



BEATRIZ SARA
COELHO DOS
SANTOS

**ESTUDOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS NO ESTUÁRIO
DO RIO TEJO**

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

ORIENTADOR

Doutora Ana Cláudia Cavaco de Sousa Coelho

COORIENTADOR

Doutora Maria de Fátima Nunes Serralha

Dezembro 2022

BEATRIZ SARA
COELHO DOS
SANTOS

**ESTUDOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS NO ESTUÁRIO
DO RIO TEJO**

JÚRI

Presidente: Professora Doutora Ana Gabriela Gonçalves Neves Gomes, Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal

Orientadora: Professora Doutora Ana Cláudia Cavaco de Sousa Coelho, Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal

Vogal: Professora Doutora Rosa Maria León-Bañares, Universidad de Huelva

Dezembro 2022

Dedico a mim própria, como demonstração do meu esforço, dedicação e resiliência!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar esta dissertação com um agradecimento às pessoas que me ajudaram direta e indiretamente na elaboração desta tese de mestrado. Em particular,

À Professora Doutora Ana Cláudia Cavaco Sousa Coelho, agradeço-lhe pela atenção, pelos ensinamentos e orientação que me transmitiu durante a formação deste trabalho e durante o percurso académico, bem como a tranquilidade e carinho que teve para comigo;

À Professora Doutora Maria de Fátima Serralha, agradeço-lhe por todo o seu apoio, na orientação do trabalho, pelo carinho e atenção, bem como pelos conhecimentos, ensinamentos e conselhos transmitidos durante este percurso;

Quero agradecer também à Professora Doutora Maria de Lurdes Gameiro, pela sua disponibilidade, apoio, atenção e serenidade que sempre me transmitiu;

Quero agradecer também à Professora Doutora Ana Gabriela Gonçalves Neves Gomes, pela sua disponibilidade, apoio e carinho que sempre me transmitiu;

Agradeço também à minha família, por todo o apoio, ajuda e dedicação que tiveram durante esta etapa de 5 anos de estudo;

Agradeço ao meu namorado Miguel Coelho, pela dedicação, força e incentivo, que me dá em qualquer momento, por nunca desistir dos meus sonhos e objetivos e, por acreditar que sou capaz, seja do que for;

Por fim, agradeço especialmente a mim própria, pelo meu esforço, resiliência e dedicação que imprimo em tudo o que faço, dando sempre o melhor de mim!

RESUMO

A monitorização do risco ambiental e de saúde pública num determinado local associado ao uso excessivo de combustíveis fósseis, necessita de uma adequação das metodologias e de um maior conhecimento sobre o comportamento destes poluentes no meio ambiente. O petróleo é uma mistura complexa composta principalmente por hidrocarbonetos, sendo estes considerados um dos principais poluentes do planeta, causando efeitos adversos nos ecossistemas. No entanto, existem naturalmente organismos capazes de resistir à presença desses poluentes e de metabolizá-los em substâncias inofensivas ou não tóxicas, definindo-se assim a biorremediação, através dos microrganismos hidrocarbonoclásticos.

Desta forma, este trabalho surge na continuação da linha de investigação de processos biodegradativos associados à biorremediação dos solos contaminados com produtos petrolíferos, de seis locais do estuário do rio Tejo, aplicando-se neste estudo a técnica de atenuação natural em conjunto com a bioestimulação, de forma a acelerar o processo de biorremediação. As amostras representativas do solo foram tratadas de duas formas diferentes: uma por imersão do solo em meio Bushnell-Haas (BH), e outra onde se procedeu a uma lavagem prévia do solo com cloreto de sódio (NaCl) 0,9% (m/v), e só depois se adicionou a solução lavagem (suspensão) ao meio BH.

Realizaram-se análises microbiológicas (observação das colónias e caracterização da diversidade morfológica e bioquímica das bactérias selecionadas), monitorizando o comportamento da população de microrganismos com potencial de biorremediação ao longo do processo de biorremediação por bioestimulação. Foram estudadas duas concentrações (0,4% e 0,6%) dos poluentes gasolina, hexano e tolueno. As colónias obtidas revelaram ser bacilos Gram-positivas e negativos na maioria das amostras, e o crescimento em meio seletivo permitiu identificar *Pseudomonas aeruginosa* na maioria das amostras. A taxa de biorremediação foi determinada utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP); na presença e na ausência do emulsificante Tween 80.

Neste ponto, as taxas de biorremediação mais altas que se obtiveram para as amostras com suspensão foram para a gasolina 62% (Alburrica), para o hexano 66% (Trafaria), para o tolueno teve-se 60% (Trafaria); no que concerne as amostras com solo, para a gasolina obteve-se 68% (Alburrica), para o hexano 65% (Algés), e para o tolueno 79% (Algés). No geral, as bactérias foram eficientes na capacidade de degradação dos hidrocarbonetos adicionados ao meio de cultura, verificando-se taxas de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos mais elevadas com a adição de emulsificante ao meio. Conclui-se assim que, a adição de emulsificantes permitiu prolongar o metabolismo degradativo dos poluentes por parte dos microrganismos, que neste processo atuaram como sendo a única fonte de carbono.

Palavras-chave: biorremediação, microrganismos hidrocarbonoclásticos, hidrocarbonetos, solo, atenuação natural, bioestimulação.

ABSTRACT

Monitoring environmental and public health risks in a given location associated with the excessive use of fossil fuels requires the adequacy of methodologies and a greater knowledge of the behaviour of these pollutants in the environment. Petroleum is a complex mixture composed mainly of hydrocarbons, considered one of the main pollutants on the planet, causing adverse effects on ecosystems. However, natural organisms can resist these pollutants and metabolise them into harmless or non-toxic substances, thus defining bioremediation, through hydrocarbonclastic microorganisms.

This work continues the investigation of biodegradative processes associated with the bioremediation of soils contaminated with petroleum products from six sites of the Tejo River estuary, applying in this study the technique of natural attenuation together with biostimulation, in order to accelerate the process of bioremediation. Representative soil samples were treated in two different ways: one by soil immersion in Bushnell-Haas (BH) medium, and another where the soil was previously washed with 0.9% (w/v) sodium chloride (NaCl), and only then the wash solution (suspension) was added to the BH medium.

Microbiological analyses were performed (observation of colonies and characterization of the morphological and biochemical diversity of the selected bacteria), monitoring the behaviour of the population of microorganisms with bioremediation potential throughout the bioremediation process by biostimulation. Two concentrations (0.4% and 0.6%) of the pollutants gasoline, hexane and toluene were studied. The obtained colonies were revealed to be Gram-positive and negative bacilli in most samples. The growth in a selective medium allowed the identification of *Pseudomonas aeruginosa* in most samples. The bioremediation rate was determined using the redox indicator 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP); in the presence and absence of the emulsifier Tween 80.

At this point, the highest bioremediation rates obtained for the samples with suspension were for gasoline 62% (Alburrica), for hexane 66% (Trafaria), for toluene 60% (Trafaria); regarding the samples with soil, for gasoline 68% (Alburrica), for hexane 65% (Algés), and toluene 79% (Algés). In general, the bacteria were efficient in degrading hydrocarbons added to the culture medium, with higher rates of aerobic biodegradation of hydrocarbons with an emulsifier. Thus, we conclude that adding emulsifiers prolonged the degradative metabolism of pollutants by microorganisms, which acted as the only carbon source in this process.

Keywords: bioremediation, hydrocarbonclastic microorganisms, hydrocarbons, soil, natural attenuation, biostimulation.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Biorremediação dos solos contaminados com hidrocarbonetos	3
2.1.1. Poluição de hidrocarbonetos	4
2.1.2. Tipos de hidrocarbonetos	4
2.1.3. Fontes de poluição	6
2.1.4. Conceitos envolvidos na biorremediação	7
2.1.5. Principais tipos de biorremediação	7
2.1.6. Métodos de biorremediação	9
2.1.7. Estudos de Biorremediação	18
2.2. Recolha e caracterização das amostras de solo	19
2.2.1. Técnica de amostragem do solo	19
2.2.2. Crescimentos microbianos	20
2.2.3. Caracterização morfológica das colónias	22
2.2.4. Caracterização bioquímica – Método da Coloração de Gram	22
2.2.5. Identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.2.6. Efeito do biossurfactante nas taxas de biodegradabilidade e índice de emulsificação	24

3. METODOLOGIA	26
3.1. Locais de recolha das amostras de solo	26
3.2. Amostragem	27
3.2.1. Preparação do local de amostragem	28
3.2.2. Amostra Simples.....	28
3.2.3. Medição do pH da amostra composta.....	28
3.2.4. Identificação da amostra composta.....	28
3.2.5. Medição da condutividade do solo	29
3.2.6. Conservação das amostras	29
3.3. Seleção dos organismos hidrocarbonoclásticos.....	30
3.3.1. Seleção e crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos.....	32
3.4. Caracterização morfológica e bioquímica dos organismos.....	35
3.4.1. Caracterização morfológica dos organismos	35
3.4.2. Caracterização bioquímica dos organismos.....	35
3.5. Identificação para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> usando um meio seletivo	36
3.6. Estudo da biodegradabilidade.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Caracterização dos locais de recolha das amostras de solo	42
4.2. Crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos em meio líquido.....	43
4.2.1. Margem Norte.....	43
4.2.2. Margem Sul	45
4.2.3. Estudo das velocidades de crescimento na fase exponencial.....	47
4.3. Seleção e caracterização das colónias de bactérias	52
4.3.1. Caracterização morfológica dos organismos	52
4.3.2. Coloração de Gram	54

4.4.	Identificação para <i>Pseudomonas</i> usando um meio seletivo.....	55
4.5.	Estudo da biodegradabilidade	57
4.5.1.	Comparação dos valores obtidos com e sem biossurfactante	62
5.	CONCLUSÃO E SUGESTÕES FUTURAS	64
6.	BIBLIOGRAFIA.....	68
	ANEXOS.....	82
	Anexo I – Tabela dos microrganismos capazes de biodegradar hidrocarbonetos	82
	ANEXO II – Informação sobre a recolha das amostras de solo	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos métodos de biorremediação in situ e ex situ, com as respetivas técnicas.	10
Figura 2: Esquema de amostragem do método de <i>zig zag</i> (Carter & Gregorich, 2007).....	19
Figura 3: Curva de crescimento microbiano; Gráfico A: Curva com a descrição das quatro fases; Gráfico B: Fases de latência e de crescimento exponencial em números absolutos e logaritmo do número de células (Rodrigues, 2019).....	20
Figura 4: Caracterização e classificação das colónias visualizadas a olho nu (adaptado de Meded & Lilley, 2015).	22
Figura 5: Esquema do procedimento da coloração de Gram (adaptado de Procop, 2016).	23
Figura 6: Mapa com a localização dos seis locais, do estuário do rio Tejo, para recolha de amostras.....	26
Figura 7: Questionário informativo para descrição do local de recolha das amostras.	29
Figura 8: Sinalizadores adaptados para sinalizar o ponto de recolha de cada amostra simples, numerado de 1 a 10.....	30
Figura 9: Exemplo de como foram guardadas as amostras compostas de cada local, em frascos de vidro, devidamente identificados como já referido no procedimento de amostragem. (Na fotografia estão os frascos das três primeiras amostras recolhidas, rio Trancão, Praia do Cais das Colinas e Praia de Algés).....	30
Figura 10: Distribuição das amostras pela microplaca (adaptado de Direct Industry, 2022).	34
Figura 11: Esquema da ordem de adição das substâncias aos eppendorfs no estudo da biodegradabilidade.	39
Figura 12: Esquema da ordem de adição das substâncias aos eppendorfs no estudo da biodegradabilidade.	39
Figura 13: Distribuição das amostras pela microplaca, no estudo a biodegradabilidade (adaptado Direct Industry, 2022).....	40
Figura 14: Esquema da distribuição das amostras pela microplaca (adaptado de Direct Industry, 2022).....	41

