

Capítulo XV

*Biotransformação de HPA em óleo cru vazado em uma
praia do litoral pernambucano*



BIOTRANSFORMAÇÃO DE HPA EM ÓLEO CRU VAZADO EM UMA PRAIA DO LITORAL PERNAMBUCANO

Andrwey Galvão Viana¹, Diogo Bernardes Dias², Ulrich Vasconcelos³

¹ Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil, (andrwey-viana@hotmail.com); ² Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia (COPPE), Rio de Janeiro-RJ, Brasil, (diogosimasbd@gmail.com); ³ Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil, (u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br)

RESUMO

Acidentes com óleo cru representam ameaça à saúde e ao ambiente em razão do grau de recalcitrância dos hidrocarbonetos presentes. Este trabalho teve por objetivo, verificar a redução dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) de amostras de areia de praia contaminada por óleo cru no litoral de Pernambuco em 2019, utilizando o bioaumento alóctone, em escala laboratorial, com *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04. Foram preparados microcosmos contendo areia fina pasteurizada, misturada com areia contaminada (razão 1:4), adicionada do inóculo (razão inóculo:solo; 1:10; 1:100; 1:1000). Após a mistura, cupons de dolamita (100 mm²) foram encravados na subsuperfície para quantificação do biofilme. O ensaio durou 21 dias à 29±°C. As perdas abióticas foram conhecidas em microcosmo mantido esterilizado com AgNO₃ 10% (m/v). A quantificação do biofilme foi realizada pela técnica do cristal violeta. Os HPAs foram consumidos entre 38 e 56%, preferencialmente aqueles com mais de 4 anéis e a melhor condição foi 1:100. A preferência por estes HPAs foi igual em todas as condições. Já HPAs com até 3 anéis a degradação foi em até 37%. A população de células no biofilme aumentou 4 unidades log acima do inóculo. Os resultados indicaram que o bioaumento alóctone é uma estratégia importante para a desintoxicação desse solo.

Palavras-chave: Biorremediação; Biodegradação; Biofilme; *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUÇÃO

A dependência por combustíveis fósseis é imperativa na sociedade moderna e infelizmente com ela, grandes vazamentos ainda são uma triste e dramática realidade (SILVA *et al.*, 2021). Durante quase dez meses entre 2019 e 2020, registrou-se o vazamento de toneladas de óleo cru numa faixa cerca de 3000 Km da costa brasileira

Biotransformation of PAH in crude oil spilled in a pernambucan beach

ABSTRACT

Crude oil accidents threat health and the environment due to the degree of recalcitrance of the hydrocarbons present. This work aimed to verify the reduction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in samples of beach sand contaminated by crude oil on the coast of Pernambuco in 2019, using allochthonous bioaugmentation, on a laboratory scale, with *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04. Microcosms were prepared containing pasteurized fine sand and beach sand contaminated with heavy crude oil (1:4), added to the microcosms at a ratio of 1:10; 1:100 and 1:1000. A 100 mm² dolomite coupons were engraved to count the biofilm. The assay longed three weeks. Abiotic losses were provided with AgNO₃ 10% (w/v). the formed biofilm was counted by crystal violet test. HPAs were reduced by ≈38 and 56% and 4-6 ring HPAs were preferentially degraded (≈ 90% in all conditions), and the highest rates of degradation, however, were observed under the 1:100. The 2-3 ring HPAs were removed by up to ≈33%. Cells increased 4 log units in colonized biofilms. Results shown that allochthonous bioaugmentation is a strategy of interest in the detoxification of this soil.

Keywords: Bioremediation; Biodegradation; Biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*.

(ARAÚJO *et al.*, 2021; LESSA *et al.*, 2021) e este acidente é considerado o maior da história do Brasil e do Atlântico Sul (ESTEVO *et al.*, 2021; PENA *et al.*, 2020).

