



**TECNOLOGIA
BARREIRO**

ESCOLA SUPERIOR
POLITÉCNICO SETÚBAL

KARINA
MENDONÇA
SANTOS

**ESTUDO DO EFEITO DE
SURFACTANTE NAS TAXAS DE
BIORREMEDIAÇÃO REALIZADAS
POR MICRORGANISMOS OBTIDOS
EM AMOSTRAS DE SOLO NO
CONCELHO DO BARREIRO.**

Relatório de Dissertação de Pesquisa do
Mestrado em Engenharia Biológica e Química

ORIENTADORAS

Doutora Ana Cláudia Cavaco Sousa Coelho
Doutora Maria de Fátima Nunes Serralha

Dezembro, 2023

KARINA
MENDONÇA
SANTOS

**ESTUDO DO EFEITO DE
SURFACTANTE NAS TAXAS DE
BIORREMEDIAÇÃO REALIZADAS
POR MICRORGANISMOS OBTIDOS
EM AMOSTRAS DE SOLO NO
CONCELHO DO BARREIRO.**

JÚRI

*Presidente: Doutora Maria de Lurdes de Figueiredo
Gameiro, ESTBarreiro/IPS*

*Orientadora: Doutora Ana Cláudia Cavaco de Sousa
Coelho, ESTBarreiro/IPS*

*Vogal: Doutor, Antonio Leon-Vaz, Universidade de
Huelva*

Dezembro, 2023

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Durante o período de elaboração desta tese, pude contar com o apoio e dedicação de professores, familiares e amigos.

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a minha mãe, Cássia Ap. S. Mendonça dos Santos, ao meu pai, Airton Ferreira dos Santos e a minha irmã Karen Mendonça por todo apoio emocional e suporte dado durante esta fase, me ajudando a passar por esta jornada da melhor forma possível. Dedico este trabalho a vocês.

Gostaria de agradecer as minhas orientadoras de tese Professoras Cláudia Coelho PhD e Fátima Serralha PhD por todo apoio e dedicação durante esta jornada e principalmente, por todo conhecimento que adquiri durante este processo. Os meus agradecimentos sinceros a todos os docentes da Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, que lecionaram durante o mestrado de aquisição.

Aos meus colegas José Roberto Padilla Torres, que além de colega de classe, se tornou um grande e querido amigo, Jamilly Braga Santos pelo acolhimento durante a fase inicial ao mestrado e pela amizade formada na fase de aquisição e a Íris Sorriany, responsável por me impulsionar a iniciar o curso e estar ao meu lado durante tantos anos de amizade. Obrigada por fazerem parte desta realização.

E por fim, gostaria de agradecer a mim, por ter coragem, determinação e resiliência, para iniciar projetos e finalizá-los de forma dedicada e sempre acreditando no meu potencial.

RESUMO

A contaminação por compostos orgânicos representa um desafio significativo para a preservação dos ecossistemas. Essas substâncias são, maioritariamente, provenientes de combustíveis fósseis e são amplamente utilizadas no setor industrial. Devido à ampla utilização destes derivados do petróleo no passado e à sua eliminação inadequada, verificou-se a contaminação de água e solo em várias regiões do mundo. Esta situação pode resultar em prejuízos ambientais e para a saúde humana. Assim, atualmente, decorrem vários estudos com o propósito de avaliar e, se possível, corrigir os danos provocados. A biorremediação tem se destacado como uma forma limpa (denominada técnica verde) e promissora para a remediação de áreas contaminadas, pois faz uso de organismos vivos para degradar os contaminantes. Neste mesmo contexto, o uso de surfactante tem despertado interesse como uma ferramenta eficaz e que acelera a biorremediação de hidrocarbonetos.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar processos biodegradativos e realizar a comparação dos resultados de biorremediação com a utilização de surfactante. Os organismos hidrocarbonoclásticos foram obtidos em amostras de solo de duas praias fluviais: a praia de Palhais e a Praia de Copacabana. Ambas interditas a zona de banhos e localizadas no concelho do Barreiro, na região da Margem Sul do estuário do rio Tejo.

Os microrganismos hidrocarbonoclásticos foram selecionados por crescimento em meio seletivo Bushnell-Haas (BH). As taxas de crescimento dos microrganismos na presença dos poluentes hexano e gasolina, como única fonte de carbono, permitiram comparar a capacidade de biodegradar estes compostos nos dois locais de amostragem.

A caracterização morfológica e bioquímica dos microrganismos foi realizada através da metodologia de Gram e crescimento em meio seletivo para identificação de *Pseudomonas*. Como resultado, as colónias obtidas revelaram-se ser Gram-Negativas e Gram-Positivas na Praia de Palhais e somente Gram-Negativas na Praia de Copacabana. O crescimento em meio seletivo permitiu concluir que em ambos os locais existem *Pseudomonas aeruginosas*.

O estudo da biodegradabilidade foi determinado utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), na presença e na ausência do emulsificante Tween 80. O resultado obtido nesta análise aponta que as taxas de biorremediação para Praia de Palhais foram de 23,81% para hexano e 35,03% para a gasolina e Praia Fluvial de Copacabana, foram de 27,05% e 34,25%, para o hexano e gasolina, respetivamente.

Em todas as amostras as taxas de biorremediação, observada na presença do surfactante, conduziu a um aumento entre 21 e 51%. A significância dos resultados obtidos foi analisada pelo teste t de Student, para 8 graus de liberdade.

Portanto, pode-se concluir que a adição de hexano e gasolina, num meio sem outra fonte de carbono, permite o crescimento de microrganismos hidrocarbonoclásticos, e que a adição de emulsificante aumenta a taxa de biodegradação.

Palavras-chave: Microrganismos hidrocarbonoclásticos, *Pseudomonas aeruginosa*, Biorremediação, DCPIP, Tween 80.

ABSTRACT

Contamination by organic compounds represents a significant challenge for the preservation of ecosystems. These substances mostly come from fossil fuels and are widely used in the industrial sector. Due to the widespread use of these petroleum derivatives in the past and their inadequate disposal, water and soil contamination has occurred in several regions of the world. This situation can result in damage to the environment and human health. Therefore, several studies are currently underway with the purpose of evaluating and, if possible, correcting the damage caused. Bioremediation has stood out as a clean (called green technique) and promising way to remediate contaminated areas, as it uses living organisms to degrade contaminants. In this same context, the use of surfactant has aroused interest as an effective tool that accelerates the bioremeasurement of hydrocarbons.

Therefore, the present work aims to investigate biodegradative processes and compare the results of bioremediation with the use of surfactant. Hydrocarbonoclastic organisms were obtained in soil samples from two river beaches: Palhais Beach and Copacabana Beach. Both bathing areas are prohibited and located in the municipality of Barreiro, in the South Bank region of the Tagus River estuary.

Hydrocarbonoclastic microorganisms were selected by growth on Bushnell-Haas (BH) selective medium. The growth rates of microorganisms in the presence of the pollutants hexane and gasoline, as the only carbon source, made it possible to compare the capacity to biodegrade these compounds in the two sampling locations.

The morphological and biochemical characterization of microorganisms was carried out using the Gram methodology and growth on selective medium to identify *Pseudomonas*. As a result, the colonies obtained turned out to be Gram-Negative and Gram-Positive on Palhais Beach and only Gram-Negative on Copacabana Beach. Growth on selective media allowed us to conclude that there are *Pseudomonas aeruginosas* in both locations.

The biodegradability study was determined using the redox indicator 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP), in the presence and absence of the emulsifier Tween 80. The result obtained in this analysis indicates that the bioremediation rates for Praia de Palhais were 23.81% for hexane and 35.03% for gasoline and Praia Fluvial de Copacabana, they were 27.05% and 34.25%, for hexane and gasoline, respectively.

In all samples, bioremediation rates, observed in the presence of surfactant, led to an increase between 21 and 51%. The significance of the results obtained was analyzed using Student's t test, for 8 degrees of freedom.

Therefore, it can be concluded that the addition of hexane and gasoline, in a medium without another carbon source, allows the growth of hydrocarbonoclastic microorganisms, and that the addition of emulsifier increases the rate of biodegradation.

Keywords: Hydrocarbonoclastic microorganisms, *Pseudomonas aeruginosa*, Bioremediation, DCPIP, Tween 80.

1. ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Contaminação por Hidrocarbonetos e suas fontes.....	3
2.2. Impacto Ambiental e na Saúde	4
2.3. Hidrocarbonetos	4
2.3.1. Gasolina	6
2.3.2. Hexano.....	6
2.4. Técnicas de Biorremediação.....	7
2.5. Microrganismos utilizados na Biorremediação	10
2.5.1. Fatores que afetam a biorremediação microbiana	13
2.5.2. Fatores biológicos	13
2.5.3. Fatores abióticos ou ambientais	14
2.6. Estudos sobre Biorremediação Bacteriana	14
2.7. Caracterização Morfológica de bactérias	17
2.8. Métodos colorimétricos	20
2.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.10. Utilização de surfactantes e biossurfactantes e seus efeitos.....	22
2.11. Escolha do local de análise de biorremediação do presente relatório	23
3. METODOLOGIA.....	26
3.1. Amostragem – Local de recolha	26
3.2. Amostragem	28
3.2.1. Preparação do local e recolha da amostra.....	29
3.2.2. Medição do pH da amostra.....	29
3.2.3. Conservação da amostra.....	29
3.3. Seleção dos organismos hidrocarbonoclásticos.....	29
3.4. Crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos	30
3.5. Análise meio líquido no espectrofotómetro	31

3.6. Crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos em meio sólido.....	32
3.7. Identificação dos microrganismos.....	32
3.8 Coloração Gram – Caracterização dos microrganismos	32
3.9 . identificação de Pseudomonas	34
3.10. Estudo de Biodegradabilidade	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
4.1. Caracterização das amostras	37
4.2. Crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos em meio líquido.....	37
4.3 Seleção e Caracterização morfológica dos organismos.....	40
4.4 Coloração de Gram	43
4.5. Identificação de Pseudomonas	45
4.6. Estudo da Biodegradabilidade	46
4.6.1. Praia de Palhais	47
4.6.2. Praia de Copacabana.....	48
4.6.3. Análise dos resultados obtidos no estudo de biodegradação.....	49
5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES FUTURAS.....	51
6. BIBLIOGRAFIA.....	54
7. ANEXOS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégias de remediação mais utilizadas, tanto in situ como ex situ. Fonte: RIZZO et al., 2006.	9
Figura 2 - Curva normal de crescimento bacteriano (Nascimento, 2010)	16
Figura 3 - Diversidade da morfologia bacteriana: 1. cocos, 2. bacilos, 3. vírgula, 4. espirilo, 5. espiroqueta, 5. estrela, 7. quadrada, 8. Cocobacilo - Fonte: Nascimento, 2010.	18
Figura 4 -Classificação do tamanho das colónias bacterianas. Adaptado Badieyan, 2018.	18
Figura 5 – Classificação de características das colónias bacterianas – Adaptado Câmara, 2013.	19
Figura 6 - Representação da ação dos reagentes utilizados na coloração de Gram. (Rotker,2023).	20
Figura 7 - Exemplos de lâminas de cocos e bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos (Rotker, 2023).	21
Figura 8 - Localização do Município do Barreiro. Fonte: Instituto Politécnico de Setubal.	23
Figura 9 - Fluxograma do processo experimental.	26
Figura 10 - Local de recolha através do Google Maps. a) Praia de Palhais – Localização: 38.6247° N, 9.0534° W.	27
Figura 11 – Local de recolha através do Google Maps. B) Praia Fluvial de Copacabana. Localização: 38°38'31.7"N 9°03'51.6"W	27
Figura 12 - Coloração Gram procedimento – (Nascimento, 2010)	33
Figura 13 - Ordem de adição das substâncias aos eppendorfs no estudo da biodegradabilidade – análise DCPIP.	36
Figura 14 - Ordem de adição das substâncias aos eppendorfs no estudo da biodegradabilidade – análise com surfactante.	36
Figura 15 - Curva de crescimento utilizando poluentes Hexano e Gasolina – Praia de Palhais.	38
Figura 16 - Curva de crescimento utilizando poluentes Hexano e Gasolina - Praia de Copacabana.	38
Figura 17 - Crescimento específico na amostra Palhais, poluente Hexano.	39
Figura 18 - Análise Palhais - Hexano	40
Figura 19 - Análise Palhais – Gasolina.	41
Figura 20 - Amostra Solo Praia de Copacabana - Hexano.	41
Figura 21 - Amostra Solo Praia de Copacabana - Gasolina.	41
Figura 22 - Análise dos microrganismos após processo de centrifugação.	42
Figura 23 - Amostra solo Palhais - Poluente Hexano.	43
Figura 24 - Amostra solo Praia de Copacabana - Poluente Hexano	44
Figura 25 - Amostra solo Palhais - Poluente Gasolina.	44
Figura 26 - Amostra solo Praia de Copacabana - Poluente Gasolina.	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Estudo Hidrocarbonetos. Realizado por Karina Mendonça, 2023.	5
Tabela 2 - Técnicas utilizadas no estudo de biorremediação. Estudo realizado por Karina Mendonça, 2023.....	7
Tabela 3 – Microrganismos usados em estudos de biorremediação. Estudo realizado por Karina Mendonça, 2023.....	11
Tabela 4 - Materiais utilizados na recolha da amostra e primeiras análises.	28
Tabela 5 - Composição dos eppendorfs sem surfactante.	35
Tabela 6 - Composição dos eppendorfs sem surfactante - (teste em branco).....	35
Tabela 7 - Estudo de biodegradabilidade com surfactante - eppendorf de análise.....	35
Tabela 8 - Dados dos locais de recolha das amostras.	37
Tabela 9 - Dados obtidos referente à D.O. máxima e respetiva hora, tempo de duração da fase log e Taxa de crescimento específica.....	39
Tabela 10 - Caracterização morfológica das colónias do tipo 1 e 2.....	43
Tabela 11 - Identificação microrganismos local de amostragem Praia de Palhais.	45
Tabela 12 - Identificação microrganismos local de amostragem Praia de Copacabana.	46
Tabela 13 - Resultados obtidos no estudo de Biodegradação Praia de Palhais.....	47
Tabela 14 - Resultados obtidos no estudo de Biodegradação Praia de Palhais com surfactante.....	48
Tabela 15 - Resultados obtidos no estudo de Biodegradação Praia de Copacabana.	48
Tabela 16 - Resultados obtidos no estudo de Biodegradação com surfactante.	49

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BH Bushnell-Haas

D.O Densidade Ótica

DCPIP 2,6 diclorofenolindofenol

LB Luria- Bertani

P. aeruginosa *Pseudomonas aeruginosa*

Rpm Rotação por minuto

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental proveniente de produtos petrolíferos, como gasolina, diesel e petróleo bruto, tem despertado uma atenção generalizada para questões ecológicas (Jimoh e Lin, 2019). A libertação desses poluentes no meio ambiente gera ameaças contínuas à saúde humana e animal, devido à sua natureza persistente e perigosa, propensa a desencadear efeitos de bioacumulação e bioamplificação nas cadeias alimentares (Rahman, 2003; Langworthy, 2002; Yadav, 2016). De facto, a presença de hidrocarbonetos derivados do petróleo no meio ambiente tem sido associada a uma variedade de efeitos adversos, incluindo efeitos tóxicos, mutagénicos e cancerígenos (Ambust et al., 2021). Sendo a depleção de oxigénio e de água e a disponibilidade limitada de nitrogénio, fósforo e ferro as principais alterações identificadas nos solos (Nogueira et al., 2011).

Para fazer frente à poluição causada por hidrocarbonetos derivados do petróleo, os investigadores têm explorado métodos físicos, químicos e biológicos como ferramentas eficazes no tratamento de áreas contaminadas (Befkadu e Chen, 2018). Entre esses métodos, a biorremediação, processo que envolve a remoção, degradação ou neutralização de poluentes existentes no meio ambiente por meio da utilização de organismos vivos, destaca-se como uma abordagem versátil e vantajosa. Além de ser económica e simples, a biorremediação é conhecida pela sua eficiência, não invasividade e respeito pelo meio ambiente, oferecendo uma solução sustentável e aplicável em diversas situações (Smutek et al., 2020).

A biorremediação engloba diferentes tecnologias, cada uma com características específicas. A fitorremediação, por exemplo, utiliza plantas para remover, degradar ou isolar contaminantes. Este método abrange diversas técnicas, como a rizodegradação, onde microrganismos nas raízes das plantas decompõem os poluentes (Ambust et al., 2021); a fitoextração, que envolve a absorção de contaminantes pelas plantas; a fitovolatilização, onde as plantas transformam substâncias poluentes em formas voláteis; a fitodegradação, que é a degradação de poluentes pela atividade enzimática das plantas; e a filtração da rizosfera e estabilização da rizosfera, que referem-se à capacidade das plantas de filtrar e estabilizar contaminantes no solo ao redor das suas raízes (Benaissa, 2019; Kumar et al., 2015; Glick, 2012).

Esta diversidade de técnicas proporciona soluções holísticas e adaptáveis para lidar com a complexidade dos desafios associados à contaminação ambiental. Não obstante a relevância de outras abordagens, estudos destacam que a biorremediação microbiana, que emprega microrganismos como bactérias, fungos e microalgas, demonstra ser mais eficaz na conversão de poluentes em formas menos tóxicas e

móveis, bem como na mineralização de hidrocarbonetos, transformando-os em H₂O, CO₂ e biomassa microbiana (Imam et al., 2019). Entre os microrganismos, as bactérias

são reconhecidas como os principais agentes de degradação de hidrocarbonetos (Abena et al., 2019). Essa eficácia decorre da capacidade adaptativa dos microrganismos ao longo do tempo, evoluindo para utilizar compostos potencialmente nocivos, como a sua principal fonte de carbono e energia, aumentando a sua taxa de sobrevivência (Azri et al., 2018).

Em ambientes contaminados com hidrocarbonetos, a capacidade de síntese de surfactantes confere uma vantagem competitiva para os organismos capazes de usar estes compostos como fonte de carbono. A dualidade estrutural dos surfactantes, que combina partes hidrofílicas (afinidade por água) e hidrofóbicas (repelência à água), confere a capacidade de interagir eficazmente com interfaces entre fases imiscíveis, como a interface óleo-água em ambientes contaminados com hidrocarbonetos (Santos et al., 2016). Estes compostos contribuem para a remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos por meio de dois mecanismos distintos. O primeiro processo envolve o aumento da biodisponibilidade do substrato para o microrganismo, enquanto o segundo envolve a interação da superfície da célula bacteriana com o substrato hidrofóbico, aumentando assim a hidrofobicidade (Ambust et al., 2021).

Prosseguindo numa sequência de investigações sobre biorremediação, utilizando o meio ambiente local como fonte de microrganismos, este projeto tem como objetivo aprofundar o estudo do efeito dos surfactantes nas taxas de biorremediação e contribuir para o conhecimento e desenvolvimento de estratégias de remediação em áreas contaminadas por produtos petrolíferos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONTAMINAÇÃO POR HIDROCARBONETOS E SUAS FONTES

Os hidrocarbonetos são formados principalmente a partir de fósseis de plantas e animais como resultado de atividades naturais ou humanas. São compostos formados por átomos de carbono e hidrogénio, constituindo a base do petróleo, gás natural e carvão. Altamente combustíveis, geram dióxido de carbono, água e calor durante a combustão. Assim, os hidrocarbonetos destacam-se pela sua eficácia como fonte de combustível, desempenhando um papel significativo na produção global de energia (Kebede et al., 2021). Quanto à sua estrutura química, os hidrocarbonetos presentes no petróleo são divididos em saturados (de cadeia linear e ramificada), aromáticos (mono e policíclicos), resinas (moléculas complexas, contendo carbono, hidrogénio e, ocasionalmente, pequenas quantidades de oxigénio, nitrogénio e enxofre e incluem as piridinas, quinolinas, carbazóis, sulfóxidos e amidas) e asfaltenos (moléculas grandes e complexas, contendo carbono, hidrogénio, oxigénio, nitrogénio e enxofre, que incluem os fenóis, ácidos gordos, cetonas, ésteres e porfirinas) (Koshlaf et al., 2017). Os constituintes do petróleo podem apresentar-se em três estados físicos distintos, sólido, líquido e gasoso. A uma temperatura muito baixa, alguns componentes, como os asfaltenos, podem precipitar, assumindo um estado sólido. Em condições normais de temperatura e pressão, a maioria do petróleo encontra-se no estado líquido, com resinas e a maioria dos hidrocarbonetos mantendo-se nesse estado. Por fim, em situações de altas temperaturas ou baixas pressões, certos hidrocarbonetos mais leves podem existir no estado gasoso. Esta diversidade de estados físicos contribui para a complexidade do petróleo, afetando o seu comportamento em várias condições ambientais (Liu et al., 2019).

Por muitos anos, hidrocarbonetos e seus derivados foram intencionalmente ou acidentalmente libertados no meio ambiente, principalmente no solo e nos oceanos. As principais fontes de poluição são atividades humanas (antrópicas) e processos naturais, tais como a atividade vulcânica. A atividade humana está associada ao atual aumento da industrialização e da civilização e geralmente contribui para o aumento de poluentes de hidrocarbonetos no meio ambiente. Assim, as fontes são postos de abastecimento de combustíveis, mineração, resíduos químicos e petroquímicos, resíduos agrícolas, combustão incompleta de matéria orgânica, resíduos de lodo, gaseificação, exaustão e processamento de automóveis, manufatura, transporte, escoamento de calçadas, asfalto, destilação de madeira, eliminação de resíduos, emissões e a sua utilização como combustível fóssil (Zafra et al. 2016). A maioria dos ambientes poluídos por hidrocarbonetos contém derivados leves do petróleo (petróleo, gasolina, querosene e diesel), hidrocarbonetos pesados (lubrificantes ambientais, óleo pesado e petróleo

bruto), solventes halogenados e outras moléculas mais complexas (hidrocarbonetos aromáticos) (Titah et al., 2021).

A complexidade na limpeza de um ambiente contaminado por hidrocarbonetos está relacionada com a capacidade de identificar as potenciais fontes, tanto pontuais quanto não pontuais. Portanto, isolar os hidrocarbonetos poluentes e identificar a origem são passos cruciais para a aplicação das técnicas de biorremediação adequadas.

