizado) coletado em 2019 no litoral cearense, inicialmente emergida e agitada de forma interrupta em 100 mL de água destilada (esterilizada) preaquecida por, aproximadamente, 43 horas. Transcorrido o tempo, a mistura foi filtrada em membrana 0,45 μm para posterior utilização.

4.3.2. Isolamento e identificação morfotintorial

Os critérios de seleção dos isolados basearam-se na diferenciação de morfologia das colônias, tamanho e presença de pigmentos. Após o isolamento, realizou-se a caracterização morfotintorial pela técnica da coloração de Gram (Tortora; Funke; Case, 2017)

4.4. Estratégias de seleção de bactérias com potencial de degradar hidrocarbonetos de petróleo

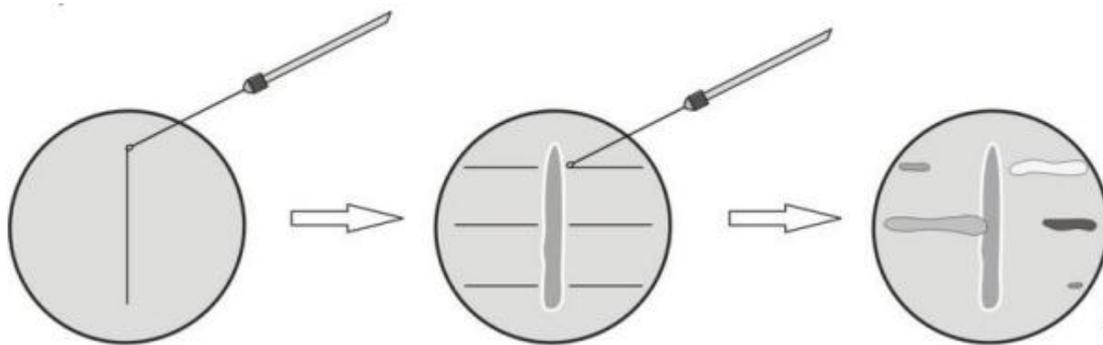
4.4.1. Teste do colapso da gota

A metodologia utilizada para o teste foi descrita por Bodour e Miller-Maier (1998) com modificações. Em uma tampa de uma microplaca de 96 poços, uma substância hidrofóbica (óleo mineral) foi espalhada e deixada em repouso por 24 horas. Em seguida, em duplicata, 10 µL do caldo de fermentação (meio contendo células bacterianas) e 10 µL do líquido metabólico (meio isento de células) foram aplicados na superfície revestida com o óleo. Transcorrido 1 minuto observou-se o comportamento da gota em contato com o composto hidrofóbico. Utilizou-se água destilada estéril como controle negativo. Como resultado positivo considerou-se o colapso ou espalhamento da gota dos meios com/sem células bacterianas testados.

4.4.2. Teste de antagonismo pelo método de estrias cruzadas (cross-streak)

A metodologia utilizada para o teste foi descrita por Yoshida *et al.* (2009) com adaptações. As culturas bacterianas foram renovadas em caldo Luria Bertani (LB) preparado com água do mar na concentração de 10 ppm e incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Em placa de Petri com meio não seletivo, uma estria vertical e até oito estrias perpendiculares e distantes 0,5 cm da estria vertical foram feitas utilizando as culturas crescidas em caldo LB. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Foi considerado antagonismo negativo (-) a ausência de inibição de crescimento, por meio de sobreposição ou contato sem formação de halo, das culturas estriadas horizontalmente em relação à estria vertical. E como antagonismo positivo (+) a inibição de crescimento das culturas horizontais.

Figura 7 - Esquema do teste de antagonismo por estrias cruzadas (*cross-streak*)



Fonte: Toth *et al.* (2013).

4.5. Seleção dos consórcios bacterianos e teste de eficiência

Os consórcios do tipo livre foram montados a partir dos resultados do teste de antagonismo (tópico 4.4.2.). Somente as cepas com antagonismo negativo foram utilizadas nos consórcios.

Foram montados consórcios para as áreas amostradas (Praia de Icarai de Amontada e Praia de Sabiaguaba) e divididos em: (a) consórcios A.C (referentes a Praia de Icarai de Amontada e (b) consórcios S.C (referentes a Praia de Sabiaguaba). Entretanto, essa separação por área não se aplicou aos pontos, ou seja, em um consórcio poderia ter a presença de cepas bacterianas oriundas de pontos de coletas diferentes, desde que fossem da mesma área.

Foram estabelecidos também alguns critérios para a composição dos consórcios a serem escolhidos para o teste de eficiência e que estão dispostos a seguir:

1. Consórcio com, no mínimo, três cepas bacterianas;
2. A presença de, pelo menos, uma cepa com resultado positivo para o teste do colapso da gota;
3. Antagonismo negativo entre as cepas.

Após a seleção, os consórcios foram submetidos a um teste de eficiência. Em 20 mL de caldo mineral Bushnell-Haas preparado com água do mar na concentração de 10 ppm foram acrescentados 2 mL de querosene. Em seguida, 1 mL do consórcio ajustado em escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi adicionado ao meio e incubado em estufa a 35 °C. Durante seis dias foi feito o acompanhamento do crescimento dos consórcios bacterianos por meio da Contagem Padrão em Placa (CPP).

Posteriormente, o crescimento desses consórcios foram comparados entre eles e, os que se sobressaíram, utilizados no teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

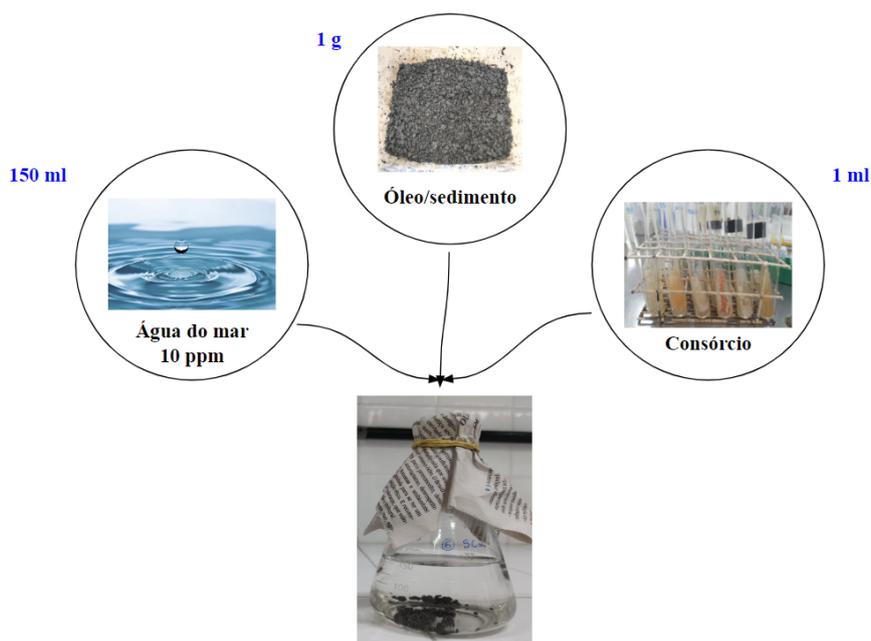
4.6. Avaliação da competência dos consórcios na degradação de hidrocarbonetos de petróleo (teste de degradação)

4.6.1. Seleção de consórcios e montagem do microcosmo

Nesta etapa da pesquisa, os consórcios utilizados foram os que apresentaram os melhores resultados no teste de eficiência (tópico 4.5.).

Em relação à montagem dos microcosmos, a figura 8 representa a composição estabelecida.

Figura 8 - Composição dos microcosmos dos consórcios A.C e S.C

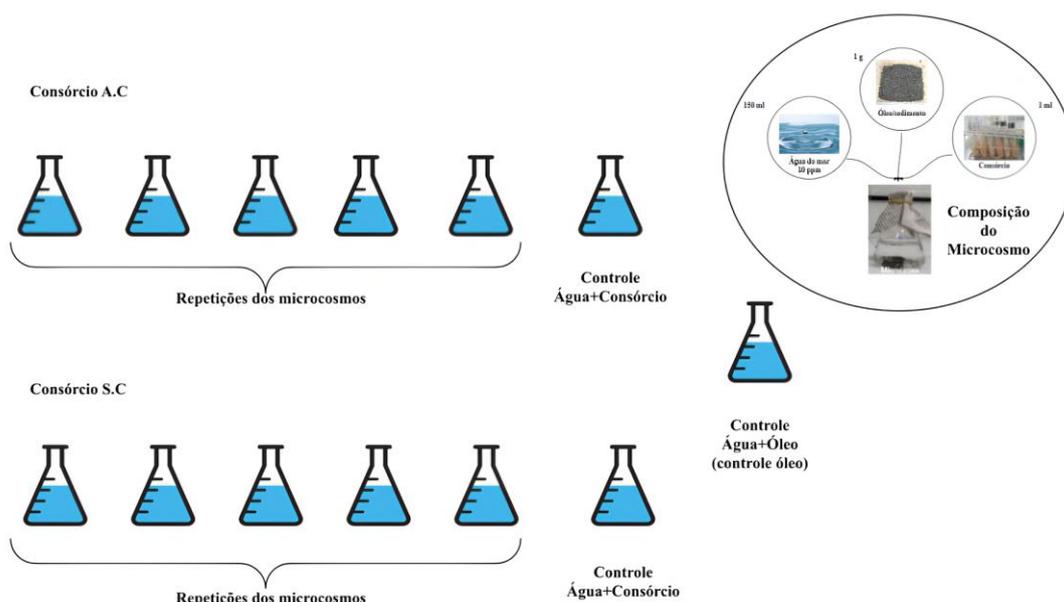


Fonte: elaborada pela autora (2024).

Os microcosmos (sistema fechado) foram montados com 150 ml de água do mar estéril na concentração de 10 ppm, 1 g de uma mistura óleo/sedimento (não esterilizada) proveniente do derramamento de óleo 2019 e 1 mL do consórcio do tipo livre ajustado (escala McFarland $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Os consórcios testados foram aplicados nos microcosmos em unicata, cada qual com cinco repetições, além de três controles. Os microcosmos foram mantidos sob agitação a 70 rpm por 15 dias. Após a incubação, o material dos microcosmos passou por etapas de extração e *clean up* para então serem analisadas por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (GC-FID).

Figura 9 - Esquematisação dos microcosmos para o teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo



Fonte: elaborada pela autora (2024).

4.6.2. Extração e *clean up* dos hidrocarbonetos de petróleo dos microcosmos

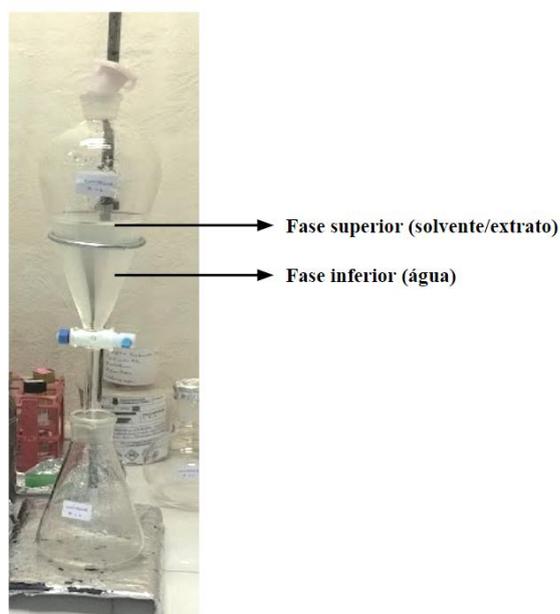
Esta etapa da pesquisa foi realizada no Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos (LACOr/LABOMAR).

O material dos microcosmos passou por etapas de extração líquido-líquido para reter a classe de hidrocarbonetos alifáticos (fase 1). A primeira extração foi feita 6 dias após a montagem dos microcosmos e a partir desta, as extrações passaram a ser realizadas a cada 3 dias e uma repetição de cada consórcio foi extraída nesse tempo. Os três controles foram extraídos apenas ao final dos 15 dias.

Na etapa de extração, todo o volume dos microcosmos (150 mL) teve a parte sólida filtrada em filtro de papel e, em seguida, a parte líquida colocada em um

funil de separação. A esse material foram adicionados 10 mL de uma mistura de hexano: diclorometano (1:1), agitado manualmente por 1 min e deixado em repouso por 10 min. Transcorrido o tempo, a fase superior que contém o solvente/extrato foi recolhida em um balão de fundo chato e a fase inferior que contém a água foi novamente para o funil de separação e todo o processo descrito anteriormente foi repetido mais 3 vezes. Por fim, as amostras colhidas foram rotaevaporadas até um volume de 1 mL para retirada dos solventes (hexano: diclorometano) e armazenadas para a etapa do *clean up*.