A exposição aos hidrocarbonetos no solo promove alteração da razão C:N:P, bem como mudanças drásticas na microbiota autóctone (SARKAR *et al.*, 2016) e uma comunidade hidrocarbonoclástica se torna dominante em seguida (TERAMOTO *et al.*, 2013). As zonas

costeiras são áreas muito frágeis (DISNER & TORRES, 2020) e uma intervenção emergencial pode exigir a inoculação de alta densidade celular de organismos hidrocarbonoclasticos competentes quando a população autóctone não está capaz de manter uma degradação eficiente do contaminante (BRZESZCZ *et al.*, 2020).

O bioaumentação é baseado na sobrevivência e manutenção da atividade catabólica do inoculante frente aos hidrocarbonetos de petróleo (NOWAK & MROZIK, 2016), sendo muito efetiva nos estágios iniciais do processo (WOŹNIAK-KARCZEWSKA *et al.*, 2019). Por sua constituição, bactérias Gram-negativas são mais promissoras em termos de tratamento por bioaumentação (ABENA *et al.*, 2019) e *Pseudomonas aeruginosa* se destaca (OJEWUMI *et al.*, 2018) por ser espécie-chave na desintoxicação do solo (HUANG *et al.*, 2021), bem como por exibir versatilidade fisiológica e metabólica (ZHAO *et al.*, 2018).

Baseado no fato da sensibilidade da área afetada e do papel ecológico da *Pseudomonas aeruginosa* este trabalho teve por objetivo avaliar a remoção de HPAs por bioaumentação autóctone utilizando uma linhagem isolada e de interesse de nosso grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Solo e contaminante

A areia da praia contaminada com o óleo cru foi coletada na faixa litorânea do município de Tamandaré (Pernambuco, Brasil), por representantes da Secretaria de Meio Ambiente, em recipientes apropriados e transportados em caixas térmicas até o laboratório. O material foi misturado com areia fina de praia, isenta de contaminação por hidrocarbonetos, previamente pasteurizada à 60°C. As amostras de solo foram caracterizadas empregando seguintes metodologias: carbono orgânico total (USEPA, 2004), nitrogênio total (USEPA, 1993), fósforo total (USEPA, 1978), hidrocarbonetos totais do petróleo, TPH (USEPA, 1992), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPA (USEPA, 1996) e granulometria (ISO 13320:2009).

Pseudomonas aeruginosa TGC0

A linhagem foi originalmente obtida de solo de posto de gasolina e está registrada no cadastro brasileiro de patrimônio genético e conhecimento associado (#A404D65). Para a aclimatação ao contaminante, foi preparada uma suspensão da linhagem em NaCl 0,85%, com turbidez padronizada em 0,4 a 600 nm (CAWLEY *et al.*, 2019) e 1 mL da suspensão foi transferido para 100 mL de meio mineral mínimo (DEL'ARCO & FRANÇA, 2001), adicionado com 1% de areia contaminada (m/v). O sistema foi incubado sob agitação de 150 rpm, à 29 ± 1°C por 5-7 dias. Com a emulsificação do óleo, nova alíquota de 1 mL foi transferida para novo frasco até atingir 10% (w/v).

Pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado com adaptações à estratégia descrita por INNEMANOVA *et al.* (2018). Inicialmente, 100 g da areia de praia foram pasteurizadas à 60°C por 30 minutos (FRANCO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2003). Após, misturou-se o bagaço de malte de cevada (suplemento) 0,5% (m/m) à areia contaminada e 5 mL do inóculo ($\approx 10^4$ UFC/mL). A incubação foi à 29±1°C por 10 dias com umidade mantida cerca de 20%, corrigido com água destilada esterilizada. Ao final dos dez dias, a densidade celular (CFU/g) aumentou duas unidades logarítmicas.