2.2. IMPACTO AMBIENTAL E NA SAÚDE

A poluição por hidrocarbonetos é um exemplo global que levanta preocupações com os animais, o meio ambiente e a saúde humana. Nos últimos anos, a possibilidade de poluição por hidrocarbonetos tornou-se uma questão de crescente preocupação. Estudos têm mostrado que os hidrocarbonetos podem ter impactos negativos e significativos nos ecossistemas (Ayed et al., 2015). Assim, a poluição por hidrocarbonetos degrada o desempenho dos ecossistemas e os seus componentes bióticos e abióticos (Essabri, et al., 2015). Além disso, quando os hidrocarbonetos penetram no solo, interferem com o fornecimento de água, nutrientes, oxigénio, luz e outros agentes essenciais aos processos biológicos. Esta interferência pode afetar a fertilidade do solo (crescimento das plantas e germinação das sementes) e, conseqüentemente, a produtividade agrícola (Varjani e Upasani, 2021).

Além desses efeitos imediatos, os contaminantes persistentes desencadeiam consequências latentes, como mutações genéticas, imunotoxicidade, teratogenicidade, carcinogénese, elevado potencial de bioacumulação e degradação do funcionamento do ecossistema, impactando a vida animal e vegetal (Prathyusha et al., 2016). A forma xenobiótica dos hidrocarbonetos também pode sorver para solos e sedimentos ricos em matéria orgânica, acumular-se em organismos (peixes, plantas e outros organismos aquáticos) e pode ser transferida para a cadeia alimentar e perturbar gravemente os organismos expostos (Singh e Haritash, 2019). A bioacumulação e biomagnificação de hidrocarbonetos causam defeitos nos estágios reprodutivo, imunológico, neurológico e de desenvolvimento (teratogénico) e também câncer de pele, pulmão, bexiga, fígado e gastrointestinal (Pattabhiramaiah et al., 2018). Além disso, a poluição por óleo e sua toxicidade reduzem a riqueza, simbiose e diversidade de espécies, resultando na presença de comunidades em ambientes de solo contaminado (Clarkson e Abubakar, 2015). Portanto, os hidrocarbonetos são conhecidos por causar grandes danos ao meio ambiente e aos organismos vivos. Devido a este e outros problemas complexos de poluição, os microrganismos foram isolados e selecionados como agentes de remediação ambiental para melhorar a remoção de poluentes e, assim, criar um ambiente saudável.

2.3. HIDROCARBONETOS

Como mencionado acima, os principais componentes poluentes do petróleo bruto são os compostos orgânicos mais simples, constituídos por apenas dois elementos, carbono e hidrogénio, chamados de hidrocarbonetos. O processamento primário do petróleo envolve a separação por destilação em uma série de diferentes frações que são caracterizadas por diferentes faixas de temperatura e pressão. Além da destilação,

vários processos de refinação são usados para melhorar a produção de determinados produtos. Com base no número de átomos de carbono na molécula, os destilados de petróleo podem ser divididos em três categorias: gasolina (12 átomos de carbono), destilado médio (9-20 átomos de carbono) e óleo combustível pesado (mais de 1 átomos de carbono) (Agência de Proteção Ambiental dos EUA, 2008). O estudo presente neste relatório foi feito através de dois principais poluentes: gasolina e hexano.

Ao longo dos anos foram realizados muitos estudos de biorremediação, utilizando uma grande variedade de hidrocarbonetos. A Tabela 1, indica as referências de 29 estudos encontrados pela na plataforma Web of Science, com o operador “e” as palavras chave biorremediação, biossurfactante, hidrocarbonetos, solo”. O primeiro ponto de corte utilizado foram estudos atuais selecionando referências apenas dos últimos 15 anos. Os artigos foram analisados de acordo com o conteúdo e detalhes de informações e estes selecionados foram os que possuíam informações completas sobre as condições de estudo e microrganismos. Ao analisar as investigações anteriores, foi possível aprofundar o conhecimento dos mecanismos subjacentes à biorremediação de hidrocarbonetos, o que indicou a prevalência de biorremediação bacteriana, numa grande variedade de condições ambientais.

Permitiu ainda identificar a necessidade de se efetuarem mais estudos *in situ*, em condições de estudos de caso, para avaliar os impactos ambientais e os aspetos de segurança associados à biorremediação em condições reais.

Tabela 1 - Estudo Hidrocarbonetos. Realizado por Karina Mendonça, 2023.

Poluente	Condições do estudo	Referência
Hidrocarbonetos Petróleo	<i>Ex situ</i>	Santos et al. 2021
		Rufino et al., 2012
		Sáenz-Marta et al 2015.
		Gidudu et al., 2020
		Silva et al., 2021
		Ambust et al., 2021
		Ángeles e Refugio, 2013
		Martins et al., 2021
		Alvarado et al., 2022
		Zhao et al., 2022
		Zhang e Zhang, 2022
		Wang et al., 2007
	<i>In situ</i> - biostimulação	Auti et al., 2019
		Wang et al., 2022
		Ramdass e Rampersad, 2021
		Chen et al., 2021
		Dell' Anno et al., 2021
		Auti et al., 2019
		Truskewycz et al., 2019
		Li et al., 2022
		Wolinska et al., 2018
		Yuting et al., 2009
		Grigiskis et al., 2015

Poluente	Condições do estudo	Referência
Benzeno	<i>Ex situ</i>	Junyuan e Xiaoying, 2021
	<i>In situ</i> - biostimulação	Dias, 2007
Naftaleno	<i>Ex situ</i>	Cheffi et al., 2020
N-hexadecano	<i>Ex situ</i>	Ghafari et al., 2019
Octano	<i>In situ</i> - biostimulação	Ibrahim et al., 2013
	<i>Ex situ</i>	Moldes et al., 2013

2.3.1. Gasolina

A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, obtida principalmente a partir do petróleo bruto por meio de processos de refinação. A sua composição exata pode variar, mas geralmente consiste em hidrocarbonetos saturados, como alcanos (parafinas), hidrocarbonetos insaturados, como alcenos (olefinas), e hidrocarbonetos aromáticos. Apresenta uma baixa concentração de compostos oxigenados, principalmente de anéis aromáticos e baixas concentrações de compostos de enxofre, nitrogénio e minerais (Streva et al., 2011; Pereira et al., 2005).

Na União Europeia (UE), a gasolina é uma substância única no inventário da Agência dos Produtos Químicos Europeia (ECHA) e é identificada pelo número de registo do *Chemical Abstract Service* (CAS) "86290-81-5", pelo nome CAS "Gasolina" e pela definição CAS "Uma combinação complexa de hidrocarbonetos constituída principalmente por parafinas, cicloparafinas, e hidrocarbonetos aromáticos e olefínicos com números de carbono predominantemente superiores a C3 e com ponto de ebulição na faixa de 30 a 260 °C (86 a 500°F)".

O número CAS é uma designação única atribuída a substâncias químicas, compostos ou ligas, visando proporcionar uma referência exclusiva para essas substâncias em bases de dados e literatura científica. Isso implica que, apesar da gasolina ter uma composição variável, há uma consistência na produção e comercialização, facilitada pela identificação inequívoca proporcionada pelo número CAS (Swick et al., 2014).

2.3.2. Hexano

O hexano é um composto com a fórmula química C_6H_{14} que vem do petróleo bruto e do gás natural como subproduto do petróleo bruto. O hexano é um líquido claro e incolor com um odor semelhante ao do petróleo e que faz parte da composição da gasolina. Menos denso e insolúvel em água. Este composto apresenta vários compostos, sendo o n-hexano o que apresenta a cadeia linear, os isómeros correspondem a arranjos distintos dos átomos de carbono e hidrogénio na molécula linear de hexano, originando propriedades físicas e químicas específicas para cada um deles. Os isómeros do n-hexano são altamente não reativos, e são frequentemente usados como solvente inerte em reações orgânicas. São também componentes comuns da gasolina.

Apesar da presença do n-hexano e dos seus isómeros representar diferentes graus de risco (Agência de Proteção Ambiental dos EUA, 2008), de acordo com a classificação e

rotulagem harmonizada (CLP00) aprovada pela União Europeia, o hexano pode ser fatal se ingerido, é tóxica para a vida aquática com efeitos de longa duração.

2.4. TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é um processo que utiliza a capacidade de redução, degradação e/ou eliminação de poluentes presentes nos ecossistemas marinhos e terrestres, minimizando assim os riscos para a saúde humana, e restaurando o retorno do ecossistema ao seu estado natural (Gkorezis et al., 2016). Os princípios básicos da biorremediação envolvem a redução da solubilidade desses contaminantes ambientais através da alteração do pH, das reações redox e da adsorção de contaminantes do ambiente poluído. (Ojuederie et al, 2017). O sucesso desta tecnologia depende da natureza química poluentes, que podem ser hidrocarbonetos, compostos orgânicos persistentes tais como como policlorados bifenilos (PCBs) e dioxinas, metais pesados, pesticidas, gases de efeito estufa e resíduos nucleares (Azubuike et al, 2016). Dependendo de onde é aplicada, podem ser classificadas como *ex situ* (envolverem a remoção física da matriz contaminada para o processo de tratamento) ou *in situ* (envolvem o tratamento do material contaminado no local com a menor perturbação possível). A escolha correta da metodologia, provém de algumas variáveis, como o tipo de poluente, grau de poluição e geologia da área contaminada (hidrologia, e composição e textura do solo) (Azubuike et al, 2016).

Na Tabela 2 encontram-se sistematizados alguns estudos de acordo com as técnicas utilizadas.

Tabela 2 - Técnicas utilizadas no estudo de biorremediação. Estudo realizado por Karina Mendonça, 2023

Condições do estudo	Variação da taxa de bioremediação	Referência
<i>In situ</i> - biostimulação	65,10%	Ibrahim et al., 2013
	89,70%	Chen et al., 2021
	16,00 %	Grigiškis et al., 2015
	5,1% - 52%	Wang et al., 2022
	75,72%	Dias, 2007
	24% - 63%	Ramdass e Rampersad, 2021
	12% a 20%	Yuting et al., 2009
	—	Dell' Anno et al., 2021
		Auti et al., 2019
		Auti et al., 2019
<i>In situ</i> - atenuação natural / bioestimulação	—	Truskewycz et al., 2019
		Li et al., 2022
		Wolinska et al., 2018
<i>Ex situ</i>	66,20%	Moldes et al., 2013
	22,10%	Ghafari et al., 2019
	57,00%	Santos et al. 2021
	96%	Rufino et al., 2012
	4,39%	Gidudu et al., 2020
	55%	Silva et al., 2021
	43%	Ambust et al., 2021
	40,50%	Ángeles e Refugio, 2013
	55,00%	Alvarado et al., 2022

Condições do estudo	Variação da taxa de bioremediação	Referência
Ex Situ	98,80%	Cheffi et al., 2020
	3,75%	Junyuan e Xiaoying, 2021
	7% a 35%	Zhao et al., 2022
	—	Wang et al., 2007
		Martins et al., 2021
		Zhang e Zhang, 2022
		Sáenz-Marta et al 2015.

Em cada uma das abordagens, seja *ex situ* ou *in situ*, são implementadas estratégias distintas para a biorremediação. Na abordagem *ex situ*, destacam-se técnicas como as biopilhas, o *landfarming* e os biorreatores. As biopilhas envolvem a criação de pilhas controladas de material contaminado, que são regularmente remexidas para criar passagens de ar essencial para a ventilação e respiração microbiana. O *landfarming* consiste na remoção do solo contaminado para uma área preparada, onde é tratado e devolvido ao local original. Também designado por métodos de biorremediação agrícola são simples de projetar e de implementar, podem ser usados para tratar grandes quantidades de terra contaminada com mínimo impacto ambiental e reduzidos requisitos de energia (Castro et al., 2012; Maila et al., 2004). Os biorreatores são sistemas fechados que permitem o controle preciso de condições ambientais para otimizar as reações de biorremediação. A flexibilidade no design do biorreator permite a biodegradação máxima, minimizando as perdas abióticas (Mohan et al., 2004).

As técnicas aplicadas *ex situ*, são naturalmente mais dispendiosas do que as *in situ* (Folch et al., 2013), mas permitem a implementação de outros sistemas de controlo, tais como o aquecimento que ao ser integrado no projeto da biopilha permite aumentar as atividades microbianas e a disponibilidade de contaminantes, aumentando assim a taxa de biodegradação (Aislabie et al., 2006; Gomez et al., 2014; Sanscartier al., 2019). Outro caso particular é a compostagem, uma técnica de biorremediação que consiste em rotacionar periodicamente o solo poluído e facilitar a biorremediação, pois aumenta a degradação microbiana de hidrocarbonoclasticos nativos e transitórios presentes no solo poluído. A rotação do solo poluído ajuda na aeração com adição de água, distribuição de nutrientes, poluentes e atividades microbianas, elevando a taxa de biorremediação. Em comparação com o tratamento em biopilha, apresenta uma maior taxa de remoção de hidrocarbonetos (Coulon et al., 2016). Porém, a rotação periódica não é o melhor método para implementar na biorremediação de solo poluído com compostos voláteis tóxicos. Esta forma de tratamento tem sido associada à libertação de gases de efeito estufa (CH₄) devido à formação de zona anaeróbia dentro do solo poluído empilhado, que frequentemente reduz a aeração (Hobson et al., 2005).

Por outro lado, na abordagem *in situ*, destacam-se técnicas como a atenuação natural, fitorremediação, bioventilação e bioasping (Figura 1). A atenuação natural, também designada por bioatenuação, biorremediação intrínseca ou restauração natural (Santos et al., 2008), envolve a exploração das próprias capacidades do ambiente para reduzir a concentração de contaminantes ao longo do tempo, sem intervenção direta. A bioventilação introduz oxigénio no solo para estimular a atividade microbiana, enquanto

o *bioasparging* injeta ar diretamente na água subterrânea para aumentar a transferência de contaminantes do líquido para o vapor, facilitando a sua remoção. Outra diferença entre a bioventilação e o *bioasparging* prende-se com o local onde é injetado o gás. Na bioventilação é utilizada na parte superior do solo, também chamada de zona insaturada ou zona de aeração. Esta camada é parcialmente preenchida por água e ar (Coelho et al., 2011; Zytner et al., 2019). No *bioasparging*, o ar é introduzido na zona saturada do solo, abaixo do lençol freático com o objetivo de remediar o aquífero poluído, neste processo ocorre a movimentação dos poluentes voláteis para a zona insaturada (Santos et al., 2008; Mahdi et al., 2017). A fitorremediação utiliza plantas para absorver, acumular ou degradar contaminantes e pode surgir associada a outras técnicas, tais como o *bioasparging*. Baseia-se nas interações físicas, químicas, biológicas, microbianas e bioquímicas das plantas e envolve vários mecanismos, como extração, degradação, filtração, acumulação, estabilização e volatilização, dependendo da quantidade e natureza dos contaminantes (Meagher et al., 2000).

Na fitorremediação, fatores essenciais incluem o tipo de sistema radicular (fibroso ou tortuoso), biomassa acima do solo, tolerância ao contaminante, resposta às condições ambientais, adaptabilidade, taxa de crescimento, monitoramento contínuo e tempo necessário para limpeza desejada. É crucial que as plantas sejam resistentes a doenças e pragas (Lee, 2013).

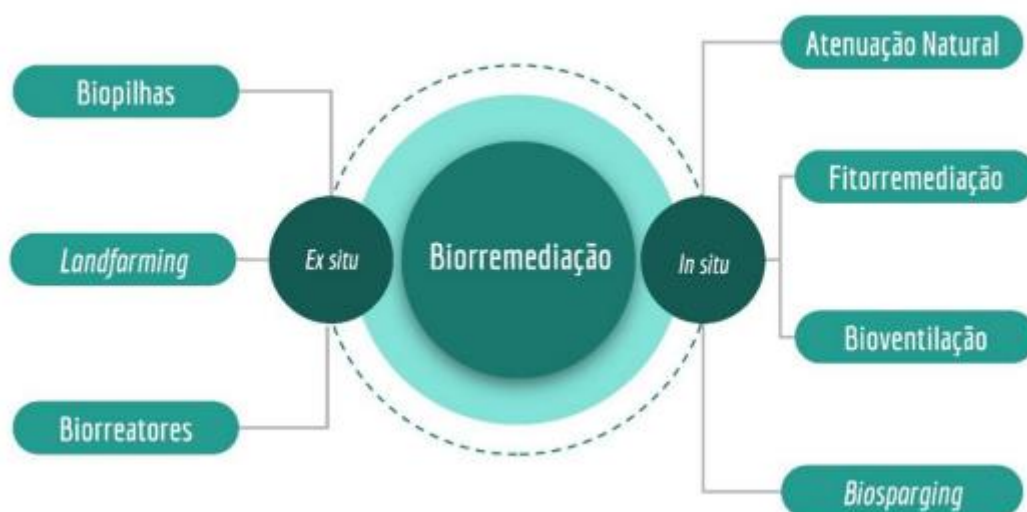


Figura 1 - Estratégias de remediação mais utilizadas, tanto *in situ* como *ex situ*. Fonte: Rizzo et al., 2006.

Comparação entre biorremediação *ex-situ* e *in-situ*

A biorremediação *ex-situ* apresenta diversas vantagens que a tornam uma escolha viável em certos contextos. Destaca-se a sua capacidade de tratar uma ampla variedade de contaminantes, e facilidade de monitorizar o processo. Além disso, a utilização de biorreatores, devido à sua capacidade de gestão e controlo, resulta em taxas mais elevadas de biodegradação em comparação com sistemas de fase sólida.

No entanto, existem desvantagens a serem consideradas na abordagem *ex-situ*. Não é aplicável em casos de contaminação por metais pesados ou hidrocarbonetos clorados, como o tricloroetileno. Solos impermeáveis podem exigir tratamentos adicionais para garantir a eficácia do processo. Adicionalmente, em determinadas situações, pode ser necessário realizar a lavagem do solo ou extração física para remover contaminantes antes da introdução no biorreator.

A biorremediação *in situ* apresenta diversas vantagens. Primeiramente, destaca-se pela menor perturbação ambiental, uma vez que reduz a necessidade de remover ou perturbar o solo contaminado, minimizando o impacto no ecossistema. Além disso, é geralmente mais económica do que abordagens *ex situ*, eliminando custos associados ao transporte e manuseio de grandes volumes de solo contaminado. A adaptação natural dos microrganismos e plantas ao ambiente contaminado é outro benefício, otimizando a eficácia da degradação. Por fim, a biorremediação *in situ* promove a manutenção da estrutura e função do ecossistema local, favorecendo a recuperação natural.

Contudo, também apresenta desafios. A eficácia da biorremediação *in situ* pode variar conforme as condições do local, o tipo de contaminantes e a capacidade dos microrganismos em degradá-los. Além disso, o processo de remediação *in situ* pode demandar um tempo prolongado em comparação com algumas abordagens *ex situ*.

2.5. MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA BIORREMEDIAÇÃO

Os microrganismos desempenham um papel vital na cadeia trófica, sendo uma parte crucial do equilíbrio biológico da vida. Esses organismos microscópicos, distribuídos por uma variedade de ambientes, desempenham funções essenciais na decomposição da matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes e na regulação populacional de outros seres vivos na cadeia alimentar.

No contexto da biorremediação, a capacidade adaptativa dos microrganismos torna-se ainda mais notável. A biorremediação envolve a utilização desses organismos para remover contaminantes do ambiente, seja no solo, na água ou em outras fontes. A presença ubíqua e a adaptabilidade desses microrganismos permitem que eles atuem eficientemente em uma ampla gama de condições ambientais, facilitando a degradação de substâncias tóxicas e a restauração do equilíbrio natural. A sua adaptabilidade é particularmente evidente, quando sobrevivem em locais onde se encontram compostos perigosos ou ocorrem fluxos de resíduos, como evidenciado por Prescott et al. em 2002.

As bactérias, microrganismos simples com uma elevada taxa de mutação, são, por excelência, os protagonistas na esfera da biorremediação.

A adaptabilidade e a capacidade de evoluir rapidamente conferem às bactérias uma vantagem significativa nesse processo. Elas formam consórcios microbianos, isto é, associações cooperativas entre diferentes espécies microbianas, desempenhando um papel crucial na degradação de substâncias contaminantes. Esse consórcio microbiano é uma estratégia eficaz, onde cada espécie contribui com habilidades específicas, resultando em um processo de biorremediação mais completo e eficiente. Diversos géneros bacterianos, como *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*,

Corynebacterium, Pseudomonas, Flavobacterium, Mycobacterium, entre outros participam ativamente do processo de biorremediação (Singh et al., 2014).

A classificação das bactérias quanto à utilização de oxigénio desempenha um papel crucial no panorama da biorremediação, pois influencia diretamente as estratégias e a eficácia dos processos de degradação de poluentes. Entre os géneros de bactérias com potencial para atuar nesse processo, destacam-se dois grandes grupos distintos: as aeróbias e as anaeróbias.

No contexto dos microrganismos aeróbios, como Pseudomonas, Acinetobacter, Sphingomonas, Nocardia, Flavobacterium, Rhodococcus e Mycobacteria, observamos a adaptação notável dessas bactérias em ambientes ricos em oxigénio. Esses microrganismos prosperam em condições aeróbicas, onde a presença de oxigénio é essencial para os processos metabólicos envolvidos na degradação de compostos complexos. Essas bactérias aeróbias desempenham um papel crucial na biorremediação de contaminantes como pesticidas, hidrocarbonetos, alcanos e compostos aromáticos policíclicos, utilizando os poluentes como fonte de carbono e energia (Souza, 2021).

Por outro lado, as bactérias anaeróbias, embora menos frequentemente utilizadas na biorremediação, estão ganhando crescente interesse. Esses microrganismos adaptaram-se a ambientes com baixa ou nenhuma concentração de oxigénio. Bactérias anaeróbias têm sido exploradas na biorremediação de substâncias como aromáticos clorados, PCBs (policlorobifenilos), e têm a capacidade de realizar processos de descloração de solventes como tricloroetileno e clorofórmio. A habilidade dessas bactérias anaeróbias em converter poluentes em formas menos tóxicas, mesmo em ambientes com limitada presença de oxigénio, destaca sua relevância na gestão ambiental (Pereira e Freitas, 2012).

Na Tabela 3 encontram-se exemplos de microrganismos usados em estudos de biorremediação.