Figura 15: A – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH do rio Trancão. B – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH do rio Trancão.	44
Figura 16: A – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH da Praia Fluvial do Cais das Colinas; B – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia Fluvial do Cais das Colinas.	44
Figura 17: A – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH da Praia de Algés; B – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia de Algés.	44
Figura 18: A – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH da Praia Fluvial da Alcochete; B – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia Fluvial da Alcochete.	46
Figura 19: A – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH da Praia Fluvial de Alburrica; B – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia Fluvial de Alburrica.	46
Figura 20: A – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão da Praia da Trafaria; B – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia da Trafaria.	46
Figura 21: Regressão linear da densidade ótica em função do tempo da amostra em suspensão do rio Trancão, com a respetiva função linear e R^2	48
Figura 22: Observação de dois exemplos de crescimento das colónias obtidas no estudo para caracterização morfológica, em meio BH com Agar nutritivo, tendo se obtido dois tipos de colónias tipo #1 e tipo #2.	53
Figura 23: Exemplo dos resultados obtidos do estudo da coloração de Gram obtidos, imagens retiradas ao microscópio a 4x e 10x.	54
Figura 24: Exemplo de resultado obtido, para identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> usando meio seletivo, neste caso exemplo da amostra da Praia Fluvial da Alburrica em suspensão, para a concentração de 0,4% gasolina.	55
Figura 25: Mapa com sinalização dos seis locais de recolha das amostras efetuada no estuário do rio Tejo, com os resultados das taxas de biodegradabilidade para os três poluentes em cada local, das amostras em suspensão.	58
Figura 26: Mapa com sinalização dos seis locais de recolha das amostras efetuada no estuário do rio Tejo, com os resultados das taxas de biodegradabilidade para os três poluentes em cada local, das amostras com solo.	59
Figura 27: Mapa com sinalização do local de recolha da amostra efetuada na Praia da Trafaria, com os resultados das taxas de biodegradabilidade para os três poluentes com e	

sem biossurfactante, nas amostras em suspensão e da amostra com solo se biossurfactante.
..... 62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição do material utilizado para recolha das amostras, as respetivas de quantidade e observações.....	27
Tabela 2 – Composição do tubo de análise sem biossurfactante	37
Tabela 3 – Composição do tubo do teste branco da suspensão celular	37
Tabela 4 – Composição do tubo do teste branco do hidrocarboneto	38
Tabela 5 – Composição do tubo de análise com biossurfactante	38
Tabela 6 – Composição do tubo de teste branco do biossurfactante.....	38
Tabela 7 – Descrição dos locais onde se efetuaram a recolha das amostras, anotando-se as coordenadas, a temperatura de ambiente (Tambiente) e a de amostra (Tamostra), o pH e condutividade, respetivamente	42
Tabela 8 – Resultados alcançados das taxas específicas de crescimento de cada tipo de amostra de cada local da margem Norte, em cada poluente em meio BH e tempo de D.O., os valores numéricos a negrito marcam a taxa específica maior registada.....	48
Tabela 9 – Resultados alcançados das taxas específicas de crescimento, de cada tipo de amostra, de cada local da margem Sul, em cada poluente em meio BH e D.O., os valores numéricos a negrito marcam a taxa específica maior registada.....	50
Tabela 10 – Caracterização morfológica das colónias que se obteve do estudo realizado..	53
Tabela 11 – Caracterização microscópica para identificação de Pseudomonas, em cada tipo de amostra da margem Norte, para cada poluente na respetiva concentração.....	55
Tabela 12 – Caracterização microscópica para identificação de Pseudomonas, em cada tipo de amostra da margem Sul, para cada poluente na respetiva concentração	56

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
APA	Agência Portuguesa do Ambiente
CN	Ácido Nalidíxico Ceftrimida
AG	Amostra com Gasolina
AH	Amostra com Hexano
AT	Amostra com Tolueno
BH	Branco do Hidrocarboneto
BH	Bushnell-Haas
BSC	Branco da Suspensão Celular
BS	Branco do Biossurfactante
D.O.	Densidade Ótica
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
INR	Instituto Nacional dos Resíduos
LB	Luria- Bertani
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
rpm	Rotações por minuto
UV's	Ultra-Violetas

Símbolos Gregos

μ	Taxa de crescimento específica
-------	--------------------------------

1. INTRODUÇÃO

Atualmente multiplicam-se as manifestações que visam promover a consciencialização ambiental, vivendo-se uma fase de transição energética. O aumento da população mundial e, o facto da economia moderna ser movida predominantemente pelos combustíveis fósseis, faz com que as atuais formas de consumo de energia aumentem, tendo como resultado o incremento das emissões globais de CO₂, e de outros gases com efeito estufa. O uso excessivo e queima de combustíveis fósseis, considerados um dos principais causadores do efeito de estufa do mundo, e as dificuldades em implementar a transição energética, leva a que mudanças significativas em prol da preservação e conservação ambiental tenham sido difíceis de alcançar, sendo imperativo o desenvolvimento de políticas e métodos que criem condições para a descarbonização da economia e da sociedade, para a recuperação e descontaminação do ambiente (Auti *et al.*, 2019; Dell' Anno *et al.*, 2021; Baruah *et al.*, 2017; Fuentes *et al.*, 2014).

Nos diferentes ecossistemas, a presença dos contaminantes exerce uma pressão ambiental que induz a alteração do microbioma, selecionando e promovendo o crescimento das estirpes capazes de metabolizar os agentes poluentes. Muitas estirpes bacterianas, encontradas em ambientes poluídos, apresentam a capacidade de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia, designando-se por microrganismos hidrocarbonoclásticos (que decompõem hidrocarbonetos). Por essa razão as bactérias apresentam um elevado potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados e têm sido apresentadas como os microrganismos com maior viabilidade na biodegradação de partículas poluentes persistentes (Auti *et al.*, 2019; Omrani *et al.*, 2018).

Na literatura encontram-se descritas duas formas diferentes de interação associadas à biorremediação bacteriana de hidrocarbonetos: i) a adesão de células microbianas a gotas de reduzidas dimensões de substratos hidrofóbicos, que serão depois incorporados por transporte ativo ou difusão; ii) a síntese de biossurfactantes, quer intracelular, quer extracelular na forma de biofilmes. Devido à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade, os biossurfactantes são muito promissores para uso em biotecnologias ambientais (Dell' Anno *et al.*, 2021; J. S. Oliveira *et al.*, 2017).

Este trabalho incidiu sobre a pesquisa da existência de microrganismos com potencial de biorremediação em seis locais do estuário do rio Tejo, que contempla zonas habitacionais e áreas com diferentes atividades antropogénicas. O estuário do rio Tejo tem sido alvo de vários estudos e investigações que visam a monitorização e o desenvolvimento de projetos ambientais (Fonseca, 2021; Jovens Repórteres para o Ambiente, 2021; Portugal, 2015).

Na continuidade de uma linha de investigação de estudos de biorremediação que utilizam o ambiente local como fonte de microrganismos este projeto visa continuar os estudos e procedimentos laboratoriais já testados anteriormente.

Tendo como objetivos fulcrais a seleção de microrganismos com potencial de biorremediação dos hidrocarbonetos já referenciados, de amostras de solo contaminados. Deste modo, optou-se por selecionar seis locais do estuário do rio Tejo, dividindo estes locais por três de cada lado das margens do rio, com os seguintes objetivos:

- Monitorização do comportamento da população microbiana ao longo do processo de biorremediação;
- Observação das colónias e caracterização da diversidade morfológica e bioquímica das colónias bactérias obtidas;
- A taxa de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos;
- Estudo do poder de síntese de biossurfactantes dos microrganismos hidrocarbonoclásticos, e adição de biossurfactantes comerciais para comparação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biorremediação dos solos contaminados com hidrocarbonetos

A poluição do solo é um desequilíbrio ambiental causado principalmente pela presença de xenobióticos de origem antropocêntrica. As fontes de poluentes e contaminantes são diversas e, apesar de todos os esforços e consciencialização global para reduzir o seu uso, os hidrocarbonetos de petróleo ainda estão entre os produtos químicos mais comuns envolvidos na poluição do solo e da água. Essa alteração no ecossistema do solo tem consequências muito vastas, pois além da degradação da terra e da contaminação da água, os xenobióticos também entram nas cadeias alimentares, sendo bioacumulados em diferentes organismos (Gayathiri *et al.*, 2022; J. Sarkar *et al.*, 2020).

Inicialmente, os processos de descontaminação do solo eram baseados em tratamentos físicos e químicos, como o bombeamento e tratamento, extração de vapor do solo e dessorção térmica. No entanto, havia muitas preocupações relacionadas com essas estratégias, pois acarretavam muitos custos, além das dúvidas sobre a sua eficácia, dado verificar-se, por exemplo, que os poluentes às vezes eram transferidos de forma inconveniente do solo para o ar e muitas vezes levavam à decomposição incompleta de poluentes (Li *et al.*, 2021; J. Sarkar *et al.*, 2020).

Deste modo, a biorremediação surgiu como uma abordagem diferenciada, baseada no estudo dos solos como ecossistemas dinâmicos que suportam uma enorme população de microrganismos, como bactérias e fungos, com potencial para degradar e metabolizar os mais variados produtos químicos. Os estudos de biorremediação foram impulsionados pela catástrofe ambiental do *Exxon Valdez*, que aconteceu em 1989, quando ocorreu um derrame massivo de cerca de onze milhões de galões de petróleo bruto no Golfo do Alasca, sendo também exemplo, o acidente de setembro de 2017, o *Agia Zoni II* que afundou no Golfo Sarónico, na Grécia, libertando aproximadamente quinhentas toneladas de óleo combustível pesado, contaminando as costas de Salamina e Atenas (Michas *et al.*, 2017; Pepper *et al.*, 2015; ThomasGareth *et al.*, 2020).

Neste momento, surgiu não apenas uma consciência global de que os danos dos hidrocarbonetos persistem por décadas, mas também que a abordagem para reduzir os seus efeitos deve ser abrangente, incluindo a remoção, imobilização e uso da comunidade de microrganismos nativos com potencial hidrocarbonoclástico para metabolizar os hidrocarbonetos. Desde então, a comunidade científica deu destaque à investigação sobre a capacidade dos organismos utilizarem os hidrocarbonetos, principalmente persistentes com baixa hidrofiliabilidade, como fonte metabólica de carbono e energia (Amer *et al.*, 2015; J. Sarkar *et al.*, 2020; Thakur *et al.*, 2019).

Cada vez mais, a abordagem da biorremediação, utilizando organismos vivos ou a transformação mediada por enzimas, oferece diversas oportunidades para solucionar problemas relacionados à contaminação de resíduos sólidos ou líquidos, uma vez que é bem

aceite, com baixo custo e baixo impacto ambiental (J. Sarkar *et al.*, 2020; Smulek *et al.*, 2020). No entanto, ainda é um processo demorado que depende não só das propriedades químicas e físicas dos poluentes, mas também da capacidade de degradação dos organismos e, portanto, é dependente de todos os fatores limitantes que afetam o crescimento e a sua sobrevivência (J. Sarkar *et al.*, 2020).