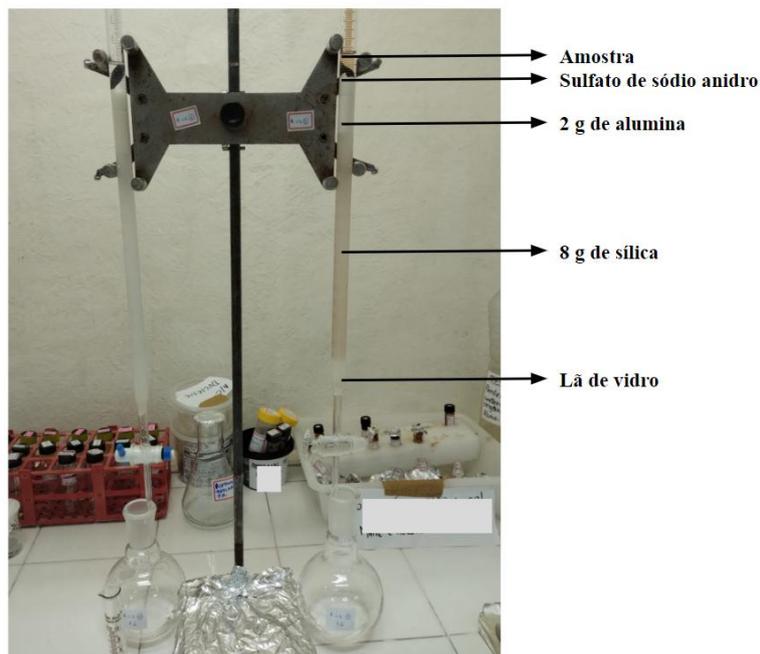
Figura 10 - Etapa de extração líquido-líquido dos hidrocarbonetos presentes nos microcosmos



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Para a purificação da classe dos hidrocarbonetos alifáticos (HA) separada na extração foram realizadas etapas de *clean up*.

Figura 11 - Etapa de *clean up* das amostras de hidrocarbonetos extraídas



Fonte: elaborada pela autora (2024).

No *clean up*, uma coluna de cromatografia de adsorção foi construída adicionando lã de vidro, 8 g de sílica, 2 g de alumina e sulfato de sódio anidro. Em seguida, as amostras colhidas na extração foram adicionadas na coluna para serem limpas em sistema aberto (gotejamento contínuo) por, aproximadamente, 1 hora. Foi utilizado 20 mL de hexano na coluna para a purificação da fase 1 (HA). Terminado o processo, as amostras purificadas foram armazenadas.

Após as etapas de extração e *clean up*, as amostras referentes à classe de hidrocarbonetos alifáticos (fase 1) foram analisadas por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (GC-FID).

4.7. Extração do material genético dos consórcios bacterianos

4.7.1. Extração do DNA total

As estirpes bacterianas puras utilizadas no teste de eficiência (tópico 4.5) e que também foram usadas nos dois consórcios aplicados no teste de degradação (tópico 4.6) foram inoculadas em meio Luria Bertani (LB) 10 ppm e incubadas a 35 °C por 48

horas. A partir disso, a extração de DNA seguiu as recomendações do fabricante e o kit comercial utilizado foi o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

4.7.2. Amplificação do produto da extração

A amplificação do material extraído ocorreu por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando o par de iniciadores (*primers*) sugeridos por Berry e Gutiérrez (2017) por serem capazes de amplificar regiões relacionadas aos táxons associados as bactérias hidrocarbonoclásticas. O par de *primer* SD-Bact-0343-a-S-15 (direto) e SD-Bact-0908-a-A-18 (reverso) forma um amplicon de 583 pares de base (pb), cobre as regiões hipervariáveis 3 - 5 do RNA ribossomal 16S e sua sequência se encontra na quadro 2.

Quadro 2 – Detalhamento dos iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação da região 16S do cromossomo bacteriano relacionados a degradação de hidrocarbonetos

<i>Primers</i>	Sequência (5' - 3')
S-D-Bact-0343-a-S-15 (direto)	TACGGRAGGCAGCAG
S-D-Bact-0908-a-A-18 (reverso)	CGTCAATTCMTTTGAGTT

Fonte: elaborada pela autora (2024).

Em termociclador AmpliTherm modelo TX96, a PCR foi realizada em um mix com volume final de 12,5 µL composto por: 1,25 µL tampão, 0,375 µL MgCL, 0,5 µL dNTP, 0,5 µL *primer* direto, 0,5 µL *primer* reverso, 0,05 µL Taq DNA polimerase, 8,325 µL H₂O e 1 µL do DNA da amostra. O DNA das amostras amplificadas foi diluído na proporção de 1:10 (10 µL de DNA para 90 µL de H₂O).

Quanto às condições de ciclagem da PCR: desnaturação inicial de 94 °C por 1 minuto, ciclos de desnaturação por 1 minuto, anelamento de 50 °C por 1 minuto e extensão de 72 °C por 1 minuto para 30 ciclos e extensão final de 72 °C por 3 minutos.

Os produtos da PCR foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose ultrapura 1% na voltagem de 120 V/cm³ por 60 minutos. Os géis da extração de DNA e da amplificação do DNA por PCR foram registrados fotograficamente pelo sistema Kodak EDAS290.

4.8. Análise granulométrica do sedimento marinho

As amostras foram analisadas no Laboratório de Oceanografia Geológica (LOG/LABOMAR) pela técnica de peneiramento (Dias, 2004). Em estufa, as amostras foram mantidas a 60 °C por 15 dias para secagem. Após esse tempo, 100 g de cada amostra foi quarteada em quatro quadrantes, sendo dois deles escolhidos para serem colocados no conjunto de peneiras. O peneiramento ocorreu no agitador Ro-Tap com tempos de 10 e 15 minutos. A análise das amostras foi tratada no software ANASED 5.0J.

4.9. Análise estatística

A diferença das médias da contagem padrão em placa entre os pontos de coleta de sedimento submerso da Praia de Icarai de Amontada e Praia de Sabiaguaba foi submetida a testes de hipóteses paramétricos. O teste de Levene foi aplicado para verificar o pressuposto de homogeneidade de variâncias e então realizada a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que esse pressuposto não foi obedecido, foi aplicada estatística mais robusta com o teste de Brown-Forsythe. Para verificar quais pontos diferenciam-se entre si, foi executado o teste *post hoc* de Bonferroni e o teste de Tamhane. Em todos os testes foi adotado 5% como nível de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software IBM SPSS Statistics 20.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição a hidrocarbonetos e derivados de petróleo tem um efeito seletivo sobre as comunidades microbianas presentes nas matrizes ambientais. Nesta pesquisa, foram analisados sedimento submerso em duas praias do litoral cearense afetadas pelo derrame de óleo acontecido no ano de 2019 e que foi submetido a etapa de seleção das bactérias degradadoras usando como uma estratégia de exposição a uma emulsão a base de fragmentos do material do derrame em água.

5.1. Abundância bacteriana e granulometria do sedimento

Foram isoladas 30 colônias bacterianas de cada amostra de sedimento totalizando 180 colônias (90 isolados de amostras de sedimento submerso da Praia de Icarai de Amontada e 90 isolados da Praia de Sabiaguaba). A tabela 1 apresenta as médias das contagens padrão em placa de bactérias isoladas em cada ponto de coleta junto com a caracterização granulométrica do sedimento.

Tabela 1 - Contagem padrão em placa dos isolados bacterianos da Praia de Icarai de Amontada e Praia de Sabiaguaba e granulometria do sedimento marinho

	Pontos	Média das contagens (UFC/g)	Granulometria do sedimento (%)			
			cascalho	areia	silte	argila
Praia de Icarai de Amontada	1	$1,9 \times 10^7$	0,225	95,46	1,49	2,82
	2	$2,4 \times 10^7$	4,291	66,78	17,43	15,75
	3	$2,6 \times 10^7$	0,097	80,12	4,0	15,78
Praia de Sabiaguaba	1	$8,0 \times 10^5$	4,549	94,22	0,11	1,12
	2	$1,9 \times 10^5$	0,286	98,86	0,03	0,82
	3	$2,4 \times 10^7$	7,199	99,39	0,03	0,51

Fonte: elaborada pela autora (2024).

Pela análise de variância foi possível constatar que a média de pelo menos um dos pontos da Praia de Icarai de Amontada se difere dos demais ($p < 0,001$). Enquanto que o Teste de Brown-Forsythe mostrou que há diferenças entre todas as médias da contagem dos três pontos da Praia de Sabiaguaba ($p < 0,000$).

O teste de Bonferroni indicou que a abundância bacteriana (UFC/g) na Praia de Icaraí de Amontada não apresentou diferença significativa entre os pontos 2 e 3 (p 0,366). Entretanto, foi possível observar que houve diferença entre os pontos 1 e 2 (p 0,004) e entre os pontos 1 e 3 (p 0,001). Em contrapartida, houve diferença significativa na abundância entre todos os pontos da Praia de Sabiaguaba (p <0,05) indicado pelo teste de Tamhane.

Os pontos 1 e 3, para ambas as praias, foram os que mais se diferenciaram em abundância. O ponto 3, tanto em Icaraí de Amontada quanto na Sabiaguaba, tinha a influência de águas fluviais. Possivelmente, o ponto recebe um aporte maior de poluição, podendo ser uma fonte de compostos hidrofóbicos para o ambiente marinho, visto que foi o ponto que apresentou maior média nas contagens comparado ao ponto 1 ($2,6 \times 10^7$ UFC/g Praia de Icaraí de Amontada e $2,4 \times 10^7$ UFC/g Praia de Sabiaguaba). Como consequência, a poluição oriunda do continente pode possibilitar uma maior presença de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos no ecossistema (Sanni; Coulon; Mcgenity, 2015). Uma maior predominância de bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos pode ser um indicador do quanto um determinado ecossistema pode estar sendo contaminado por esses poluentes (Engel; Gupta, 2014).

A análise granulométrica do sedimento foi feita com base no teor de cascalho, areia, silte e argila nas amostras. Sendo o cascalho de dimensão maior (> 2 mm), seguido pela areia (2mm a $63\mu\text{m}$), pelo silte ($63\mu\text{m}$ e $4\mu\text{m}$) e pela argila que tem dimensão menor (< $4\mu\text{m}$) (Dias, 2004).

Sabe-se que contaminantes orgânicos tendem a se acumular em sedimentos com granulometria mais fina, uma vez que eles se depositam nesses ambientes (UNEP, 1982). Embora, cerca de 80% da granulometria do sedimento marinho analisado seja basicamente composto por areia, na Praia de Icaraí de Amontada, os teores de argila, ou seja, partículas mais finas, foram superiores aos da Praia de Sabiaguaba para todos os pontos. Isso pode ter influenciado em uma maior abundância populacional nos pontos de Icaraí de Amontada em relação aos pontos de Sabiaguaba como visto na tabela 2.

Estudos encontraram altas taxas de degradação aeróbica em sedimentos de areia porosa e mais pobres em matéria orgânica em comparação com sedimentos mais finos, além de uma maior abundância bacteriana nesse tipo de sedimento (Beer *et al.*, 2005; Musat *et al.*, 2006). Outro estudo também sugere que a abundância de bactérias no sedimento muitas vezes está mais relacionada com o tipo de conteúdo orgânico

presente do que a própria granulometria do sedimento e que análises relacionando sedimento e bactérias precisam ser feitas com cautela (Cammen, 1982).

5.2. Características morfológicas das colônias isoladas

A tabela 2 traz o resultado da morfologia bacteriana com base na técnica de Gram dos isolados da Praia de Icaraí de Amontada e da Praia de Sabiaguaba.

Tabela 2 - Resultado da coloração de Gram dos isolados bacterianos da Praia de Icaraí de Amontada e Praia de Sabiaguaba

	Pontos	Número de cepas gram-positivas	Número de cepas gram-negativas
Praia de Icaraí de Amontada	1	0	30
	2	0	30
	3	0	30
Praia de Sabiaguaba	1	20	10
	2	14	14
	3	25	4

Fonte: elaborada pela autora (2024).

Todas as cepas isoladas da Praia de Icaraí de Amontada foram bactérias gram-negativas. Gorshkova *et al.* (2003) isolaram bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos a partir de sedimentos de uma baía no Japão. As cepas foram identificadas como gram-negativas halofílicas. Dong *et al.* (2019) também isolaram uma cepa bacteriana gram-negativa a partir de um consórcio de degradação de hidrocarbonetos enriquecido *in situ* no Mar da China Meridional.

Das 90 cepas isoladas na Praia de Sabiaguaba, 59 foram identificadas como gram-positivas, a maioria presente no ponto 3. Bactérias gram-negativas somaram 28 no total e 3 cepas não foram identificadas. Comparando ambos os locais de amostragem, a diversidade se mostrou maior na Praia de Sabiaguaba. A presença de hidrocarbonetos no sedimento marinho pode ser um dos fatores que moldam as comunidades bacterianas nesse ambiente e a diversidade dessas comunidades tende a mudar conforme a quantidade de hidrocarbonetos presentes (Bacosa *et al.*, 2018).

Outros trabalhos realizados em ambientes marinhos, como em águas oceânicas, encontraram cepas bacterianas capazes de degradar hidrocarbonetos com morfologias semelhantes às encontradas neste estudo (Syakti *et al.*, 2019; Gupta *et al.*,

2015). Syakti *et al.* (2019) isolaram bastonetes gram-positivos, enquanto que Gupta *et al.* (2015) isolaram bastonetes gram-negativos. Em outro trabalho, agora em solo contaminado por petróleo, os autores encontraram cepas bacterianas de cores brancas, formas circular e irregular e margens inteiras e onduladas, além de bastonetes gram-positivos e negativos (Dhabaan, 2019).

5.3. Teste do colapso da gota

Os resultados do teste do colapso da gota podem ser visualizados na tabela 3. Duas das 57 cepas testadas da Praia de Icaraí de Amontada tiveram resultados positivos para o colapso, ambas presentes no meio contendo células bacterianas e nenhum resultado positivo foi encontrado para o líquido metabólico. Em relação as cepas bacterianas da Praia de Sabiaguaba, das 59 cepas usadas no teste, duas tiveram resultado positivo para o colapso no líquido metabólico e cinco tiveram resultados positivos no caldo de fermentação.