Tabela 3 – Microrganismos usados em estudos de biorremediação. Estudo realizado por Karina Mendonça, 2023

Microrganismo	Metodo de deteção	Variação da taxa de bioremediação	Referência
Arthrobacter	Não informa	Não informa %	Wolinska et al., 2018
Acidobacteria	Cromatografia Gasosa / Espectrofotometria	Não informa %	Auti et al., 2019
Agrobacterium			
Actinobacteria - Gordonia			
Acinetobacter	Cromatografia	Não informa %	Auti et al., 2019
		5.1% - 52%	Wang et al., 2022
Alcanivorax		5.1% - 52%	Wang et al., 2022
Ascomycota		24% - 63%	Ramdass e Rampersad, 2021
Achromobacter	Não informa	Não informa %	Wang et al., 2007
Bacteroides	Não informa	7% a 35%	Zhao et al., 2022

Microrganismo	Metodo de detecção	Variação da taxa de bioremediação	Referência
Bacterial Consortia	Cromatografia	Não informa %	Zhang e Zhang, 2022
Brevibacterium			Auti et al., 2019
Bacillus		5.1% - 52%	Wang et al., 2022
Basidiomycota		24% - 63%	Ramdass e Rampersad, 2021
Chloroflexi	Cromatografia Gasosa / Espectrofotometria	Não informa %	Auti et al., 2019
Chlorobi			
Chryseobacterium			
Cyanobacteria			
Firmicutes	Não informa	7% a 35%	Zhao et al., 2022
	Cromatografia Gasosa	Não informa %	Auti et al., 2019
Gemmatimonadetes	Cromatografia Gasosa	Não informa %	
Mycobacterium	Não informa	Não informa %	Wolinska et al., 2018
	Cromatografia Gasosa / Espectrofotometria	5.1% - 52%	Wang et al., 2022
		Não informa %	Auti et al., 2019
Nesterenkonia			
Paenibacillus	Não informa	Não informa %	Wolinska et al., 2018
Proteobacteria		7% a 35%	Zhao et al., 2022
		Cromatografia Gasosa	Não informa %
Planctomycetes			
Pseudomonas			
Porticoccaceae	Não informa	5.1% - 52%	Wang et al., 2022
Rhodococcus		Não informa %	Wang et al., 2007
Rhodobacteraceae		Não informa %	Wolinska et al., 2018
Rhizobium sp.		5.1% - 52%	Wang et al., 2022
Staphylococcus		Não informa %	Wang et al., 2007
Sphingomonas cloacae		7% a 35%	Zhao et al., 2022
		Não informa %	Wang et al., 2007
Thermi - Desemzia	Cromatografia Gasosa / Espectrofotometria	Não informa %	Auti et al., 2019
Tissierella_Soehngenia			
TM7 - Paracoccus			
Verrucomicrobia			
Wolbachia			
WS6 – Sphingomonas			

2.5.1. Fatores que afetam a biorremediação microbiana

A eficácia da biorremediação microbiana é influenciada por uma variedade de fatores que interferem na interação entre microrganismos e os poluentes. O tipo específico de poluente presente é um ponto inicial essencial, pois diferentes microrganismos podem ser mais especializados na degradação de determinadas substâncias químicas. A degradação dos poluentes ocorre apenas quando os microrganismos entram em contacto com compostos que os ajudam a gerar energia e nutrientes para a proliferação celular (Fantroussi e Agathos, 2005).

As condições ambientais também desempenham um papel significativo. Fatores como temperatura, pH e a biodisponibilidade de nutrientes afetam diretamente a atividade dos microrganismos, e otimizá-los pode aumentar substancialmente a eficiência da biorremediação.

A disponibilidade de oxigénio é um fator determinante na biorremediação, pois os processos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos. A presença ou ausência de oxigénio tem implicações diretas nas vias metabólicas dos microrganismos e, portanto, na eficácia global do processo.

O tempo é outro componente crítico, já que os processos microbiológicos muitas vezes exigem períodos substanciais para a degradação completa dos poluentes. O tempo necessário varia de acordo com a complexidade dos poluentes e as condições ambientais. Além disso, a concentração inicial dos poluentes no ambiente desempenha um papel crucial. Concentrações muito altas podem sobrecarregar a capacidade dos microrganismos, enquanto concentrações muito baixas podem não fornecer estímulo suficiente para a atividade microbiana (Souza e Morassuti, 2018).

2.5.2. Fatores biológicos

A eficácia da degradação de poluentes no ambiente está intrinsecamente ligada a diversos fatores biológicos, que desempenham um papel crucial nesse complexo processo de biorremediação. Dois elementos fundamentais que influenciam diretamente a taxa de degradação são a concentração do poluente e a quantidade de catalisador presente na reação bioquímica. No entanto, a compreensão abrangente dos fatores biológicos que moldam essas interações vai além desses parâmetros iniciais. Aspectos como a atividade enzimática, que catalisa as reações bioquímicas, as interações entre os diferentes microrganismos (competição, sucessão e predação), a ocorrência de mutações genéticas, a transferência horizontal de genes, o crescimento na produção de biomassa e características específicas da população, como seu tamanho e composição, têm uma grande influência na dinâmica da biorremediação (Madhavi et al., 2012; Betancur et al., 2006; Hutchinson et al., 2003; Alexander et al., 1977).

Os microrganismos envolvidos na biorremediação utilizam diferentes vias metabólicas para desdobrar os contaminantes. No contexto da biorremediação microbiana, as principais vias metabólicas incluem a oxidação biológica, a redução biológica e a bioconversão. Essas vias são conduzidas por enzimas específicas que catalisam as

reações químicas necessárias para transformar os poluentes em produtos menos tóxicos ou inócuos.

A oxidação biológica é frequentemente observada em microrganismos aeróbios, que utilizam oxigénio para decompor compostos orgânicos complexos. Essa via metabólica é eficaz na degradação de poluentes como hidrocarbonetos e compostos aromáticos policíclicos, convertendo-os em subprodutos menos prejudiciais.

Em contrapartida, microrganismos anaeróbios empregam a redução biológica, onde a ausência de oxigénio é fundamental. Nesse processo, os poluentes são utilizados como aceptadores de eletrões em substituição ao oxigénio, resultando na transformação dos contaminantes em formas menos tóxicas.

A bioconversão é outra via metabólica relevante, envolvendo a modificação química dos poluentes por microrganismos. Essa abordagem é frequentemente utilizada na degradação de poluentes persistentes, como pesticidas, através de reações bioquímicas que alteram a estrutura molecular dos contaminantes.

A capacidade de um microrganismo para escolher e empregar uma via metabólica específica está intrinsecamente relacionada com a sua genética e adaptação evolutiva. Variações genéticas dentro de uma população microbiana podem resultar em diferentes capacidades metabólicas, influenciando diretamente a eficiência da biorremediação (Nogueira e Filho, 2015).

2.5.3. Fatores abióticos ou ambientais

O êxito das interações entre microrganismos e poluentes está intrinsecamente ligado às condições ambientais que moldam esses processos. O crescimento e a atividade dos microrganismos são profundamente influenciados por uma série de fatores ambientais, nos quais se destacam a temperatura, pH, humidade, estrutura do solo, solubilidade dos poluentes em água e a disponibilidade de nutrientes (Madhavi et al., 2012). A temperatura desempenha um papel crítico, já que afeta diretamente a velocidade das reações bioquímicas, influenciando a atividade enzimática dos microrganismos. O pH, por sua vez, regula a acidez ou alcalinidade do ambiente, impactando a estabilidade das enzimas e, conseqüentemente, a eficácia da degradação dos poluentes, sendo a gama mais comum para ocorrer a biodegradação do poluente entre 6,5–8,5 (Lorenzo V et al., 2005). A humidade é um fator determinante para a sobrevivência dos microrganismos e para a distribuição homogênea dos poluentes no meio. A estrutura do solo influencia a permeabilidade e a disponibilidade de oxigénio, essencial para os processos aeróbicos. A solubilidade dos poluentes em água afeta a sua mobilidade e, por conseguinte, a acessibilidade pelos microrganismos. Além disso, a disponibilidade de nutrientes, como carbono e azoto, desempenha um papel crucial na alimentação e no crescimento dos microrganismos (Lorenzo et al., 2005; Madhavi et al., 2012).

2.6. ESTUDOS SOBRE BIORREMEDIAÇÃO BACTERIANA

A biorremediação bacteriana é um campo em crescimento na pesquisa ambiental, com estudos recentes destacando a eficácia e a versatilidade das bactérias na remediação de diversos poluentes, que vão desde os hidrocarbonetos aos metais pesados.

As fontes de carbono e energia desempenham um papel crucial nas necessidades nutricionais das bactérias, influenciando diretamente o seu crescimento e atividade metabólica. Em muitos casos, os microrganismos utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia para sustentar suas funções vitais. Este processo é especialmente relevante no contexto da biorremediação, onde a capacidade de degradação de poluentes é uma característica essencial. A quantidade significativa de enzimas envolvidas no processo de degradação destaca a complexidade do metabolismo bacteriano. As enzimas desempenham um papel fundamental na quebra de compostos complexos em formas mais simples que podem ser utilizadas pela bactéria como nutrientes. No entanto, é importante notar que a maioria dos microrganismos não possui naturalmente a capacidade de degradar poluentes específicos encontrados em ambientes contaminados. Portanto, o isolamento e a seleção de microrganismos degradadores capazes de lidar com os poluentes presentes em determinado local é uma etapa importante para a compreensão dos processos envolvidos na biorremediação.

O isolamento e seleção envolve a identificação de estirpes bacterianas que possuem as características desejadas de degradação. Essas características incluem a capacidade de utilizar os poluentes como fonte de carbono e energia, bem como a presença de enzimas específicas que catalisam as reações de degradação.

A eficácia da biorremediação bacteriana foi evidenciada em locais contaminados por atividades industriais, onde a presença de substâncias químicas perigosas foi significativamente reduzida após a aplicação controlada desses microrganismos (Ambust et al., 2021; Silva et al., 2021). Ao longo dos anos foram isoladas bactérias com capacidade para degradar estes compostos, nomeadamente os géneros: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Kimiella*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Shingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophicum*, *Paracoccus*, *Buchholderia*, *Microbacterium*, *Gordonella*, *Bacillus* (Jaques et al., 2005; Alvarado et al., 2022; Dell'Anno et al., 2021). Esses microrganismos são chamados de microflora hidrocarbonoclástica ou oleofílica (Varjani et al., 2017).

Por possuírem um sistema complexo de enzimas degradantes e, portanto, demonstrarem diferenciação nas propriedades metabólicas e fisiológicas, *Pseudomonas*, *Blastococcus* e *Nocardioideis* obtiveram destaque na biodegradação de solos contaminados por petróleo bruto e gasolina, sendo atualmente os microrganismos mais encontrados em locais poluídos por esses materiais (Li et al., 2022). Sabe-se também que *Pseudomonas* tem a capacidade de produzir glicolipídios e biossurfactantes (Li et al., 2022).

Muitos estudos foram realizados utilizando conjunto de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Esses estudos mostraram que é difícil conseguir a degradação completa dos poluentes por uma única cepa (Zhang et al., 2022). Como diferentes estirpes têm diferentes vias metabólicas, as bactérias com diferentes capacidades de remoção são misturadas e o consórcio microbiano pode integrar as vantagens de cada estirpe para alcançar a degradação eficiente dos poluentes (Bhatt et al., 2021; Varjani et al., 2021; Ali et al., 2020). Consórcios microbianos mistos exibiram bom desempenho na tolerância ao substrato e maior degradação de poluentes (Viera et al., 2021; Basak et al., 2021). O co-cultivo do consórcio microbiano é mais eficaz do que bactérias isoladas,

degrada os poluentes mais rapidamente e pode aumentar significativamente a biodegradação dos poluentes no solo (Varjani et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Crescimento e identificação de bactérias

No início do processo, as bactérias de interesse são isoladas a partir de amostras ambientais ou de culturas já existentes. A seleção cuidadosa das estirpes é essencial, considerando características específicas, como resistência a condições ambientais adversas ou capacidade de produzir os compostos desejados.

O próximo passo envolve a preparação de meios de cultura adequados. Os microrganismos precisam de energia, fontes de carbono, nitrogénio, sais minerais, água, fatores de crescimento (vitaminas e outros). Essas substâncias são fornecidas de fontes orgânicas e/ou inorgânicas. Como princípio básico, o meio de cultura deve ser o mais próximo possível das condições reais, onde os microrganismos se desenvolvem melhor. Portanto, não existe um meio universal, pois cada microrganismo tem suas próprias necessidades nutricionais (Zhang et al., 2022).

A incubação ocorre em condições favoráveis para promover a reprodução rápida e eficiente das bactérias, ou em condições que visem mimetizar as condições ambientais que se pretendem estudar. Durante o processo de crescimento, é necessário acompanhar a densidade populacional bacteriana ao longo do tempo. Isso é frequentemente realizado através de técnicas como a medição da absorvância ótica (espectrofotometria) ou contagem direta de células, e permite o traçado das curvas de crescimento. Uma curva de crescimento microbiano normal apresenta quatro estágios distintos (Figura 2) (Nascimento, 2010; Trabulsi et al., 2008).

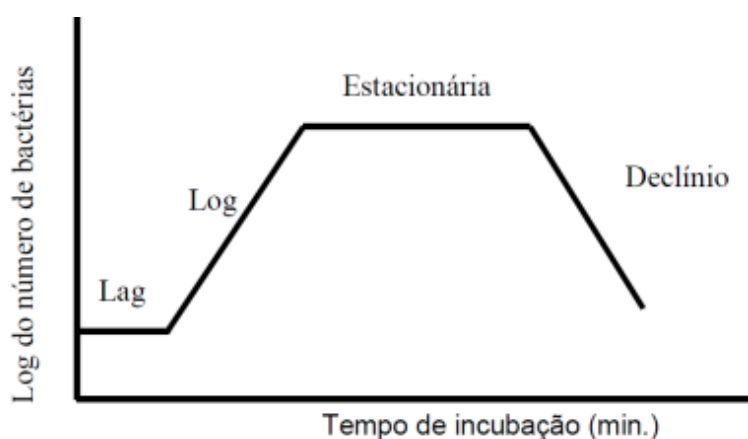


Figura 2 - Curva normal de crescimento bacteriano (Nascimento, 2010).

- Fase lag: período de adaptação ou latência, no qual a célula ativa fortemente o seu metabolismo, porém não vai se reproduzir. Esta fase varia muito dependendo da espécie, e do meio e condições do crescimento;

- Fase log: a fase logarítmica, ou fase de crescimento, que se caracteriza pela divisão constante das células, que duplicam em número a cada geração. Existe forte atividade metabólica, e grande consumo de nutrientes. Caso seja renovado o meio de cultura sistematicamente, esta população de bactéria permanece na fase log sem passar à fase seguinte;
- Fase estacionária: fase em que o número de novas células produzidas diminui, sendo equivalente ao número de células destruídas pelo próprio metabolismo e escassez nutricional. A população atinge uma densidade populacional máxima, que se mantém estável. Durante a fase estacionária, as bactérias podem passar por adaptações fisiológicas para sobreviver às condições adversas. Elas podem produzir metabolitos secundários, como antibióticos, ou mudar seu perfil metabólico para otimizar a utilização de recursos limitados. Algumas bactérias também podem formar biofilmes nessa fase, estruturas multicelulares que oferecem proteção adicional contra fatores adversos, ou esporos, que permitem que as bactérias sobrevivam em ambientes hostis até que as condições melhorem. Quando as condições ambientais se tornam favoráveis, os esporos podem germinar e dar origem a novas células bacterianas ativas.
- Fase de declínio: Nesta fase, a taxa de morte celular supera a taxa de reprodução. Vários fatores contribuem para o declínio populacional, como a exaustão de nutrientes, acumulação de produtos metabólicos tóxicos e condições ambientais adversas. Algumas bactérias sobrevivem a longo prazo, mesmo nesses ambientes, outras são gravemente afetadas e nunca se recuperam.

2.7. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS

As bactérias apresentam uma variedade de formas celulares, sendo classificadas geralmente como cocos (forma esférica), bacilos (forma cilíndrica) ou espirilos/espiroquetas (forma espiralada) (Figura 3). Além disso, o arranjo celular é um aspeto relevante, indicando como as células bacterianas se organizam umas em relação às outras. Por exemplo, podem formar diplococos (pares de cocos), estreptococos (cadeias de cocos) ou estafilococos (aglomerados de cocos) (Trabulsi et al., 2008; Nascimento, 2010).

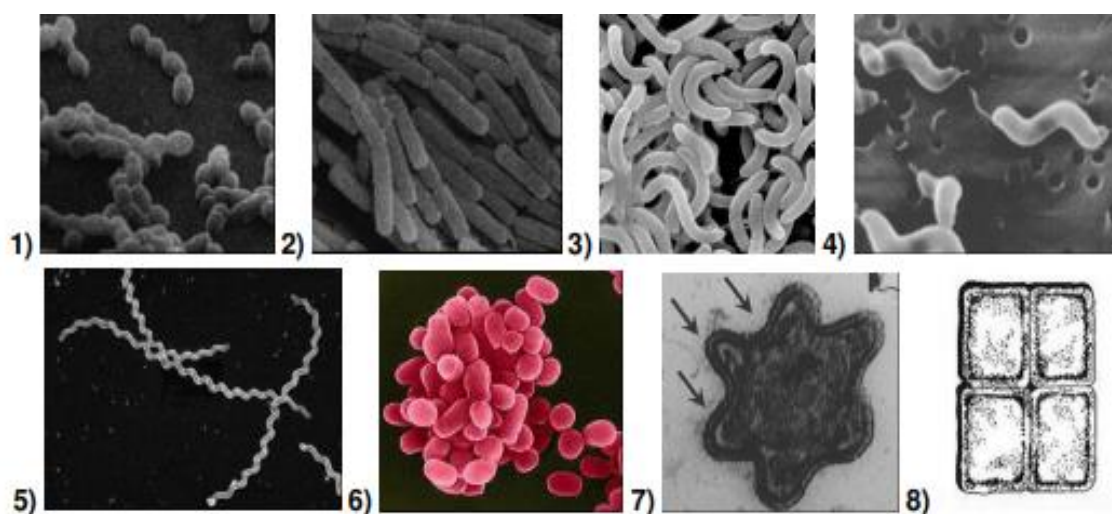


Figura 3 - Diversidade da morfologia bacteriana: 1. cocos, 2. bacilos, 3. vírgula, 4. espirilo, 5. espiroqueta, 6. estrela, 7. quadrada, 8. Cocobacilo - Fonte: Nascimento, 2010.

Além dos aspetos gerais de forma e tamanho, a caracterização morfológica inclui a observação de características específicas, como a presença de cápsulas, flagelos ou fímbrias, que desempenham papéis importantes na interação das bactérias com o ambiente e outros organismos.

Frequentemente, a caracterização morfológica é efetuada mediante a análise de colónias, em vez das próprias bactérias de forma individual. As colónias bacterianas constituem agregados visíveis de milhões de células que se desenvolvem a partir de uma única célula parental. A caracterização de colónias proporciona dados macroscópicos essenciais.

A observação da aparência das colónias em meios de cultura oferece informações sobre características como forma, cor, tamanho, margens e elevação da colónia. O tamanho das colónias também varia consideravelmente, sendo importante ter em conta não apenas o tamanho absoluto, mas também o tamanho relativo em comparação com outras colónias bacterianas (Figura 4).



Figura 4 -Classificação do tamanho das colónias bacterianas. Adaptado Badieyan, 2018.

A textura e consistência das colónias, avalia se são lisas ou rugosas, bem como a sua consistência.

A análise de colónias frequentemente serve como a primeira etapa na identificação bacteriana, permitindo uma avaliação inicial das características morfológicas sem a necessidade de técnicas mais avançadas.

A categorização das características de colónias bacterianas, tais como forma, elevação e margem inclui alguns critérios estabelecidos, sendo essenciais para garantir a padronização e precisão do processo (Figura 5) (Tankeshwar et al., 2022; Câmara, 2013).

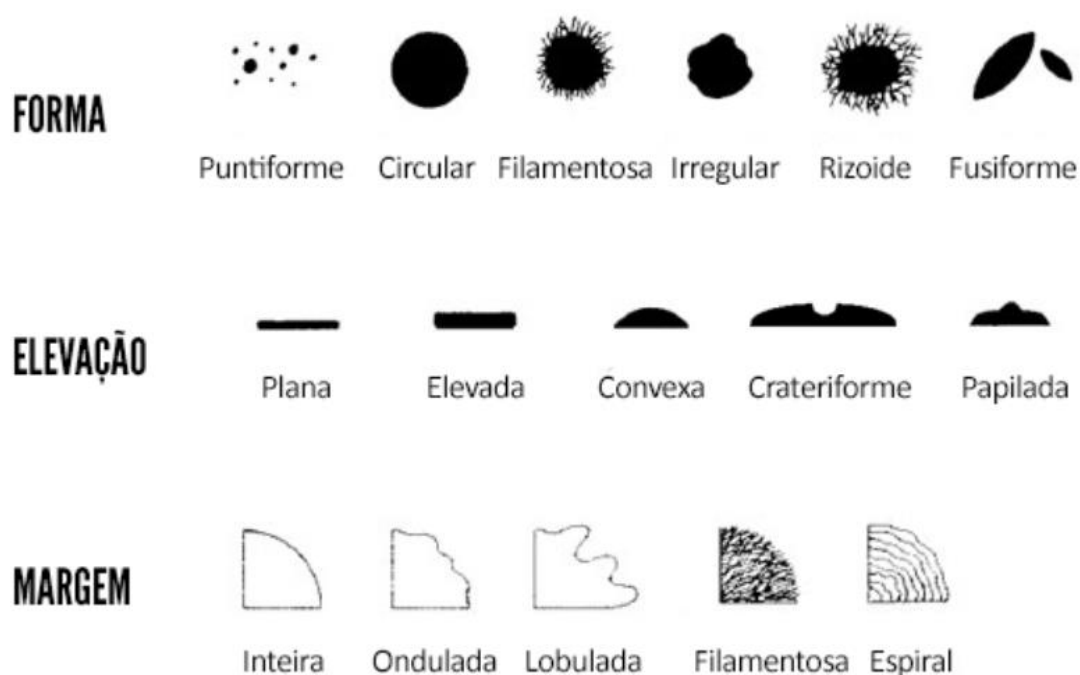


Figura 5 – Classificação de características das colónias bacterianas – Adaptado Câmara, 2013.