Ensaio do bioaumentação autóctone

Foram preparados microcosmos com capacidade para 400 mL, preenchidos com 200 g de areia, distribuídos em duas camadas: 50 g de areia fina como base, completados com 150 g de areia de praia contaminada com o óleo cru (SUNDARAM *et al.*, 2013). Em seguida, porções do pré-inóculo foram transferidas para os microcosmos e misturadas novamente (razão inóculo:soil 1:10; 1:100 e 1:1000). Os microcosmos foram incubados à 29°C por 21 dias e as concentrações residuárias dos HPAs foram determinadas. As perdas abióticas foram conhecidas em microcosmo contendo a mesma quantidade de solo, mantido esterilizado pela adição de solução de nitrato de prata 10% m/m (VASUDEVAN & RAJARAM, 2001).

Ensaio microbianos

A quantificação celular foi realizada por *pour plate* e expressada em UFC/g. Cupons de dolamita de 100 mm² foram encravados na subsuperfície dos microcosmos para quantificação do biofilme pelo teste do cristal violeta e os resultados expressos em expressa em UFC/g/mm² (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2010).

Tratamento estatístico

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e de forma randômica. Os resultados estão expressos como a média±desvio padrão. Para a verificação da distribuição normal dos dados, os valores foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk. A homocedasticidade foi testada e checada pelo teste de Levene e quando os dados não seguiam distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Conover, ajustado pelo teste de Hochberg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela I resume a caracterização dos solos. A concentração de 10 HPAs da lista holandesa era de 52,62 mg/Kg, indicando a necessidade de intervenção, porque não pode exceder 40 mg/Kg em solos naturais (NEDERLAND, 2007). Além disso, o solo era pobre em fósforo e a razão C:N bastante alterada do padrão natural. Sendo assim, a suplementação com o bagaço de malte de cevada foi importante para garantir o crescimento do inóculo.

Tabela I. Caracterização das amostras de solo de praia.

Parâmetros	Solos		Referência
	Areia	Areia fina	
	contaminada		
Carbono Orgânico total (%)	25976	0,74	USEPA 9060
Nitrogênio Total (mg/Kg)	35,2	31,8	USEPA 315.2
Fósforo Total (mg/Kg)	<1	3,04	USEPA 365.3
Argila (%)	0,80	0,99	ISO 13320:
Silte (%)	6,40	1,29	2009
Areia grossa (%)	60,10	1,86	
Areia fina (%)	32,70	95,86	
Σ 16 HPAs (mg/Kg)	75,83	---	USEPA 8270
Σ HPA com 2-3 anéis (mg/Kg)	36,41	---	
Σ HPA com 4-6 anéis (mg/Kg)	39,42	---	
Σ HPA da lista holandesa*	57,62	---	

* valor de intervenção quando > 40 mg/Kg de solo (NEDERLAND, 2007)

A razão C:N:P inicial nos microcosmos no

momento da inoculação com *P. aeruginosa* TGC04 era de 100: 0,1:0,003. Após três semanas verificou-se uma redução entre ≈38 e 56% dos 16 USEPA HPAs nas três razões testadas, sendo observado o consumo preferencial por HPAs com 4 a 6 anéis (≈80-89%, p=0,02). Benzo[a]fluoranteno foi o HPA menos assimilado. Os demais foram degradados, com destaque para criseno e pireno.

Já os HPAs com 2 e 3 anéis, o tamanho do inóculo foi importante na remoção entre ≈15 e 34% (p=0,01) desses hidrocarbonetos. Os mais prevalentes eram fenantreno, fluoreno e antraceno, e praticamente foram todos removidos. Por outro lado, naftaleno não foi transformado, sugestivo de que não estava biodisponível (Tabela II). A condição 1:100 demonstrou as maiores taxas de remoção diária dos 16 HPAs, levados pelos HPAs com 4-6 anéis, como observado na Tabela III.

Tabela II. Percentual de redução dos hidrocarbonetos (p = 0,02).

Tratamentos	Σ 16 HPAs	Σ HPAs 2-3 anéis	Σ HPAs 4-6 anéis
1:10	38,4±0,1	15,6±0,1	89,1±0,1
1:100	56,4±0,1	33,5±0,1	89,1±0,1
1:1000	50,7±0,1	23,7±0,1	89,0±0,1

Tabela III. Taxa de remoção diária dos HPAs (p= 0,01).