Tabela 3 - Resultados do teste do colapso da gota dos isolados bacterianos das Praias de Icaraí de Amontada e Praia de Sabiaguaba

	Pontos	N	Resultado do colapso		
			Código da cepa	Líquido Metabólico	Caldo de Fermentação
Praia Icaraí de Amontada	1	13	30	ND	+-
	2	22	-	ND	ND
	3	22	80	ND	++
Praia de Sabiaguaba			91	++	++
	1	19	117	ND	++
	2	14	131	++	++
	3	26	153	ND	+-
			169	ND	++

Fonte: elaborada pela autora (2024).

Legenda: N= número de cepas testadas; ++ = colapso bom; +- = colapso moderado; ND= colapso não detectado.

Ao todo, cinco cepas bacterianas apresentaram o que foi considerado um colapso “bom” (sinalizado por ++), pela gota ter colapsado nas duplicadas em até 1 minuto quando em contato com a superfície hidrofóbica. Duas cepas tiveram o resultado considerado “moderado” (sinalizado por +/-) em que, em uma duplicada, o colapso não ocorreu de forma instantânea ultrapassando o tempo estabelecido de 1 minuto. E o colapso “não detectado” foi evidenciado, principalmente, no líquido metabólico.

A maioria das cepas positivas para o teste do colapso foi detectada no caldo de fermentação, ou seja, meio com a presença de células bacterianas. Sabe-se que o biossurfactante produzido pode ser liberado para o meio pela célula ou ficar aderido a ela (Santos *et al.*, 2016), portanto, há uma indicação de que as cepas testadas mantiveram essa substância aderida à própria célula.

Por ser um teste simples e rápido de ser realizado, diversos trabalhos utilizam-no, seja para detectar bactérias produtoras de BS ou mesmo para investigar a eficiência do biossurfactante produzido por ela, uma vez que, essa substância auxilia na degradação de hidrocarbonetos.

Gao *et al.* (2020) isolaram bactérias em ambiente marinho e constataram que o biossurfactante produzido pela cepa *Paracoccus* sp. MJ9 teve uma eficiência de remoção de 81% de um derivado do petróleo ao longo de cinco dias. Os autores consideraram que a cepa ou o seu biossurfactante, estudados com mais detalhes, são uma alternativa para remediar ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos.

Sun *et al.* (2018) ao isolarem bactérias de um campo petrolífero constataram que o biossurfactante produzido por uma *Pseudomonas* sp. foi capaz de emulsionar e a cepa bacteriana degradar o óleo diesel em 60,1% e 54,7%, respectivamente, sendo uma boa alternativa para a remediação de ambientes contaminados por petróleo.

Habib *et al.* (2020) detectaram a capacidade da cepa *Rhodococcus* sp. oriunda do ambiente antártico degradar óleo diesel e produzir biossurfactante, apresentando um grande potencial para a remoção desse tipo de composto em ambientes frios. Em outro estudo, Wu *et al.* (2019) isolaram bactérias de ambiente marinho e ao combinarem bactérias degradadoras de diesel com aquelas que produzem biossurfactantes, obtiveram uma redução de 67,88% desse óleo.

Embora a produção do biossurfactante auxilie de forma significativa a degradação de compostos hidrofóbicos pelos microrganismos, como as bactérias, estas não necessariamente o produzem nesse processo. Mas o teste é uma ferramenta que

otimiza a procura por bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos e, quando realizado em combinação com outros testes, amplia a mais resultados tendem a ser encontrados.

5.4. Teste de antagonismo e montagem dos consórcios

As cepas bacterianas utilizadas no teste do colapso da gota foram aplicadas no teste de antagonismo. Destas, 23 cepas da Praia de Icaraí de Amontada apresentaram antagonismo negativo entre elas, ou seja, o crescimento de uma, não inibiu o crescimento da outra (figura 12). Em relação a Praia de Sabiaguaba, 49 cepas foram antagônicas negativas entre elas (figura 13).

Figura 12 - Resultado do teste de antagonismo referente ao isolados bacterianos da Praia de Icaraí de Amontada

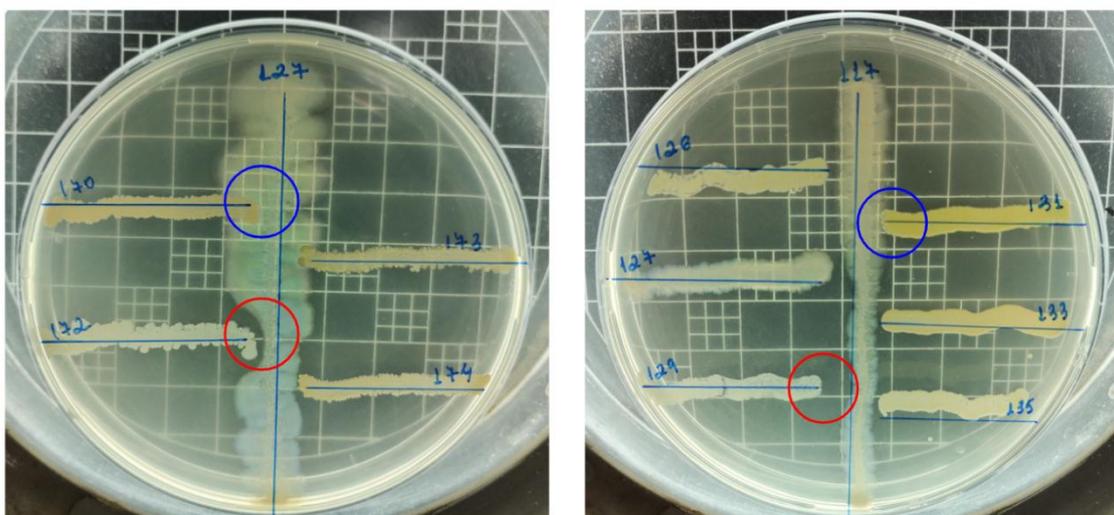
*	1	4	9	10	11	18	25	27	30	31	33	34	35	42	43	44	53	55	59	61	63	65	66	70	75	76	80	82	83	88
4	+	*																												
9	+	+	*																											
10	+	+	+	*																										
11	+	+	+	+	*																									
18	+	+	+	+	+	*																								
25	+	+	+	+	+	+	*																							
27	+	+	+	+	+	+	-	*																						
30	+	+	+	+	+	+	+	-	*																					
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*																				
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	*																			
34	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	*																			
35	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	*																		
42	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	*																	
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*															
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*														
53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*													
55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*												
59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*											
61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*										
63	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*									
65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*								
66	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	*						
70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	*						
75	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	*					
76	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	*				
80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	*		
82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	*	

83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	*	
88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	*

Fonte: elaborada pela autora (2024).
 Legenda: antagonismo positivo (+); antagonismo negativo (-).

Os demais resultados no teste de antagonismo deram positivos, ou seja, o crescimento de uma cepa inibiu o crescimento da outra evidenciado pela formação de halo exemplificado na figura 14 pelos círculos vermelhos (círculos azuis representam antagonismo negativo).

Figura 14 - Imagem de leitura do teste de antagonismo entre as bactérias potencialmente degradadoras de petróleo isoladas em praias na costa do Ceará afetados pelo derrame de petróleo de 2019



Fonte: elaborada pela autora (2024).

A partir dos resultados do antagonismo, os consórcios foram montados e divididos em: (1) Consórcio com isolados bacterianos da Praia de Icarai de Amontada e (2) Consórcio com isolados bacterianos da Praia de Sabiaguaba. Para as cepas bacterianas oriundas do sedimento marinho de Amontada, foram obtidos 10 consórcios e para as cepas bacterianas referentes à região da Sabiaguaba, um total de 16 consórcios. Todos os consórcios foram compostos por três ou quatro cepas bacterianas.

A tabela 4 apresenta mais detalhes dos consórcios montados.

Tabela 4 - Características dos consórcios montados a partir de isolados bacterianos das praias de Icaraí de Amontada e Sabiaguaba

	Número de consórcios	Total de cepas bacterianas	Número de consórcios com CPBS
Praia de Icaraí de Amontada	10	15	2
Praia de Sabiaguaba	16	22	4

Fonte: elaborada pela autora (2024).

Legenda: CPBS: Cepa Produtora de Biossurfactante

No ambiente natural é comum a coexistência entre os microrganismos em comunidades o que ajuda a potencializar a degradação de moléculas complexas como os hidrocarbonetos e a produção de biossurfactantes (Paniagua-Michel; Fathepure, 2019). Uma única célula não é capaz de degradar todo um composto, sendo assim, um consórcio pode facilitar e acelerar a retirada de poluentes nas matrizes ambientais (água, solo, sedimento) (Abena *et al.*, 2019).

Em um experimento realizado por Santisi *et al.* (2019), os autores identificaram a presença de dois consórcios bacterianos formados a partir de culturas de enriquecimento. Uma cultura possuía petróleo bruto como única fonte de carbono e a outra tinha capacidade de degradar outros tipos de hidrocarbonetos aromáticos. A maioria das cepas que compunham o consórcio eram do grupo de bactérias hidrocarbonoclásticas. O próprio meio pode selecionar e favorecer o desenvolvimento de indivíduos que melhor se adaptem àquelas condições em forma de consórcios.

Além disso, os consórcios trazem outras vantagens para os organismos que o compõem como: uma maior resistência ao estresse metabólico, facilitar reações bioquímicas e evitar ações tóxicas do meio (Bittihn *et al.*, 2018). Estudos também relatam que consórcios inter-reinos, por exemplo, são capazes de instigar a produção de metabólitos secundários e mesmo a ativação de genes que, possivelmente, não seriam desencadeados sem as interações de competição ou antagonismo entre essas espécies. Fato interessante dado a complexidade das relações entre os organismos que existem na natureza e o como isso pode influenciar na biorremediação de um ambiente contaminado.

5.5. Teste de eficiência

Do total de consórcios montados, somente quatro foram selecionados para um teste de eficiência. Dois consórcios compostos pela microbiota da Praia de Icarai de Amontada (A.C) e dois consórcios compostos pela microbiota da Praia de Sabiaguaba (S.C). A montagem dos consórcios obedeceu os critérios descritos no tópico (4.5.) e os resultados do teste estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 - Características dos consórcios escolhidos das praias de Icarai de Amontada e Sabiaguaba para o teste de eficiência

	Consórcios	Nº de cepas bacterianas no consórcio	Nº de cepas com colapso positivo	Nº cepas Gram +	Nº cepas Gram -
Praia Icarai de Amontada	A.C1	4	1	0	4
	A.C2	3	1	0	3
Praia de Sabiaguaba	S.C1	3	1	1	2
	S.C2	3	1	1	2

Fonte: elaborada pela autora (2024).

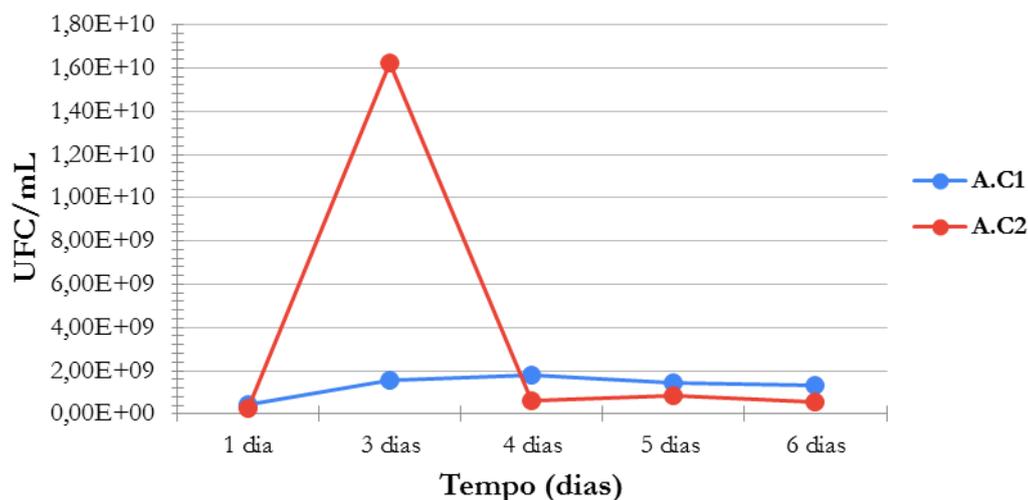
De modo geral, todos os consórcios apresentaram crescimento ao longo dos seis dias de experimento, indicando que as cepas estavam conseguindo utilizar o querosene como única fonte de energia. O crescimento bacteriano dos consórcios foi acompanhado por meio da contagem padrão em placa e os resultados podem ser observados nas figuras 15 e 16.

Vale ressaltar que, o resultado da segunda contagem em placa pode ter tido um comportamento diferente quando comparado às contagens seguintes. A discrepância ocorrida nessa contagem, que a princípio equivaleria ao segundo dia de experimento, se deu pelo fato da contagem ter sido realizada 48h após a primeira contagem e não com 24h como se seguiu nos dias seguintes. Exceto a segunda contagem (equivalente ao tempo de 3 dias nas figuras 15 e 16), todas as outras foram realizadas a cada 24h.

A figura 15 traz os resultados do crescimento bacteriano dos consórcios da Praia de Icarai de Amontada. O consórcio A.C1 apresentou crescimento exponencial ao longo de 4 dias consecutivos, com crescimento que variou de $4,26 \times 10^8$ a $1,81 \times 10^9$

UFC/mL. Entre os dias 5 e 6, a curva do crescimento começou a decair ($1,41 \times 10^9$ a $1,32 \times 10^9$ UFC/mL), mas os valores foram relativamente semelhantes.