Além dos critérios mencionados, ainda se avalia o brilho e a cor das colónias bacterianas. A avaliação do brilho refere-se à capacidade de transmissão de luz através das colónias e podem ser classificadas como transparentes, translúcidas ou opacas. Esta característica está associada à densidade da colónia. Quanto à cor, estas podem ser incolores ou pigmentadas, indicando a presença de pigmentos bacterianos específicos, associados a propriedades bioquímicas das bactérias em questão.

Estas características adicionais, juntamente com o tamanho, a forma, elevação e margem, contribuem para uma caracterização morfológica, para a sua identificação, e também para a compreensão da diversidade e das adaptações das bactérias em diferentes ambientes.

2.8. MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

A caracterização de bactérias através de métodos colorimétricos envolve a utilização de corantes e reações químicas para destacar e distinguir características específicas das células bacterianas. Existem vários métodos, destacando-se o método de Gram como um dos métodos mais fundamentais na caracterização bacteriana.

A coloração de Gram, concebida por Hans Christian Gram em 1884, utilizada para diferenciar e classificar bactérias com base nas características de suas paredes celulares. Este método implica a colocação de amostras bacterianas em violeta de genciana, seguida da fixação com Lugol. Todas as bactérias absorvem e fixam o corante, adquirindo uma tonalidade roxa. Posteriormente, procede-se à descoloração através do uso de etanol-acetona. Este solvente descolora as membranas externas de algumas bactérias (Gram-negativas), enquanto não afeta outras (Gram-positivas). A retenção do corante está associada às propriedades físicas e químicas das paredes celulares bacterianas, como a espessura, densidade, porosidade e integridade, que influenciam a sua suscetibilidade a substâncias químicas. As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede simples, enquanto as bactérias Gram-negativas exibem uma estrutura mais complexa (Filho e Oliveira, 2023). As colorações observadas nas diferentes etapas do método encontram-se na Figura 6 e imagens reais na Figura 7 (Rotker, 2023).

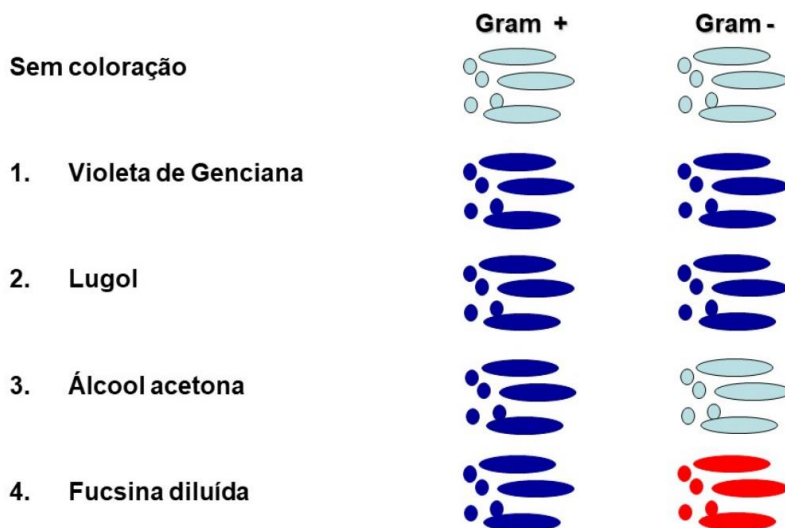


Figura 6 - Representação da ação dos reagentes utilizados na coloração de Gram (Rotker,2023).

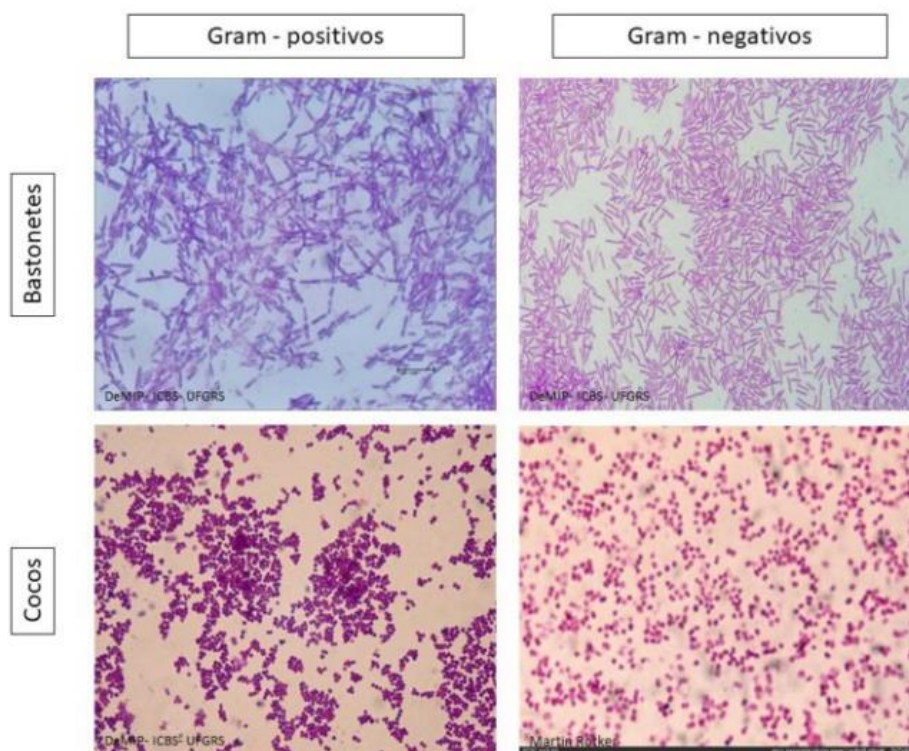


Figura 7 - Exemplos de lâminas de cocos e bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos (Rotker, 2023).

2.9. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Atualmente são utilizados alguns testes para detecção e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*, a grande parte deles são técnicas clássicas, por cultivo em meio seletivo e realização de testes bioquímicos, de acordo com as características do organismo alvo.

As *Pseudomonas aeruginosa* crescem de forma rápida na grande parte dos meios usados em ensaios e é capaz de crescer a 42°C, o que a distingue de outras espécies de *Pseudomonas*. As suas colónias são grandes, translúcidas e às vezes de formato oval. Elas geralmente são verdes devido à produção de pigmentos piocianina (azul) e pioverdin (amarelo), que são intensificados em meio de brometo de cetrimónio, e as culturas têm por norma um odor frutado. O teste da oxidase é positivo, o que permite distinguir esta espécie de enterobactérias (metabolismo fermentativo). Produz nitrases que reduzem os nitratos a azoto molecular (desnitrificação) (Murray et al., 2014).

O método mais utilizado para a quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* é a filtração através de uma membrana de celulose e inoculação em meio sólido. Após o procedimento é necessário transferir as membranas para placas contendo meios seletivos e diferenciais contendo brometo de cetrimónio e ácido nalidíxico [brometo de cetrimónio à base de ágar (ágar CN)] e 10 mL de glicerol.

Atavés de testes bioquímicos é possível verificar a capacidade desses microrganismos de hidrolisar a caseína em meios contendo o composto e/ou de fluorescer em meios contendo brometo de cetrímónio. Para isso, as placas são analisadas sob luz UV (comprimento de onda 360 ± 20 nm) para verificar a emissão de fluorescência, levando em consideração que a exposição prolongada a essa radiação destrói as colónias (PanReac AppliChem, 2020).

2.10. UTILIZAÇÃO DE SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES E SEUS EFEITOS

O uso de surfactante é muito comum no setor industrial, como produtores de cosméticos, produtos de limpeza, sabonetes, shampoos, entre outros. Estes são classificados como moléculas anfifílicas, ou seja, possuem em sua estrutura um lado com grupo hidrofóbico e outro lado com grupo hidrofílico. Tal característica é responsável por sua utilização nas indústrias do ramo de limpeza, pois seus grupos hidrofóbicos interagem com a molécula de gordura, enquanto seus grupos hidrofílicos interagem com a água (Del'Labon et al., 2023).

As adsorções características de tais moléculas são provenientes da necessidade de reduzir a energia livre da sua fase de inserção, gerando a espuma como subproduto desta adsorção. Ao interagir com ambos os grupos (hidrofóbicos e hidrofílicos) ocorre a formação de micelas, um grupo de moléculas polares com alta solubilidade em água (Del'Labon et al., 2023).

Estudos indicam que não há uma opção universal de surfactante eficaz para todos os usos, por este motivo é necessário verificar qual será a sua aplicação e assim definir o que mais se adequa. Uma forma de analisar qual o melhor surfactante a ser utilizado é considerar a solubilidade relativa ao solvente em que será inserido (Ghafari et al., 2019; Del'Labon et al., 2023).

Nas análises de biodegradabilidade do presente trabalho, foi utilizado o surfactante TWEEN 80. Este é considerado um éster de polietileno sorbitol (Polissorbato 80). É altamente utilizado em aplicações bioquímicas, como solubilização de proteínas, emulsificação e dispersão de substâncias na indústria de alimentos e medicina, no isolamento de núcleos de células em cultura, entre outros (Preté, 2000). A funcionalidade do TWEEN 80 no estudo de biodegradabilidade será emulsificar e solubilizar os hidrocarbonetos, para verificar se ocorrerá uma maior facilidade do crescimento de microrganismos no meio a ser analisado.

Devido as tendências atuais, grande parte dos surfactantes de origem petroquímica estão sendo substituídos por biosurfactantes (compostos provenientes de microrganismos que possuem características surfactantes, com alta capacidade emulsificante) (Santosa et al., 2021).

Os biosurfactantes, compostos tensoativos produzidos por microrganismos e têm recebido atenção crescente nas últimas décadas devido às suas vantagens sobre os

tensoativos químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, estabilidade e manter a funcionalidade mesmo em pH e temperatura extremo. O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais, incluindo emulsificação, desemulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial. Podem ser utilizados em vários setores como construção civil, alimentícia, na agricultura, farmacêutica, entre outros. Com um grande potencial de aplicação na indústria do petróleo, principalmente no caso de limpeza de tanques, recuperação avançada e biorremediação, como vazamento de petróleo em ecossistemas aquáticos (Colla et al., 2003).

Os microrganismos utilizados para produzir biossurfactantes podem ser bactérias, leveduras ou fungos. Podemos citar alguns tipos de biossurfactantes como os principais, são eles: os glicolipídios, fosfolipídios, lipopeptídeos, ácidos gordos e lipídeos neutros (Colla et al., 2003).

2.11. ESCOLHA DO LOCAL DE ANÁLISE DE BIORREMEDIAÇÃO DO PRESENTE RELATÓRIO

O Barreiro é um município situado na região da Margem Sul do estuário do Tejo, em Portugal. A sua localização estratégica torna-o parte integrante da área metropolitana de Lisboa. A proximidade com a capital portuguesa é uma característica distintiva, com o Barreiro estendendo-se ao longo da margem oriental do estuário, diretamente em frente a Lisboa.



Figura 8 - Localização do Município do Barreiro. Fonte: Instituto Politécnico de Setúbal.

No entanto, esta localização também expõe o Barreiro a desafios ambientais significativos, particularmente no que diz respeito à poluição. O estuário do Tejo é uma zona de elevada atividade industrial e navegação, o que pode resultar em emissões poluentes no ar e na água. A poluição proveniente de atividades industriais, descargas urbanas e navegação pode afetar a qualidade da água e do solo, impactando diretamente o ecossistema local.

Os problemas de poluição no estuário do Tejo e na região do Barreiro têm despertado a atenção das autoridades locais e da comunidade (Câmara Municipal do Barreiro). Há um crescente interesse na descontaminação e reabilitação ambiental dessas áreas para mitigar os efeitos negativos da poluição. Iniciativas de monitorização ambiental, regulamentações mais rigorosas e esforços para promover práticas industriais mais sustentáveis estão entre as medidas adotadas para abordar essas questões.

O interesse na descontaminação não só visa preservar a saúde dos ecossistemas locais, mas também atender às preocupações com a saúde pública e melhorar a qualidade de vida da comunidade. Além disso, a reabilitação ambiental dessas zonas fluviais contribui para a promoção de espaços de lazer seguros e sustentáveis, integrando-se aos esforços globais de desenvolvimento sustentável.

Este é um assunto de elevada relevância, até porque a revitalização das zonas fluviais e ribeirinhas não apenas visa melhorar o bem-estar da população local, mas também se alinha com diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos pela Agenda 2030 das Nações Unidas, nomeadamente: o ODS 11 - Cidades e Comunidades Sustentáveis, promovendo o desenvolvimento urbano inclusivo, seguro, resiliente e sustentável, criando espaços públicos acessíveis e benéficos para a comunidade. O ODS 15 - Vida Terrestre, pois a preservação e reabilitação das zonas ribeirinhas contribui para a conservação da biodiversidade e habitats naturais, protegendo ecossistemas terrestres. O ODS 3 - Saúde e Bem-Estar, ao oferecer espaços de lazer ao ar livre e promover atividades físicas, a recuperação destas áreas contribui para a promoção da saúde e bem-estar da população local. O ODS 6 - Água Limpa e Saneamento, a reabilitação de margens de rios muitas vezes envolve a melhoria da qualidade da água e a preservação dos recursos hídricos, contribuindo para o alcance de metas relacionadas à gestão sustentável da água; e o ODS 13 - Ação pelo Clima, porque a revitalização das zonas fluviais pode incluir medidas de adaptação às mudanças climáticas e promover práticas mais sustentáveis, contribuindo para a mitigação dos impactos ambientais.

Nos anos 1900, a Companhia União Fabril chegou ao Barreiro e começou a transformar a vila no maior polo industrial do país. Em 1930, o Barreiro havia se tornado um centro frequentado por milhares de pessoas de todo o país (Faria e Mendes, 2010).

Num cenário de profundas transformações, o Barreiro tornou-se um dos centros mais industrializados do país, com a intensificação da produção fabril a representar uma rotura radical com a paisagem tradicional.

As atividades industriais transformaram a paisagem e o ambiente por completo, num processo destrutivo que, para os padrões atuais, seria completamente inaceitável. Houve uma grande destruição da fauna e flora, e principalmente, a emissão de uma enorme quantidade de gases poluentes e a poluição da água e solo.

Nas décadas que se seguiram, as preocupações ambientais continuaram, até hoje como um dos legados do processo de industrialização que marcou a vida e a paisagem do

Barreiro durante quase um século, tornando-se uma imagem de marca negativa desta famosa vila industrial e operária (Faria e Mendes, 2010).

Por este motivo, acredita-se que a biorremediação possa ajudar a diminuir a quantidade de poluentes ainda presente neste solo. Este trabalho visa analisar se a bioestimulação e utilização de surfactante tem um resultado positivo na biorremediação dos componentes químicos/petrolíferos que ainda se encontram no solo contaminado na Margem Sul.

3. METODOLOGIA

O esquema representado na figura 9 descreve as etapas fundamentais realizadas ao longo do estágio, com o intuito de alcançar os objetivos propostos. O primeiro objetivo é verificar a existência de microrganismos hidrocarbonoclásticos nas áreas onde as amostras foram recolhidas e proceder à sua caracterização morfológica. Numa fase subsequente, foi estudada a taxa de biodegradabilidade, e o impacto da adição de surfactante na biorremediação através da técnica de bioestimulação.

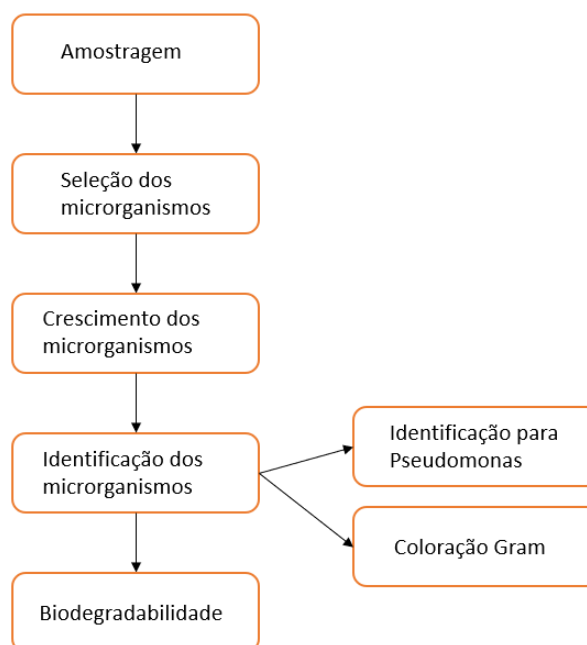


Figura 9 - Fluxograma do processo experimental.

3.1. AMOSTRAGEM – LOCAL DE RECOLHA

A decisão sobre onde recolher as amostras foi baseada em diversos fatores, incluindo a presença histórica de atividades industriais, o potencial impacto ambiental e a suspeita de contaminação por hidrocarbonetos. Além disso, considerou-se o potencial das zonas ribeirinhas para serem otimizadas em benefício da comunidade. Essa escolha estratégica não apenas atendia aos objetivos do estudo, mas também reconhecia o potencial dessas áreas ribeirinhas para contribuir de forma positiva para o ambiente local e o bem-estar da comunidade.

Os locais escolhidos para a amostragem foram: Praia de Palhais, localizado em Palhais e o segundo local foi a Praia Fluvial de Copacabana, localizada em Santo André, ambas no concelho do Barreiro e distam entre si 6,6 km.



Figura 10 - Local de recolha através do Google Maps. a) Praia de Palhais – Localização: 38.6247° N, 9.0534° W



Figura 11 – Local de recolha através do Google Maps. B) Praia Fluvial de Copacabana. Localização: 38°38'31.7"N 9°03'51.6"W

A Praia Fluvial de Copacabana, localizada no final da Rua de Maputo, em Santo André, Barreiro, destaca-se como uma agradável área para passeios. Integrando o circuito ribeirinho junto com outras duas praias fluviais do Barreiro, essa localidade apresenta,

no entanto, um desempenho menos favorável como zona balnear. O Município do Barreiro, inclusive, afixou uma placa de Interdição de Zona Balnear nessa região. Banhada pelas águas do Rio Coina, esta praia estende-se desde o Pontão da Seca do Bacalhau – Bensaúde até ao Parque Recreativo da cidade do Barreiro.

3.2. AMOSTRAGEM

As amostras foram obtidas em horário de maré baixa, uma escolha que não apenas otimiza as condições para a recolha, mas também aprimora a segurança do operador durante o processo. A redução do nível da água nesse período facilita o acesso direto aos locais, minimizando o risco de submersão e proporcionando um ambiente de trabalho mais seguro e controlado. Além disso, neste período existe menor quantidade de água e as amostras são mais concentradas e representativas da composição real do solo na área em estudo. Cada amostra foi recolhida com instrumentos esterilizados, evitando assim a contaminação cruzada e preservando a integridade dos dados obtidos. Os materiais necessários para a recolha e primeiras análises, encontra-se descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Materiais utilizados na recolha da amostra e primeiras análises.

Material	Observações
Frascos de vidro com tampa (esterilizados) – 2 unidades	Esterilizados; para guardar a amostra
Colheres de sopa - 2 unidades	Esterilizados; para usar como medidor
Copo de plástico de 2000 mL - 1 unidade	Para misturar as amostras simples formando a composta
Copo de plástico de 250 mL	-
Fita medidora de pH	Para medição do pH da amostra composta
Luvas	-
Proveta de plástico 50 mL - 1 unidade	Para medição da porção retirada do solo
Régua	Para medição da profundidade do solo necessária a retirar a amostra
Termómetro digital	Para medição da amostra composta e da temperatura ambiente
Água destilada	Para medição do pH e lavar algum material

3.2.1. Preparação do local e recolha da amostra

Devido a grande quantidade de pedras, galhos e vegetação, foi necessário limpar primeiramente o local e retirar todos os fatores externos com o auxílio de uma espátula. Somente após a limpeza do local iniciou-se a recolha do solo contaminado.

Para a recolha, foram demarcados 5 locais com espaçamento de 30 cm em linha horizontal, com o mesmo distanciamento de uma para a outra em relação a margem.

Com o auxílio da régua (para verificar a profundidade) e de uma proveta de 50 ml (para auxiliar na recolha do solo), perfurou-se o solo em 20 cm e com a proveta, retirou-se 10 cm de amostra do solo. Em seguida, colocou-se a amostra no copo de vidro de 2000 mL. Este processo foi repetido para cada local de recolha e após a recolha, as amostras foram colocadas no mesmo copo de 2000 mL para em seguida, serem misturadas para formar única amostra de forma homogênea.

3.2.2. Medição do pH da amostra

Retirou-se três colheres de sopa da amostra final para um copo de 250 mL adicionando-se água destilada até completar 125 mL. Misturou-se com o auxílio da mesma colher. A fita do indicador universal de pH foi mergulhada no copo por 30 segundos. Cada conjunto de cores na fita corresponde a um valor específico de pH, possibilitando uma estimativa qualitativa do pH da amostra.

3.2.3. Conservação da amostra

As amostras recolhidas foram cuidadosamente armazenadas no frigorífico a 4°C em recipientes estéreis, uma medida tomada com o intuito de prevenir qualquer possibilidade de contaminação. O armazenamento em condições refrigeradas contribui para a manutenção da estabilidade das amostras, sendo uma salvaguarda essencial para análises posteriores.

3.3. SELEÇÃO DOS ORGANISMOS HIDROCARBONOCLÁSTICOS

Para a análise foram preparados meio LB (meio líquido), meio BH (meio líquido), meio BH + Agar Nutritivo 20% (meio sólido) e solução de cloreto de sódio (0,9% NaCl (m/V)).

I. Preparação do meio BH – meio líquido

Foi preparado um volume total de meio BH de 900 mL de acordo com o fabricante (HIMEDIA):

- ✓ Suspende 3,27 g de BH em 1000 mL de água destilada. Aquecer até ferver para dissolver o meio por completo, esterilizar no autoclave a 121°C por 15 ciclos, arrefecer até 45°C-50°C.

- ✓ Para o material utilizado no estudo, foi alterado o valor de 3,27g para 2,95g, em relação a quantidade de 900 mL água destilada.

II. Preparação do meio LB – meio líquido

Foi preparado um volume total de meio LB de 450 mL de acordo com o fabricante (Nzytech):

- ✓ Suspende 25g de LB em 1000 mL de água destilada, aquecer até ferver para dissolver o meio por completo (geralmente por 2 minutos), esterilizar no autoclave a 121°C por 15 ciclos.
- ✓ Para o material utilizado no estudo, foi alterado o valor de 25g para 11,25g, em relação a quantidade de 450 mL água destilada.