2.1.1. Poluição de hidrocarbonetos

A contaminação ambiental com hidrocarbonetos está intrinsecamente relacionada às substâncias orgânicas tóxicas presentes no petróleo e representam os contaminantes ambientais mais frequentes no mundo. O petróleo bruto e os produtos petrolíferos refinados são amplamente utilizados como matéria-prima para diferentes indústrias, atividades diárias e para produção de energia. As fontes mais notáveis de contaminação do petróleo estão relacionadas com sua extração, processamento em instalações de refinação, despejo e acidentes durante o transporte (Cafaro, 2014; Hidalgo *et al.*, 2020; Jariyal *et al.*, 2020; J. Sarkar *et al.*, 2020).

O petróleo bruto consiste numa mistura complexa, contendo mais de dezassete mil componentes químicos identificáveis. Os principais componentes do petróleo bruto são os hidrocarbonetos apolares, como os hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos (Cafaro, 2014; Hidalgo *et al.*, 2020; Jariyal *et al.*, 2020; J. Sarkar *et al.*, 2020).

A sua baixa polaridade faz com que persistam no meio ambiente por muito tempo e tenham um grande impacto ecológico nos ecossistemas do solo. Há também uma fração menor de compostos (< 15% em massa) que contém heteroátomos, quer isto dizer que são átomos que não são de carbono nem de hidrogénio e encontram-se entre dois ou mais átomos de carbono, como o nitrogénio (N), o enxofre (S) e o oxigénio (O), e que possuem maior solubilidade em água e representam maior toxicidade para os ecossistemas aquáticos (Cafaro, 2014; Hidalgo *et al.*, 2020; Jariyal *et al.*, 2020; J. Sarkar *et al.*, 2020).

Apesar da presença de hidrocarbonetos estar associado a um impacto ambiental negativo, a sua gravidade está relacionada com o tipo e volume de poluentes, geografia local e complexidades hidrogeológicas, clima e estação do ano, espécies e comunidades biológicas, atividade de degradação (geoquímica e microbiana), economia e considerações de conveniência e a adequação e aplicação oportuna de métodos de limpeza. Por esta razão, o projeto, implementação, monitoramento e/ou avaliação de desempenho de tecnologias de biorremediação requerem uma abordagem holística, uma equipe multidisciplinar e requer tempo. A capacitação para dar uma resposta adequada e frutuosa exige uma organização, sistematização e partilha do conhecimento existente com a comunidade científica (Cafaro, 2014; Jariyal *et al.*, 2020; J. Sarkar *et al.*, 2020).

2.1.2. Tipos de hidrocarbonetos

Como já referido anteriormente, os principais poluentes, constituintes do petróleo são os compostos orgânicos mais simples são compostos por apenas dois elementos: carbono e hidrogénio, denominados de hidrocarbonetos.

O processamento inicial do petróleo envolve a separação por destilação numa série de frações diferenciadas e caracterizadas pelos intervalos de temperatura e pressão. Além da destilação, numerosos processos de refinaria são utilizados para otimizar a obtenção de certos produtos. As frações destiladas do petróleo podem ser classificadas em três grupos, de acordo com o número de átomos de carbono das moléculas: as gasolinas (4 a 12 átomos de carbono), os destilados médios (9 a 20 átomos de carbono) e óleos combustíveis pesados (mais de 14 átomos de carbono) (United States Environmental Protection Agency, 2008).

2.1.2.1. Gasolina

A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos hidrofóbicos relativamente voláteis. É um produto refinado do petróleo bruto e a mistura de hidrocarbonetos que tem são aditivados e agentes de mistura, sendo um líquido tóxico e altamente inflamável (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000, 2021; Vempatapu & Kanaujia, 2017).

Estes agentes de mistura são adicionados ao hidrocarboneto para melhorar o desempenho e a estabilidade da gasolina. Já a mistura de hidrocarbonetos, na sua maioria são aromáticos, seguindo-se isoalcanos, cicloalcanos e cicloalcenos, alcanos e alcenos (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000, 2021; Vempatapu & Kanaujia, 2017).

2.1.2.2. Hexano

O hexano é um alcano de cadeia linear com seis átomos de carbono e tem a fórmula molecular C_6H_{14} , sendo um hidrocarboneto alifático muito volátil e não polar. Provém do petróleo bruto, é altamente inflamável e os seus vapores podem ser explosivos.

É um líquido incolor que faz parte da composição da gasolina em 3% (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2020; Hazardous Chemicals and Occupational Diseases, 2022; Merck, 2021; National Library of Medicine, 2021).

2.1.2.3. Tolueno

O tolueno é um hidrocarboneto aromático de sete carbonos, sendo um dos que existe em menor quantidade. É um líquido incolor e inflamável, e bastante tóxico. A sua fórmula molecular é C_7H_8 (Finotti et al., 2001; Howard, 1990; Pinho, 2010; Suzuki & Watanabe, 2005).

No derramamento em solo ou na atmosfera, o tolueno apresenta um comportamento semelhante ao do benzeno. Em condições aeróbias a sua biodegradação é relativamente rápida, principalmente se se encontrar em águas subterrâneas (Finotti *et al.*, 2001; Howard, 1990; Pinho, 2010; Suzuki & Watanabe, 2005).

No meio ambiente aquático o tolueno possui um nível de toxicidade aguda moderada, e crónica moderada para a vida aquática. O tolueno ao ser libertado para a atmosfera rapidamente evapora, e quando absorvido pelo solo fica retido sem evaporar degradando

águas subterrâneas bem como os restantes constituintes presentes no solo, tais como microrganismos e plantas (Australian GOV, 2022).

2.1.3. Fontes de poluição

Segundo a Agência Europeia do Ambiente (AEA), estima-se que cerca de duzentos e cinquenta mil locais estão contaminados na Europa, prevendo-se um aumento de 50% até 2050. Segundo este relatório, as principais indústrias poluidoras do solo na Europa são designadamente a Militar, a produção industrial e serviços comerciais, a indústria petrolífera, o tratamento e deposição de resíduos industriais e sólidos, armazenamentos, centrais elétricas, derrames no solo durante o transporte e exploração mineira (European Environment Agency, 2007).

Uma das principais fontes de poluição, já subentendida, são os hidrocarbonetos, tendo vindo a aumentar o número de contaminações em solos e águas por derramamento de combustíveis, originados por: acidentes de navios, camiões, tanques de armazenamento subterrâneo (que estão expostos a processos corrosivos), entre outras ocorrências do mesmo foro (Lin *et al.*, 2013; Taketani *et al.*, 2021).

Os problemas gerados por estas contaminações são vários, desde o risco à saúde pública, segurança de propriedades, risco dos ecossistemas, e diversas restrições a vários níveis. A recuperação das áreas afetadas é muitas vezes morosa, e atualmente, os estudos que visam a recuperação ambiental, têm vindo cada vez mais a serem consolidados e desenvolvidas diversas técnicas de remediação (Lin *et al.*, 2013; *Relatório do Estado do Ambiente 2007*, 2008).

Relativamente a Portugal, o Instituto Nacional dos Resíduos (INR) identificou como principais zonas de contaminação as áreas industriais, as lixeiras e os aterros sanitários, as regiões mineiras e as zonas agrícolas. Segundo a Agência Portuguesa do Ambiente (APA), não há valores concretos sobre os locais contaminados e as principais fontes de contaminação, todavia é expectável que as zonas mais afetadas ocorram essencialmente no litoral (Porto, Aveiro, Setúbal e Lisboa), como consequência da localização das grandes indústrias, armazenamento de materiais perigosos, centros de abastecimento, entre outros fatores (*Relatório do Estado do Ambiente 2007*, 2008).

No estudo da biorremediação de hidrocarbonetos é importante, além de se estudar o tipo de poluente contaminante do local a ser tratado, estudar os microrganismos nativos do mesmo ecossistema, dado estes seres terem um papel importante na biodegradabilidade dos contaminantes (Lofthus *et al.*, 2018).

Para tal ocorrência, os microrganismos de locais poluídos sofrem várias adaptações de acordo com as variações ambientais, podendo ser modificações morfológicas, fisiológicas ou comportamentais, designando-se essa adaptação por mutagénese (Fester *et al.*, 2014; Johnsen *et al.*, 2005).

Na biorremediação os organismos usados são as bactérias, os fungos, as algas e/ou as plantas. As bactérias são os organismos que têm mais facilidade de adaptação e crescem

num intervalo de temperatura maior, na presença de oxigénio em excesso e em condições anaeróbicas, e na presença de componentes perigosos e tóxicos, sendo mais facilmente manipuladas para o efeito. Os principais requisitos para que haja uma boa adaptação do organismo são fontes de energia e de carbono (Fester *et al.*, 2014; Johnsen *et al.*, 2005).

2.1.4. Conceitos envolvidos na biorremediação

A biodegradação é o modo como a natureza degrada matéria orgânica e residuais, em nutrientes e compostos utilizáveis por organismos vivos, seja na presença de oxigénio (biodegradação aeróbia) seja na sua ausência (biodegradação anaeróbia) (Kim *et al.*, 2017; S. V. Mohan *et al.*, 2006).

Desta forma, para auxiliar a natureza neste processo, principalmente solos contaminados com agentes de origem petrolífera, tem vindo cada vez mais a ser aceite e uma forma de solução pela sociedade científica, pois é uma tecnologia segura, amiga do ambiente e económica, podendo ser realizada *in* ou *ex situ*, variando as técnicas de uma forma para a outra consoante o local contaminado e outros diversos aspetos (Kim *et al.*, 2017; S. V. Mohan *et al.*, 2006).

O principal foco na biorremediação que serve de auxílio a recuperação e degradação dos poluentes presentes nos solos e nas águas contaminados, resume-se à ação dos microrganismos nativos do meio poluído. A metabolização dos poluentes envolve a oxidação dos mesmos com transferência de eletrões para o aceitador final. Na respiração aeróbia o aceitador irá ser o oxigénio, quando presente, quando o oxigénio não está presente, os organismos usam como aceitador final os compostos orgânicos e inorgânicos, como alternativa. Já a biodegradação anaeróbia ocorre pela desnitrificação, redução do ferro, do sulfato ou outras reações (Cordazzo, 2000).

2.1.5. Principais tipos de biorremediação

Existe uma multiplicidade de organismos com potencial de biorremediação, que são capazes de metabolizar e não sofrer efeitos nocivos devido à presença do agente contaminante no seu habitat. Esses organismos ou as suas enzimas, definem os tipos de biorremediação e a abordagem tecnológica necessária para implementar o processo. A maioria desses organismos são extremófilos e em situações adversas aproveitam-se da pressão ambiental. O seu crescimento pode ser limitado apenas pela fonte de nutrientes, ou seja, apesar do seu número aumentar significativamente nas áreas de derramamento de óleo, também diminui quando o poluente desaparece, sendo um crescimento autorregulado (Kebede *et al.*, 2021; Orellana *et al.*, 2018).

2.1.5.1. Biorremediação bacterial

A utilização de bactérias hidrocarbonoclasticas é a escolha mais comum para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, seja na recuperação de ambientes aquáticos ou terrestres. Apesar de todo o potencial biotecnológico, estas bactérias estão amplamente distribuídas na

natureza, e produzem significativamente biossurfactantes com propriedades emulsificantes que são extremamente úteis na utilização de óleos como fonte alimentar e energética. (Goswami *et al.*, 2021; Sathiyarayanan *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2021).