Figura 15 - Crescimento bacteriano dos consórcios montados com isolados na Praia de Icaraí de Amontada ao longo de seis dias inoculados em meio com querosene



Fonte: elaborada pela autora (2024).

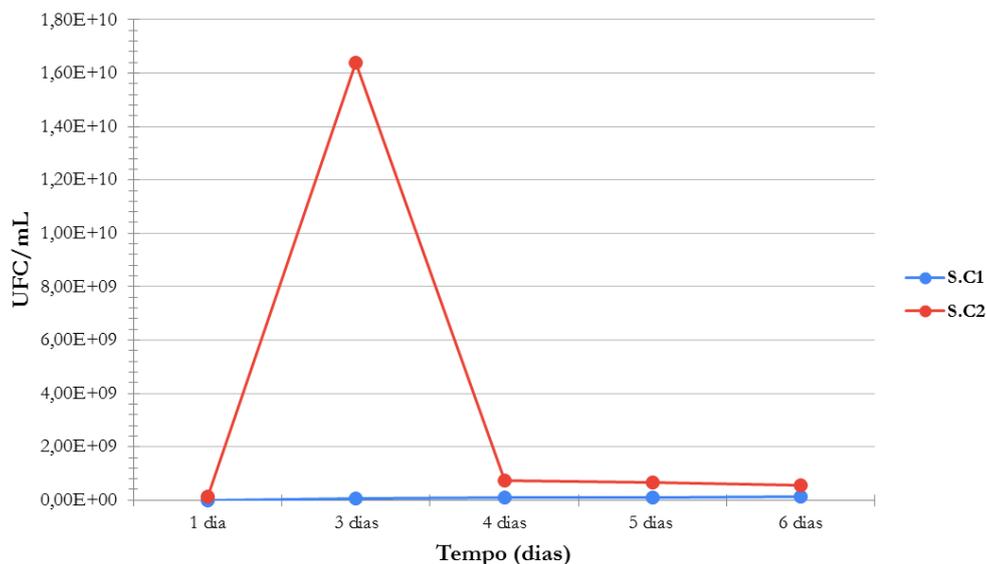
Já o consórcio A.C2, teve um pico de crescimento com 3 dias de experimento saltando de $2,62 \times 10^8$ para $1,62 \times 10^{10}$ UFC/ml (fato justificado anteriormente), seguido por um declínio, crescimento e outro declínio. É possível que, nesse momento, houvesse a predominância de cepas especializadas em consumir componentes mais difíceis do querosene e conforme a disponibilidade de moléculas mais simples, as demais cepas que compõem o consórcio puderam prosseguir com a degradação desse composto. Compostos complexos não costumam ser degradados por uma só cepa bacteriana (Paniagua-Michel; Fathepure, 2019).

No que diz respeito aos consórcios montados a partir dos isolados da Praia de Sabiaguaba, assim como o consórcio A.C2, o consórcio S.C2 teve um crescimento acentuado com 3 dias de experimento ($1,37 \times 10^8$ para $1,64 \times 10^{10}$ UFC/mL). E nos dias seguintes, o crescimento bacteriano foi apenas decaindo.

Já o consórcio S.C1, foi seguindo uma curva de crescimento ascendente até o último dia de observação, variando de $3,65 \times 10^6$ UFC/mL no primeiro dia a $1,19 \times 10^8$ UFC/mL no último de experimento. Esse comportamento pode indicar que o consórcio

poderia estar conseguindo consumir de forma eficiente o querosene, uma vez que também, não foi evidenciado uma queda do crescimento ao final do experimento.

Figura 16 - Crescimento bacteriano dos consórcios montados com isolados da Praia de Sabiaguaba ao longo de seis dias inoculados em meio com querosene



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Portanto, é possível verificar que os consórcios A.C1 e S.C2 foram os que apresentaram os melhores resultados em relação à degradação de um derivado do petróleo com base no crescimento bacteriano ao longo de seis dias e estimado a partir da Contagem Padrão em Placas.

Mesmo em testes *in vitro* é perceptível verificar uma potencialização da degradação de hidrocarbonetos a partir da aplicação de consórcios, sejam eles favorecidos ao encontrar condições ótimas de crescimento ou em simulações que tentam chegar o mais próximo da realidade.

Kumar *et al.* (2019) utilizaram um consórcio formado a partir de cepas bacterianas hidrocarbonoclasticas extraídas de sedimento profundo marinho. O consórcio conseguiu degradar mais de 85% dos hidrocarbonetos totais do petróleo bruto ao longo de 10 dias de experimento. Em outro estudo, a eficiência de degradação de um consórcio bacteriano após 100 dias foi de 52,99%, sobressaindo-se da atenuação natural (30,61%) e da bioestimulação (13,57%). A eficiência da degradação foi verificada em piscinas experimentais construídas na região costeira contaminada por óleo pesado (Dai *et al.*, 2022).

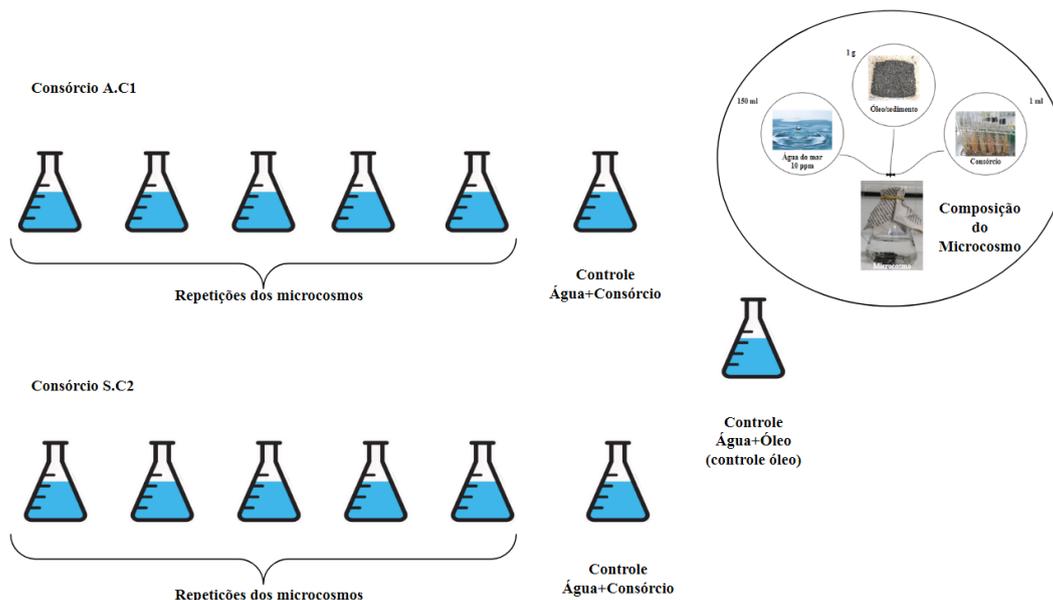
Zhou *et al.* (2023) utilizaram um consórcio formado por degradadores de hidrocarbonetos e produtores de biossurfactante para biorremediar sedimento marinho contaminados com óleo com eficiência de 34,4% na remoção de hidrocarbonetos aromáticos. Os autores constataram um aumento da atividade metabólica microbiana, enriquecimento das populações indígenas degradadoras, mudanças na estrutura comunitária e melhores interações microbianas pela presença do consórcio.

Junusmin, Manurung e Darmayati (2019) ao testarem a eficiência da degradação de hidrocarbonetos em sedimento de ambiente costeiro contaminado, por meio de consórcios imobilizados em matrizes diferentes, encontraram valores de degradação variando de 90,49% a 93,28% após 28 dias de observação. Agora utilizando um consórcio com bactérias isoladas do sedimento de águas profundas, os autores concluíram que a bioestimulação conseguiu ser mais eficiente que a atenuação natural na degradação de compostos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos (Tomasino *et al.*, 2021).

5.6. Teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo

Os consórcios livres A.C1 e S.C2 foram os escolhidos para o teste de degradação de hidrocarbonetos do petróleo por terem apresentado os melhores resultados no teste de eficiência. Os consórcios foram aplicados nos microcosmos ilustrados na figura 17. Os hidrocarbonetos analisados ao longo de 15 dias foram alcanos alifáticos de cadeias de C8 a C40 e alcanos ramificados (prístano e fitano). A primeira análise para o consórcio A.C1 foi feita 3 dias após a montagem dos microcosmos e para o consórcio S.C2, a primeira análise foi realizada com 6 dias.

Figura 17 - Esquematização dos microcosmos para o teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo pelos consórcios A.C1 e S.C2

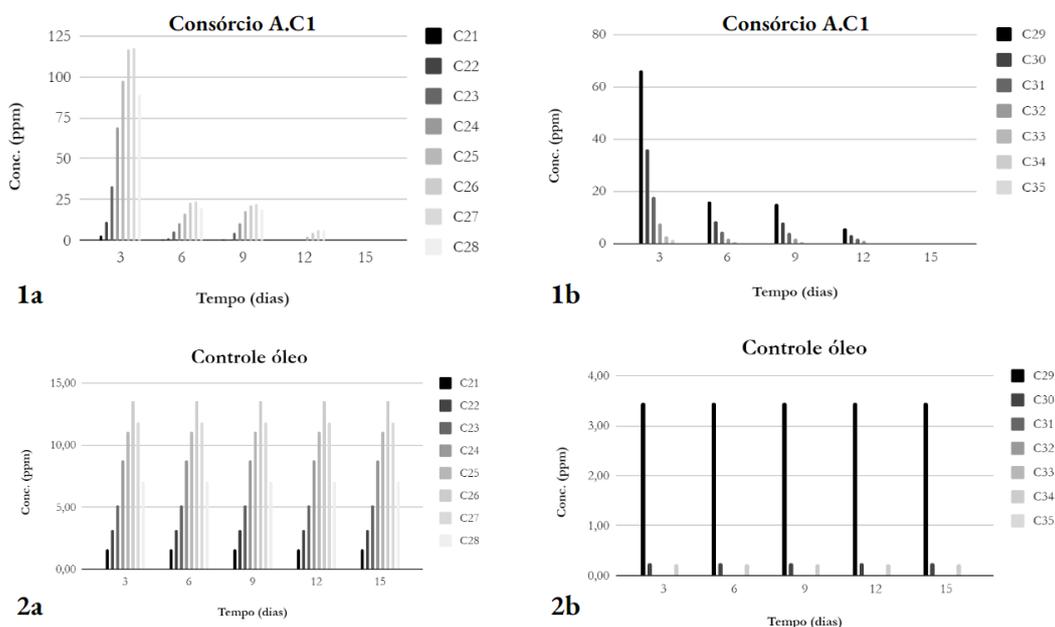


Fonte: elaborada pela autora (2024).

No que diz respeito aos resultados das análises referente ao consórcio A.C1, as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos de cadeias C8 e C9 não foram detectadas. Enquanto isso, cadeias de C11 a C14 tiveram suas concentrações iguais ou superiores ao do controle óleo durante todo o experimento.

As concentrações de C15, C21 até C35 estavam acima do controle óleo desde a primeira análise (3 dias após a montagem dos microcosmos), contudo, esses compostos foram decaindo conforme os dias iam passando, até chegarem em concentrações iguais ou menores que as encontradas no controle óleo (figura 18).

Figura 18 - Concentração de *n*-alcanos de alta massa molecular (C21 a C35) ao longo do tempo pelo consórcio A.C1 e pelo controle óleo



Fonte: elaborada pela autora (2024).

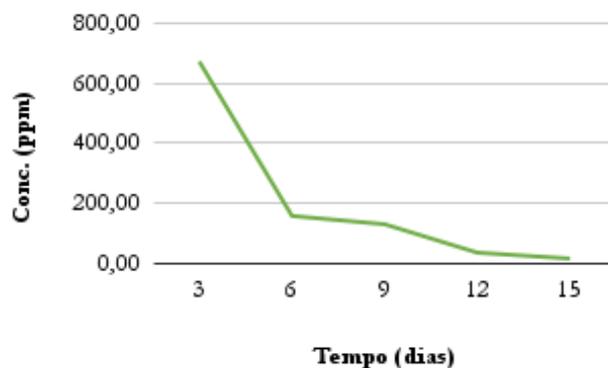
As figuras 1a e 1b apresentam as concentrações dos *n*-alcanos nos microcosmos com o consórcio A.C1 e as figuras 2a e 2b apresentam as concentrações dos *n*-alcanos nos microcosmos com o controle óleo.

Algumas cadeias como, C36, C37 e C40, apresentaram comportamentos de altas e baixas concentrações ao longo do tempo, entre os dias 6 e 9, mas com tendências a chegarem em concentrações menores que a do controle óleo.

As cadeias C17, C18, C19, C20, C39, pristano e fitano foram as únicas que estavam em concentrações menores que o controle óleo e se mantiveram assim durante os 15 dias de experimento, ou seja, não houve uma degradação efetiva desses compostos.

Foi possível constatar que ao longo do experimento, as concentrações de *n*-alcanos (C8-C40) diminuíram de 671,95 ppm para 13,59 ppm ao final dos 15 dias (figura 19) e que os *n*-alcanos de alto peso molecular (AMM C21 a C40) e pesados foram os que mais apresentaram essa diminuição na concentração quando comparado ao controle óleo (figura 19).