III. Preparação do meio BH – meio sólido

- ✓ Com relação ao meio sólido de BH foi preparado 1000 mL da solução, a preparação foi de acordo com as instruções do fabricante (descrito no item I). Posteriormente foi adicionado 20g de Agar Nutritivo, que tem como objetivo solidificar o meio. O material foi esterilizado no autoclave a 121°C por 15 ciclos.

IV. Distribuição dos materiais e amostras

Dado início aos estudos da seleção dos organismos hidrocarbonoclasticos, os materiais produzidos no item anterior foram distribuídos e organizados da seguinte forma:

- ✓ Para selecionar os microrganismos foram retiradas 1g de amostra de solo e adicionadas em seis Erlenmeyers de 75 mL de meio BH.
- ✓ Posteriormente foram adicionados 375 µL de poluente em cada Erlenmeyer. O estudo foi feito em duplicata, sendo usados Gasolina e Hexano como poluente. Incubando-os de seguida a 30°C, com agitação de 180 rpm, deixando por sete dias.

3.4. CRESCIMENTO DOS ORGANISMOS HIDROCARBONOCLÁSTICOS

A partir desta etapa da análise, todos os procedimentos laboratoriais foram realizados na câmara de fluxo laminar, havendo sempre a desinfeção da mesma para não ocorrer qualquer tipo de contaminação ou alteração dos resultados obtidos.

- Ligar os UV's durante 30 minutos, e 15 minutos entre operações;
- Verificação de se todo o material necessário à execução do trabalho prático se encontra dentro da câmara;

- Verificação de, se necessário, desencher ou trocar o saco do recipiente de descarte de resíduos e outros materiais laboratoriais;
- Por fim, limpar a superfície de trabalho e todos os equipamentos e materiais dentro da câmara com lixívia a 15% e/ou etanol a 70%.

Seguindo as regras do laboratório, a utilização de luvas e bata pessoal foi obrigatória em todo o procedimento.

- ✓ Após o crescimento dos microrganismos, para cada amostra de meio BH + poluente e amostra de solo, foram distribuídos 500 µl no meio LB (os Erlenmeyers continham 75 mL de meio LB). Incubando-os de seguida a 30°C, com agitação de 180 rpm, deixando *overnight*.
- ✓ Após um dia de incubação, 75 µl do meio LB foram adicionados em Erlenmeyers de meio BH puro (sem poluente e amostra de solo), incubando-os de seguida a 30°C, com agitação de 180 rpm, deixando por 2 dias.
- ✓ Para a análise no meio sólido, foi adicionado 2,5 mL de Hexano em um Erlenmeyer de 500 mL com meio BH + Agar Nutritivo. O mesmo procedimento foi realizado utilizando a Gasolina. Após este procedimento, foram preparadas placas de Petri com meio BH + Agar Nutritivo levando aproximadamente 15 ml de material.

Posteriormente aos procedimentos acima e a seleção das colónias, estas foram transferidas para novas placas de Petri e para meio LB estimulando assim o seu crescimento.

Após utilização os Erlenmeyers e as placas de Petri foram guardadas no frigorífico a 4 °C.

3.5. ANÁLISE MEIO LÍQUIDO NO ESPETROFOTÓMETRO

Para a análise do meio líquido no espectrofotómetro foram utilizados 400 µl da amostra final de meio BH.

- ✓ A primeira amostra foi retirada logo após adicionar 75 µl do meio LB em Erlenmeyers de meio BH puro. Foram retirados 400 µl de solução e adicionados na placa de leitura do espectrofotómetro (Shimadzu, UV 1800), fazendo-se duplicados para a média dos pontos de leitura e formação do gráfico da curva de crescimento.
- ✓ Leitura da densidade ótica a 600 nm;

- ✓ O estudo e crescimento dos organismos fez-se por 3 dias consecutivos, tendo-se feito a primeira medição logo antes de se colocar a incubar, a 30°C, com agitação de 180 rpm.
- ✓ Após a incubação, foram feitas medições a cada duas horas de intervalo, reutilizando os mesmos materiais, limpando com água destilada e sempre utilizando a câmara de fluxo laminar.

Após leitura da placa, os Erlenmeyers foram colocados novamente na incubadora, para dar sequência ao processo até o fim do período de incubação, que obteve duração de 3 dias.

3.6. CRESCIMENTO DOS ORGANISMOS HIDROCARBONOCLÁSTICOS EM MEIO SÓLIDO

- ✓ Foram preparadas quatro placas de Petri com meio BH + Ágar Nutritivo para cada amostra de solo, tendo sido divididas em duplicata por cada poluente utilizado, neste caso, Hexano e Gasolina. A concentração utilizada para o crescimento em meio sólido foi de 0,5% de poluente, correspondendo a 375 µl.
- ✓ Após este procedimento, dos Erlenmeyers que continham meio LB com crescimento dos organismos, pipetou-se 100 µl para a placa do respetivo local e novamente com o auxílio de um espalhador, espalhou-se uniformemente o líquido por toda a placa.
- ✓ Depois de finalizar os procedimentos anteriores, as placas foram para a estufa a 30°C por 24h e posteriormente foram no frigorífico a 4°C.
- ✓ Foi necessário transferir para novas placas de Petri devido ao crescimento avançado dos organismos. As novas placas foram guardadas no frigorífico a 4°C por 24h.

O procedimento acima foi repetido por duas vezes até obter colónias separadas e visíveis para poderem ser identificadas.

3.7. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para identificar os microrganismos foi necessário analisar as placas de Petri com o procedimento descrito no item 3.6 e realizar dois novos procedimentos: coloração de Gram (descrito no item 3.8) e identificação de *Pseudomonas* (descrito no item 3.9).

3.8 COLORAÇÃO GRAM – CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para caracterizar os microrganismos foi realizado o procedimento de coloração Gram. O procedimento tem como objetivo verificar se as bactérias são Gram Negativas (apresentam coloração roxa) ou Gram Positivas (apresentam coloração rosa).

Inicialmente, foi essencial ligar o bico de Bunsen para desinfetar e esterilizar através da chama a área onde o procedimento seria realizado. A ansa e a lâmina também passaram por um processo de esterilização para prevenir possíveis contaminações.

- ✓ Foram separadas as placas que seriam analisadas e colocadas em cima da bancada para realizar o estudo.
- ✓ As placas de Petri foram abertas próximo a chama para evitar contaminação e coletadas com o auxílio da ansa as colónias que se pretendiam estudar. Após a coleta, foi realizado um esfregaço uniforme e de forma fina na lâmina.
- ✓ Em seguida, cobriu-se o material com solução violeta cristal por um minuto. Para haver uma melhor visibilidade, foi necessário deixar o líquido escorrer para não haver uma concentração elevada do material na lâmina.
- ✓ Posteriormente foi adicionado a solução Lugol, por um minuto. Para haver uma melhor visibilidade, foi necessário deixar o líquido escorrer para não haver uma concentração elevada do material na lâmina.
- ✓ A seguir, foi utilizado álcool a 96%, durante um minuto e posteriormente a lâmina foi lavada com água destilada.
- ✓ A última etapa foi adicionar na lâmina safranina e aguardar por um minuto. Para haver uma melhor visibilidade, foi necessário deixar o líquido escorrer para não haver uma concentração elevada do material na lâmina.
- ✓ Após os procedimentos citados acima, foi necessário esperar a lâmina secar completamente. Após a secagem completa, o material foi levado ao microscópio na objetiva 40x.
- ✓ Ao finalizar o estudo, as placas foram guardadas no frigorífico a 4 °C.

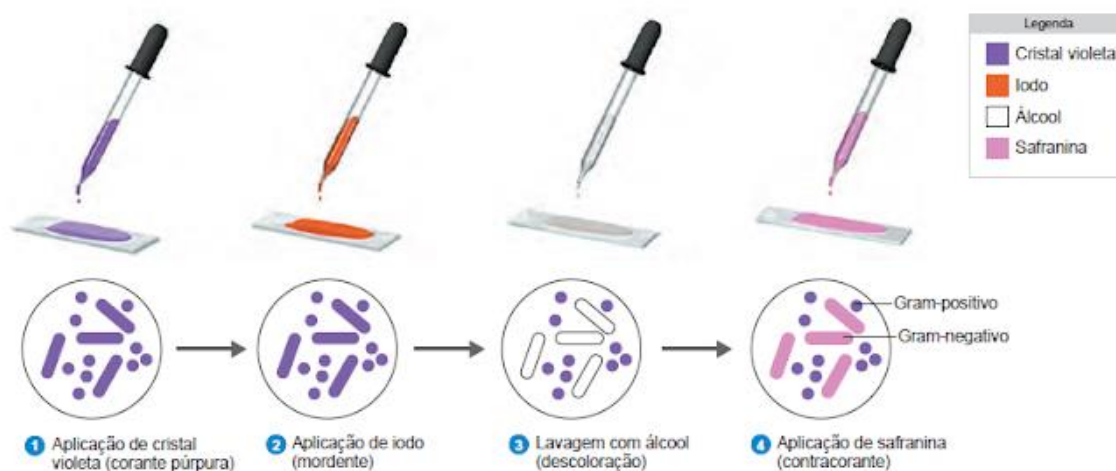


Figura 12 - Coloração Gram procedimento – (Nascimento, 2010)

3.9 . IDENTIFICAÇÃO DE PSEUDOMONAS

A última fase do procedimento de identificação dos microrganismos consistiu na análise das placas de Petri para determinar a presença de *Pseudomonas* no meio seletivo (Erlenmeyers com meio LB e respetiva amostra de cada local). Foram selecionadas para análise as placas que apresentaram um desempenho superior, indicado pelo maior crescimento de microrganismos.

O comprimento de onda utilizado para esta medição foi 360 nm, correspondente à avaliação da fluorescência de uma variedade de bactérias, especialmente das *Pseudomonas*, quando selecionadas em colónias específicas.

O procedimento envolve, essencialmente, a observação das placas de Petri escolhidas para o estudo sob luz UV (comprimento de onda de 360 nm) e a verificação da presença de fluorescência. As placas em que se observou fluorescência podem ser consideradas como indicativas do crescimento de *Pseudomonas*.

3.10. ESTUDO DE BIODEGRADABILIDADE

A técnica utilizada para estudar a biodegradabilidade foi do indicador redox, 2,6-diclorofenol indofenol. O teste consiste em detetar visualmente a oxidação biológica da fonte de carbono fornecida pelos microrganismos. Esta oxidação é indicada pela mudança na cor do meio. No processo metabólico os hidrocarbonetos são oxidados e os eletrões libertados são transferidos para aceitadores. Quando ao adicionar o indicador redox DCPIP ao meio BH, ele atuará como aceitador de eletrões que pode confirmar a atividade de degradação de carbono de microrganismos fonte. Um teste é considerado positivo quando a cor do indicador DCPIP muda de azul, e negativo quando fica incolor

Este ensaio foi realizado com dois brancos, como indicado na Tabela 6, e cinco replicados, indicado na Tabela 5 e Tabela 7. Dos Erlenmeyers retirou-se 2,0 mL da suspensão celular e centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 rpm, por três vezes.

- ✓ Finalizada a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 2,0 mL de meio BH.
- ✓ Foi adicionado mais dois tubos de ensaios para o teste em branco, para ambos os estudos, inclusive para o estudo com surfactante os testes foram repetidos em cinco eppendorfs de 2 mL cada. Para o estudo com surfactante o emulsificante utilizado foi o Tween 80 (C₆₄H₁₂₅O₂₆) com densidade de 1,08 g/ml.
- ✓ Na tabela abaixo é possível verificar a composição e a ordem dos eppendorfs mencionados nos parágrafos acima. É importante ressaltar que todas as amostras foram analisadas com D.O de 0.500 (a D.O foi medida antes de iniciar o estudo de biodegradabilidade).

Tabela 5 - Composição dos eppendorfs sem surfactante.

Estudo da biodegradabilidade sem surfactante – eppendorf de análise			
Constituintes		Volume (μl)	Concentração (%) (V/V)
4º	Poluente (G ou H)	8	0,5
3º	DCPIP	15	1
2º	Meio BH	1447	-
1º	Suspensão celular	30	2

Para as análises do teste em branco a composição e ordem foram as descritas na tabela abaixo.

Tabela 6 - Composição dos eppendorfs sem surfactante - (teste em branco)

Estudo da biodegradabilidade sem surfactante – eppendorf de análise (teste em branco)			
Constituintes		Volume (μl)	Concentração (%) (V/V)
3º	Poluente (G ou H)	8	0,5
2º	DCPIP	15	1
1º	Meio BH	1447	-

Para as análises do estudo com surfactante a composição e ordem foram as descritas na tabela abaixo.

Tabela 7 - Estudo de biodegradabilidade com surfactante - eppendorf de análise.

Estudo da biodegradabilidade com surfactante – eppendorf de análise			
Constituintes		Volume (μl)	Concentração (%) (V/V)
5º	Poluente (G ou H)	8	0,5
4º	DCPIP	15	1
3º	Meio BH	1447	-
2º	Surfactante	2,7	0,002 g/ml
1º	Suspensão celular	30	2

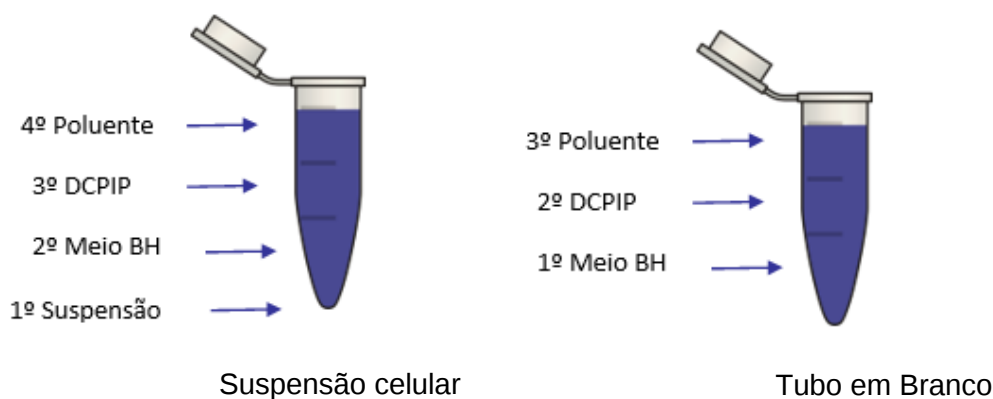


Figura 13 - Ordem de adição das substâncias aos eppendorfs no estudo da biodegradabilidade – análise DCPIP.

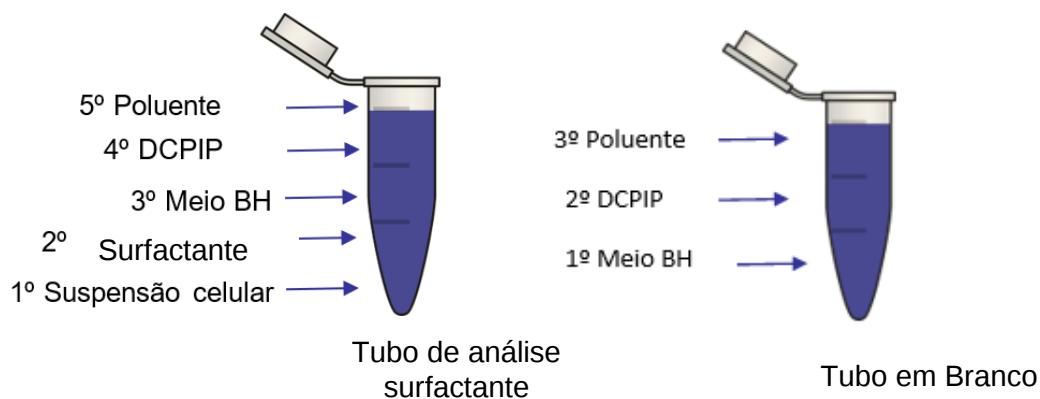


Figura 14 - Ordem de adição das substâncias aos eppendorfs no estudo da biodegradabilidade – análise com surfactante.

- ✓ Como foram necessárias duas medições (10 e 15 dias, foram preparados sete eppendorfs para realizar a leitura ao final dos 10 dias e sete eppendorfs para realizar a leitura ao final de 15 dias).
- ✓ Após dez dias foi realizada uma leitura de absorvância dos sete primeiros tubos. O comprimento de onda utilizado foi 604 nm. Após a leitura o material foi descartado.
- ✓ A segunda medição foi feita cinco dias após a primeira medição, utilizando o mesmo comprimento de onda. Foram medidos os outros sete eppendorfs que ficaram na incubadora por um período de 15 dias. Após a medição o material foi descartado.
- ✓ Após identificar a biodegradabilidade com DCPIP foi dado início ao processo de identificação da biodegradabilidade utilizando o surfactante. O procedimento é igual ao descrito acima, porém utilizando os materiais descritos nas Tabelas 6 e 7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os locais escolhidos para a recolha das amostras foram: Praia de Palhais, localizado em Palhais e Praia de Copacabana, localizada em Santo André. Antes de guardar as amostras no frasco higienizado, foram medidas as temperaturas ambiente da amostra e o pH. Na Tabela 8 é possível verificar esses valores, bem como a caracterização geográfica das amostras.

Tabela 8 - Dados dos locais de recolha das amostras.

Local	Zona	Coordenadas	Tambiente (°C)	Tamostra (°C)	pH
Praia de Palhais, Palhais, Margem Sul	Palhais	38.6247° N, 9.0534° W	29,4	27,8	7
Praia de Copacabana, Santo André, Margem Sul	Santo André	38°38'31.7"N 9°03'51.6"W	28,7	26,8	6

Os ensaios de biorremediação foram realizados no laboratório (*ex situ*) com bioestimulação, por adição de hidrocarbonetos como fonte de carbono, permitindo a observação da atividade microbiana nativa, sem a intervenção de outros processos.

Quanto às amostras recolhidas em ambos os locais, em relação à sua coloração, apresentaram-se de forma relativamente semelhante, exibindo uma combinação de areia e grãos nas tonalidades castanhas e cinzas, com uma textura predominantemente arenosa. Com relação às características químicas das amostras, é possível verificar na tabela 8 que em termos de pH, a amostra de Palhais indicou ter um pH 7, enquanto a amostra da Praia Fluvial de Copacaba obteve um pH 6, classificando-se ambos os locais com pH ácido. As temperaturas no dia da coleta foram similares, sendo 29,4°C e 28,7°C em Palhais e na Praia Fluvial de Copacaba, respetivamente.

4.2. CRESCIMENTO DOS ORGANISMOS HIDROCARBONOCLÁSTICOS EM MEIO LÍQUIDO

Os resultados obtidos nas análises estão representados nas Figuras 15 e 16. As análises foram feitas utilizando como poluente hexano e gasolina.

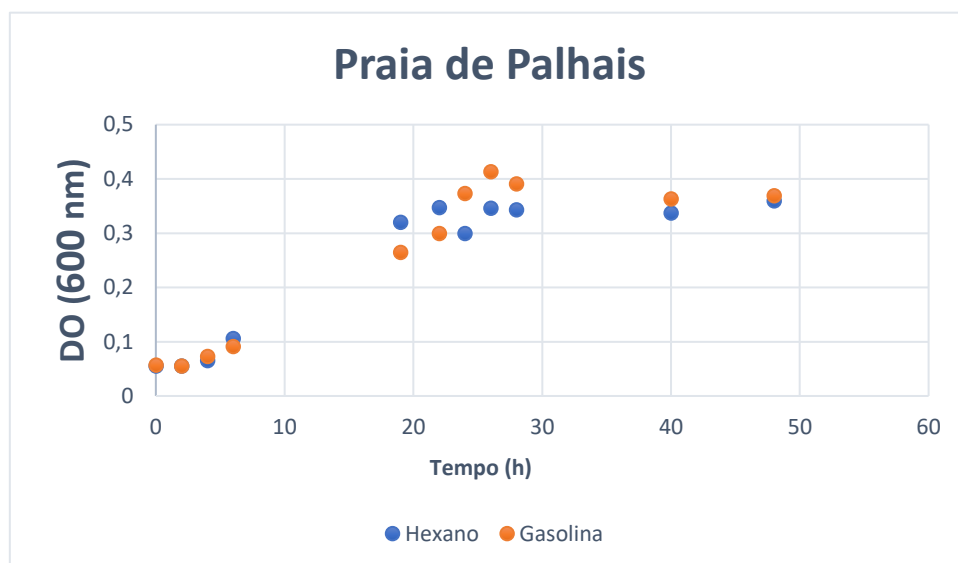


Figura 15 - Curva de crescimento utilizando poluentes Hexano e Gasolina – Praia de Palhais.

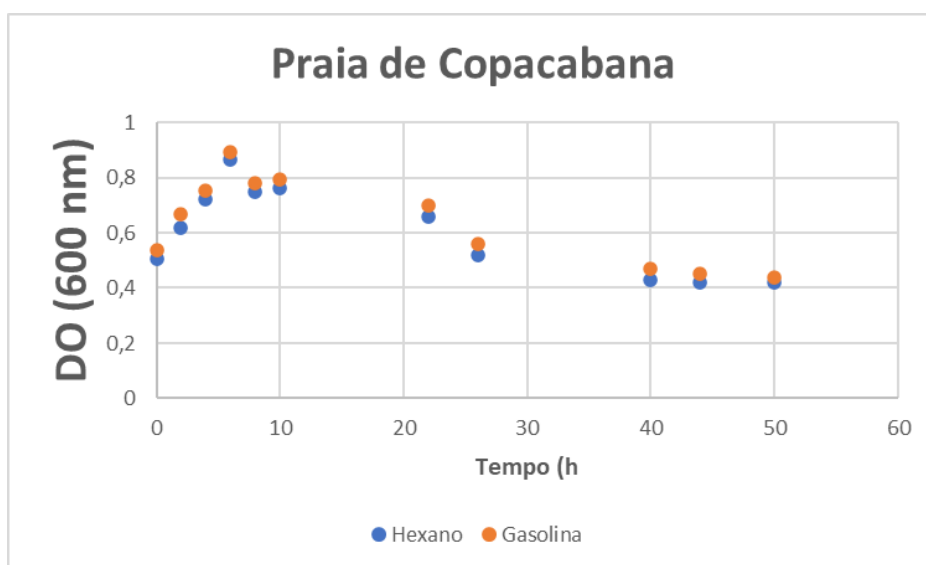


Figura 16 - Curva de crescimento utilizando poluentes Hexano e Gasolina - Praia de Copacabana.