2.1.5.2. Fitorremediação

A fitorremediação baseia-se no uso de interações (físicas, bioquímicas, biológicas, químicas e microbiológicas) de plantas e de microrganismos associados para assimilar, transformar, metabolizar, desintoxicar e degradar poluentes em locais poluídos. A remediação do solo ou da água é realizada por esse processo com base na vegetação por meio de uma variedade de mecanismos, como fitoextração, fitovolatilização, rizodegradação, rizofiltração, fitoestabilização e fitodegradação. Deste modo, existem alguns fatores importantes a considerar na escolha da planta a desempenhar a função de fitorremediadora, como o sistema radicular (fibroso ou ramificado), biomassa acima do solo, toxicidade do poluente para a planta, a sua capacidade de adaptabilidade às condições ambientais, ser resistente a pragas e doenças, e o principal fator, o tempo necessário para atingir o tamanho desejado para atingir os objetivos de reparação (Gkorezis *et al.*, 2016; Goswami *et al.*, 2021; Thijs *et al.*, 2016).

Vários benefícios da fitorremediação foram estabelecidos pelo facto de se introduzir produtores que também podem melhorar a estética de campos abandonados ou outros locais contaminados (Meagher, 2000; V. Oliveira *et al.*, 2014; Thijs *et al.*, 2016).

2.1.5.3. Micorremediação

Neste caso, a biorremediação é realizada por fungos que degradam substratos em moléculas menores por enzimas fúngicas extracelulares. Essas moléculas são posteriormente absorvidas e metabolizadas nas células. Existem várias vantagens na micorremediação, nomeadamente a sua elevada taxa de crescimento, a sua capacidade de penetração no poluente e a sua sobrevivência relativamente a condições de stress, pH e nutrientes. Além disso, a condição de stress nutricional estimula o mecanismo enzimático fúngico, oferecendo benefícios significativos (Goswami *et al.*, 2021; Groffman *et al.*, 2019).

2.1.5.4. Sistema de cultura de células mistas

As técnicas atuais de remediação ambiental contam com consórcios de bactérias, microalgas e fungos. Os consórcios são benéficos porque ao atuarem em várias espécies ao mesmo tempo a degradação dos poluentes ocorre de forma mais rápida e eficiente. No entanto, o uso de consórcios tem os seus limites devido, por exemplo, à falta de organelos, genes e atividades enzimáticas presentes num reino que não estão disponíveis noutros (Aubé *et al.*, 2020; Goswami *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2018).

Em geral, os consórcios microbianos apresentam estratégias adaptativas para sobreviver a ambientes extremos. Consórcios entre reinos mantêm a estabilidade e fortalecem as defesas contra tensões externas por meio de mudanças na estrutura física e espacial, mas com mais

variedade, complexidade e possibilidades de interações. Estes podem interagir fisicamente por meio de agregação, carga superficial ou imobilização (Aubé *et al.*, 2020; Chicca *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2018).

2.1.5.5. Microrganismos geneticamente modificados

Embora os avanços na biologia molecular tenham tido um efeito profundo na compreensão dos processos biológicos de recuperação de locais contaminados com hidrocarbonetos e, sejam aplicados na investigação deste tipo de problema, a sua aplicação na realidade é limitada. Há, no entanto, um tremendo potencial para o uso de tecnologias de biologia molecular para melhorar o projeto, a sua implementação, desempenho de campo e monitoramento de tecnologias de remediação (Chicca *et al.*, 2022; Widada & Omori, 2002).

Uma fase importante dos processos de biorremediação é a identificação da comunidade microbiana presente em ambientes poluídos por combustíveis fósseis, utilizando metodologias de biologia molecular para avaliar genes específicos (Gertler *et al.*, 2015; Konieczna *et al.*, 2018).

Vários tipos de poluentes orgânicos podem ser degradados pela ação de enzimas microbianas. As reações de biodegradação que são mediadas por essas enzimas são responsáveis por ativar certas vias metabólicas geradoras de energia. Estas espécies têm a capacidade de usar oxigénio molecular (microrganismos aeróbios) ou nitrato (microrganismos anaeróbios) como aceitador final de eletrões na cadeia de transporte de eletrões. Além disso, alguns microrganismos excretam enzimas que são funcionais apenas no ambiente extracelular. Alguns dos genes que codificam essas enzimas biodegradáveis cruciais estão presentes em plasmídeos e podem ser usados para transformar outras bactérias e desenvolverem novas linhagens capazes de produzir e segregar enzimas com alta especificidade para um poluente específico. Os organismos geneticamente modificados são uma mais-valia em todo o processo, uma vez que nas circunstâncias mais comuns num local poluído por óleo, os microrganismos indígenas são incapazes ou não agem em toda a sua capacidade de degradar os poluentes (Alrumman *et al.*, 2015a, 2015b; D. Sarkar *et al.*, 2022).

Como exemplo tem-se o caso dos 16S *rRNA*, que segundo o estudo de Becker designa que são genes catabólicos que têm como função degradar os hidrocarbonetos (Becker *et al.*, 2001). Estes genes catabólicos são específicos para codificar as enzimas essenciais no hidrocarboneto e dessa forma degradá-lo, através da análise deste mecanismo tem se examinado a presença de outras bactérias com a mesma capacidade no meio ambiente. Com estas técnicas moleculares extremamente importantes, é possível obter-se microrganismos geneticamente modificados capazes de degradar eficientemente os poluentes do meio ambiente (Higashioka *et al.*, 2008; Omrani *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2021; Stapleton & Saylor, 1998; Widada & Omori, 2002).

2.1.6. Métodos de biorremediação

Os métodos de biorremediação podem ser classificados por *ex situ* e *in situ* encontrando-se esquematizado na figura 1, os dois métodos e as respetivas técnicas de biorremediação que

se encaixam em cada um. Esta terminologia está associada ao local dos tratamentos, *ex situ* envolverem a remoção física da matriz contaminada para o processo de tratamento. Em contraste, as técnicas *in situ* envolvem o tratamento do material contaminado no local com a menor perturbação possível. Ambos têm as suas vantagens e desvantagens com base na natureza e extensão da contaminação. Os tratamentos *in situ* são os mais rentáveis e são recomendados sempre que a escavação de material contaminado for perigosa. Os métodos *ex situ* têm custos operacionais e requisitos de espaço relativamente elevados, mas permitem um melhor controlo das condições ambientais, uma monitorização mais fácil, maior eficácia e fiabilidade (Acosta-González & Marqués, 2016b; Alrumman *et al.*, 2015a; J. Sarkar *et al.*, 2020).

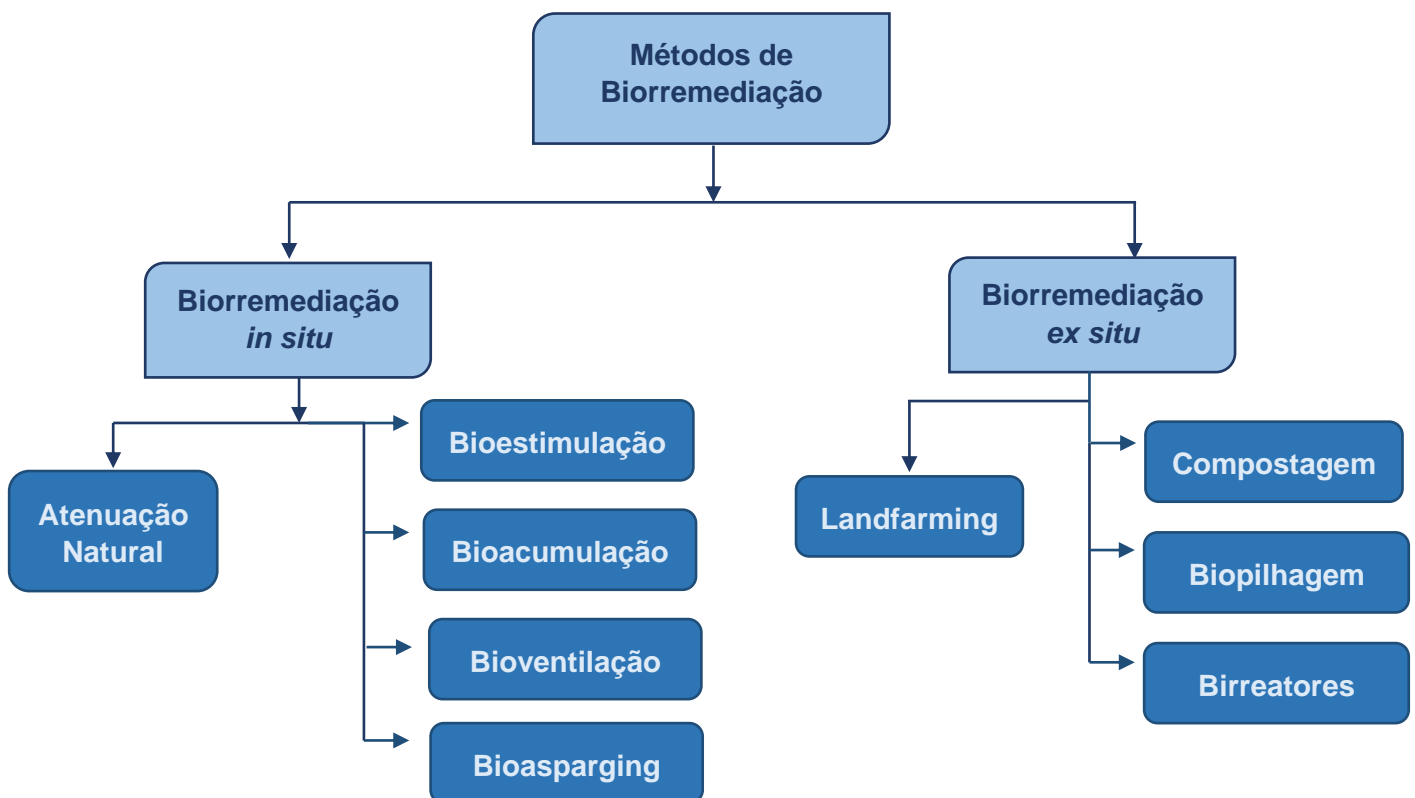


Figura 1: Esquema dos métodos de biorremediação *in situ* e *ex situ*, com as respetivas técnicas.

2.1.6.1. Técnicas de biorremediação *in situ*

2.1.6.1.1. Atenuação natural

A atenuação natural, também designada por biorremediação intrínseca, é uma técnica passiva de remediação de locais poluídos, sem a intervenção de qualquer fonte externa (atividade humana). Consiste em utilizar processos naturais causados por comunidades nativas para degradar contaminantes e reduzir as suas concentrações a níveis aceitáveis. Uma das principais vantagens desta tecnologia é que não há necessidade de adição de nutrientes ao solo ou adequação de qualquer condição ambiental, podendo a redução do

contaminante acontecer de forma contínua. Isto deve-se à adaptação natural de microrganismos nativos do solo contaminado que passam a utilizar os compostos orgânicos poluentes no seu metabolismo como fonte de carbono (Kebede *et al.*, 2021).

Porém, o uso desta tecnologia como principal opção na biorremediação requer algumas ressalvas, nomeadamente, as condições do ambiente, dependendo da concentração dos contaminantes, podem não contribuir para a redução de substâncias poluentes e consequentemente aumentar os riscos de contaminação da saúde pública, dos animais e restante ecossistema (Andrade *et al.*, 2010; Catarino, 2016; Kebede *et al.*, 2021).

A ausência de atividade externa implica que a técnica seja menos dispendiosa comparada com outras técnicas *in situ* da biorremediação, porém, como os processos de atenuação natural costumam bastante morosos, levando meses e anos, os resultados obtidos com a biodegradação são muito lentos e até imprevisíveis, por isso, consequentemente, foi necessário realizar a atenuação natural monitorada ou acelerada, chamada de bioestimulação (Andrade *et al.*, 2010; Catarino, 2016).