Figura 19 - Biodegradação de *n*-alcanos (C8-C40) ao longo do teste de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio A.C1

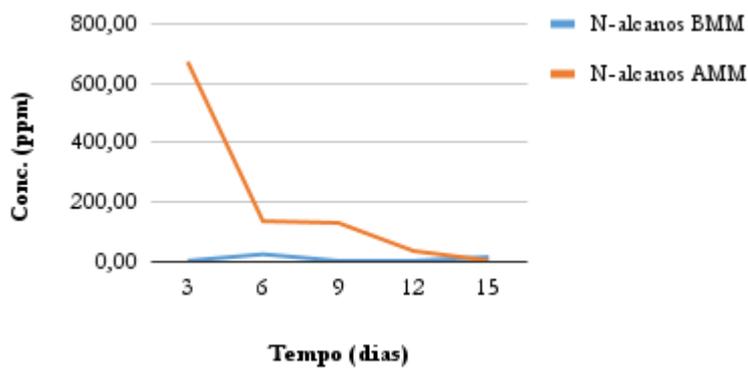


Fonte: elaborada pela autora (2024).

Cerca de 98,7% dos *n*-alcanos pesados (C21-C40) tiveram sua concentração reduzida quando comparados ao controle óleo. Contudo, houve um aumento de 94,1% na concentração de *n*-alcanos de baixa massa molecular (BMM C8-C20) e leves (figura 20). Sabe-se que hidrocarbonetos de cadeias mais longas são biodegradados em compostos de cadeias mais curtas (Tripathi *et al.*, 2023; Elumai *et al.*, 2017), então é possível que com a redução da concentração de alcanos pesados, houve um aumento da concentração dos alcanos mais leves.

Os *n*-alcanos de cadeias mais longas (>C20) são mais hidrofóbicos e, conseqüentemente, isso dificulta sua biodegradação. Portanto, a redução dessas cadeias pelo consórcio bacteriano A.C1 retira do ambiente uma fração do poluente que muito dificilmente outros organismos são capazes de degradar.

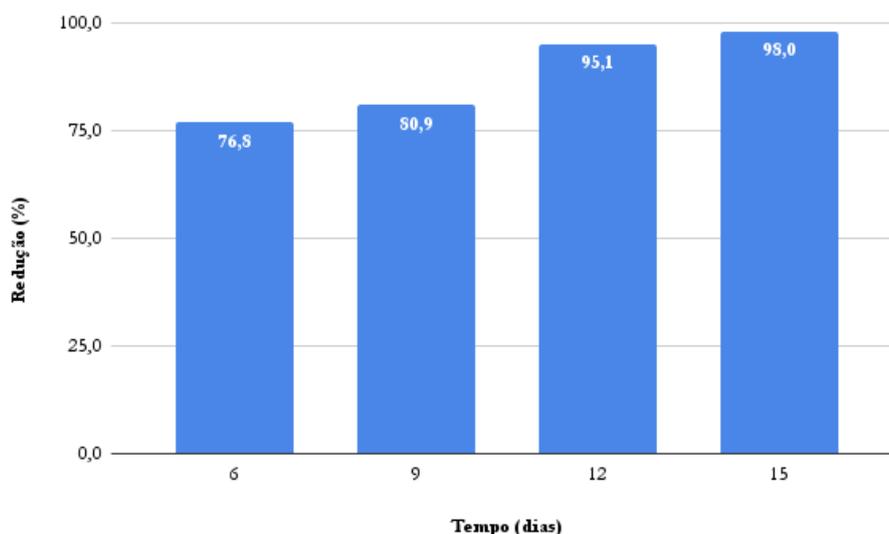
Figura 20 - Concentração de alcanos de alta massa molecular (AMM) e baixa massa molecular (BMM) ao longo do teste de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio A.C1



Fonte: elaborada pela autora (2024).

A figura 21 mostra a variação das concentrações de *n*-alcanos ao longo dos 15 dias de experimento. É possível constatar que a cada dia as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos foram sendo reduzidas dos microcosmos, sendo o dia 15, o que mais apresentou essa redução (98,0%).

Figura 21 - Variação diária da concentração de *n*-alcanos ao longo de 15 dias pelo consórcio A.C1



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Tripathi *et al.* (2023), ao utilizarem cepas bacterianas individuais e um consórcio formado por essas cepas, constataram a degradação de mais de 90% de hidrocarbonetos alifáticos (C8-C40) e observaram uma taxa de degradação máxima durante os primeiros 15 dias de um experimento de 45 dias. Os autores também relatam que não houve uma diminuição significativa na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo passado o período de degradação máxima.

Em outro estudo, os autores encontraram uma eficiência de degradação de *n*-alcanos (C12-C32) em 53,5% realizado por consórcios livres. Alcanos de cadeia C25 a C32 foram os que apresentaram os maiores valores de degradação, chegando até 79,2% ao longo de 7 dias. Contudo, essa eficiência foi potencializada em 85,4% quando foi usado o consórcio imobilizado (Chen *et al.*, 2017).

Chen *et al.* (2020) ao também utilizarem um consórcio bacteriano com cepas capazes de degradar petróleo e produzir biossurfactantes, encontraram uma taxa de biodegradação de cadeias C31-C35 de 78,3%. Entretanto, em cadeias (C21-C25) a atuação do consórcio não foi tão significativa ao longo de 10 dias.

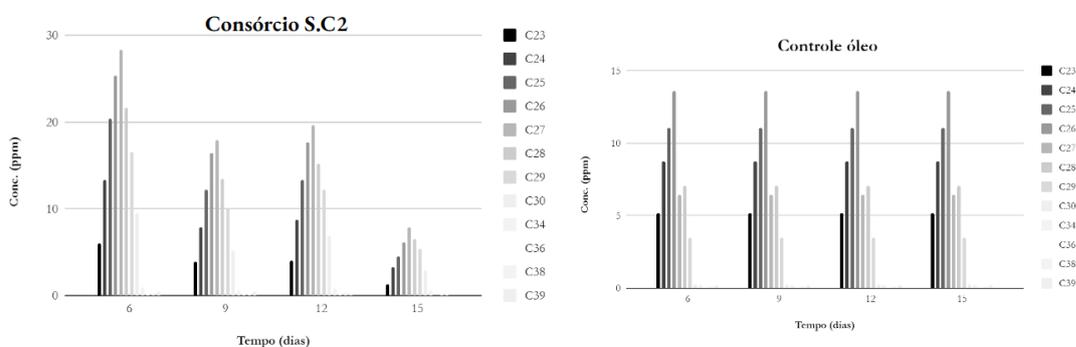
Quanto às análises referentes ao consórcio S.C2, que passaram a ser feitas a partir de 6 dias após a montagem dos microcosmos, *n*-alcanos leves (C8, C10-C14 e C16) apresentaram concentrações semelhantes ao controle óleo no início do

experimento e a partir de 12 dias, essas concentrações ultrapassaram as do controle. Portanto, esses compostos passaram a estar mais presentes nos microcosmos.

Concentrações de C15, C17, pristano e fitano foram as únicas que estavam e se mantiveram inferiores às concentrações do controle óleo ao longo de todo o experimento. Enquanto isso, C36 e C39, embora estivessem em concentrações superiores ao controle, a partir do dia 6, foi possível perceber uma queda nessas concentrações ao ponto de ficarem inferiores ao controle. Aqui é possível observar, novamente, a diminuição das concentrações de alcanos pesados e o aumento de alcanos leves.

Alifáticos de cadeia C18, C20 e C40 com concentrações iniciais menores que o controle passaram a aumentar com 12 dias. *N*-alcanos pesados (C23-C39) apresentaram concentrações superiores ao controle óleo. Essas concentrações passaram a diminuir entre 9 e 12 dias de experimento, mas não atingiram valores inferiores ao controle. Os resultados estão dispostos na figura 22.

Figura 22 - Concentração de *n*-alcanos de alta massa molecular (C23 a C39) ao longo do tempo pelo consórcio S.C2

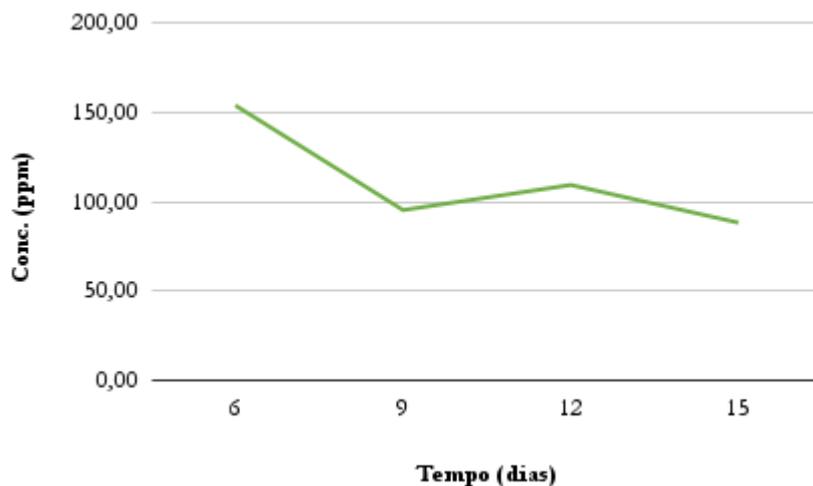


Fonte: elaborada pela autora (2024).

De modo geral, as concentrações dos *n*-alcanos (C8-C40), assim como no consórcio A.C1, diminuiram ao decorrer dos 15 dias, passando de 154,06 ppm para 88,42 ppm desses compostos nos microcosmos. Além disso, foi possível constatar a diminuição na concentração de alifáticos pesados (C21-C40), apesar de um aumento, seguido por outra diminuição das concentrações com 12 dias de experimento, conforme representado nas figuras 23 e 24. Também houve um aumento na concentração de

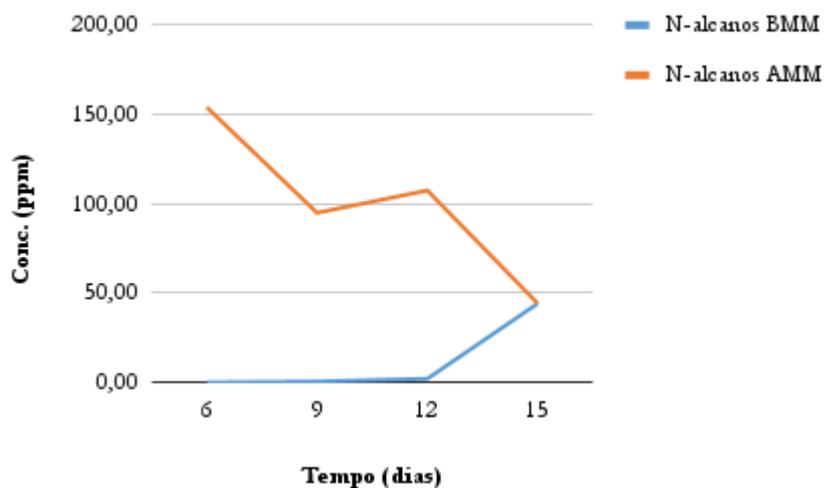
alifáticos leves (C8-C20) a partir de 12 dias de experimento, sendo ambas as situações comparadas ao controle óleo.

Figura 23 - Biodegradação de *n*-alcanos (C8-C40) ao longo do teste de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio S.C2



Fonte: elaborada pela autora (2024).

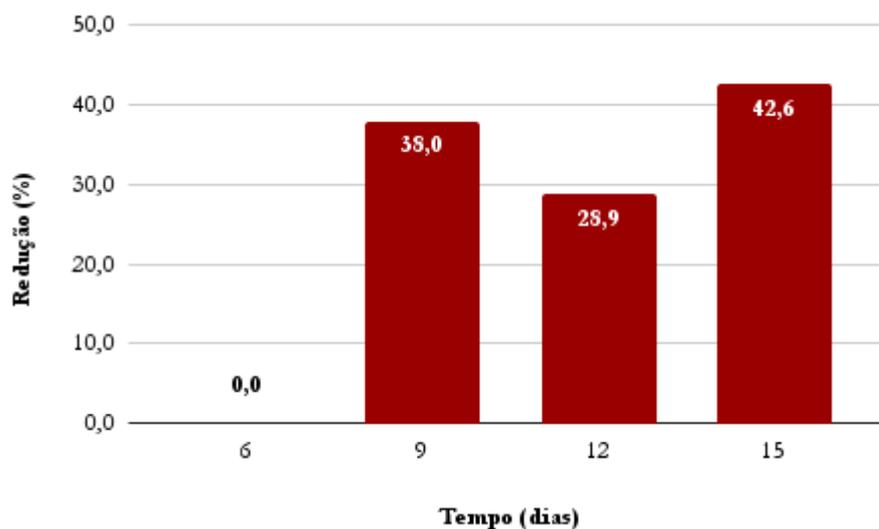
Figura 24 - Concentração de alcanos de alta massa molecular (AMM) e baixa massa molecular (BMM) ao longo do teste de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio S.C2



Fonte: elaborada pela autora (2024).

A figura 25 representa a variação da concentração dos hidrocarbonetos alifáticos ao longo dos dias 6, 9, 12 e 15.

Figura 25 - Variação diária da concentração de *n*-alcanos ao longo do tempo pelo consórcio S.C2



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Constata-se que o momento em que houve uma maior diminuição das concentrações de *n*-alcanos (C8-C40), assim como no consórcio A.C1, foi com 15 dias de experimento, sendo 42,6% desses compostos reduzidos dos microcosmos em relação ao controle óleo. Com 12 dias de experimento, as concentrações dos *n*-alcanos não diminuiu tanto quanto nos outros dias e esse comportamento coincidiu com o aumento das concentrações de alcanos mais leves (AMM).