Tratamentos	Taxa de degradação (±0.10 mg/Kg)		
	Σ 16 HPAs	Σ HPAs 2-3 anéis	Σ HPAs 4-6 anéis
1:10	1,82	0,74	4,24
1:100	2,69	1,60	4,24
1:1000	2,41	1,13	4,23

As perdas abióticas representaram 10% para os HPAs e o valor foi descontado em todos os resultados apresentados. Isto indicou que *P. aeruginosa* TGC04 esteve viável durante o processo e que a bactéria utilizou artifícios para se manter no meio, como colonizar em biofilmes. Ambas as populações de *P. aeruginosa* TGC04 no solo e nos cupons de dolamita após três semanas eram de ≈10⁵ CFU/g de solo e ≈10⁸ CFU/g/mm², respectivamente, não tendo sido alteradas possivelmente por estarem em fase estacionária (Tabela 4), porém expostas aos contaminantes, as células presentes no solo se mantiveram como inoculadas, possivelmente pelos efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos.

Por outro lado, o crescimento do biofilme

depende de ferro presente no meio e compostos redox ativos produzidos pela *P. aeruginosa*, como a piocianina, auxiliam na biodisponibilidade de Fe^{2+} (McROSE *et al.*, 2023). Ferro ocorre em zonas costeiras e o metal age como barreira retendo e acumulando fósforo (CHARETTE & SHOLKOVITZ, 2002). Além disso, o conteúdo de calcáreo da areia auxilia no depósito e transporte do ferro, proporcionando um cenário em que é possível a sobrevivência microbiana nestes sítios. Ressalta-se que um estudo o local do acidente possui um conteúdo do ferro por volta de 5000 mg/Kg (MIRLEAN *et al.*, 2013).

O potencial hidrocarbonoclástico bem como o uso de *P. aeruginosa* na biorremediação de solos contaminados por óleo é muito difundido (SUWARDI *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2019). O aumento da matéria orgânica no solo causada pelos hidrocarbonetos desequilibra o teor de nutrientes e as novas gerações de bactérias hidrocarbonoclásticas podem ser impedidas de crescer, proporcionando um cenário que possibilita a intervenção emergencial por bioaumento (LEYS *et al.*, 2005).

Para evitar a competitividade natural, novos modelos de bioaumento podem minimizar limitações do processo (FERNANDEZ *et al.*, 2019) e algumas estratégias adotadas, como o bioaumento alóctone garantem bons resultados (CHEN *et al.*, 2019), como demonstrado por este estudo, quando o bioaumento não é indicado para tratamentos prolongados, porém é mais efetivo se aplicado na fase inicial e mais crítica da intervenção (WOŹNIAK-KARCZEWSKA *et al.*, 2019). Nestas condições, os HPA podem ser removidos em até 75% dentro de 30 a 100 dias (CAVALCANTI *et al.*, 2019). Assim, baseado no fato de que a linhagem *P. aeruginosa* TGC04 removeu mais de 80% dos HPA com 4-6 anéis em 21 dias, conclui-se que a seleção do agente é vital para um tratamento bem-sucedido. BRZESZCZ *et al.* (2020) observaram uma redução de quase 87% do óleo, atribuindo o resultado ao potencial hidrocarbonoclástico de *P. aeruginosa*, bem como sua persistência às condições hostis.

Na literatura há exemplo de que a bactéria apresenta os requisitos cruciais em termos de catabolismo de óleo sendo disparadamente promissora em triagens de linhagens hidrocarbonoclásticas (CHIKERE & FENIBO,

2018). ILORI & AMUND (2000) a descreveram como a única a degradar 13 hidrocarbonetos relativo a 4 espécies investigadas. MITTAL & SINGH (2009) observaram que 4 linhagens de *P. aeruginosa* degradaram 20% de compostos aromáticos em 60 dias numa triagem com 20 isolados. Já NORMAN *et al.* (2004) apresentaram o fato da bactéria adicionada poder alterar a composição da diversidade microbiana natural, tratamentos como cultura axênica de *P. aeruginosa* produzem resultados não menos efetivos que culturas mistas.