2.1.6.1.2. Bioestimulação

A bioestimulação ou atenuação natural acelerada é uma estratégia de biorremediação que visa alcançar um equilíbrio de nutrientes para o crescimento e funcionamento da comunidade nativa. A suplementação com um ou mais nutrientes limitantes, como nitrogénio, fósforo e enxofre, em locais carregados de hidrocarbonetos é importante, pois ajuda a acelerar o crescimento microbiano, aumentando a capacidade de degradação dos hidrocarbonetos. Os bioestimulantes podem ser nutrientes inorgânicos solúveis em água, fertilizantes oleofílicos, bem como oxigenação. A adição de nutrientes e a otimização das condições, permitem aumentar a taxa de crescimento e as atividades metabólicas dos microrganismos, com o consequente aumento da velocidade e percentagem de biodegradação. Neste contexto, a bioestimulação pode ter custos menores em comparação com outras técnicas de biorremediação (Andrade *et al.*, 2010; Kebede *et al.*, 2021; J. Sarkar *et al.*, 2020).

2.1.6.1.3. Bioacumulação

O bioacumulação ou bioaumento visa adicionar microrganismos especializados ao ambiente para ajudar a remover poluentes. Os agentes de bioacumulação são caracterizados pela sua capacidade não apenas de degradar o contaminante de interesse, mas também de serem resilientes às condições ambientais predominantes, bem como pela sua estabilidade genética e capacidade de sobreviver em competição com a comunidade nativa (Gkorezis *et al.*, 2016; Kebede *et al.*, 2021; J. Sarkar *et al.*, 2020).

Alguns estudos mostram que para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo geralmente é necessário um consórcio microbiano com uma sucessão de espécies, e que o uso de cultura bacteriana mista é mais vantajoso em relação a culturas puras, devido às interações sinérgicas entre as espécies microbianas. Também é mencionado em alguns desses estudos que a combinação das duas estratégias mencionadas acima, bioestimulação e sistema de cultura de células mistas, pode ser bastante eficiente, aumentando a redução

de hidrocarbonetos totais do petróleo de 57% a 75% (Gkorezis *et al.*, 2016; Kebede *et al.*, 2021; Philip & Atlas, 2005; J. Sarkar *et al.*, 2020).

2.1.6.1.4. Bioventilação

A bioventilação estimula a biodegradação aeróbica natural dos poluentes no solo, controlando o fluxo de ar ou oxigénio, através de poços verticais e horizontais, onde o ar é injetado diretamente na zona contaminada reduzindo a volatilização e descarga de contaminantes no meio ambiente e melhorando a capacidade dos microrganismos existentes na zona, para aumentar a biorremediação, bem como as suas atividades microbianas, decompondo os hidrocarbonetos adsorvidos ao solo (Amruta, 2022b; Philip & Atlas, 2005).

2.1.6.1.5. Biosparging

A técnica de *biosparging*, consiste na injeção do ar ou gás pressurizado numa área poluída, geralmente solos e subsolos, para assim estimular as atividades microbianas aeróbicas *in situ* do local, promovendo a remoção e reduzindo a concentração dos poluentes da zona, e favorecendo a transferência dos hidrocarbonetos da fase residual ou dissolvida para a fase vapor (Amruta, 2022a; Philip & Atlas, 2005).

2.1.6.2. Técnicas de Biorremediação *ex situ*

Para que haja a descontaminação de locais com solo contaminado, a biorremediação sustentável é uma alternativa aos procedimentos físico-químicos comuns. A biorremediação *ex situ* é um método que envolve a escavação de poluentes da zona poluída, e posteriormente, remoção desse material contaminado para outro local para tratamento. Quando a porção é retirada do meio ambiente, pode ser tratada pelas diferentes técnicas, desde compostagem, biopilhagem, biorreatores e/ou *landfarming*. A decisão de avançar com estas técnicas tem como base o custo de tratamento, a profundidade da poluição do solo, tipo de poluente, o grau de poluição, a localização geográfica para verificar os acessos e se é de fácil remoção, entre outros fatores (Amruta, 2022c; Philip & Atlas, 2005).

2.1.6.2.1. Compostagem

A compostagem é um processo biológico por contaminantes orgânicos, como hidrocarbonetos, que são convertidos em subprodutos estabilizados pelos microrganismos, por condições aeróbias ou anaeróbias. Mais tarde após o tratamento, o solo pode até ser aproveitado como adubo orgânico, entre outros fins (Abena *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2022; Lu *et al.*, 2019; Ozaki *et al.*, 2017).

2.1.6.2.2. Biopilhagem

A biopilhagem, como o próprio nome indica, envolve o empilhamento do solo contaminado sobre uma base impermeável para maximizar a biodegradação e gerenciar a drenagem da precipitação da água a que o solo está sujeito (Delille *et al.*, 2008).

2.1.6.2.3. Biorreatores

Um biorreator é um equipamento que possui um sistema de processamento bioquímico *ex situ*, opera em diferentes modos, e cria um ambiente biologicamente ativo, no qual as matérias-primas são convertidas em produtos específicos, podendo trabalhar em condições aeróbias ou anaeróbias, e deste modo garantir as condições do ambiente natural necessário para o crescimento ideal de cada grupo de organismos (Amruta, 2022c; S. v. Mohan *et al.*, 2004).

2.1.6.2.4. Landfarming (*ex situ* e *in situ*)

A técnica de *landfarming* é das técnicas de biorremediação mais simples, devido ao baixo custo e o uso de menos equipamentos para operação, no entanto, requer grandes áreas para ser aplicada, o que não é muito viável para locais mais pequenos (Amruta, 2022c; Nikolopoulou *et al.*, 2013; Silva-Castro *et al.*, 2015).

Landfarming consiste na escavação e mistura dos solos contaminados e espalhados cuidadosamente numa camada fina sobre a superfície do solo, e estimular a atividade microbiana aeróbica dentro desses solos, através da preparação do solo proporcionando aeração/arejamento do mesmo, adição de nutrientes, minerais, humidade, e irrigação, são os principais fatores e ter em consideração para estimular a atividade dos microrganismos autóctones, potencializando a biorremediação durante o tratamento da terra. Dependendo dos casos onde é aplicada pode ser considerada uma técnica de biorremediação *ex situ* ou *in situ* (Amruta, 2022c; Becarelli *et al.*, 2021; Nikolopoulou *et al.*, 2013; Silva-Castro *et al.*, 2015).

2.1.6.3. Fatores limitantes

2.1.6.3.1. Bióticos e abióticos

A biorremediação só pode ser eficaz quando as condições ambientais são propícias e permitem o crescimento e atividade microbiana. O crescimento de microrganismos é muitas vezes muito específico e exigente. Ao longo de toda a bibliografia estudada é unânime que o sucesso da biorremediação utilizando a comunidade de microrganismos nativos é muito limitado pelos níveis desequilibrados de nutrientes e/ou condições físico-químicas prevalentes nos locais contaminados, como mencionado anteriormente (Kebede *et al.*, 2021; Sengupta & Pal, 2021).

2.1.6.3.2. Fatores ambientais

Resume-se em fatores que influenciam a biodegradação: nutrientes, salinidade, pressão, temperatura, pH, disponibilidade hídrica, estresse osmótico e presença de contaminantes.

O possível desequilíbrio de nutrientes essenciais é considerado o fator crítico na redução da taxa de metabolismo dos organismos, portanto, a biorremediação natural. Com uma proporção ideal de 100:10:1 (Carbono: Nitrogênio: Fósforo), um excesso de carbono na forma de hidrocarbonetos pode causar escassez de nitrogênio e fósforo. O oxigênio é geralmente usado como um aceitador final de elétrons no metabolismo microbiano, e ambos, oxigênio e oxigênio molecular, são essenciais nas principais vias de degradação de hidrocarbonetos de bactérias aeróbicas. Em bactérias anaeróbicas os aceitadores de elétrons mais comuns no ambiente natural são nitratos, manganês, ferro e sulfato (Daghio *et al.*, 2017; Marietou *et al.*, 2018; J. Sarkar *et al.*, 2020)

A temperatura é um dos fatores que mais controla a degradação dos hidrocarbonetos, pois influencia não só a atividade enzimática e todo o metabolismo, mas também a solubilidade e as propriedades físicas e químicas dos hidrocarbonetos. O melhor intervalo de temperatura é 15-30°C para processos aeróbicos e 25-30°C para processos anaeróbicos (Daghio *et al.*, 2017; Marietou *et al.*, 2018; J. Sarkar *et al.*, 2020).

As concentrações iniciais de hidrocarbonetos presentes no meio podem inibir o funcionamento de poderosos degradadores. Assim sendo, constata-se que a estrutura e a concentração inicial dos hidrocarbonetos determinam a biodegradabilidade por parte dos microrganismos degradantes (Miri *et al.*, 2019; Mukherjee & Chattopadhyay, 2017; J. Sarkar *et al.*, 2020).

2.1.6.3.3. Natureza do contaminante

Os principais elementos a analisar no contaminante é a solubilidade, concentração, hidrofobicidade, volatilidade e peso molecular.

Outro fator também extremamente importante e que influencia na degradação de hidrocarbonetos é a presença de tensoativos que visam aumentar a biodisponibilidade de poluentes hidrofóbicos. Estes desempenham um papel vital no aumento da taxa de degradação, facilitando a solubilidade dos hidrocarbonetos. Geralmente, a maioria dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos realizam a síntese *in situ* de uma ampla gama de biossurfactantes, que são chamados de biossurfactantes. Esses biossurfactantes têm mais vantagens do que os biossurfactantes químicos porque são muito menos tóxicos, mais biodegradáveis, seletividade e especificidade sob condições extremas (Ibrar & Zhang, 2020; Jariyal *et al.*, 2020; Smulek *et al.*, 2020; Smulek *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018).

Os microrganismos produzem uma grande variedade de metabolitos secundários que são bastante interessantes para diversas indústrias, mas também para a biorremediação. Os biossurfactantes consistem num grupo muito diversificado de lipídios que possuem caráter polar anfifílico, contendo domínios hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, onde a parte hidrofóbica compreende ácidos gordos saturados ou insaturados, ácidos gordos

hidroxilados ou álcoois entre 8 e 18 átomos de carbono. Os componentes hidrofílicos, por outro lado, consistem em pequenos grupos hidroxilo, fosfato ou carboxilo, hidrocarbonetos (como mono, oligo ou polissacarídeos) ou porções de (poli) peptídeos (Brakstad *et al.*, 2018; Kubicki *et al.*, 2019).

Como consequência da estrutura anfifílica, a menor tensão interfacial desses compostos permite, por exemplo, a solubilização de substâncias hidrofóbicas em água. Propriedades frequentemente destacadas incluem baixas concentrações críticas de micelas, forte redução na tensão superficial, complexação de íons metálicos, bioatividade proeminente e baixa ecotoxicidade (Brakstad *et al.*, 2018; Kubicki *et al.*, 2019).

Os biossurfactantes são compostos predominantemente aniônicos ou não iônicos, uma vez que os biossurfactantes catiónicos apresentam maior toxicidade e, portanto, são raramente encontrados (Kubicki *et al.*, 2019).

Além do agrupamento por carga, os metabólitos secundários podem ser amplamente classificados como de alto ou baixo peso molecular (Kubicki *et al.*, 2019).

De acordo com sua função natural, os biossurfactantes podem ser aplicados para promover a solubilidade em água de poluentes hidrofóbicos, como mencionado acima, o que facilita a sua remoção (Kubicki *et al.*, 2019).