Dai *et al.* (2022) encontraram valores de remoção de *n*-alcanos (C15-C35) variando de 25,98 a 95,80% ao utilizarem consórcio bacteriano. No trabalho desses autores, o consórcio com bioestimulantes foi capaz de potencializar a degradação das cadeias longas mais difíceis de serem degradadas (C26-C35) quando comparado ao controle sem o consórcio do experimento após 100 dias de remediação.

Zhou *et al.* (2023) em um experimento de biorremediação, utilizaram um consórcio capaz de melhorar a remoção dos hidrocarbonetos de petróleo em sedimento entre-marés com eficiência de remoção de $80,2 \pm 2,8\%$ de *n*-alcanos (C8-C40) e $34,4 \pm 10,8\%$ de compostos aromáticos em 10 semanas.

Yang *et al.* (2020) encontraram valores de biodegradação de alcanos totais (C9-C40) de 96% após 8 semanas de incubação a 4 °C e de 99% após 4 semanas de incubação a 22 °C. Uma das constatações dos autores foi que a biodegradação alcanos alifáticos ocorre de forma mais eficiente em temperaturas mais elevadas.

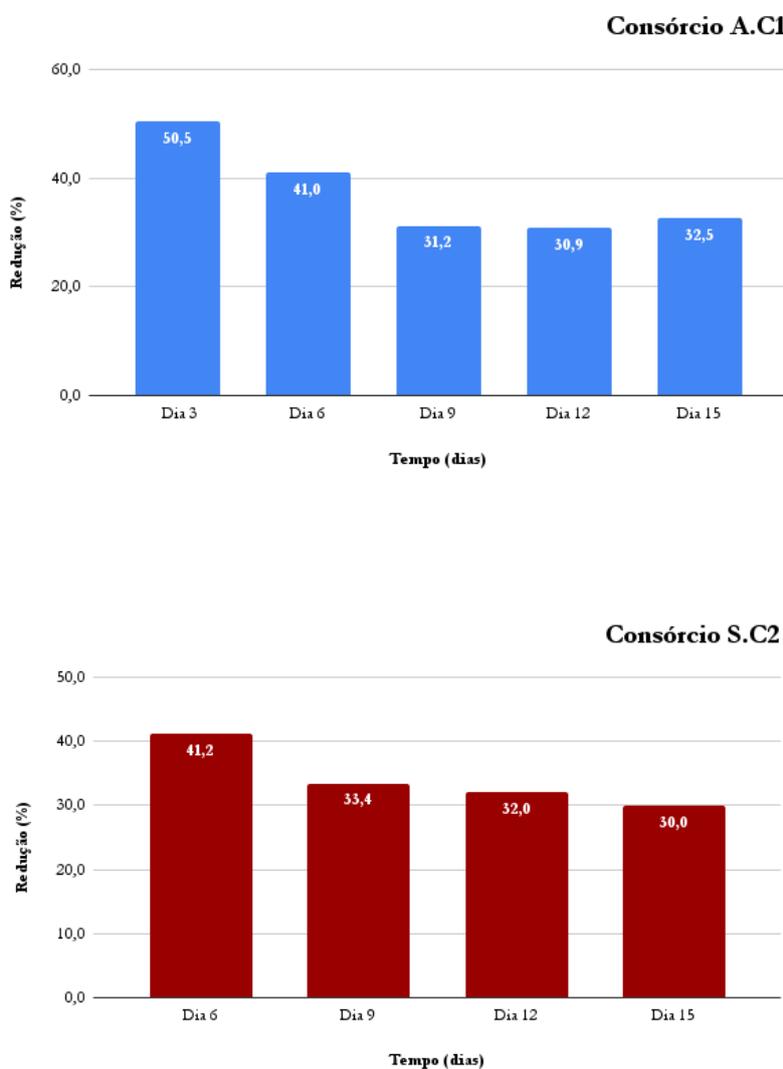
Albena *et al.*, (2019) ao fazerem um experimento em meio líquido durante 10 dias, observaram que o consórcio utilizado foi capaz de degradar mais de 94% do petróleo bruto sem um bioestimulante. Além disso, cadeias de alcanos leves (C15, C17, C19) e naftaleno foram totalmente degradadas e alcanos ramificados como pristano e fitano foram degradados em mais de 80%.

Ambos os consórcios nesta pesquisa (A.C1 e S.C2) apresentaram diminuição nas concentrações de *n*-alcanos de cadeia longa e pesados (C21-C40) e um aumento nas concentrações de *n*-alcanos de cadeia curta e leves (C8-C20). Processos moderados e severos de degradação podem apresentar altos níveis de *n*-alcanos leves (Liu *et al.*, 2020). Além disso, *n*-alcanos com cadeias entre C10 e C30 tem como fontes no ambiente os microrganismos bacterianos (Cavalcante, 2020).

Nos microcosmos referentes ao consórcio A.C1 houve uma maior degradação de hidrocarbonetos alifáticos quando comparado a degradação dos hidrocarbonetos presentes nos microcosmos referentes ao consórcio S.C2. Neste último, houve uma maior variação ao longo dos 15 dias das concentrações de *n*-alcanos. Neste ponto, é importante frisar que, como foi utilizada uma mistura óleo/sedimento nos microcosmos, é possível que a fonte de hidrocarbonetos disponibilizada aos consórcios não tenha sido fielmente igual para todos os microcosmos. E perdas dessa mistura também ocorreram ao longo do experimento como, óleo (presente na mistura óleo/sedimento) preso na parede do erlenmeyer. O que pode, de alguma forma, ter influenciado nos resultados aqui descritos.

A figura 26 traz a porcentagem da fonte de hidrocarbonetos utilizada nos microcosmos dos consórcios A.C1 e S.C2 após o teste de degradação.

Figura 26 - Quantidade do material sólido (mistura óleo/sedimento) presente nos microcosmos após filtragem na etapa de extração dos hidrocarbonetos referentes aos consórcios A.C1 e S.C2



Fonte: elaborada pela autora (2024).

É possível observar que ao longo do experimento, a massa da mistura óleo/sedimento filtrada antes do processo de extração e *clean up* dos hidrocarbonetos presentes nesse material foi diminuindo, o que pode significar que, os compostos da mistura adicionados nos microcosmos, podem ter sido, de fato, utilizados pelos consórcios, como também podem ter sido perdidos após as diversas manipulações (filtragem, pesagem, presos nos materiais utilizados, entre outros) ao longo do experimento.

Apesar disso, os consórcios livres A.C1 e S.C2 apresentaram resultados satisfatórios quanto à biodegradação de compostos hidrofóbicos em um curto período de tempo e sem a adição de bioestimulantes. Provavelmente, pelas características das cepas bacterianas selecionadas como, a capacidade de produzir biossurfactantes e, mesmo as diversas rotas de degradação que esses microrganismos com capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono.

5.7. Detecção de gene precursor de enzimas relacionadas à degradação de hidrocarbonetos de petróleo

Todas as cepas bacterianas utilizadas no teste de eficiência (tópico 4.5.) e no teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo (tópico 4.6.) tiveram seu material genético extraído. O quadro 3 mostra as cepas bacterianas usadas em cada um dos consórcios aplicados nos testes e que passaram pela extração de DNA.

Quadro 3 – Código das cepas bacterianas das praias de Icarai de Amontada e Sabiaguaba utilizadas nos consórcios testados e que tiveram o material genético extraído

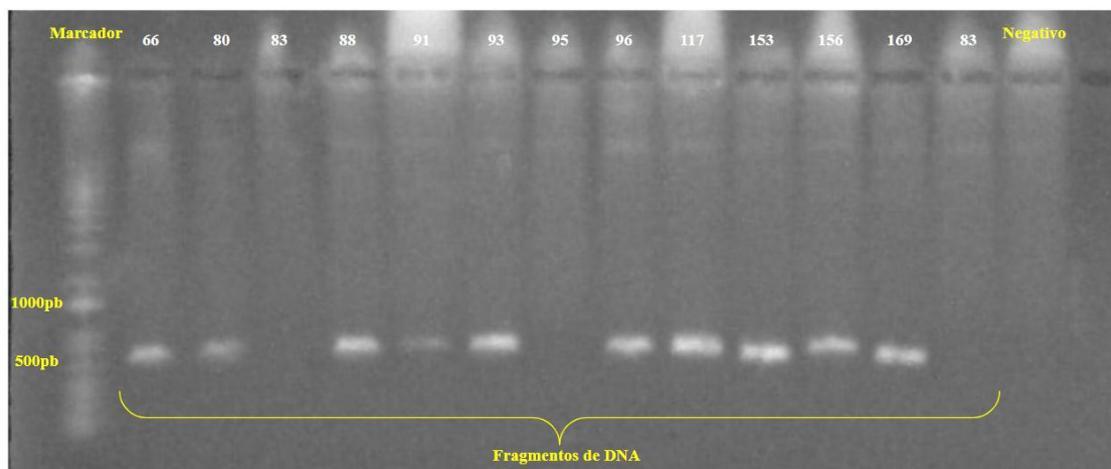
Teste de eficiência		Teste de degradação de hidrocarbonetos	
Consórcio	Códigos das cepas	Consórcio	Códigos das cepas
A.C1	66, 80*, 83, 88	A.C1	66, 80*, 83, 88
A.C2	80*, 83, 88	S.C2	96, 117*, 156
S.C1	93, 95, 169*		
S.C2	96, 117*, 156		

Fonte: elaborado pela autora (2024).

Legenda: * cepas produtoras de biossurfactante

A amplificação do DNA das cepas bacterianas utilizadas nos consórcios foi realizado por meio da PCR usando um par de *primers* universais e o resultado da amplificação está disposto na figura 27.

Figura 27 - Produto da amplificação por PCR de cepas bacterianas utilizadas no teste de eficiência e no teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo



Fonte: elaborada pela autora (2024).

Exceto pelas cepas bacterianas 83 e 95, todas as demais tiveram seu material genético amplificado como mostra o produto da PCR registrado na figura 27. As bandas de DNA ficaram em faixas um pouco acima da banda que corresponde a 500pb, indicando uma correspondência de anelamento com o par de *primers* utilizado nesta pesquisa e que possui 583bp.

A cepa 83 que fez parte dos consórcios A.C1 e A.C2 não teve seu material amplificado com os iniciadores utilizados. Contudo, esses consórcios conseguiram utilizar as fontes de hidrocarbonetos utilizadas no teste de eficiência e no teste de degradação. O consórcio A.C1 foi o que apresentou um melhor desempenho no teste de eficiência quando comparado ao consórcio A.C2 que teve o material genético amplificado de apenas duas das suas três cepas bacterianas.

No consórcio S.C1, duas das três cepas que compõem o consórcio anelaram-se aos iniciadores. Enquanto isso, o DNA de todas as cepas do consórcio S.C2 foi amplificado, sendo este considerado o melhor consórcio no teste de eficiência.

Em relação às cepas 91 e 153, embora não tenham sido utilizadas nos consórcios, ambas apresentaram a capacidade de produzir biossurfactantes conforme o teste do colapso e, apenas por isso, foram extraídos seus materiais genéticos. O DNA dessas cepas conseguiu ser amplificado na PCR.

O par de *primers* utilizado sugerido por Berry e Gutierrez (2017) tem como gene flanqueado uma porção do gene RNA 16S, tendo como produto o RNA ribossomal. Nesse caso, o produto da PCR amplificou regiões relacionadas aos táxons

associados ao grupo de bactérias hidrocarbonoclásticas e, portanto, é possível supor que os isolados bacterianos utilizados nos consórcios A.C1, A.C2, S.C1, S.C2 e as cepas 91 e 153 que tiveram seu DNA amplificado pelos iniciadores sugeridos pelos autores supracitados, fazem parte desse grupo de bactérias que conseguem degradar hidrocarbonetos de petróleo.

A literatura acerca das bactérias hidrocarbonoclásticas traz como principais táxons pertencentes a esse grupo a classe Gammaproteobacteria, sendo esta subdividida em quatro ordens: Cellvibrionales, com bactérias do gênero *Porticoccus*; Nevskiales, com representantes dos gêneros *Algiphilus* e *Polycyclovorans*; Oceanospirillales, gêneros *Alcanivorax*, *Oleibacter*, *Oleiphilus*, *Neptunomonas* e *Thalassolituus*; Thiothrichales, com representantes do gênero *Cycloclasticus*. Além do gênero *Planomicrobium* pertencente a classe Bacilli e da ordem Firmicutes (Yakimov; Bargiela; Golyshin, 2022). Neste ponto, a utilização de iniciadores específicos traria um melhor detalhamento dos isolados utilizados nos consórcios desta pesquisa.