Realizando uma breve comparação entre os resultados, é possível verificar que a curva de crescimento microbiano para ambos os poluentes foi significativa, porém os resultados obtidos na Praia de Copacabana foram ligeiramente maiores dos resultados obtidos na Praia de Palhais. O D.O máximo da primeira amostra em Hexano foi 0,357 com 28 horas, em paralelo, para a segunda amostra o D.O máximo foi 0,722 com 4 horas. Utilizando a Gasolina, o D.O máximo da primeira amostra foi 0,413 com 26 horas, para a segunda amostra, o D.O máximo foi 0,894 com 6 horas.

Como seguimento da análise de crescimento, foi calculada a taxa de crescimento específica (μ). Durante esta fase, os microrganismos desenvolvem todas as suas capacidades num ambiente onde o fornecimento de nutrientes excede as necessidades dos microrganismos. A figura 17 exemplifica a determinação da regressão linear para a fase de crescimento exponencial e o valor de R^2 .

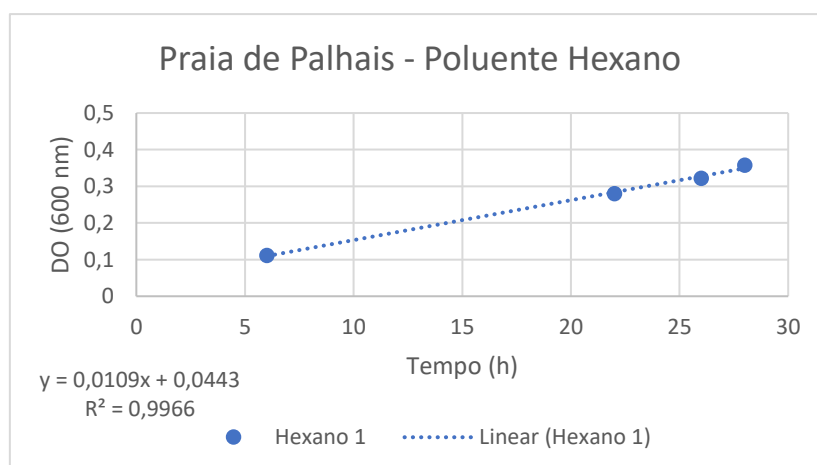


Figura 17 - Crescimento específico na amostra Palhais, poluente Hexano.

A Tabela 9 contempla todos os dados obtidos sendo possível verificar a D.O. máximo atingida e o respetivo tempo, o tempo da fase log e taxa de crescimento específico para cada crescimento.

Tabela 9 - Dados obtidos referente à D.O. máxima e respetiva hora, tempo de duração da fase log e Taxa de crescimento específica.

Local	Poluentes	D.O. Máximo	Hora da D.O. máxima (h)	Tempo de duração da fase log (h)	Taxa de crescimento específica - μ (h^{-1})
Praia de Palhais	Hexano	0,357	28	28-6=22	0,0109
	Gasolina	0,413	26	26-6=20	0,0154
Praia de Copacabana	Hexano	0,722	4	4-0=4	0,0088
	Gasolina	0,894	6	6-0=6	0,0064

Os dados indicam que os microrganismos encontrados na Praia de Palhais obtiveram um melhor desempenho utilizando a Gasolina como hidrocarboneto ($0,0154 h^{-1}$), podendo concluir que há uma maior facilidade dos microrganismos se desenvolverem na presença deste poluente. O oposto ocorre na Praia de Copacabana, onde o Hexano possui um melhor desempenho ($0,0088 h^{-1}$), desta forma, é possível notar que no

segundo local, os microrganismos apresentam um melhor desempenho em contato com este poluente.

Outro ponto que difere os tipos de microrganismos encontrados em ambos os locais é o tempo da fase Log, estacionária e declínio. Os microrganismos encontrados na Praia de Palhais possuem uma fase Log mais lenta e estabilizada, assim como a fase estacionária. O mesmo não ocorre na Praia de Copacabana. O crescimento é acelerado logo nas primeiras horas, onde é possível verificar um aumento significativo na quantidade de microrganismos nas primeiras seis horas, porém esta fase não se mantém e dá início a fase de declínio. Suspeita-se que seria necessária uma maior quantidade de hidrocarbonetos para ocorrer uma fase estacionária mais duradoura e um melhor desempenho no processo de biorremediação.

Como observação final, é necessário ressaltar que o resultado obtido não se assemelha ao esperado, pois a zona em que as amostras foram retiradas são próximas do tráfego marítimo e de zonas industriais existente no rio Tejo. Por este motivo, seria de esperar uma fase de crescimento e estabilização duradoura em ambas as amostras, para poder ser visível o processo de biorremediação. A amostra que mais se assemelha ao que era esperado foi o material recolhido na Praia de Palhais.

4.3 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ORGANISMOS

Após verificar o crescimento dos microrganismos em meio líquido, deu-se início a seleção e caracterização morfológica. A concentração de poluente usado para cada local foi 0,5%. Os estudos foram realizados pelo mínimo três vezes para poder identificar os tipos de microrganismos presentes em cada local, pois havia um crescimento muito rápido no meio sólido, precisando ser repetido o procedimento até conseguir obter placas com colónias visíveis e separadas. Após a identificação e seleção das placas com melhor resultado, foi iniciado o processo de caracterização.

Nas figuras de 18 a 21 encontram-se imagens das placas referente a cada poluente e em cada amostra de solo.

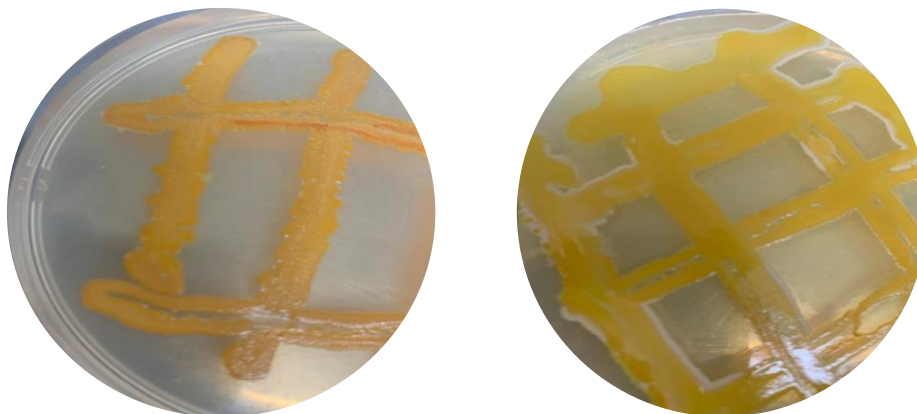


Figura 18 - Análise Palhais - Hexano

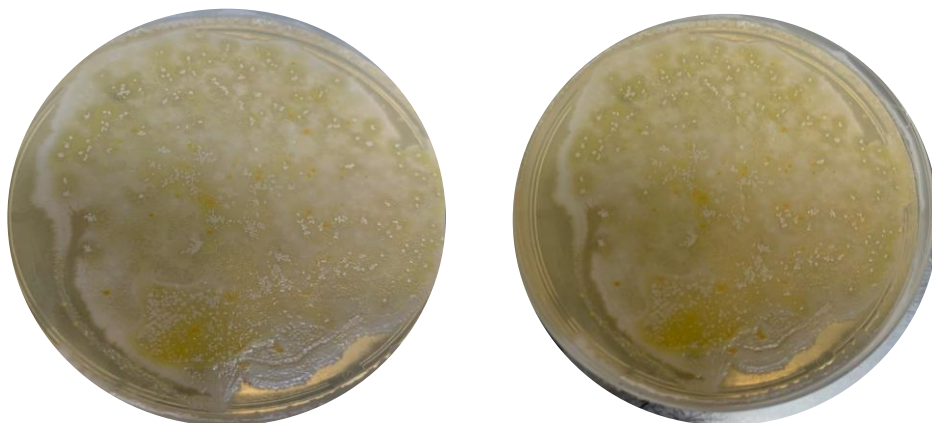


Figura 19 - Análise Palhais – Gasolina.

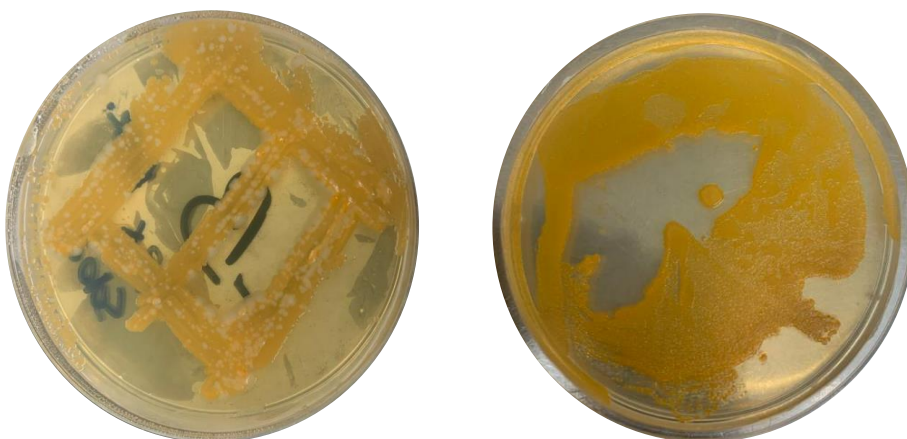


Figura 20 - Amostra Solo Praia de Copacabana - Hexano.



Figura 21 - Amostra Solo Praia de Copacabana - Gasolina.

A observação ao microscópio ótico revelou uma semelhança morfológica entre os microrganismos que apresentaram um desempenho superior na biorremediação do Hexano e da Gasolina. Observa-se que os microrganismos que foram mais eficazes no Hexano exibem uma coloração amarelada, ao passo que na Gasolina a coloração assemelha-se mais ao branco, como é possível constatar na Figura 22.

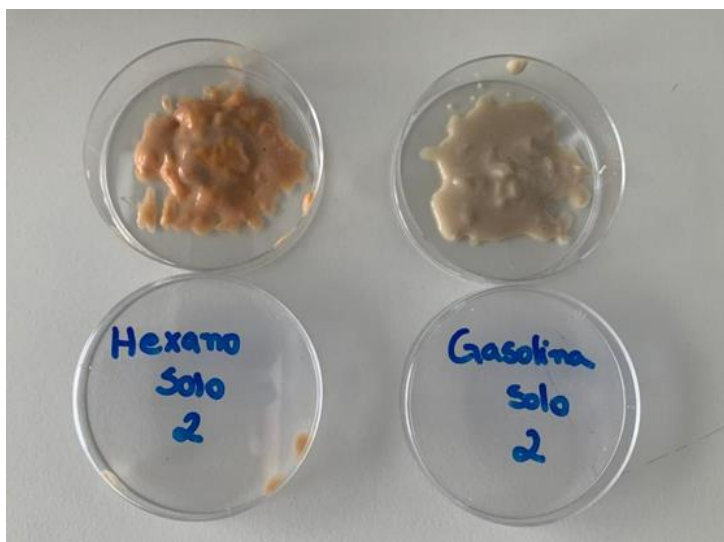


Figura 22 - Análise dos microrganismos após processo de centrifugação.

O resultado obtido após a centrifugação foi semelhante para ambos os solos. As amostras com Hexano obtiveram uma massa mais amarelada e espessa, enquanto as amostras com Gasolina obtiveram uma massa branca e menos espessa.

Em ambos os locais de amostragem e ambos os poluentes obtiveram crescimento de colónias. Por haver um crescimento de forma rápida, as amostras ficaram somente um dia na estufa e logo após 24 horas foi possível verificar as colónias e caracterizá-las.

Não foi possível verificar uma grande variedade de colónias, sendo identificadas somente dois morfótipos. Desta forma foram caracterizados como Tipo #1, encontrado no Hexano para ambos os locais e Tipo #2, encontrado na Gasolina para ambos os locais.

A Tabela 10 resume as características dos dois tipos diferentes de colónias que se formaram.

Tabela 10 - Caracterização morfológica das colónias dos dois morfótipos 1 e 2.

	Tipo #1	Tipo #2
Tamanho	Média (2 a 5 mm) e pequena (2 mm)	Média (2 a 5 mm) e pequena (2 mm)
Forma	Irregular	Filamentoso
Elevação	Elevada	Elevada
Margem	Ondulada	Filiforme
Estrutura	Suave	Suave
Cor	Pigmentada (Amarela)	Pigmentada (Branca)
Brilho	Opaca	Opaca

4.4 COLORAÇÃO DE GRAM

Após a caracterização das colónias, procedeu-se à análise utilizando o método de coloração de Gram. Para este estudo, foram escolhidas as placas que apresentaram os melhores resultados no crescimento de microrganismos para cada amostra de solo. Nas figuras de 23 a 26, é possível observar as imagens das placas correspondentes a cada poluente em cada amostra de solo.

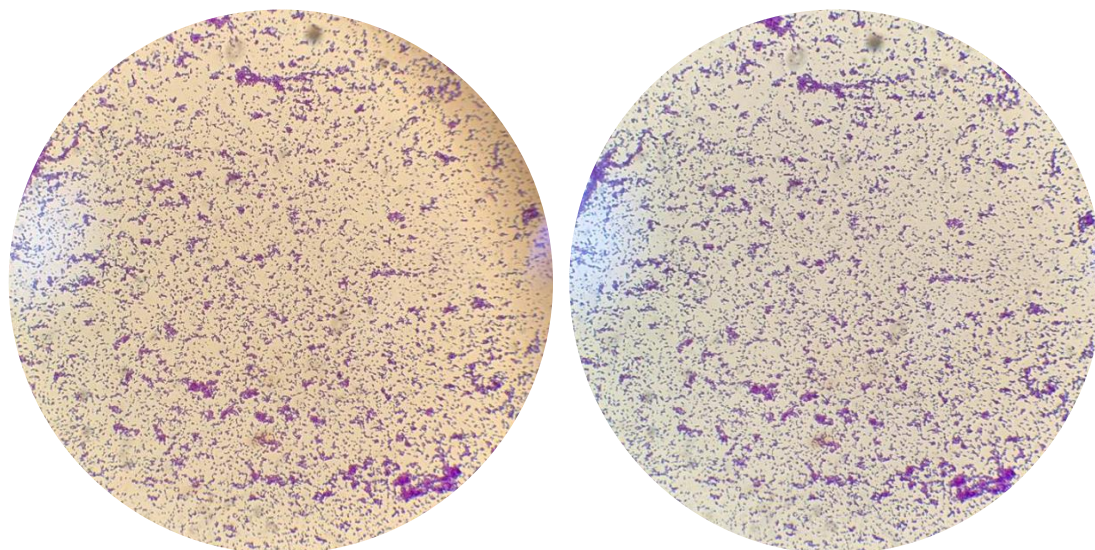


Figura 23 - Amostra solo Palhais - Poluente Hexano.

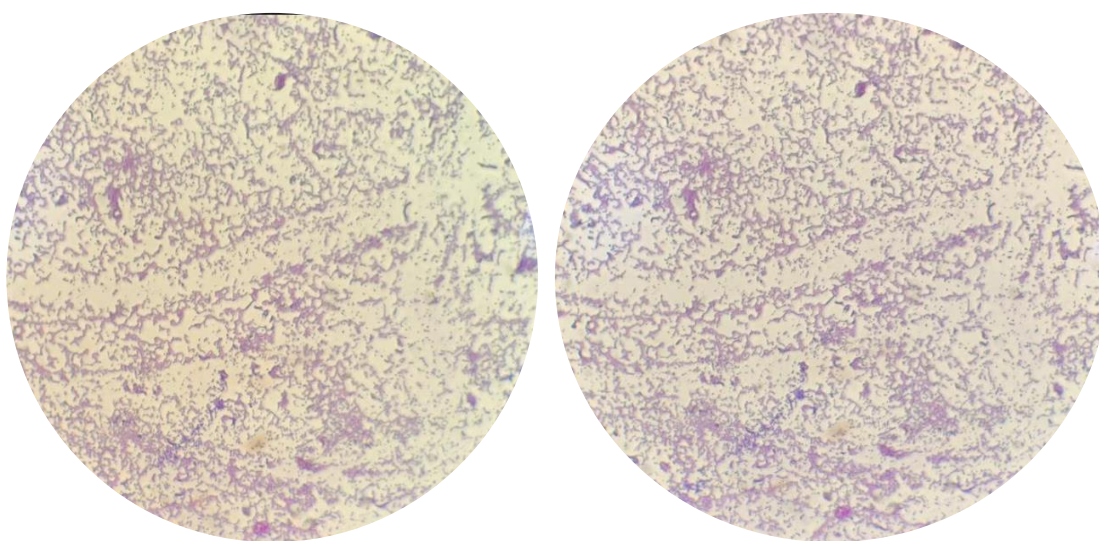


Figura 24 - Amostra solo Praia de Copacabana - Poluente Hexano

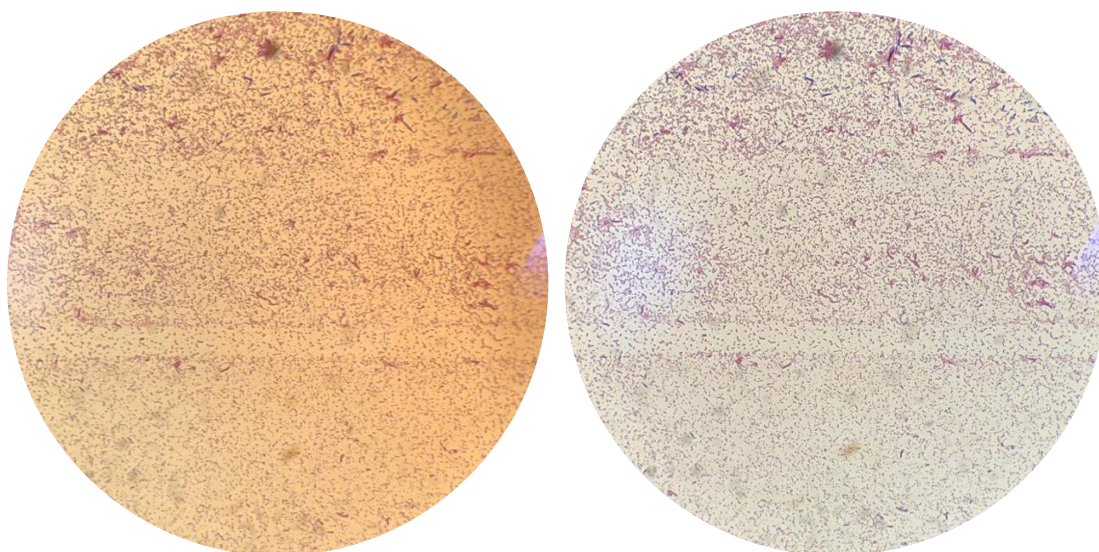


Figura 25 - Amostra solo Palhais - Poluente Gasolina.

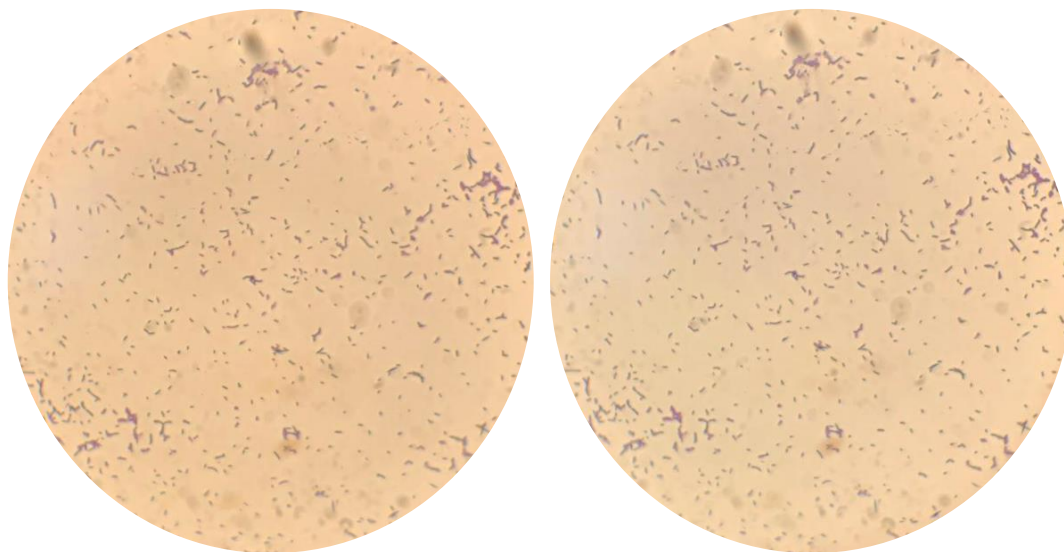


Figura 26 - Amostra solo Praia de Copacabana - Poluente Gasolina.

Ao examinar os resultados, foi possível constatar uma notável similaridade, uma vez que Bacilos foram identificados em todas as amostras, sendo predominantemente Gram Negativos. Contudo, cabe destacar uma exceção na amostra de solo de Palhais, onde, ao utilizar o poluente Hexano, identificaram-se Bacilos Gram Positivos. Assim, ao analisar esses resultados e compará-los com as observações visuais das placas de meio sólido, torna-se evidente que os microrganismos presentes nas amostras com Hexano são semelhantes em ambos os locais de recolha. Da mesma forma, os microrganismos presentes nas amostras com Gasolina também demonstram semelhanças. Esta consistência entre os resultados microscópicos e macroscópicos reforça a confiabilidade das conclusões sobre a composição microbiana em resposta à presença específica de poluentes nos diferentes solos analisados.

4.5. IDENTIFICAÇÃO DE PSEUDOMONAS

Dando finalização ao processo de identificação dos microrganismos, as placas foram analisadas, de acordo com o procedimento descrito no item 3.8.

Para uma melhor visualização da identificação dos microrganismos as Tabelas 11 e 12 contemplam todos os resultados obtidos por cada local de amostragem.

Tabela 11 - Identificação microrganismos local de amostragem Praia de Palhais.