2.1.6.3.4. Composição da comunidade nativa e sua capacidade funcional

Vários estudos concluíram que é muito benéfico utilizar culturas mistas (bactérias, fungos e algas) em oposição a culturas puras na biorremediação, pois possuem interações sinérgicas e uma capacidade de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de 91% e 52%, respectivamente (Acosta-González & Marqués, 2016a; Brakstad *et al.*, 2018; Imam *et al.*, 2019; Koo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017; Sarka *et al.*, 2020).

Assim, para garantir as reais necessidades de nutrientes, é necessário identificar os microrganismos, conhecer as suas vias metabólicas e inter-relações sinérgicas. Só assim as diferentes estratégias de biorremediação, incluindo bioestimulação e/ou bioacumulação, podem efetivamente acelerar o processo de biorremediação (Kebede *et al.*, 2021; J. Sarkar *et al.*, 2020; Sathiyarayanan *et al.*, 2017).

No entanto, a taxa de biodegradação depende do estado fisiológico dos microrganismos, que são sensíveis a fatores ambientais variáveis. Sabe-se que a imobilização melhora a resistência dos microrganismos a impactos ambientais desfavoráveis (Kebede *et al.*, 2021; Mukherjee & Chattopadhyay, 2017).

2.1.6.3.5. Físicos e Químicos

Os parâmetros físicos que têm influência na degradação dos contaminantes são: a natureza física da matriz onde o contaminante é encontrado, ou seja, as características do solo, água ou sedimento, a temperatura e a luz. Pois a atividade metabólica dos microrganismos pode

ser reduzida ou acelerada consoante a temperatura do meio que habita, interferindo na taxa de biodegradação dos poluentes dessa área (Laczi *et al.*, 2015; Vidali, 2009).

Já os fatores químicos incluem a composição química da matriz ambiental, que por sua vez define a capacidade nutritiva, pH, humidade, teor de oxigénio dissolvido, potencial redox do meio e a composição e estrutura química do poluente (Vidali, 2009).

Tem-se como exemplo o caso de bactérias do género *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium*, entre outras, que só sobrevivem na presença de oxigénio (Laczi *et al.*, 2015; Vidali, 2009).

Normalmente, o metabolismo da comunidade microbiana degrada com maior preferência os contaminantes menos complexos e mais simples, pelo que a presença de outros contaminantes de estrutura mais complexa dificultam o seu metabolismo (P. Gaylarde *et al.*, 2005).

2.1.6.3.6. Biológicos

A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende da população de microbiana capaz de metabolizar a molécula original e os seus produtos de degradação, ocorrendo mais provavelmente quando a estrutura química do poluente é semelhante à estrutura de moléculas naturais. Pois desta forma, as enzimas que catabolizam o processo de degradação dos compostos naturais podem apresentar baixa especificidade pelo substrato, e os contaminantes com estrutura química semelhante podem ser reconhecidos pelo sítio ativo da enzima, possibilitando assim a sua transformação química (Sanni *et al.*, 2015; Vidali, 2001).

Existem dois tipos principais de degradação dos poluentes por parte dos microrganismos o metabolismo primário e o cometabolismo.

O metabolismo aeróbico, também chamado de respiração aeróbica, envolve o oxigénio como reagente para oxidar parte do carbono do contaminante em dióxido de carbono e o restante do carbono utilizado serve para produzir nova massa celular. O metabolismo aeróbico é mais comumente explorado e pode ser eficaz para hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos (Abena *et al.*, 2019; Daghighi *et al.*, 2017; Verasoundarapandian *et al.*, 2021).

O metabolismo anaeróbico envolve reações microbianas que ocorrem na ausência de oxigénio e engloba muitos processos, como fermentação, metanogénese, descloração reductiva, atividades de redução de sulfato e desnitrificação. Neste metabolismo, nitrato, sulfato, dióxido de carbono, metais oxidados ou compostos orgânicos podem substituir o oxigénio como aceitador de eletrões (Abena *et al.*, 2019; Daghighi *et al.*, 2017; Verasoundarapandian *et al.*, 2021).

Quando o poluente tem a possibilidade de percorrer todos os passos catalíticos de uma determinada rota catabólica enzimática, provavelmente torna-se uma possibilidade nutritiva para o microrganismo, sendo os produtos da sua degradação aproveitados pelo seu metabolismo construtivo e energético. Porém, quando o composto é apenas parcialmente

degradado, por ação de uma ou mais enzimas de uma rota catabólica sem que o produto resultante contribua para a sobrevivência do microrganismo, esta transformação metabólica é denominada de cometabolismo (C. C. Gaylarde *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2018).

À vista disso, o cometabolismo é definido como a degradação simultânea de dois compostos, em que a degradação do segundo composto (substrato secundário) depende da presença do primeiro composto (substrato primário), e muitas vezes, o produto resultante pode, desta forma, servir de substrato para transformações enzimáticas de outras espécies microbianas, possibilitando a degradação total do contaminante (Abena *et al.*, 2019; C. C. Gaylarde *et al.*, 2005).

Os pré-requisitos para a transformação metabólica são as enzimas e a síntese dos cofatores necessários para a reação enzimática (Abena *et al.*, 2019; Knapik *et al.*, 2020).

Dependendo do contaminante em questão e do meio, uma tecnologia pode explorar o metabolismo aeróbio ou anaeróbio de microrganismos heterotróficos (Abena *et al.*, 2019; Knapik *et al.*, 2020).

2.1.6.4. Caracterização do local para implementação da biorremediação "*in situ*"

O primeiro passo para uma biorremediação bem-sucedida é a caracterização do local, que ajuda a estabelecer a técnica de biorremediação mais adequada e viável (*ex situ* ou *in situ*). As técnicas de biorremediação *ex situ* tendem a ser mais caras devido aos custos adicionais atribuídos à escavação e transporte. No entanto, eles podem ser usados para tratar uma ampla gama de poluentes de forma controlada. Em contraste, as técnicas *in situ* não têm custo adicional atribuído à escavação; no entanto, o custo de instalação do equipamento no local, juntamente com a incapacidade de visualizar e controlar efetivamente a subsuperfície do local poluído, pode tornar ineficientes algumas técnicas de biorremediação *in situ*. Consequentemente, o custo da remediação aparentemente não é o principal fator que deve determinar a técnica de biorremediação a ser aplicada em qualquer local poluído (Duarte *et al.*, 2018; Montanarella *et al.*, 2015; Walker, 2012).

No caso de amostras de solo contaminado, o contaminante é uma substância ou elemento químico que é inócuo para o ecossistema, enquanto poluentes causa efeitos nefastos ao ecossistema. A sua caracterização depende da concentração com que se encontra no ecossistema (Duarte *et al.*, 2018; Montanarella *et al.*, 2015; Walker, 2012).

Assim sendo, os principais fatores que influenciam a biodegradação e a sua eficiência no processo de biorremediação são nomeadamente a temperatura, o pH, os nutrientes, o oxigénio, a água, entre outros fatores (Duarte *et al.*, 2018; Montanarella *et al.*, 2015; Walker, 2012).

2.1.7. Estudos de Biorremediação

A pesquisa bibliográfica foi realizada com recurso à Biblioteca de Conhecimento Online: *b-on* e o banco de dados *Science Direct*, entre outras referências mencionadas ao longo do texto pesquisadas no *Google Scholar*. A pesquisa foi feita com as palavras-chaves pesquisadas em simultâneo: “*bioremediation, fuels, hydrocarbonoclastic, metagenome, soil*”. A pesquisa foi feita para o período de 2012 a 2022, tendo-se obtido inicialmente um total de setenta e nove artigos, que após a seleção dos critérios pretendidos restringiu-se a cinquenta artigos, esses critérios foram selecionados tendo sido: “*bioremediation, microbial biotechnology, microbial ecology, biodegradation, sustainable agriculture, soil microbiology, soil remediation, pollutants, hydrocarbons, metagenomics, oil spills, petroleum, phytoremediation, biosurfactants, fungi*”.

No anexo I encontra-se a tabela referente à revisão bibliográfica descrita no parágrafo anterior onde constam os microrganismos com potencial para degradar os hidrocarbonetos, analisados e reunidos nesta tabela com base nos cinquenta artigos da pesquisa realizada no site *b-on*.

Os cinco géneros de microrganismos que são mais referidos na tabela do anexo I, que constam na maior parte dos artigos revistos e focando nos com análise de amostras de solo são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Alcanivorax* e *Acinetobacter*, sobre estas bactérias:

- ***Pseudomonas*** – surge na bibliografia consultada, tanto para amostras com solo como para outras de diferente origem, este microrganismo é excelente para ser aplicado na biorremediação devido à flexibilidade das suas vias metabólicas e apresentam alto potencial de degradação de hidrocarbonetos, tendo resultados distintos quando isolada. São Gram negativo em forma de bastonete (Auti *et al.*, 2019; Baruah *et al.*, 2017; Gayathiri *et al.*, 2022; Kebede *et al.*, 2021; Pandey *et al.*, 2021; Roy *et al.*, 2018; Taketani *et al.*, 2021; Thakur *et al.*, 2019).
- ***Bacillus*** – com base nos artigos pesquisados, têm elevada capacidade de degradação de hidrocarbonetos, são microrganismos em forma de bastonetes Gram positivos (Baruah *et al.*, 2017; Chicca *et al.*, 2022; Gayathiri *et al.*, 2022; Kebede *et al.*, 2021; Pandey *et al.*, 2021; Thakur *et al.*, 2019).
- ***Rhodococcus*** – consta nos artigos estudados que esta bactérias é bastante promissora quando aplicada para biorremediação dado ter uma elevada tolerância para as condições ambientais mais severas, resistência a vários contaminantes. São bactérias Gram positivas (Fuentes *et al.*, 2014; Gayathiri *et al.*, 2022; Kebede *et al.*, 2021; Pandey *et al.*, 2021; Taketani *et al.*, 2021; Thakur *et al.*, 2019).
- ***Alcanivorax*** – são microrganismos capazes de degradar alcanos mais comuns em ambientes marinhos. Tratam-se de bactérias Gram negativas (Fuentes *et al.*, 2014; Gkorezis *et al.*, 2016; Kebede *et al.*, 2021; J. S. Oliveira *et al.*, 2017; Thakur *et al.*, 2019).
- ***Acinetobacter*** – são organismos Gram negativos, capazes de degradar extensivamente hidrocarbonetos utilizando-os como fonte de carbono (Auti *et al.*, 2019; Baruah *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2020; Gkorezis *et al.*, 2016; Kebede *et al.*, 2021; Thakur *et al.*, 2019).

Na maioria das investigações concluídas, onde se realizou o estudo do efeitos da adição de surfactante, conclui-se que estes microrganismos alcançam taxas maiores de biorremediação com a adição destes agentes ao meio.

2.2. Recolha e caracterização das amostras de solo

2.2.1. Técnica de amostragem do solo

Existem várias técnicas de amostragem de solo, sendo a técnica de *zig zag* uma das mais utilizadas.

Nesta técnica de *zig zag*, onde são escolhidas aleatoriamente zonas e assinaladas com um marcador, com uma distância de 50 cm aproximadamente. Esta técnica permite abranger exemplares de solo de toda a área. O terreno é dividido em parcelas, caso se queira analisar uma mistura do solo da área a analisar. A figura 2, exemplifica como são escolhidos os pontos da técnica de *zig zag* (Carter & Gregorich, 2007).