6. CONCLUSÃO

- A partir de uma pré-seleção utilizando uma emulsão de óleo ao meio de cultura, foram isoladas 90 cepas bacterianas (todas gram-negativas) do sedimento submerso marinho da Praia de Icaraí de Amontada e 90 cepas na Praia de Sabiaguaba (59 gram-positivas e 28 gram-negativas).
- De 57 cepas testadas, foram identificadas duas cepas bacterianas produtoras de biosurfactante (BS) na Praia de Icaraí de Amontada ao ser testado o caldo de fermentação, mas não houve resultado para o líquido metabólico. Em relação a Praia de Sabiaguaba, de 59 cepas testadas, cinco apresentaram atividade de produção de BS no caldo de fermentação e duas no líquido metabólico.
- Foi constatado antagonismo negativo entre 23 cepas bacterianas do sedimento marinho da Praia de Icaraí de Amontada e entre 49 das cepas isoladas da Praia de Sabiaguaba.
- Quanto a formação de consórcios livres, foi possível a montagem de 10 consórcios com as cepas isoladas na Praia de Icaraí e 16 consórcios dos isolados da Praia de Sabiaguaba, mas para o teste de eficiência, apenas quatro consórcios foram testados (consórcios A.C1, A.C2, S.C1 e S.C2) e desses, dois (A.C1 e S.C2) foram aplicados nos microcosmos para o teste de degradação de hidrocarbonetos de petróleo.
- Os consórcios bacterianos aplicados no teste de degradação foram capazes de diminuir as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos com cadeias de C8 a C40 em até 97% ao longo de 15 dias de experimento.
- Os consórcios A.C1 e S.C2 foram capazes de baixar as concentrações de *n*-alcanos de 671,95 ppm para 13,59 ppm (97%) e de 154,06 ppm para 88,42 ppm (42%), respectivamente.
- Observou-se um aumento na concentração de *n*-alcanos de baixo peso molecular (BMM) nos microcosmos referentes a ambos os consórcios.
- Um total de 10 cepas bacterianas foram utilizadas nos consórcios (A.C1, A.C2, S.C1 e S.C2) submetidas a extração de DNA utilizando iniciadores que marcam regiões com a existência de táxons relacionados às hidrocarbonoclasticas. Oito cepas tiveram seus materiais genéticos amplificados pelo par de *primers* dando um indicativo de que essas cepas fazem parte do grupo de bactérias

hidrocarbonoclásticas. Portanto, o sequenciamento ou mesmo a utilização de outros iniciadores é crucial para a identificação dessas bactérias.

REFERÊNCIAS

Abbasian, F. *et al.* A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. **Aplic. Bioquímica. Biotecnologia.**, v. 176, p. 1-30, May, 2015. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25935219/>. Access on: Sept 25, 2022.

Abreu, J. O. **Elaboração de consórcios probióticos bacterianos para uso em cultivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*)**. 2019. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Programa de Ciências Marinhas Tropicais, Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/50648>. Acesso em: 02 set. 2023.

Albena, M. T. B. *et al.* Crude Oil Biodegradation by Newly Isolated Bacterial Strains and Their Consortium Under Soil Microcosm Experiment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, pp. 1223-1244, June, 2019. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-019-03058-2#Sec13>. Access on: Out 30, 2023.

Amani, H. Study of enhanced oil recovery by rhamnolipids in a homogeneous 2D micromodel. **J. Pet. Sci. Eng.**, v. 128, p. 212 - 219, 2015. Available in: <https://doi.org.ez11.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.petrol.2015.02.030>. Access on: June 19, 2022.

Antunes, A. A. *et al.* Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/TG7rzzCs5xt7cRJqKJLD66r/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 25 ago. 2021.

Araújo, M. P. *et al.* Assessment of brazilian mangroves hydrocarbon contamination from a latitudinal perspective. **Marine Pollution Bulletin**, v. 150, pp. 110673, Jan. 2020. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110673>. Access on: Aug 20, 2023.

Azevedo, R. N. A. *et al.* Is there a similarity between the 2019 and 2022 oil spills that occurred on the coast of Ceará (Northeast Brazil)? An analysis based on forensic environmental geochemistry. **Environmental Pollution**, v. 134, p. 120283, December 2022. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026974912201497X>. Access on: Aug 26, 2023.

Bacosa, H. P. *et al.* Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil. **The ISME Journal**, v. 12, p. 2532 - 2543, 2018. Available in: <https://www.nature.com/articles/s41396-018-0190-1>. Access on: Sept 29, 2022.

Barron, M. G. *et al.* Long-term ecological impacts from oil spills: comparison of Exxon Valdez, Hebei Spirit, and Deepwater Horizon. **Environ. Sci. Technol.**, v. 54, n. 11, p.

6456 - 6467, 2020. Available in: <https://pubs-acsc.org.ez11.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acs.est.9b05020>. Access on: June 18, 2022.

Berry, D.; Gutierrez, T. Evaluating the detection of hydrocarbon-degrading bacteria in 16S rRNA gene sequencing surveys. **Front Microbiol**, v. 8, pp. 896, May, 2017. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28567035/>. Access on: May 5, 2023.

Bittihn, P. *et al.* Rational engineering of synthetic microbial systems: from single cells to consortia. **Current Opinion in Biotechnology**, v.45, pp. 92-99, 2018. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.009>. Access on: Out 03, 2023.

Bodour, A. A.; Miller-Maier, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701298000311>. Access on: Aug 31, 2022.

Brzeszcz, J., kaszycki, P. Aerobic bacteria degrading both *n*-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. **Biodegradation**, [meio eletrônico], v. 29, pp. 359–407, aug. 2018. Available in: <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9837->. Access on: Sept 20, 2023

Bulbul, M. *et al.* Occurrence, distribution and sources of phthalates and petroleum hydrocarbons in tropical estuarine sediments (Mandovi and Ashtamudi) of western Peninsular India. **Environmental Research**, v, 214, pp. 113679, Nov. 2022. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113679>. Access on: Out 10, 2023.

Canuto, G. A. B. *et al.* M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Quím. Nova**, v. 41, jan. 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/hCJGvVZhZ9Zf4RyskbhgwJf/?lang=pt#>. Acesso em: 04 set. 2021.

Cavalcante, R. M. (Org.). **Contaminantes orgânicos em ambientes aquáticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/55985>. Acesso em: 13 set. 2023.

Chandran, P.; DAS, N. Biosurfactant production and Diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Engineering Science and Technology*, v. 2, p. 6942 - 6953, 2010. Available in: https://www.researchgate.net/profile/Nilanjana-Das/publication/50384241_Biosurfactant_production_and_diesel_oil_degradation_by_yeast_species_Trichosporon_asahii_isolated_from_petroleum_hydrocarbon_contaminated_soil/links/0d_ee531f0a7c2f3ee000000/Biosurfactant-production-and-diesel-oil-degradation-by-yeast-species-Trichosporon-asahii-isolated-from-petroleum-hydrocarbon-contaminated-soil.pdf. Access on: Sept 30, 2022.

Chen, Q. G. *et al.* Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. **Plus One**, v. 12, pp. e0174445, March,

2017. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174445>. Access on: Out 30, 2023.

Chen, W. *et al.* Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 154, pp. 105047, October, 2020. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105047>. Access on: Out 30, 2023.

Dai, X. *et al.* Bioremediation of heavy oil contaminated intertidal zones by immobilized bacterial consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 158, pp. 70 - 78, February, 2022. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.11.038>. Access on: Out 30, 2023.

Das, M.; das, S. K.; mukherjee, R. K. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**, v. 63, p. 231-235, 1998. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852497001338>. Access on: Aug 31, 2022.

Dhabaan, F. A. Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p.1247-1252, September 2019. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.029>. Access on: Sept 27, 2022.

Dias, J. A. **A análise sedimentar e o conhecimento dos sistemas marinhos: uma introdução à oceanografia geológica.** 2004. Universidade do Algarve - Faro. *E-Book* disponível em: http://w3.ualg.pt/~jdias/JAD/eb_Sediment.html. Acesso em: 06 jun. 2023.

Djahnit, N. *et al.* Isolation, characterization and determination of biotechnological potential of oil-degrading bacteria from Algerian centre coast. *Journal of Applied Microbiology*, v. 126, pp. 780-795, December, 2018. Available in: <https://doi.org.ez11.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jam.14185>. Access on: Sept 29, 2022.

Dong, C. *et al.* Hydrocarboniastica marina gen. nov., sp. nov., a marine hydrocarbonoclastic bacterium isolated from an in situ enriched hydrocarbon-degrading consortium in sea sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.69, 01 August 2019. Available in: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003454>. Access on: Sept 29, 2022.

Elumai, P. *et al.* Enzyme-mediated biodegradation of long-chain n-alkanes (C32 and C40) by thermophilic bacteria. **3 Biotech**, v. 7, pp. 1-10, May, 2017. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0773-y>. Access on: Nov 04, 2023.

Engel, A. S.; gupta, A. A. Regime shift in sandy beach microbial communities following *Deepwater Horizon* oil spill remediation efforts. **PLoS ONE**, v. 9, pp. e10293, 2014. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102934>. Access on: Sept 28, 2022

Farias, C. B. B. *et al.* Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic**

Journal of Biotechnology, v. 51, pp. 28-39, May. 2021. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>. Access on: Sept 20, 2023.

Fernandes, G. M. *et al.* Levels, source appointment, and ecological risk of petroleum hydrocarbons in tropical coastal ecosystems (northeast Brazil): Baseline for future monitoring programmes of an oil spill area. **Environmental Pollution**, v. 296, pp. 118709, Mar. 2022. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118709>. Access on: Out 26, 2023.

Fuchs, G.; boll, M.; heider, J. Degradação microbiana de compostos aromáticos de uma estratégia para quatro. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 803 - 816, 2011.

Gadelha, L. G. *et al.* Distribution patterns of aliphatic hydrocarbons in sediments from a tropical estuarine system Mar. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110607, Dec. 2019. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110607>. Access on: Feb 08, 2023.

Ganesan, M. *et al.* Bioremediation by oil degrading marine bacteria: an overview of supplements and pathways in key processes. **Chemosphere**, v. 303, p. 134956, 2022. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134956>. Access on: June 20, 2022.

Gao, Y. *et al.* Characterization of a biosurfactant-producing bacteria isolated from Marine environment: Surface activity, chemical characterization and biodegradation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, Issue 5, pp. 104277, October, 2020. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104277>. Access on: Ouc 24, 2023.

Gao, Y. *et al.* Composition and distribution of aliphatic hydrocarbon compounds and biomarkers in seafloor sediments from offshore of the leizhou peninsula (South China). **ACS Omega**, v. 6, n. 50, pp. 34286–34293, Dec. 2021. Available in: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03529>. Access on: Mar 27, 2023

García-Bautista, I. *et al.* Optimization of the biodegradation of aliphatic, aromatic, and ucm hydrocarbons from light crude oil in marine sediment using response surface methodology (RSM). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 108, pp. 107–113, Jun. 2022. Available in: <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03281-w>. Access on: Mar 15, 2023.

Gauthier, M. J. *et al.* *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, v. 4, October 1992. Available in: [10.1099/00207713-42-4-568](https://doi.org/10.1099/00207713-42-4-568). Access on: Sept 29, 2022.

Gorshkova, N. M. *et al.* *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, pp. 01 November 2003. Available in: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02693-0>. Access on: Sept 29, 2022.

Guo, P. *et al.* Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain

Planococcus sp. XW-1 from the Cold Marine Environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 19, n. 2, pp. 782, 2022. Available in: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/2/782/htm>. Access on: June 18, 2022.

Gupta, P. *et al.* Phylogenetic analysis and biological characteristic tests of marine bacteria isolated from Southern Ocean (Indian sector) water. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 34, pp. 73 - 82, 2015. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13131-015-0709-5>. Access on: Sept 26, 2022.

Gutierrez, T. Occurrence and roles of the obligate hydrocarbonoclastic bacteria in the ocean when there is no obvious hydrocarbon contamination. *In*: MCGENITY, T. (eds). **Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes**. Springer, Cham, pp 337–352, 2019. Available in: https://doi.org/10.1007/978-3-030-14796-9_14. Access on: Aug 20, 2023.

Habib, S. *et al.* Production of lipopeptide biosurfactant by a hydrocarbon-degrading antarctic *Rhodococcus*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, issues, 12, pp. 6138, August, 2020. Available in: <https://doi.org/10.3390/ijms21176138>. Access on: Out 14, 2023.

Harayama, S.; KASAI, Y.; HARA, A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 15, p. 205–214, 2004. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.002>. Access on: June 21, 2022.

Hassan, H. A. *et al.* Isolation and characterization of halophilic aromatic and chloroaromatic degrader from Wadi El-Natron Soda lakes. **Life Sci J**, v. 9, n. 3, pp. 1565 - 1570, 2012. Available in: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84874902530&origin=inward&txGid=9a89f36cb86067c80e996e42f54bab27>. Access on: June 16, 2022.

Hentani, D. *et al.* Investigation of halotolerant marine *Staphylococcus* sp. CO100, as a promising hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacterium, under saline conditions. **Journal of Environmental Management**, v. 277, p. 111480, 2021. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111480>. Access on: June 19, 2022.

Heshka, N. E. Applications of high performance liquid chromatography in the petroleomic analysis of crude oil: a mini-review. **Energy Fuels**, v. 35, n. 22, pp. 18104–18115, Sept. 2021. Available in: <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.1c02091>. Access on: Out 26, 2023.

Hidalgo, K. J. *et al.* Metagenomic Insights Into the Mechanisms for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Oil Supply Chain. **Front. Microbiol**, September, 2020. Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.561506/full>. Acesso em: 25 ago. 2021.

Hopwood, D. A. *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. 1985.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Manchas de óleo: litoral brasileiro. 2020a. Disponível em:

http://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2020/manchasdeoleo/ibama-manchasdeoleo-desmobilizacao-cartilha_v2.pdf. Access on: Aug 10, 2021.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Vistoria em áreas com localidades oleadas no litoral brasileiro nos dias 04/03 a 19/03/2020. 2020b. Disponível em:

http://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2020/manchasdeoleo/2020-03-19_LOCALIDADES_AFETADAS.pdf. Acesso em: 10 ago. 2021.

Junusmin, K. I.; Manurung, B. S.; Darmayati, Y. Bioremediation of oil-contaminated sediment by hydrocarbonoclastic bacterial consortium immobilized in different types of carrier. **AIP Conf. Proc.**, v. 2175, pp. 020056, November, 2019. Available in:

<https://doi.org/10.1063/1.5134620>. Access on: Oct 15, 2023.