Locais	Poluentes	Concentração (%)	Forma	Gram	Morfótipo	Identificação <i>Pseudomonas</i>
Praia de Palhais	Gasolina	0,5	Bacilos	Negativa	#2	Sim
	Hexano	0,5	Bacilos	Positiva	#1	Sim

Tabela 12 - Identificação microrganismos local de amostragem Praia de Copacabana.

Locais	Poluentes	Concentração (%)	Forma	Gram	Morfótipo	Identificação <i>Pseudomonas</i>
Praia de Copacabana	Gasolina	0,5	Bacilos	Negativa	#2	Sim
	Hexano	0,5	Bacilos	Negativa	#1	Sim

Ao examinar as Tabelas 11 e 12 e revisitar os resultados previamente obtidos, torna-se evidente uma semelhança notável entre ambos os locais de coleta. Ao utilizar a Gasolina como poluente, observou-se o crescimento exclusivo do morfótipo #2 nos microrganismos coletados na Praia de Palhais e na Praia de Copacabana. Já para o poluente Hexano, o crescimento do morfótipo #1 foi constatado em ambas as localidades.

Como mencionado anteriormente, em ambas as áreas de coleta, as colónias encontradas exibiram a forma de Bacilos. No que diz respeito à coloração de Gram, para o poluente Hexano, foi possível identificar bactérias Gram-Positivas na amostra recolhida na Praia de Palhais, enquanto nas demais amostras foram identificadas bactérias Gram-Negativas.

Ao analisar os resultados e as características das colónias, nota-se, em relação à caracterização, a presença de *Pseudomonas* spp. ou aeruginosa para ambos os morfótipos. Essa identificação é relevante para compreender a diversidade microbiana e as respostas específicas dos microrganismos aos poluentes presentes nas áreas estudadas. Esses dados contribuem significativamente para a compreensão dos processos de biorremediação e oferecem insights valiosos sobre a capacidade adaptativa dos microrganismos em ambientes contaminados.

4.6. ESTUDO DA BIODEGRADABILIDADE

A parte final do estudo foi a análise de biodegradabilidade de acordo com o procedimento descrito no item 3.9. Esta análise foi feita utilizando o indicador redox DCPIP. Quando ao adicionar o indicador redox DCPIP ao meio de cultura, ele atuará como aceitador de eletrões que pode confirmar a atividade de degradação de carbono de microrganismos fonte. Um teste é considerado positivo quando a cor do indicador DCPIP muda de azul, e negativo quando fica incolor. Após finalizar o período de incubação (este período teve duração de 15 dias), não foi possível verificar alteração significativa de cor, mantendo-se a coloração azul-escuro do início do processo. Desta forma, somente analisando a coloração, não foi possível detetar se houve ou não degradação.

A segunda parte do estudo, com a adição de surfactante, foi adicionar o surfactante Tween 80, este é um detergente de solubilidade de proteínas. Seguindo o procedimento

descrito no item 3.8, o estudo foi feito para ambos os locais de recolha de amostra e utilizando como poluente Gasolina e Hexano.

Após a finalização do processo experimental, foi necessário calcular a percentagem/taxa de biodegradação, sendo utilizada a fórmula abaixo:

$$\% \text{ biodegradação} = 100 - \left(\frac{\text{Absorvância de cada amostra}}{\text{Absorvância do poluente}} * 100 \right) \quad (1)$$

Em relação à absorvância do poluente foi utilizada a média dos valores obtidos durante o processo experimental por cada amostra.

O comprimento de onda utilizado para a medição foi de 604 nm, pois, devido a presença de emulsificante e surfactante, a densidade da amostra dificulta a passagem do laser.

4.6.1. Praia de Palhais

A investigação da biodegradabilidade do Hexano e da Gasolina em relação às absorvâncias e percentagens de biodegradação, utilizando o DCPIP, é documentada na Tabela 13. O valor registado para a absorvância do Hexano foi de 1,904, enquanto o valor correspondente para a Gasolina foi de 1,918.

Tabela 13 - Resultados obtidos no estudo de Biodegradação Praia de Palhais.

Poluente	Tubo Teste Branco	Biodegradação	Taxa de biorremediação
Hexano	1,904	1,425	23,81%
		1,458	
		1,472	
		1,431	
		1,467	
Gasolina	1,918	1,214	35,03%
		1,236	
		1,248	
		1,262	
		1,271	

Posteriormente esta análise, foi realizada a análise com o surfactante

Tween 80. O valor obtido para a absorvância do Hexano foi de 1,895 e o valor obtido para a Gasolina foi de 1,902. Os resultados obtidos neste estudo podem ser verificados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados obtidos no estudo de Biodegradação Praia de Palhais com surfactante

Poluente	Tubo Teste Branco	Biodegradação	Taxa de biorremediação
Hexano	1,895	1,202	36,04%
		1,215	
		1,228	
		1,204	
		1,211	
Gasolina	1,902	1,089	44,04%
		1,056	
		1,074	
		1,061	
		1,042	

4.6.2. Praia de Copacabana

O estudo de biodegradabilidade da Hexano e da Gasolina, com relação a absorvâncias e percentagens de biodegradação, utilizando o DCPIP são verificados na tabela 15. O valor obtido para a absorvância do Hexano foi de 1,911 e o valor obtido para a Gasolina foi de 1,923.

Tabela 15 - Resultados obtidos no estudo de Biodegradação Praia de Copacabana.

Poluente	Tubo Teste Branco	Biodegradação	Taxa de biorremediação
Hexano	1,911	1,398	27,05%
		1,387	
		1,399	
		1,394	
		1,392	
Gasolina	1,923	1,289	34,25%
		1,256	
		1,274	
		1,261	
		1,242	

Posteriormente esta análise, foi realizada a análise com o surfactante Tween 80. O valor obtido para a absorvância do Hexano foi de 1,848 e o valor obtido para a Gasolina foi de 1,917. Os resultados obtidos neste estudo podem ser verificados na tabela 16.

Tabela 16 - Resultados obtidos no estudo de Biodegradação com surfactante.

Poluente	Tubo Teste Branco	Biodegradação	Taxa de biorremediação
Hexano	1,848	1,24	32,92%
		1,217	
		1,259	
		1,245	
		1,237	
Gasolina	1,917	1,102	41,53%
		1,125	
		1,129	
		1,113	
		1,135	

4.6.3. Análise dos resultados obtidos no estudo de biodegradação

Ao analisar os resultados com a adição de DCPIP, é possível perceber que houve biodegradação após o período de 15 dias. Em ambas as amostras, o desempenho mais eficaz ocorreu ao utilizar a Gasolina como poluente, resultando em valores finais muito semelhantes para ambas as localidades.

Os resultados indicam percentagens de biodegradação de 35,03% para a Praia de Palhais e 34,25% para a Praia de Copacabana ao utilizar a Gasolina. Isso sugere uma capacidade dos microrganismos presentes nestes locais de degradar hidrocarbonetos.

Ao examinar os resultados obtidos com o Hexano, nota-se uma diferença em relação à Gasolina, apresentando percentagens de biodegradação de 23,81% (Praia de Palhais) e 27,05% (Praia de Copacabana). Embora isso não signifique ausência de biorremediação, indica que o desempenho dos microrganismos na degradação desse poluente não é tão significativo quanto o observado com a Gasolina.

É importante destacar que as amostras foram coletadas em locais próximos a fábricas e à margem do Rio Tejo. Ao considerar a zona de coleta, é altamente provável que o solo tenha entrado em contato com combustíveis. Esta informação contextualiza os resultados, destacando a possível influência das atividades industriais e da proximidade com corpos de água na composição e desempenho dos microrganismos no processo de biorremediação. No estudo realizado em 2002 por Crapez, destaca-se que a biodegradação de hidrocarbonetos não pode ser conduzida por uma única espécie microbiana, uma vez que nenhum microrganismo possui a capacidade isolada de degradar todos os compostos presentes. O processo metabólico torna-se complexo, resultando na formação de consórcios compostos por microrganismos de diferentes espécies e géneros, cada um especializado na degradação de uma ou várias frações do óleo (Crapez et al., 2002).

Essa constatação sustenta a conclusão de que o conjunto de microrganismos encontrados em ambos os locais apresentou um desempenho superior na degradação da Gasolina como poluente. A introdução do surfactante resultou em um aumento de cerca de 10% nos resultados, com valores variando entre 44,04% (Praia de Palhais) e 41,53% (Praia de Copacabana) ao utilizar o poluente Gasolina, que também registrou o melhor resultado nesta análise.

Analisando este estudo, observa-se que os valores obtidos são mais elevados, indicando uma taxa de degradação mais acentuada dos hidrocarbonetos. A comparação entre os valores com e sem surfactante revela que a adição desse componente pode aumentar ou potencializar a taxa de biodegradação. A análise estatística do teste t de Student apontou diferenças significativas entre as médias dos valores observados, com um nível de significância de 5%, fortalecendo a validade estatística dos resultados. Assim, a incorporação do surfactante resultou em taxas de biodegradação mais elevadas.

Ao comparar as tabelas obtidas em cada análise, os resultados para ambos os poluentes são ligeiramente superiores. Apesar de o Hexano não atingir as melhores taxas, também apresentou um desempenho aprimorado após a adição do surfactante, registrando 36,04% para a amostra de Palhais e 32,92% para a amostra de Copacabana.

Ao realizar uma comparação final entre os resultados utilizando o poluente Hexano, observamos que as taxas obtidas foram de 23,81% (sem surfactante) e 36,04% (com surfactante) para a Praia de Palhais, representando uma diferença de aproximadamente 12%. Na Praia de Copacabana, os valores foram de 27,05% e 32,92%, apresentando uma diferença de aproximadamente 6%. Este conjunto de resultados indica claramente o impacto positivo da adição de surfactante na eficácia da biorremediação. Comparando os resultados para a Gasolina, os valores encontrados foram de 35,03% (sem surfactante) e 44,04% (com surfactante) para a Praia de Palhais, demonstrando uma diferença de 9%. E com relação a Praia de Copacabana, 34,25% e 41,53%, aproximadamente 8% de diferença entre os valores.

Conclui-se que a adição deste material tem efeito positivo na biorremediação em ambos os poluentes e que os melhores resultados foram provenientes do primeiro local de recolha, Praia de Palhais.

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES FUTURAS

Na década de 1930 a Margem Sul tornou-se centro frequentado por muitas pessoas, em sua grande maioria imigrantes que vieram para trabalhar no polo industrial fundado na margem do Rio Tejo. Durante este período esta zona sofreu grandes transformações, tornando-se um dos grandes centros industrializados do país. Estas atividades industriais transformaram a fauna e a flora da região e, principalmente, a qualidade das águas e solos. Por este motivo, é de suma importância estudos que foquem na qualidade da água e dos solos dessas áreas, para, a longo prazo, tentar recuperar a fauna e a flora que haviam anteriormente.

A biorremediação *in situ* é uma técnica limpa e que tem muitas vantagens. Como apresentado neste trabalho, é possível utilizar uma ampla gama de microrganismos, e por ser realizada no próprio local onde há poluição, sem precisar transportar para outro local para realizar a biorremediação, torna o processo simples e de baixo custo. Combinado com outros métodos, como tratamentos físico-químicos, pode ampliar sua eficiência de biodegradação.

O objetivo central deste estudo foi atingido ao demonstrar o potencial de degradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos presentes nos locais investigados. Foram analisadas suas características morfológicas e bioquímicas, seguidas pela identificação desses microrganismos.

Ao examinar os resultados, observa-se que a biodegradação dos hidrocarbonetos foi alcançada. Globalmente, todas as amostras apresentaram curvas de crescimento microbiano semelhantes, destacando-se que, para ambos os locais estudados, o melhor desempenho foi obtido ao utilizar a Gasolina como hidrocarboneto. Os microrganismos encontrados compartilharam características físico-químicas similares, possivelmente explicadas pela proximidade geográfica dos locais de coleta na Margem Sul, sugerindo uma semelhança na qualidade das amostras.

Ao finalizar o estudo, identificou-se uma similaridade nos microrganismos que degradaram o Hexano e os que degradaram a Gasolina. Ambos os locais de coleta apresentaram apenas dois tipos de microrganismos identificados.

Ao analisar as colónias obtidas, verificou-se que, predominantemente, em ambos os locais, foram encontradas *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-Negativas na forma de bacilos. Com relação ao morfotipo, identificou-se um morfotipo nas análises do Hexano e outro nas análises da Gasolina, presentes em ambos os locais de estudo. Essas conclusões destacam a relevância da compreensão dos microrganismos envolvidos na biorremediação e contribuem para a elaboração de estratégias eficazes na recuperação

ambiental dessas áreas industriais. Ao analisar as colónias obtidas, verificou-se que em ambos os locais, em sua grande maioria, foram encontradas *Pseudomonas aeruginosas*, Gram-Negativa na forma de bacilos. E com relação ao morfotipo, foi identificado um morfotipo encontrado nas análises do Hexano e um morfotipo encontrado nas análises do Gasolina, em ambos os locais de estudo.

Era esperado que ao iniciar os estudos de biodegradação, os resultados seriam mais positivos, pois apesar de não haver uma variedade de morfotipos, ao realizar o estudo em meio sólido, os microrganismos cresciam de forma acelerada, sendo necessário somente 24 horas em estufa para poder visualizá-los.

No estudo da biodegradabilidade, nas amostras recolhidas na Praia de Palhais obtiveram-se resultados mais promissores, chegando, ao final de quinze dias, a uma taxa de biodegradação de 35,03% utilizando o DCPIP e 44,04% utilizando DCPIP e surfatante.

Observando os resultados, é possível perceber que a análise realizada com surfactante, mesmo que com uma percentagem baixa, foi eficaz, comprovando que a aplicação deste emulsificante têm como função auxiliar os microrganismos a degradar contaminantes tóxicos e complexos. Conclui-se desta forma, por meio deste trabalho de dissertação, que o desempenho dos microrganismos degradantes de poluente se eleva com a adição de surfactantes ao meio, baixando a toxicidade do contaminante, aumentando a biodegradabilidade e desta forma, facilitando a disponibilidade de atividade microbiana.

Durante todo o estudo não foi verificada discrepâncias entre os resultados obtidos, em ambos os locais de recolha, os resultados foram muito similares, o que, de certa forma, indica que ambos possam ter contactado com hidrocarbonetos similares. E, ao realizar as análises para identificação, comprovamos que os microrganismos presentes também são similares e tem uma performance parecida em cada hidrocarboneto estudado. Com uma percentagem um pouco mais elevada, é possível dizer que os microrganismos encontrados na Praia de Palhais obtiveram um desempenho ligeiramente maior e mais similar ao que era esperado.

Como perspectivas de trabalho futuro, a fim de aprimorar o presente trabalho e os trabalhos realizados anteriormente, sugerem-se as seguintes propostas:

- Recolha de amostras em outros locais da Margem Sul, situados próximo ao Rio Tejo para poder identificar se são encontrados microrganismos similares ou com melhor potencial de biorremediação.
- Aumento do tempo de análise no estudo de biorremediação, para verificar se o desempenho aumenta com um tempo prolongado, devendo ser feito para a utilização de DCPIP e posteriormente para o surfactante.
- Utilizar outras quantidades de surfatante e outros tipos de surfactante, nomeadamente biossurfactantes.

- Realizar estudos com outras percentagens de poluente, desta vez inferior e ver como os microrganismos agem.
- Realizar parcerias com laboratórios/faculdades que tenham interesse em identificar os microrganismos encontrados de forma mais precisa e assim realizar uma comparação entre cada local de amostragem e seu desempenho perante os hidrocarbonetos.

Como parte final, sugere-se realizar estudos mais aprofundados na identificação dos microrganismos encontrados, pois, como verificado neste trabalho, os locais estudados possuíam microrganismos semelhantes. Se houver a possibilidade de identificá-los de forma mais precisa, acredita-se que poderia ser criado uma biblioteca-genómica em amostras recolhidas na Margem Sul e assim posteriormente verificar metodologias mais eficazes para a biodegradação com relação aos microrganismos encontrados.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abena, M. T. B., Li, T., Shan, M. N., Zhon, W. (2019). Crude Oil Biodegradation by Newly Isolated Bacterial Strains and Their Consortium Under Soil. In *Microcosm Experiment*. (pp 864-874). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1044448/full>
- Ali, S.S., Kornaros, M., Manni, A., Sun, J., El-Shanshoury, A. E. R., Kenawy, E. R., Khalil, M. A. (2020). Enhanced anaerobic digestion performance by two artificially constructed microbial consortia capable of woody biomass degradation and chlorophenols detoxification. *J. Hazard. Mater*, 2020.
- Almansoori, A. F., Hasan, H. A., Abdullah, S.R.S., Idris, Anuar, M. N., Al-Adiwish, W. M. (2019). Biosurfactant produced by the hydrocarbon-degrading bacteria: characterization, activity and applications in removing TPH from contaminated soil. In *Environ. Technol. Innov.* <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100347>
- Alvarado, K., Ninõ, L., Gelves, G. (2022). Kinetic modeling of biosurfactant production from crude oil using *Bacillus subtilis* cells. (pp 176-181). <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2022.06.009>
- Ambust, S., Amar, J. D., Kumar, R. (2021). Bioremediation of petroleum contaminated soil through biosurfactant and *Pseudomonas* sp. SA3 amended design treatments. (pp. 01-02).
- Ángeles, M. T., Refugio, R. V. (201). In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. In *Braz J Microbiol*, 44(2). (pp 595-605). <http://doi:10.1590/S1517-83822013000200040>
- Ayangbenro, A. S., Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
- Ayed, H. B., Jemil, N., Maalej, H., Bayoudh, A., Hmidet, N., Nasri, M. (2015). Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens*. In *International Biodeterioration and Biodegradation*. (pp 8–14).
- Azevedo, A. P. M. (2004). Efeito de produtos químicos e ruído na gênese de perda auditiva ocupacional. Dissertação de Mestrado Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

Azri, M. H., Ismail, S., Abdullah, R. (2018). An endophytic *Bacillus* strain promotes growth of oil palm seedling by fine root biofilm formation. In *Rhizosphere*, 1. (pp. 1-7). <http://doi:10.1016/j.rhisph.2017.10.003>.

Azubuike, C. C., Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (pp 32-180). <http://doi10.1007/s11274-016-2137-x>.

Basak, B., Patil, S. M., Saha, S., Kurade, M. B., Ha, G. S., Govindwar, S. P., Lee, S. S., Chang, S. W., Chung, W. J., Jeon, B. H. (2021). Rapid recovery of methane yield in organic overloaded-failed anaerobic digesters through bioaugmentation with acclimatized microbial consortium. In *Sci. Total Environ.* <http://doi.10.1016/j.scitotenv.2020.144219>

Bhatt, P., Gangola, S., Bhandari, G., Zhang, W., Maithani, D., Mishra, S., Chen, S. (2021). New insights into the degradation of synthetic pollutants in contaminated environments. In *Chemosphere*. <http://doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128827>

Befkadu, A. A., Chen. (2018). Surfactant-enhanced soil washing for removal of petroleum hydrocarbons from contaminated soils: a review. In *Pedosphere*. (pp 383–410).

Benaissa, A. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria a review. In *Alger. J. Environ. Sci. Technol.* (pp 873-880).

Betancur, L. A. G, Bernal, D.A., Valdivia, A. C. R., Dendooven, L. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated salinealkaline soils of the former Lake Texcoco. (2006). In *Chemosphere*. (pp 1749-1760). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.026>

Câmara, B. (2013). *Descrição morfológica de colônias em microbiologia*. 2013. <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2013/08/descricao-morfologica-de-colonias-em.html>. Acesso em 30.11.2013

Cases, I., de Lorenzo, V. (2005). Genetically modified organisms for the environment: Stories of success and failure and what we have learned from them. In *International Microbiology*. (pp 213-222). <https://goo.gl/3oaxJT>

Clarkson, M. A., Abubakar, S. I. (2015). Bioremediation and biodegradation of hydrocarbon contaminated soils: a review. In *OSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. (pp. 38–45, 2015).

Castro, G. A. S., Lopez, U. I. G. J, Fandino, C. G, Toledo, F. L, Calvo, C. (2012). Application of selected microbial consortia combined with inorganic and oleophilic fertilizers to recuperate oil-polluted soil using land farming technology. In *Clean Technology of Environment Policy*. (pp 719-726). <http://doi:10.1007/s10098-011-0439-0>

Cheffi, M., Hentati, D. (2020). Isolation and characterization of a newly naphthalene-degrading *Halomonas pacifica*, strain Cnaph3: biodegradation and biosurfactant production studies. [http://doi: 10.1007/s13205-020-2085-x](http://doi.org/10.1007/s13205-020-2085-x)

Chen, C., Li, D., Li, R., Shen, F., Xiao, G., Zhou, J. (2021). Enhanced biosurfactant production in a continuous fermentation coupled with in situ foam separation. In *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108206>

Coelho, V. H. R. (2011). Monitoramento e análise da variação do nível d'água para estimativa de recarga do aquífero livre da bacia do Rio Gramame. Dissertação de Mestrado Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011

Colla, L. M., Costa, J. A. V. (2003). Otenção e Aplicação de Biossurfactantes. In *Vetor*, Rio Grande. (pp 85-103)

Conceição, D. M. (2005). Fungos filamentosos isolados do rio Atibais, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. In *Arquivos do Instituto Biológico*. (pp 99-106).

Coulon, F., Awadi, A. M., Cowie, W., Mardlin, D., Pollard, S., Cunningham, C. (2009). When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial. In *Environmental Pollution*. (pp 3032-3040). [http://doi: 10.1016/j.envpol.2010.06.001](http://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.001)

Crapez, M. A. C., Borges, A. L. N., Bispo, M. G. S., Pereira, D. C. (2002). Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. In *Ciência Hoje*. (pp 32-33).

Del'Labon, G. P. (2023). *A biorremediação do Lauril Éter Sulfato de Sódio presente em efluentes de Indústrias Cosméticas: uma revisão sistemática*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos Centro de ciências agrárias, 2023.