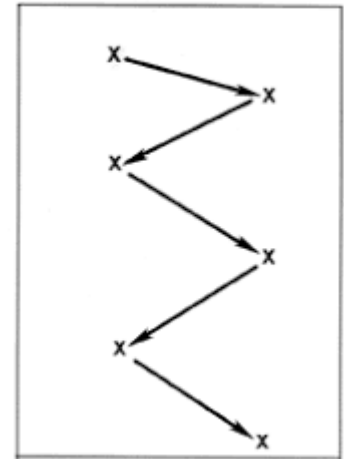


Figura 2: Esquema de amostragem do método de *zig zag* (Carter & Gregorich, 2007).

São então recolhidas várias amostras simples, que no fim, são misturadas e compõem a amostra composta. Isto quer dizer que ao fazer-se a amostragem não se deve retirar solo apenas de um local, deve-se tirar uma porção de solo de vários pontos da mesma zona, variando de 10 a 30 pontos de coleta, e cada ponto amostrado deve ser colocado num recipiente, como por exemplo, um balde ainda não utilizado. A amostra simples é cada porção individual do solo que foi retirado de vários pontos, que ao serem vigorosamente bem misturadas formam a amostra final a ir ser analisada, a designada amostra composta (Carter & Gregorich, 2007; Instituto Nacional de Recursos Biológicos, 2019).

Antes da recolha em cada ponto a superfície do terreno deve ser limpa, retirando ervas, pedras, detritos, vegetação, etc., a profundidade da amostra a recolher deve ser entre 10 cm a 40 cm, dependendo do propósito do estudo do solo, sendo escolhido geralmente um meio termo de 20 cm de profundidade (Carter & Gregorich, 2007; Instituto Nacional de Recursos Biológicos, 2019).

A amostra é retirada com o auxílio de uma pá, enxada ou sonda. Depois de misturadas as amostras simples, a amostra composta é guardada num frasco de vidro estéril ou num outro recipiente estéril, de maneira a que não haja contaminação da amostra com outros microrganismos, que possa influenciar os resultados (Carter & Gregorich, 2007; Instituto Nacional de Recursos Biológicos, 2019).

Para que ao longo do estudo e análise da amostra, composta do solo recolhido, haja a caracterização e justificação de algum tipo de resultado obtido, deve-se realizar um questionário sobre o terreno e a amostra coletada, mencionando e dividindo em informações gerais, apontando a identificação da amostra, o local (coordenadas), o coletor, data da amostra; e informações sobre a área amostrada, onde consta a quantidade recolhida, vegetação nativa e circundante, relevo e inclinação, cor (vermelha, amarela, cinza, preta,

castanha), textura (argilosa, arenosa, calcária, humosa, siltosa, turfosa/pantanososa, granulada), terreno homogêneo ou heterogêneo, tipo de ambiente circundante (caso seja ao perto de água esta ser salobra, salgada, doce/fluvia), a temperatura da amostra composta e ambiente, pH, condutividade, e observações se necessário (Hubel Verde, 2021; Instituto Nacional de Recursos Biológicos, 2019; Popek, 2003).

2.2.2. Crescimentos microbianos

A monitorização do crescimento da população microbiana ao longo do tempo é caracterizado por leitura da densidade ótica obtida a 600 nm, caracteriza-se por quatro fases que formam a curva de crescimento microbiana, a fase lag ou fase de adaptação, a fase log ou exponencial, a fase estacionária, e a fase de declínio ou morte celular (Kryptou et al., 2019; Rochat *et al.*, 2018; Stevenson *et al.*, 2016).

Quando as bactérias são introduzidas num meio em sistema fechado, como um tubo de ensaio, ou um Erlenmeyer, a população de células exibe sempre a dinâmica de crescimento durante essas quatro fases, ou três, pois até ao fim do tempo de estudo pode ainda não ter ocorrido a fase de declínio (Wang, Fan, Terentjev, et al., 2015).



Figura 3: Curva de crescimento microbiano; **Gráfico A:** Curva com a descrição das quatro fases; **Gráfico B:** Fases de latência e de crescimento exponencial em números absolutos e logaritmo do número de células (Rodrigues, 2019).

A figura 3, exemplifica um gráfico com a curva de crescimento microbiana e o conceito de cada fase da curva de crescimento descreve-se de seguida.

Fase Lag ou fase de adaptação: acaba quando começa a fase log, é a fase de ajuste ao novo ambiente em que os microrganismos são inseridos, parecendo inicialmente que não têm capacidade de se replicar. Esta fase inicial é caracterizada pela atividade metabólica e não pelo crescimento microbiano. As bactérias ao tentarem adaptar-se ao novo meio sintetizam pequenas moléculas necessárias à sua replicação, começando a aumentar de tamanho (Rodrigues, 2019; Scientific Bioprocessing, 2021; Wang, Fan, Chen, *et al.*, 2015).

Fase log ou fase exponencial: desde que as células se começam a dividir por fissão binária regularmente, entra-se na fase log, que atinge a taxa máxima de crescimento, que é estimada pelo tempo de duplicação de cada geração. A atividade metabólica durante esta fase é bastante alta, porém limitada apenas às etapas necessárias de reprodução (Rodrigues, 2019; Scientific Bioprocessing, 2021; Wang, Fan, Chen, *et al.*, 2015).

Fase estacionária: as condições do meio vão mudando, e a disponibilidade de nutrientes torna-se um fator limitante do crescimento celular, e o número de células em divisão é igual ao número de mortes celulares. As células começam por retardar a reprodução, entrando nesta fase, pois as condições não são mais as ideais e a atividade metabólica microbiana é alterada e os microrganismos entram em stress. Durante esta fase, algumas bactérias podem desencadear mecanismos de sobrevivência e resistência ao meio, como ocorre na biorremediação, onde as bactérias usam os hidrocarbonetos como fonte de carbono e de energia (Rodrigues, 2019; Scientific Bioprocessing, 2021; Wang, Fan, Chen, *et al.*, 2015).

Fase de declínio, decaimento ou morte: à medida que os resíduos se acumulam e as fontes de nutrientes se esgotam, os microrganismos começam a morrer, esta fase é o ponto em que as células vivas interrompem as funções metabólicas e iniciam o processo de morte. Com o lise das células e o meio de cultura fica preenchido pelo que constituía o interior das células o meio muda uma última vez entrando em decadência exponencial (Rodrigues, 2019; Scientific Bioprocessing, 2021; Wang, Fan, Chen, *et al.*, 2015).

2.2.3. Caracterização morfológica das colónias

A caracterização e classificação preliminar das bactérias pode-se concluir através das suas propriedades morfológicas, como o seu tamanho, forma, elevação, margem da bactéria, estrutura, brilho e cor. Para que a classificação seja correta, deverão de ser controladas as condições ambientais em que estão inseridas, no meio de cultura, bem como a inoculação, de modo a se obter um crescimento de colónias eficiente, separadas e bem formadas (Reynolds, 2021).

A atribuição da classificação é feita com base na figura 4, visualizando a olho nu e se necessário à lupa, a placa inoculada com as colónias (Meded & Lilley, 2015).

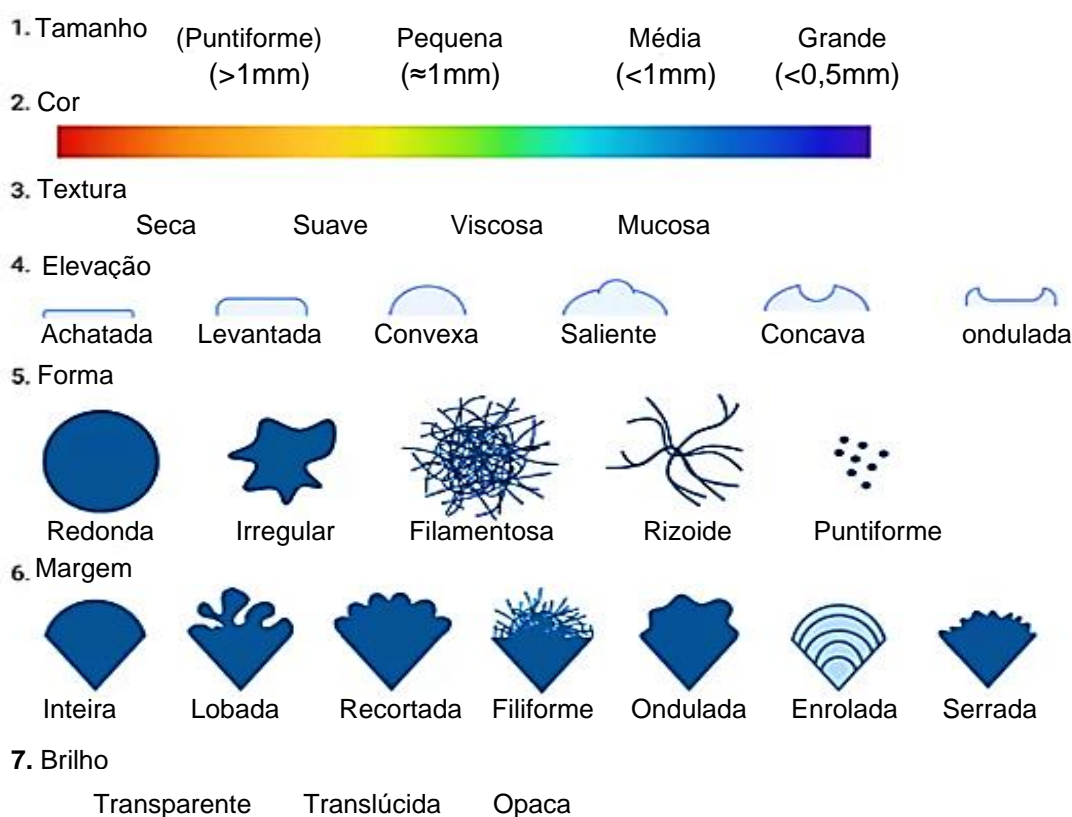


Figura 4: Caracterização e classificação das colónias visualizadas a olho nu (adaptado de Meded & Lilley, 2015).

2.2.4. Caracterização bioquímica – Método da Coloração de Gram

A coloração de Gram constitui a base de seleção dos testes bioquímicos, é um procedimento de coloração complexo e diferencial que permite a determinação da morfologia das bactérias, dividindo-as em dois grupos: Gram positivas ou Gram negativas. As Gram positivas após a execução da técnica apresentam coloração roxa/azulada, as Gram negativas adquirem coloração rosa/vermelho (Procop, 2016; Siegrist, 2022).

Através de uma série de colorações e descolorações, os organismos bacterianos são diferenciados consoante a composição da parede celular ou membrana celular, pois as bactérias Gram positivas têm paredes celulares de camadas espessas de peptidoglicano razão pela qual adquirem a coloração roxa. As bactérias Gram negativas, que têm paredes finas com concentração reduzida de peptidoglicano na sua composição, e elevado teor de lípidos, motivo pelo qual adquirem a coloração de rosa (American Society for Microbiology, 2019; Aryal, 2022; Smith & Hussey, 2019; Vieira & Fernandes, 2012b).

A realização da coloração de Gram em qualquer amostra é dividida em quatro etapas básicas que incluem, a fixação de uma porção da colónia das amostra a analisar, por esfregaço, e a fixação dá-se à chama muito rapidamente; de seguida, por um minuto, aplica-se uma coloração primária (violeta cristal), deixando escorrer o excesso para que as células não fiquem muito concentradas com o corante, dificultando a sua visualização; após um minuto passa-se com água destilada para retirar o excesso do corante; de seguida adiciona-se o soluto de Lugol, por mais um minuto, lavando depois com álcool a 95-99% por 30 segundos. Para retirar o álcool lava-se a lâmina por água corrente muito rapidamente, cobrindo de seguida com safranina por 30 segundos, o passo final consiste em passar por água destilada, deixar secar e observar ao microscópio a coloração que as bactérias fixaram (American Society for Microbiology, 2019; Aryal, 2022; Smith & Hussey, 2019; Vieira & Fernandes, 2012b). O esquema do procedimento de coloração de Gram representado na figura 5, ajuda a compreender melhor passo a passo.