Kadri, T. *et al.* Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) por enzimas fúngicas: uma revisão. **J. Ambiente. Sci.**, v. 51, p. 52 - 74, 2017.

Kumar, A. G. *et al.* Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. **Marine Pollution Bulletin**, v. 146, pp. 741-750, September, 2019. Available in:

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.006>. Access on: Oct 25, 2023.

Kuppusamy, S *et al.* Ecological Impacts of Total Petroleum Hydrocarbons. *In*: Kuppusamy *et al.* (Eds). **Total Petroleum Hydrocarbons**. Switzerland: Springer, 2020, pp. 95-138. Available in: https://doi.org/10.1007/978-3-030-24035-6_5. Access on: Sept 15, 2023.

Lagier, J. C. *et al.* Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. **Clin Microbiol Infect.**, v. 18, dez. 2012. Available in:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23033984/>. Access on: Sept 4, 2021. LANE, D. 16S/23S rRNA sequencing and Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, UK (1991), pp. 115- 175.

Lee, D. W. *et al.* Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. **Environmental Pollution**, v. 241, p. 254 - 264, 2018. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.070>. Access on: June 19, 2022.

Lima e Silva, T. A. *et al.* Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, p. 19-26, 2010.

Disponível em:

<http://periodicos.uninove.br/index.php?journal=exacta&page=article&op=view&path%5B%5D=1686&path%5B%5D=1686>. Acesso em: 31 ago. 2022.

Liu, Y. *et al.* Biodegradation of *n*-alkanes in crude oil by three identified bacterial strains. **Fuel**, v. 275, pp. 117897, September, 2020. Available in:

<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117897>. Access on: Nov 07, 2023.

Liu, G. *et al.* Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: a review. **Biotechnol Bioeng.**, v.115, n. 4, p. 796 - 814, 2018. Available in: <https://doi-org.ez11.periodicos.capes.gov.br/10.1002/bit.26517>. Access on: June 20, 2022.

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, July 2020. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X20303374>. Access on: Aug 26, 2021.

Madigan, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

Mahjoubi, M. *et al.* Genomic characterization of a polyvalent hydrocarbonoclastic bacterium *Pseudomonas* sp. strain BUN14. **Sci. Rep.**, v. 11, n. 8124, 2021. Available in: <https://doi-org.ez11.periodicos.capes.gov.br/10.1038/s41598-021-87487-2>. Access on: June 23, 2022.

Mujumdar, S.; joshi, P; karve, N. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: a review. **J. Basic. Microbiol.**, v. 59, n. 3, p. 277 - 287, 2019. Available in: <https://doi-org.ez11.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jobm.201800364>. Access on: June 20, 2022.

Nelson, R. K. *et al.* 8 - applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) in studying the source, transport, and fate of petroleum hydrocarbons in the environment. *In*: STOUT, S. A., WANG, Z. (Eds.). **Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics** (second ed.). Academic Press, pp. 399-448 (2016). Available in: <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00228-3>. Access on: Oct 10, 2023.

Paniagua-Michel, J., Fathepure, B. Z. (2018). Microbial Consortia and Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Marine Environments. *In*: Kumar, V., Kumar, M., Prasad, R. (eds) **Microbial Action on Hydrocarbons**. Springer, Singapore. Available in: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_1. Access on: Oct 10, 2023.

Pashaeri, R. *et al.* The effects of oil spills on ecosystem at the Persian Gulf. **Int. J. Rev. Life. Sci.**, v. 5, n. 3, p. 82 - 89, 2015. Available in: <https://www.researchgate.net/publication/286060949>. Access on: June 16, 2022.

Pinassi, J; Zweifel, U. L.; Hagström, A. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. **ASM Journals**, v. 63, 1997. Available in: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.63.9.3359-3366.1997>. Access on: Oct 10, 2022

Pourfadakari, S.; Ghafari, S.; Takdastan, A.; Jorfi, S. A salt resistant biosurfactant produced by moderately halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* (AHV-KH10) and its application for bioremediation of diesel-contaminated sediment in saline environment. **Biodegradation**, v. 32, p. 327 - 341, 2021. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33860410/>. Access on: June 20, 2022.

Prince, R. C., Walters, C. C. Modern analytical techniques are improving our ability to follow the fate of spilled oil in the environment. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 36, pp. 100787, June. 2022. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.coche.2021.100787>. Access on: May 10, 2023.

Rodrigues, E. M. *et al.* Hydrocarbonoclastic bacterial species growing on hexadecane: Implications for bioaugmentation in marine ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 267, pp. 115579, Dec. 2020. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115579>. Access on: Oct 25, 2023.

Rodrigues, E. M.; Kalks, K. M. H.; Tótola, M. R. Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island, Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 156, June 2015. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479715001462?via%3Dihub> Access on: Aug 20, 2021.

Sanni, G.; Coulon, F.; Mcgenity, T. Dynamics and distribution of bacterial and archaeal communities in oil-contaminated temperate coastal mudflat mesocosms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 15230–15247, 14 April 2015. Access on: Aug 20, 2021. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-4313-1>. Access on: Sept 29, 2022.

Santisi, S. *et al.* Biodegradation ability of two selected microbial autochthonous consortia from a chronically polluted marine coastal area (Priolo Gargallo, Italy). **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, pp. 618-629, March, 2019. Available in: doi:10.1111/jam.14246. Access on: Oct 25, 2023.

Santos, D. K. F. *et al.* Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4813256/#B1-ijms-17-00401>. Access on: Aug 20, 2021.

Sarubbo, L. A. *et al.* Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, pp. 108377, Apr. 2022. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>. Access on: Sept 10, 2023.

Soares, M. O. *et al.* Déjà vu: New oil spill poses cumulative risks to protected coastal environments in the South Atlantic. **Marine Policy**, v. 155, pp. 105764, Sept. 2023. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2023.105764>. Access on: Oct 26, 2023.

Soares, M. O. *et al.* Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, v. 115, May 2020a. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308597X19308346>. Access on: Aug 24, 2021.

Soares, M. O. *et al.* Brazil oil spill response: Time for coordination. **Science**, v. 367,

p. 155, January, 2020b. Available in:

<https://www.science.org/lookup/doi/10.1126/science.aaz9993>. Access on: Aug 26, 2021.

Soto, L. A. *et al.* The environmental legacy of the Ixtoc-I oil spill in Campeche Sound, southwestern Gulf of Mexico. **Front. Mar. Sci.**, 2014. Available in:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2014.00057/full>. Access on: June 18, 2022.

Sun, W. *et al.* Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading *Pseudomonas* sp. CQ2 from Changqing oil field, China. **RSC Adv.**, v. 8, pp. 39710-39720, November, 2018. Available in:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c8ra07721e>. Access on: Oct 24, 2023.

Syakti, A. D. *et al.* Culturable hydrocarbonoclastic marine bacterial isolates from Indonesian seawater in the Lombok Strait and Indian Ocean. **Heliyon**, May 7, 2019.

Available in: [10.1016/j.heliyon.2019.e01594](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01594) Access on: Sept 25, 2021.

Techtmann, S. M.; HAZEN, T. C. Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, out. 2016. Available in:

<https://academic.oup.com/jimb/article/43/10/1345/5995976?login=true>. Access on: Sept 4, 2021.

Tomasino, M. P. *et al.* Diversity and hydrocarbon-degrading potential of deep-sea microbial community from the mid-atlantic ridge, South of the Azores (North Atlantic Ocean). **Microorganisms**, v. 9, issue. 11, pp. 2389, Novembre, 2021. Available in:

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9112389>. Access on: Oct 25, 2023.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 964 p.

Tripathi, V. *et al.* Assessing the half-life and degradation kinetics of aliphatic and aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from crude oil contaminated soil.

Chemosphere, v. 337, pp. 39264, October, 2023. Available in:

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139264>. Access on: Nov 03, 2023.

Truskewycz, A. *et al.* Petroleum Hydrocarbon Contamination in Terrestrial Ecosystems-Fate and Microbial Responses. **Moléculas**, v. 24, pp. 3400, 2019.

Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31546774/>. Access on: Oct 01, 2023.

Türetken, P. S. Ç. Environment variables, composition and metabolic characteristics of culturable sediment bacteria isolated around Gökçeada Island, Aegean Sea, Turkey. **Regional Studies in Marine Science**, v. 42, 2021. Available in:

<https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101613>. Access on: Oct 10, 2022.

Uol. **O mistério do óleo**. (2023). Disponível em:

<https://noticias.uol.com.br/reportagens-especiais/o-misterio-por-tras-dos-vazamentos-de-oleo-no-nordeste-em-2019/#cover>. Acesso em: 18 nov. 2023.

Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **ASM Journals**, [meio eletrônico], v. 67, n. 4, p. 70, dec. 2003. Available in: <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.503-549.2003>. Access on: Sept 20, 2023.

Vanhaecke, P. *et al.* Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 5, pp. 382-387, September 1981. Available in: [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(81\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0147-6513(81)90012-9) Access on: Sept 29, 2022.

Varjani, S. J. *et al.* Synergistic ex - situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from onshore sites of Gujarat, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 103, pp. 116 - 124, September, 2015. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830515001158>. Access on: July 10, 2022.

Varjani, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277 - 286, 2017. Available in: <https://www.sciencedirect.ez11.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0960852416314432#b0005> Access on: June 20, 2022.

Velmurugan, P. *et al.* Marine Bacteria Is the Cell Factory to Produce Bioactive Pigments: A Prospective Pigment Source in the Ocean. **Front. Sustain. Food Syst.**, 26 November 2020. Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2020.589655/full>. Access on: Sept 29, 2022.

Whyte, L. G.; Bourbonniere, L.; Greer, C. W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3719 - 3723, 1997. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9293024/>. Access on: June 21, 2022.

Wilkes, H. *et al.* Metabolismo de hidrocarbonetos em *n*-alcanos utilizando bactérias anaeróbicas. **J. Mol. Microbiol. Biotecnologia**, v. 26, p. 138 - 151, 2016.

Wu, Y. *et al.* Characterization and enhanced degradation potentials of biosurfactant producing bacteria isolated from a marine environment. **ACS Omega**, v. 4, n. 1, pp. 1645 - 1651, 2019. Available in: <https://pubs-acsc.org.ez11.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acsomega.8b02653>. Access on: June 19, 2022.

Yakimov, M. M. *et al.* Marine, aerobic hydrocarbon-degrading *Gammaproteobacteria*: the family *Alcanivoracaceae*. **Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon Degrading Microbes**, p. 167 - 179, 2019. Available in: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-030-14796-9_24?noAccess=true. Access on: June 17, 2022.

Yakimov, M. M.; Bargiela, R.; Golyshin, P. N. Calm and Frenzy: marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria sustain ocean wellness. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 73, pp. 337-345, 2022. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166921001920>. Access on: Jan 10, 2024.

Yang, Z. *et al.* Biodegradation potential assessment by using autochthonous microorganisms from the sediments from Lac Mégantic (Quebec, Canada) contaminated with light residual oil. **Chemosphere**, v. 239, pp. 124796, January, 2020. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124796>. Access on: Oct 30, 2023.

Yoshida, K. *et al.* A novel convenient method for high bacteriophage titer assay. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 53, p. 315-6, 2009. Available in: <https://academic.oup.com/nass/article/53/1/315/1099824>. Access on: Aug 20, 2022.

Zacharias, D. C.; Gama, C. M.; Fornaro, A. Mysterious oil spills on Brazil coast: analysis and estimates. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, 2021. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112125>. Access on: June 16, 2022.

Zenati, B. *et al.* A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 154, p. 100-107, 15 June 2018. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.032>. Access on: Sept 29, 2022.

Zhou, H. *et al.* Enhanced remediation of oil-contaminated intertidal sediment by bacterial consortium of petroleum degraders and biosurfactant producers. **Chemosphere**, v. 330, pp. 38763, July, 2023. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138763>. Access on: Oct 30, 2023.

APÊNDICE A

Resultado ANOVA Teste *Post-Hoc* de Bonferroni (diferença de médias) entre os pontos de amostragem da Praia de Icarai de Amontada

Pares	Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite Superior
Ponto 1 Ponto 2	-5573333,33333*	992773,89168	,004	-8837032,9834	-2309633,6833
Ponto 1 Ponto 3	-7360000,00000*	992773,89168	,001	-10623699,6500	-4096300,3500
Ponto 2 Ponto 1	5573333,33333*	992773,89168	,004	2309633,6833	8837032,9834
Ponto 2 Ponto 3	-1786666,66667	992773,89168	,366	-5050366,3167	1477032,9834
Ponto 3 Ponto 1	7360000,00000*	992773,89168	,001	4096300,3500	10623699,6500
Ponto 3 Ponto 2	1786666,66667	992773,89168	,366	-1477032,9834	5050366,3167

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

APÊNDICE B

Resultado Teste de Tamhane (diferença de médias) entre os pontos de amostragem da Praia de Sabiaguaba

Pares	Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite Superior
Ponto 1 Ponto 2	-11166666,66667*	1147945,02385	,004	-16269009,6986	-6064323,6348
Ponto 1 Ponto 3	-240200000,00000*	51319554,42779	,001	-2790971530,5205	-2013028469,4795
Ponto 2 Ponto 1	11166666,66667*	1147945,02385	,004	6064323,6348	16269009,6986
Ponto 2 Ponto 3	-2390833333,33333*	51325313,22630	,001	-2779598032,1056	-2002068634,5611
Ponto 3 Ponto 1	-2390833333,33333*	51319554,42779	,001	2013028469,4795	2790971530,5205
Ponto 3 Ponto 2	2390833333,33333*	51325313,22630	,001	2002068634,5611	2779598032,1056

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.