Tabela IV. Quantificação da população final de *Pseudomonas aeruginosa* TGC04 (inóculo \approx 104 UFC/mL).

Tratamentos	Solo (UFCx10 ⁴ /g)	Biofilme (UFCx10 ⁷ /mm ²)	Razão solo:biofilme
1:10	36±2	31±2	1: 860
1:100	33±2	35±2	1: 1060
1:1000	89±4	39±2	1: 438

No presente estudo foi observada uma alta taxa de degradação diária dos HPAs pela *P. aeruginosa* TGC04. Isto possivelmente ocorreu em função do inóculo ter se mantido por mais tempo na fase de crescimento estacionária porque é capaz de utilizar diferentes vias metabólicas alternativas (FRIMMERSDORF *et al.*, 2010). KARAMALIDIS *et al.* (2010), ao contrário do nosso estudo, observaram preferência por HPAs com 3 anéis e só a partir do 21º dia os demais HPAs começaram a ser degradados. Por outro lado, SALAM *et al.* (2011) verificaram que duas linhagens de *P. aeruginosa* degradaram 90-92% de diferentes hidrocarbonetos em 21 dias, demonstrando mais afinidade ao pireno e ao óleo cru, registrando uma taxa de remoção diária de 4,32 a 4,38%, valores aproximados ao visto neste estudo com HPAs com 4-6 anéis.

A degradação de moléculas mais recalcitrantes, tais como HPAs com 4-6 anéis ocorre via cometabolismo. Exemplos na literatura podem ilustrar esta afirmação: SAWULSKI *et al.* (2015) observaram que em 20 dias, a assimilação de fenantreno contribuiu para a remoção do fluoranteno. Da mesma forma, benzo[a]pireno foi removido na presença de HPAs de 4 anéis. SILVA *et al.* (2009) observaram que após 12 semanas, pireno participou da remoção de HPAs com mais de 5 anéis.

Por outro lado, embora naftaleno, antraceno e fenantreno tenham sido mais removidos que HPAs

com 4-6 anéis (valores não apresentados), verificou-se concentrações residuais do naftaleno. Mesmo parecendo contraditório, deve-se isto ao fato de o naftaleno ter ficado menos biodisponível, seja em razão da massa de óleo encrustada nos aglomerados, seja porque muitos HPAs exibem taxas de biodegradação decrescente, resultando por vezes, concentrações remanescentes elevadas (HUNG *et al.*, 2011).

Embora a contaminação por hidrocarbonetos recalcitrantes é um evento de alta complexidade e a pluralidade química do óleo cru torna o desafio ainda maior, este trabalho testemunhou o fato de *P. aeruginosa* TGC04 alcançar bons resultados, reduzindo significativamente moléculas com baixa disponibilidade em um tempo menor que estudos prévios a este, abrindo novas frentes de investigações.