Dell' Anno, F., Rastelli, E., Sansone, C., Brunet, C., Ianora, A., Dell' Anno, A. (2021). Bacteria, Fungi and Microalgae for the Bioremediation of Marine Sediments Contaminated by Petroleum Hydrocarbons in the Omics Era. In *Microorganisms*. (pp 1–14). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>

Dias, F. G. Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo. Dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007

Eslami, E., Joodat., Seyed, S. T. (2018). Bioremediation of oil and heavy metal contaminated soil in construction sites: a case study of using bioventing-biosparging and phytoextraction techniques. <https://arxiv.org/abs/1806.03717>

Essabri, A. M. A., Aydinlik, N. P., Willia, N. E. (2019). Bioaugmentation and biostimulation of total petroleum hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil with fungi isolated from olive oil effluent. In *Water, Air, and Soil Pollution*. (pp 1–16).

Fantroussi, S., Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? In Microbiology. (pp 268-275). <https://goo.gl/y6kLsc>

Faria, M.F., Mendes, A. (2010). Actas do colóquio internacional industrialização em Portugal no século XX: o caso do Barreiro. In *Actas do colóquio internacional Industrialização em Portugal no século XX: o caso do Barreiro* (pp. 1-15).

Filho, A. A. M., Oliveira, V, K. (2014). *Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: o que são? Como é a técnica de Gram? Quais as vantagens de diferenciar as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas?* <https://www.abc.med.br/p/587007/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas-o-que-sao-como-e-a-tecnica-de-gram-quais-as-vantagens-de-diferenciar-as-bacterias-gram-negativas-e-gram-positivas.htm>. Acesso em 02.12.2023

Folch, A., Vilaplana, M., Amado, L., Vicent, R., Caminal, G. (2016). Fungal permeable reactive barrier to remediate groundwater in an artificial aquifer. In Journal of Hazardous Materials. (pp 554-560). <http://doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.09.004>

Forster, L. M. K.; Tannhauser, M., Tannhauser, S. L. (1994). Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. In Revista de Saúde Pública. (pp 167-172).

Gidudu, B., Chirwa, E. M. N. (2020). Application of Biosurfactants and Pulsating Electrode Configurations as Potential Enhancers for Electrokinetic Remediation of Petrochemical Contaminated Soil. (pp 1-17). <https://doi.org/10.3390/su12145613>

Ghafari, S., Baboli, Z., Neisi, A., Mirzaee, S. A. (2019). Surfactant-enhanced Bioremediation of n-Hexadecane-contaminated Soil Using Halo-tolerant Bacteria

Penicillium glucanolyticus sp. Strain T7-AHV Isolated from Marine Environment. In *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* (pp. 111-123). <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1465>

Glick B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. In *Scientifica*. <http://doi:10.6064/2012/963401>

Gomez F., Sartaj, M. (2014). Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). In Integrated Journal of Biodeterioration Biodegradation. (pp 89:103-109). <http://doi: 10.1016/j.ibiod.2014.01.010>

Gkorezis, P., Daghighi, M., Franzetti, A., Hamme, J. D. V., Vangronsveld, W. S. J. (2016). The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. In *Frontiers in microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01836>

Grigiskis, S., Baškys, E., Levišauskas, D., Kavaliauskė, M., Dižavičienė, O., Aikaitė-Stanaitienė, J. (2015). Optimization Of Sorbent System From Paper Mill Waste Short Fibers For Bioremediation Of Heavy Hydrocarbons In Soil. Environment. Technology. Resources. Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference. Volume 1. (pp 104-111). <https://doi.org/10.17770/etr2011vol1.894>

- Hamamura, N., Ward, D. M., Inskeep, W. P. (2013). Effects of petroleum mixture types on soil bacterial population dynamics associated with the biodegradation of hydrocarbons in soil environment. In *FEMS Microbiol.* (pp 168–178). <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12108>
- Hang, L.V., Xiaosi, S. U., Wang, Y., Zhenxue, D., Mingyao, L. (2018). Effectiveness and mechanism of natural attenuation at a petroleum - hydrocarbon contaminated site. In *Chemosphere.* (pp 293-301).
- Hawash, A.B., Alkooranee J. T., Abbood, H.A., Zhang, J., Sun, J., Zhang, J., Ma, F. (2018). Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field. In *Biotechnology Reports.* (pp 104-109).
- Hobson, A. M, Frederickson, J., Dise, N. B. (2005). CH₄ and N₂O from mechanically turned windrow and vermincomposting systems following in-vessel pre-treatment. In *Waste Management.* (pp 345-352) <https://doi: 10.1016/j.wasman.2005.02.015>
- Hutchinson, S. L., Schwab,, A. P., Bankis, M.K. (2003). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in the rhizosphere. In *Phytoremediation - Transformation and control of contaminants.* (pp 355-386) <https://doi.org/10.1002/047127304X.ch11>
- Ibrahim, M. L., Ijah, U. J. J., , S.B. Manga, S. B., Bilbis, S. Umar, S. (2013). Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. In *International Biodeterioration & Biodegradation.* (pp 28-34).
- Imam, A., Suman, S. K., Ghosh, D., Kanaujia, P. K. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons. In *Petroleum-contaminated soil and sludge, Trac Trends in Analytical Chemistry.* (pp. 50–64).
- Jacques, R. J. S. (2007). Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. In *Ciência Rural, Santa Maria,* (pp 1192-1201).
- Jeffrey, P. K. (2020). N-Hexane. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2020). N-Hexane. Center for Disease Control and Prevention, 2020. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp113-c3.pdf>
- Jimoh, J. Lin. (2019). Biosurfactant: a new frontier for greener technology and environmental sustainability. In *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (pp 184).
- Junyuan, G., Xiaoying, W. (2021). Performance and kinetics of benzo(a)pyrene biodegradation in contaminated water and soil and improvement of soil properties by biosurfactant amendment. In *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 207, 111292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111292>
- Kebede, G., Tefese, E., Adba, E. M., Kamaraj, M., Assefa, F. (2021). Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts. <https://doi.org/10.1155/2021/9823362>

- Koshlaf, E., Ball, A. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. In AIMS Microbiology. (pp. 25–49).
- Kumar, R., Das, A.J., Juwarkar, A. A. (2015). Reclamation of petrol oil contaminated soil by rhamnolipids producing PGPR strains for growing *Withania somnifera* a medicinal shrub. In World J. Microbiol. Biotechnol. (pp 307–313).
- Langworthy, D. E., Stapleton, R.D., Sayler, G. S., Findlay, R. H (2002). Lipid analysis of the response of a sedimentary microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Microb. Ecol* (pp. 189-198).
- Lee, J. H. (2013). An overview of phytoremediation as a potentially promising technology for environmental pollution control. In *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. (pp 431-439.). <http://doi: 10.1007/s12257-013-0193-8>
- Li, Y., Li, C., Xin, Y., Huang, T., Liu, J. (2022). Petroleum pollution affects soil chemistry and reshapes the diversity and networks of microbial communities. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*. (pp 1 – 10). <http://doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114129>
- Liu, Q., Tang, J., Liu, X, Song, B., Zhen, M., Ashbolt, N. J. (2019). Vertical response of microbial community and degrading genes to petroleum hydrocarbon contamination in saline alkaline soil. In *Journal of Environmental Sciences*, vol. 81. (pp 80–92).
- Madhavi, G. N., Mohin,i D. D.(2012). Review paper on parameters affecting bioremediation. In *International Journal of Life Science and Pharma Research*. (pp 77-80). <https://goo.gl/tBP2C6>
- Mahdi, A. M. El., Aziz, H., Eqab, E. S. (2017). Review on innovative techniques in oil sludge bioremediation. In *AIP Conference Proceedings*. <https://doi.org/10.1063/1.5005706>
- Maila, M. P, Colete, T. E. (2004). Bioremediation of petroleum hydrocarbons through land farming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? Review. In *Environmental Science Biotechnology*. (pp 349-360). <http://doi.10.1007/s111157-004-6653>
- Martins, R., Castro Bravo, C., Vilela, L., Costa, L., Souza Dias, E. (2021). Multivariate analysis of nutritional parameters required for the submerged cultivation of three coprinaceous fungi for biosurfactant production. In *Ciência e Agrotecnologia*, 45. <http://doi:10.1590/1413-7054202145022220>
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental organic pollutants. In *Currant Opinion Plant Biology*. (pp 153-162). [http://doi.10.1016/S1369-5266\(99\)00054-0](http://doi.10.1016/S1369-5266(99)00054-0)
- Melo, I. S., Azevedo, J. L. (2008). *Microbiologia ambiental*. Itamar Soares de Melo, João Lúcio de Azevedo, Jaguariúna, 2008. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149954/1/2008OL-05.pdf>
- Moldes, A. B., Paradelo, R., X. Vecino, X., Cruz, M., Gudiña, E., Rodrigues, L., Teixeira, J. A., Domínguez, J. M., Barral, M.T. (2013). Partial Characterization of Biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and Comparison with Sodium Dodecyl Sulphate for the

Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil. In New Trends in Biotechnological Processes to Increase the Environmental Protection.
<https://doi.org/10.1155/2013/961842>

Morales, N. K. C., Tovar, A. V. R., Zúñiga, A. G. (2016). Plant growth promoting characterization of soil bacteria isolated from petroleum contaminated soil. In Int. J. Environ. Agric. Res. (pp. 15-21).

Murray, P., Rosethal, K., Pfaller, A. (2014). Microbiologia Médica (7^a ed.), Acinetobacter, Pseudomonas e Bactérias relacionadas. In Elsevier. (pp 386-388).

Mohan, S. V., Sirisha, K., Rao, N. C., Sarma, P. N., Reddy, S. J. (2004). Degradation of chlorpyrifos contaminated soil by bioslurry reactor operated in sequencing batch mode: Bioprocess monitoring. In Journal of Hazardous Materials. (pp 39-48).
<http://doi:10.1016/j.jhazmat.2004.05.037>.

Nascimento, J.S. (2010). Biologia de microrganismos. In. Guerra, R.A.T. (pp. 233-306).

Nogueira, A. V., Filho, G. N. S. (2015). *Microbiologia*. Nogueira, Alexandre Verzani, Santa Catarina, 2015. (pp 10-211).

Nogueira, L., Rodrigues, A. C. F., Trídico, C. P., Fossa, C. E., Almeida, E. A. (2011). Oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. In Environ. Monit. Assess. (pp. 243-255)

Ojuederie, O. B., Babalola, O. O. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. In International journal of environmental research and public health. <http://doi:10.3390/ijerph14121504>.

PanReac AppliChem. (2020). Pseudomonas CN Agar Base (EN ISO 16266) (Dehydrated Culture Media) for microbiology - ITW Reagents. Microbiologia - ITW Reagents.https://www.itwreagents.com/download_file/product_infos/413752/en/413752_en.pdf. Acesso em 03.12.2023.

Pattabhiramaiah, M., Shanthala, M., Rajashekara, S., Sheikh, F., Naik, S. (2018). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbes isolated from the marine sponge *biemna fortis* (topsent 1897). In Microbial Action on Hydrocarbons

Pawlik, M., Cania, B., Thijs, S., Vangronsveld, J., Seget, Z. P. (2017). Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site. In Environ. Sci. Pollut. Res. (pp 19640-19652)

Plóciniczak, M. P., Płaza, G. A., Seget, Z. P., Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. In Int. J. Mol. Sci., 12. (pp. 633-654).

Prathyusha, K., Mohan, Y. S. Y. V. J., Sridevi, S., Sandeep, B. V. (2016). Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon degrading indigenous bacteria. In Contaminated sites of Visakhapatnam," International Journal of Advanced Research. (pp 357–362).

- Pereira, R. C. C., Pasa, V. M. D. (2005). Effect of alcohol and copper content on the stability of automotive gasoline. In *Energy Fuel*. (pp 426–432).
- Pereira, A. R. B., Freitas, D. A. F. (2012). Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes. In *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. (pp 975-1006).
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (2022). *Microbiology*. 5th ed. New York: McGraw Hill. (pp. 10-14).
- Preté, P. S. C. (2000). Solubilização de membranas de eritrócitos por surfactantes da série Tween. In *Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade Estadual de Campinas*. <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1588757>
- Rahman, K.S., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I. M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. In *Bioresour. Technol.* (pp. 159-168). [https://doi: 10.1016/s0960-8524\(03\)00114-7](https://doi: 10.1016/s0960-8524(03)00114-7).
- Ramdass, A. C., Rampersad, S. N (2021). Diversity and Oil Degradation Potential of Culturable Microbes Isolated from Chronically Contaminated Soils in Trinidad. In *Microorganisms*, 9(6), (pp 1167). <http://doi: 10.3390/microorganisms9061167>.
- Rizzo., Andreia C. D. L. (2006). Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. In *Série Tecnologia Ambiental* 37. (pp 76).
- Rotker, M. *Photomicrograph of cultured Neisseria meningitidis (meningococcus), a gram-negative diplococcus bacterium that causes cerebrospinal meningitis, gram stain, mag. 1125x (at 24 x 36 mm)*. <https://www.medicalimages.com/stock-photo-photomicrograph-of-cultured-neisseria-meningitidis-meningococcus-a-gram-negative-diplococcus-image22440749.html/>. Acesso em 03.12.2023.
- Rufino, R. D., Luna, J. M., Takaki, G. M. C., Ferreira, S. R. M., Sarubbo, L.A. (2012). Application of the Biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the Remediation of Heavy Metals. In *Chemical Engineering*. (pp 61-66).
- Sáenz-Marta, C. I., Ballinas-Casarrubias, M. de L., Rivera-Chavira, B. E., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). Biosurfactants as Useful Tools in Bioremediation. In *Tech*. doi: 10.5772/60751
- Santos, D. K. F., Rufino, R.D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. In *Int. J. Mol. Sci.* (pp 401).
- Santos, E., Ungari, H. C. N., Santos, M. B. D. (2008). Principais técnicas de remediação e gerenciamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos no estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- Santos J. C. V., Mendes da S. Santos, E., da Silva, Y.A., Lira I. R .A. da S., Silva R., Durval, I. J. B., Sarubbo, L. A., Luna, J. M. (2021). Application of *Candida Lipolytica*

Biosurfactant for Bioremediation of Motor Oil from Contaminated Environment. In Chemical Engineering Transactions. (pp 649-654). <https://doi.org/10.3303/CET2186109>

Sanscartier, D., Zeeb, B., Koch, I., Reimer, K. (2009). Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. In Cold Regions Science and Technology. (pp 167-173) <http://doi:10.1016/j.coldregions.2008.07.004>

Sayer, J. A., Gadd, G. M. (2001). Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. In Mycological Research, Cambridge. (pp.1261– 1267).

Silva, I. G. S., Almeida, F. C. G., Silva, N. M. P. R., Converti, A., Sarubbo, L. A. (2021). Application of Green Surfactants in the Remediation of Soils Contaminated by Hydrocarbons. In Role of Microorganisms in Remediating Contaminated Soils. (pp 1 – 21). <https://doi.org/10.3390/pr9091666>

Singh, S. K., Haritash, A. K. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation,” International journal of Environmental Science and Technology, vol. 16, no. 10. (pp. 6489–6512).

Singh, R., Singh, P., Sharma, R. (2014). Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: A review. In International Academy of Ecology and Environmental Science. (pp 1-6).

Smulek, W., Sydow, M., Matejuk, J. Z., Kaczorek, E. (2020). Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH – a case study of long term contaminated industrial area. In Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 187. (pp 1–10).

Souza, A. K. R., Morassuti, C. Y., Deus, W. B. (2018). Poluição do ambiente por metais pesados e utilização de vegetais como bioindicadores. In Acta Biomedica Brasiliensia. (pp 1-12). <https://doi.org/10.18571/acbm.189>

Souza, J. F. L. (2021). Estratégias de biorremediação aplicadas a solos contaminados com hidrocarbonetos: Revisão literária. Dissertação de Mestrado, Centro Federação de Educação Tecnológicas de Minas Gerais Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental. Graduação de Engenharia Ambiental e Sanitária, 2021. (pp 1-69).

Swick, D., Jaques, A., Walker, J. C., & Estreicher, H. (2014). Gasoline toxicology: Overview of regulatory and product stewardship programs. Regulatory Toxicology and Pharmacology, In European Chemical Agency (ECHA). <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals>

Streva, E. R., Pasa, V. M. D., Sodr , J. R. (2011). Aging effects on gasoline–ethanol blend properties and composition. Fuel, v. 90. (pp 215-219).

Teixeira, A. S. (2007). *Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial*. Dissertação de Mestrado Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, 2007.

Titah, H. S., Syawlia, R. M. (2021). Removal of Hydrocarbons from Contaminated Soils Using Bioremediation by Aerobic Co-composting Methods at Ship Dismantle Locations.

Journal of Ecological Engineering, 22(6), (pp 181-190).
<https://doi.org/10.12911/22998993/137441>

Trabulsi, L.R., Alterthum, F., Gompertz, O.F., Candeias, J. A. N. *Microbiologia*. 5.ed. Atheneu. São Paulo, 2008.

Truskewycz, A., Gundry, T. D., Khudur, L. S, Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Ball, A. S, Shahsavari, E. (2019). Petroleum Hydrocarbon Contamination in Terrestrial Ecosystems-Fate and Microbial Responses. In *Molecules*, 24(18), 3400.
<http://doi.10.3390/molecules24183400>

Varjani, S., Upasani V. N. (2019). Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. *Journal of Environmental Management*, vol. 245. (pp 358–366).

Varjani, S. J., Gnansounou, E. (2017). Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. In *Biores. Technol.* (pp 1258–1265). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.028>

Varjani, S., Pandey, A., Upasani, V. N. (2021). Petroleum sludge polluted soil remediation: Integrated approach involving novel bacterial consortium and nutrient application. In *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142934>

Vieira, G. A. L., Cabral, L., Otero, I. V. R., Ferro, M., Faria, A. U., Oliveira, V. M., Bacci, M., Sette, L. D. (2021). Marine associated microbial consortium applied to RBBR textile dye detoxification and decolorization: Combined approach and metatranscriptomic analysis. In *Chemosphere*. [10.1016/j.chemosphere.2020.129190](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129190)

Wang, H., Wu, S., Zhang, Y., Bohu, T., Bai, Z., Zhuang, X. (2022). Understanding the Implications of Predicted Function for Assessment of Rapid Bioremediation in a Farmland-Oilfield Mixed Area. In *Sustainability*, 14(4). (pp 2248).
<https://doi.org/10.3390/su14042248>

Wang, J., Xu, H., Guo, S. (2007). Isolation and characteristics of a microbial consortium for effectively degrading phenanthrene. *Pet. Sci.* 4. (pp 68–75).
<https://doi.org/10.1007/s12182-007-0012-y>

Wolinska, A., Galazka, A., Kuzniar, A., Goraj, W., Jastrzebska, N., Grzadziel, J., Stepniewska, Z. (2018). Catabolic Fingerprinting and Diversity of Bacteria in Mollic Gleysol Contaminated with Petroleum Substances. In *Applied Sciences*.
<https://doi.org/10.3390/app8101970>

Xiao, M., Zytner, R. G. (2019). The effect of age on petroleum hydrocarbon contaminants in soil for bioventing remediation. *Bioremediation Journal*, v. 23, n. 4. (pp 311-325).
<https://doi.org/10.1080/10889868.2019.1671306>

Yadav, A. K., Manna, Pandiyan, S. K, Singh, A., Kumar, M., Chakdar, H., Srivastava, A. K. (2016). Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus sp.* from

diesel fuel-contaminated site. In *Microbiology* (pp. 56-62). <https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261716010161>.

Yuting, L., Joy, D., Van, N., Wang, J., Zhang, X., Zhou, J., Li, G. (2009). Microarray-based functional gene analysis of soil microbial communities during ozonation and biodegradation of crude oil. In *Chemosphere*, 75(2). (pp 193-199). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.007>.

Zafra, G., R. Regino, B., Agualimpia., Aguilar, F. (2016). Molecular characterization and evaluation of oil degrading native bacteria isolated from automotive service station oil contaminated soils. In *Chemical Engineering Transactions*. (pp. 511–516).

Zhang, C., Wu, X., Wu, Y., Li, J., An, H., Zhang, T. (2021). Enhancement of dicarboximide fungicide degradation by two bacterial co-cultures of *Providencia stuartii* JD and *Brevundimonas naejangsanensis* J3. In *J. Hazard. Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123888>

Zhang, T., Zhang, H. (2022). Microbial Consortia Are Needed to Degrade Soil Pollutants. In *Microorganisms*, 10(2). (pp 261). <http://doi: 10.3390/microorganisms10020261>

Zhao, X., Li, X., Li, Y. (2019). Shifting interactions among bacteria, fungi and archaea enhance removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in the soil bioelectrochemical remediation. In *Biotechnol Biofuels*, 12, (pp 160) <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1500-1>

Zinkevich, V., Bogdarina, I., Kang, H., Hill, M.A.W., Tapper, R. and Beech, I.B.(1996). Characterization of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria. *International Biodeterioration Biodegradation*. In Barking. (pp 163–172). [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(96\)00025-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(96)00025-X)

Portal Institucional da Câmara Municipal do Barreiro. <https://www.cm-barreiro.pt/viver/noticia/estuario-do-tejo-a-caminho-da-despoluicao-total>. Acesso em 03.12.2023.

7. ANEXOS

ANEXO 1 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

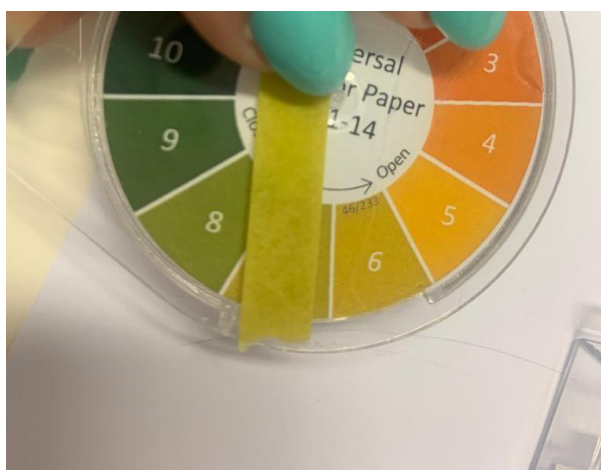
1- Solo de retirada da amostra da Praia de Palhais – Fonte: Junta de Freguesia de Palhais



2 – Solo de retirada da amostra da Praia de Copacabana.



3- Análise do pH da amostra de Palhais.



4 – Análise pH amostra Praia de Copacabana.



5 - Materiais utilizados na metodologia para meio LB e BH líquido e sólido.



6 – Material utilizado no estudo de biodegradabilidade – DCPIP.



7 - Material utilizado no estudo de biodegradabilidade – Tween 80.