CONCLUSÃO

P. aeruginosa TGC04 exibe elevado potencial biorremediador de sistemas de solo poluídos com óleo cru e embora os resultados deste estudo não possam prever o desempenho em campo, indicam que o bioaumento alóctone é uma abordagem a ser considerada em intervenções emergenciais em zonas costeiras.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar seu agradecimento à Universidade Federal da Paraíba pelo suporte financeiro a este projeto (Chamada Interna Produtividade em Pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB nº 03/2020, processo # PVI13656-2020).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENA, M.T.B.; LI, T.; SHAH, M.N.; ZHONG, W. 2019. Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. *Chemosphere*, 234: 864-874.
- ARAÚJO, K.C.; BARRETO, M.C.; SIQUEIRA, A.S.; FREITAS, A.C.P.; OLIVEIRA, L.G.; BASTOS, M.E.P.A.; ROCHA, M.E.P.; SILVA, L.A.; FRAGOSO, W.D. 2020. Oil spill in northeastern Brazil: Application of fluorescence spectroscopy and PARAFAC in the analysis of oil-related compounds. *Chemosphere*, 267: 129154. (doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129154).
- BALASUBRAMANIAN, V.; NATARAJAN, K.; HEMAMBIKA, B.; RAMESH, N.; SUMATHI, C.S.; KOTTAIMUTHU, R.; RAJASH, K.V. 2010. High-density polyethylene (HDPE) degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Letters in Applied Microbiology*, 51: 205-211.
- BRZESZCZ, J.; KAPUSTA, P.; STELIGA, T.; TURKIEWICZ, A. 2020. Hydrocarbon removal by two differently developed microbial inoculants and comparing their actions with biostimulation treatment. *Molecules*, 25: 661. (doi: 10.3390/molecules25030661).
- CAVALCANTI, T.G.; SOUZA, A.F.; FERREIRA, G.F.; DIAS, D.S.B.; SEVERINO, L.S.; MORAIS, J.P.S.; SOUSA, K.A.; VASCONCELOS, U. 2019. Use of agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. *Waste and Biomass Valorization*, 10(1): 205-214.
- CAWLEY, A.; GOLDING, S.; GOULSBRA, A.; HOPTROFF, M.; KUMARAN, S.; MARRIOTT, R. 2019. Microbiology insights into boosting salivary defenses through the use of enzymes and proteins. *Journal of Dentistry*, 80(1): S19-S25.
- CHARENTE, M.A.; SHOLKOVITZ, E.R. 2002. Oxidative precipitation of groundwater-derived ferrous iron in the subterranean estuary of a coastal bay. *Geophysics Research Letter*, 29(10): 1444. (doi: 10.1029/2001GL014512).
- CHEN, Y.-A.; LIU, P.-W.G.; WHANG, L.-M.; WU, Y.-J.; CHENG, S.-S. 2019. Biodegradability and microbial community investigation for soil contaminated with diesel blending with biodiesel. *Process Safety Environment Protection*, 130: 115-125.
- CHIKERE, C.B.; FENIBO, E.O. 2018. Distribution of HPA-ring hydroxylating dioxygenase genes in bacteria isolated from two illegal oil refining sites in the Niger Delta, Nigeria. *Scientific African*, 1: e00003. (doi: 10.1016/j.sciaf.2018.e00003).
- DEL'ARCO, J.P.; DE FRANÇA, F.P. 2001. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon in sandy sediment. *Environmental Pollution*, 110(3): 515-519.
- DISNER, G.R.; TORRES, M. 2020. The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, 7(15): 241-255.
- ESTEVO, M.A.; LOPES, P.F.M.; OLIVEIRA Jr, J.G.C.; JUNQUEIRA, A.B.; SANTOS, A.P.O.; LIMA, J.A.S.; MALHADO, A.C.M.; LADLE, R.J.; CAMPOS-SILVA, J.V. 2021. Immediate social and economic impacts of a major oil spill on Brazilian coastal fishing communities. *Marine Pollution Bulletin*, 164:111984. (doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.111984).
- FERNANDEZ, M.; PEREIRA, P.P.; AGOSTINI, E.; GONZÁLEZ, O.S. 2019. How the bacterial community of a tannery effluent responds to bioaugmentation with the consortium SFC 500-1. Impact of environmental variables. *Journal of Environmental Management*, 247: 46-56.

- FRANCO-HERNÁNDEZ, O.; McKELLIGAN-GONZALEZ, A.N.; LOPEZ-OLGUIN, A.M.; ESPINOSA-CERON, F.; ESCAMILLA-SILVA, E.; DENDOOVEN, L. 2003. Dynamics of carbon, nitrogen and phosphorus in soil amended with irradiated, pasteurized and limed biosolids. *Bioresource Technology*, 87: 93-102.
- FRIMMERSDORF, E.; HORATZEK, S.; PELNIKEVICH, A.; WIEHLMANN, L.; SCHOMBURG, D. 2010. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiology*, 12(6): 1734-1747.
- HUANG, Y.; HE, Z.; XU, L.; YANG, B.; HOU, Y.; LEI, L.; LI, Z. 2021. Alternating current enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *Environmental Science Pollution Research*, 28: 47562-47573.
- HUNG, J.-M.; LIU, H.-C.; HWU, C.-S.; H.-C.; LAI, T.H.-Y.; LU, C.-J. 2011. Bioavailability evaluation of naphthalene in soil using persulfate oxidation and ultrasonic extraction method. *Journal of Environmental Biology*, 32: 277-282
- ILORI, M.O.N., AMUND, D-I. 2000. Degradation of anthracene by bacteria isolated from oil polluted tropical soils. *Zeitschrift fur Naturforschung C – Journal of Biosciences*, 55(11-12): 890-897.
- INNEMANOVÁ, P.; FILIPOVÁ, A.; MICHALÍKOVÁ, K.; WIMMEROVÁ, L.; CAJTHAML, T. 2018. Bioaugmentation of HPA-contaminated soils: A novel procedure for introduction of bacterial degraders into contaminated soil. *Ecological Engineering*, 118: 93-96.
- ISO 13320:2009, Particle size analysis — Laser diffraction methods.
- KARAMALIDIS, A.K.; EVANGELOU, A.C.; KARABIKA, E.; KOUKKOU, A.I.; DRAINAS, C.; VOUDRIAS, E.A. 2010. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. *Bioresource Technology*, 101: 6545-6552.
- LESSA, G.C.; TEIXEIRA, C.E.P.; PEREIRA, J.; SANTOS, F.M. 2021. The 2019 Brazilian oil spill: Insights on the physics behind the drift. *Journal of Marine Systems*, 222: 103586. (doi: 10.1016/j.jmarsys.2021.103586).
- LEYS, N.M.; BASTIENS, L.; VERSTRAETE, W.; SPRINGAEL, D. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ration on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied and Environmental Biotechnology*, 66(6): 726-736
- McROSE, D.L.; LIA, J.; NEWMAN, D.K. 2023. The chemical ecology of coumarins and phenazines affects iron acquisition by pseudomonads. *PNAS*. 120(14): 2217951120. (doi: 10.1073/pnas.2217951120).
- MIRLEAN, N.; GARCIA, F.; BAISCH, P.; QUINTANA, G.C.; AGNES, F. 2013. Sandy beaches contamination by arsenic, a result of near shore sediment diagenesis and transport (Brazilian coastline). *Estuarine Coastal Shelf Science*, 135: 241-247.
- MITTAL, A.; SINGH, P. 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 760-765.
- NEDERLAND. Ministerie van Volkshuisvesting Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer. 2007. *Soil Protection Act*. 36p.
- NORMAN, R.S.; MOELLER, P.; MCDONALD, T.J.; MORRIS, P.J. 2004. Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7): 4004-4011.
- NOWAK, A.; MROZIK, A. 2016. Facilitation of co-metabolic transformation and degradation of monochlorophenols by *Pseudomonas* sp. CF600 and changes in its fatty acid composition. *Water Air Soil Pollution*, 227: 83. (doi: 10.1007/s11270-016-2775-5).
- OJEWUMI, M.E.; OKENIYI, J.O.; IKOTUN, J.O.; OKENIYI, E.T.; EJEMEN, V.A.; POPOOLA, A.P.I. 2018. Bioremediation: Data on *Pseudomonas aeruginosa* effects on the bioremediation of crude oil polluted soil Author links open overlay panel. *Data in Brief*, 19(1): 101-113.
- PENA, P.G.L.; NORTHROSS, A.L.; LIMA, M.A.G.; RÊGO, R.C.F. 2020. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public health emergency. *Reports in Public Health*, 36(2): e00231019. (doi: 10.1590/0102-311X00231019).
- SALAM, L.B.; OBAYORI, O.S.; AKASHORO, O.S.; OKOGIE, G.O. 2011. Biodegradation of bonny light crude oil by bacteria isolated from contaminated soil. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13: 245-250.
- SARKAR, J.; KAZY, S.K.; GUPTA, A.; DUTTA, A.; MOHAPATRA, B.; ROY, A.; BERA, P.; MITRA, A.; SAR, P. 2016. Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Frontiers of Microbiology*, 7:01407. (doi:10.3389/fmicb.2016.01407).
- SAWULSKI, P.; BOOTS, B.; CLIPSON, N.; DOYLE, E. 2015. Differential degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by indigenous microbial assemblages in soil. *Letters in Applied Microbiology*, 61: 199-207.
- SILVA, E.S.; PRAGANA, L.G.; VASCONCELOS, U. 2021. Photooxidation vs biodegradation: A short review on fate of heavy hydrocarbons after oil spill in sea water. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 11(5): 8-17.
- SILVA, I.S.; SANTOS, E.C.; MENEZES, C.R.; FARIA, A.F.; FRANCISCON, E.; GROSSMAN, M.; DURRANT, L.R. 2009. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, 100: 4669-4675.
- SUNDARAM, S.; DAS, M.T.; THAKUR, I.S. 2013. Biodegradation of cypermethrin by *Bacillus* sp. in soil microcosm and in-vitro toxicity evaluation on human cell line. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77: 39-44.

- SUWARDI, A.; RATNANINGSIH, R.; RINANTI, A. 2021. Bioremediation of petroleum hydrocarbon by mixed bacteria culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacterium* sp. *Material Science and Engineering*, 1098: 052036. (doi: 10.1088/1757-899X/1098/5/052036).
- TERAMOTO, M.; QUECK, S.Y.; OHNISHI, K. 2013. Specialized hydrocarbonoclastic bacteria prevailing in seawater around a port in the Strait of Malacca. *Plos One*, 8(6): 66594. (doi:10.1371/journal.pone.0066594).
- USEPA. 1978. Method 365.3. Phosphorus, all forms (colorimetric, ascorbic acid, two reagents), United States Environmental Protection Agency.
- USEPA. 1992(?). Method 8015. Nonhalogenated Volatile Organics, United States Environmental Protection Agency.
- USEPA. 1993. Method 315.2. Determination of total Kjeldahl nitrogen by semi-automatic colorimetric, United States Environmental Protection Agency.
- USEPA. 1996. Method 8270. Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, United States Environmental Protection Agency.
- USEPA. 1996. Method 9060. Total Organic Carbon, United States Environmental Protection Agency.
- VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. 2001. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International*, 26(5-6): 409-411.
- WOŹNIAK-KARCZEWSKA, M.; LISIECKI, P.; BIAŁAS, W.; OWSIANIAK, M.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; WOLKO, Ł.; ŁAWNICZAK, Ł.; HEIPIEPER, H.J.; GUTIERREZ, T.; CHRZANOWSKI, Ł. 2019. Effect of bioaugmentation on long-term biodegradation of diesel/biodiesel blends in soil microcosms. *Science of the Total Environment*, 671: 948-958.
- WU, M.; WU, J.; ZHANG, X.; YE, X. 2019. Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. *Chemosphere*, 237:124456. (doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124456).
- ZHAO, F.; LI, P.; GUO, C.; SHI, R.-J.; ZHANG, Y. 2018. Bioaugmentation of oil reservoir indigenous *Pseudomonas aeruginosa* to enhance oil recovery through in-situ biosurfactant production without air injection. *Bioresource Technology*, 251: 295-302.

Impressão e Acabamento:FGEL - Faculdade de Geologia, UERJ - Universidade Estadual do Rio de Janeiro
Setembro de 2024

Capa: triplex 250g/ Miolo: couchet brilho 115g/ Tipologia: Adobe Garamond