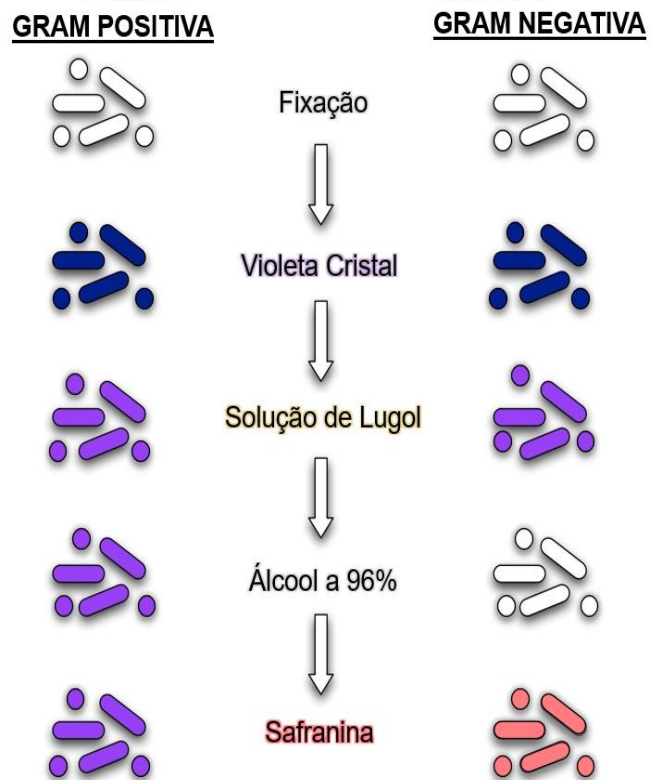


Figura 5: Esquema do procedimento da coloração de Gram (adaptado de Procop, 2016).

A observação das colónias coradas permite ainda observar a sua morfologia (American Society for Microbiology, 2019; Smith & Hussey, 2019).

Existem quatro formas básicas das bactérias: esférica (cocos), bastonete (bacilos), espiral (espiroqueta), (Procop, 2016; Vieira & Fernandes, 2012b):

- **Forma esférica:** Cocos – são células que formam grupos homogêneos em relação ao tamanho.
- **Forma de bastonete:** Bacilos – têm forma de bastão, podem ser longos ou delgados, pequenos ou grossos, com extremidade reta ou arredondada. Os bacilos podem ser isolados (bacilos isolados), de dois bacilos (diplobacilos), ou mais de duas unidades (streptobacilos)

- **Forma de espiral:** Espiroquetas – o corpo é rígido e movem-se às custas de flagelos externos; Espiroquetas – são flexíveis e a locomoção ocorre através de contrações do citoplasma.

2.2.5. Identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Atualmente, os métodos básicos para detecção de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* é suficiente, através do cultivo das colónias a analisar em meio seletivo.

A *Pseudomonas aeruginosa* cresce rapidamente, nos meios de cultura, normalmente, usados em análise (como o CN Agar Base) incubadas entre 37°C a 42°C, durante 24-48h no máximo obtém-se crescimento e detecção destas bactérias (Murray, 2018; Vieira & Fernandes, 2012a).

Apresentam cor branca a bege em meio CN Agar mais meio Bushnell-Hass (BH).

Existem estirpes de *P. aeruginosa* que crescem neste meio seletivo, mas não têm a capacidade de produzir piocianina, contudo apresentam fluorescência, devido à produção de outros pigmentos (piorrubrina e piomelanina). Para isso, as placas são analisadas sob a ação de luz UV (com comprimento de onda de 360 nm), para verificar a emissão de fluorescência, tendo em conta que períodos longos sob esta radiação podem destruir as colónias (Murray, 2018; Vieira & Fernandes, 2012a).

2.2.6. Efeito do biossurfactante nas taxas de biodegradabilidade e índice de emulsificação

O estudo da atividade microbiana na degradação de hidrocarbonetos no meio em que habitam por meio de técnicas de biorremediação, podem ser favorecidas e analisados os resultados de biodegradação com a adição de um corante redox, como o DCPIP (2,6-Diclorofenolindofenol) que é um corante redox usado como aceitador de eletrões, de cor azul quando oxidado e incolor quando reduzido, mudando a cor devido à sua estrutura química, e dessa mudança pode se concluir se houve degradação ou não, dependendo do poluente em causa, pois nem sempre ocorre a alteração de cor e ocorre na mesma degradação do poluente, maioritariamente esta situação ocorre em técnicas *in situ* (Chikere *et al.*, 2019; Denby, 1996; Mariano, 2006; Mariano *et al.*, 2007; Sanches, 2009).

Como dito, este corante comportar-se-á como um substrato, que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, os eletrões são transferidos para os aceitadores, podendo estes ser o oxigénio, nitrato ou sulfato (daí ser importante a presença de um aceitador de eletrões ou substituto com a mesma função), e com essa reação química averiguar-se a capacidade dos microrganismos utilizar os hidrocarbonetos como substratos quando representam uma fonte de carbono, o DCPIP irá revelar esta ocorrência pela possível mudança de cor (Chikere *et al.*, 2019; Denby, 1996; Mariano, 2006; Mariano *et al.*, 2007; Sanches, 2009).

Já em relação o índice de emulsificação e respetiva taxa de biodegradabilidade, quando os hidrocarbonetos são muito tóxicos e de forma a facilitar a atividade metabólica degradativa da população microbiana indígena do local a ser tratado, a adição de um biossurfactante e/ou emulsificante, aumenta a solubilização do hidrocarboneto e como tal a sua biodisponibilidade.

Os biossurfactantes têm a vantagem de ter baixa toxicidade, são biodegradáveis e têm ampla eficácia com variação de temperatura, pH e salinidade (Tabatabaee *et al.*, 2005).

Um exemplo de emulsificante é o Tween 80 ou polisorbato 80, é um biossurfactante e emulsificante frequentemente utilizado para extração e isolamento de proteínas como os hidrocarbonetos. A sua viscosidade aumenta e facilita o contato com as células microbianas favorecendo mais a biodegradação por parte das mesmas. Os resultados das taxas de biodegradação podem-se verificar através da leitura da D.O. a 604 nm ao longo do tempo (Fogaça, 2007; Thermo Fisher, 2022).

3. METODOLOGIA

3.1. Locais de recolha das amostras de solo

Dado o estuário do rio Tejo ter uma concentração de áreas densamente urbanizadas e aglomerados industriais nas suas margens, pode haver comprometimento da qualidade da água bem como do solo. De modo a obter uma maior heterogeneidade de microrganismos capazes de serem implementados nas técnicas de atenuação natural e bioestimulação do método de biorremediação in situ, optou-se por efetuar a recolha em seis locais distintos do estuário do rio Tejo, paralelos uns aos outros de cada margem do rio, para investigar a diversidade microbiológica entre os locais, possivelmente contaminados.

Foram escolhidos seis locais do estuário do rio Tejo, tendo sido divididas as amostragens por dois dias distintos e por margem, da seguinte forma:

- Margem Norte
 - A. Rio Trancão, Praça Mar da Palha, Sacavém, Lisboa
 - B. Praia Fluvial do Cais das Colinas, Praça do Comércio, Lisboa
 - C. Praia de Algés, Carnaxide, Cascais, perto do Caminho Marítimo de Algés
- Margem Sul
 - D. Praia Fluvial de Alcochete, Rua da Praia, nº 15, Samouco, Alcochete
 - E. Praia Fluvial de Alburrica, Alburrica, Barreiro
 - F. Praia Trafaria, Trafaria, Almada

Os locais encontram-se indicados no mapa da figura 6.



Figura 6: Mapa com a localização dos seis locais, do estuário do rio Tejo, para recolha de amostras.

3.2. Amostragem

Para a recolha das amostras de solo foi sempre necessário verificar previamente as condições meteorológicas e das marés, ou seja, pesquisar a que horas haveria maré baixa, para assim ser possível realizar a amostragem de forma correta e segura, e como estaria o tempo meteorologicamente.

O material que foi usado encontra-se descrito, com as respetivas observações na tabela 1:

Tabela 1 – Descrição do material utilizado para recolha das amostras, as respetivas de quantidade e observações

Material	Observações
Frascos de vidro com tampa	Esterilizados; para guardar a amostra
Colheres de sopa	Esterilizados; para usar como medidor
Marcos sinalização/localização	Numerados de 1 a 10; sinalizadores do local de coleta da amostra simples
Copo de plástico de 250 mL	Para medição do pH da amostra composta
Copo de plástico de 2000 mL	Para misturar as amostras simples formando a composta
Fita medidora de pH	-
Luvas	-
Espátula	Para misturar as amostras simples
Proveta de plástico 50 mL	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
Pá de pedreiro	Para limpeza da superfície do local de amostragem
Água destilada	Para medição do pH e lavar algum material

Teve-se em atenção que para este ato foi obrigatório pedir permissão e informar por email o Comandante da Polícia Marítima de Lisboa, sobre a identificação das pessoas constituintes do grupo que iria realizar a amostragem, a metodologia de recolha das amostras, o âmbito de estudo das mesmas, os locais de recolha, as datas e horas da coleta em cada local.

3.2.1. Preparação do local de amostragem

Primeiramente escolheram-se dez zonas para colocar os marcadores.

Limpou-se a superfície do local de amostragem, com o auxílio de uma pá de pedreiro, de seguida retirou-se a vegetação, galhos, pedras, carapaça de bivalves sem remover a camada superficial do solo.

3.2.2. Amostra Simples

Amostra simples foi o nome que se deu a cada amostra retirada das dez zonas escolhidas ao acaso, ao percorrer o solo em *zig zag*, que é uma técnica aplicada na recolha de amostras de solo para respetiva análise. Os sinalizadores usados para marcar as dez zonas a recolher da amostra encontram-se na figura 8.

Com o auxílio da proveta de 50 mL, perfurou-se o solo, sem rodar, até 20 cm, tendo-se medido previamente com a régua até que volume da proveta seriam os 20 cm, de seguida puxou-se, colocando-se a porção central no copo de plástico de 2000 mL. Estes passos foram os mesmos para a recolha de todas as amostras simples, juntando sempre no mesmo copo de plástico de 2000 mL a porção de solo de cada zona.

Por fim, misturou-se com uma espátula as amostras para obter a amostra composta, que é a junção de todas as amostras simples colhidas.

3.2.3. Medição do pH da amostra composta

Retirou-se duas colheres de sopa da amostra composta para um copo de 250 mL adicionou-se água destilada até meio do copo, e misturou-se com o auxílio da mesma espátula. Mergulhou-se uma porção da fita medidora de pH por 30 segundos, (em alguns casos, se necessário, para se limpar a fita mergulhou-se breves segundos num outro copo com água destilada). Após este passo comparou-se a cor da fita com as cores presentes no rótulo do kit.

3.2.4. Identificação da amostra composta

Encheu-se o copo de vidro esterilizado com a amostra composta, identificando-se devidamente o frasco da seguinte forma: Nome da amostra; Amostrador; Local, Data, Hora, pH, Temperatura ambiente.

3.2.5. Medição da condutividade do solo

No mesmo dia, foi medido no laboratório a condutividade de cada amostra, tendo-se pesado 5 g de solo e adicionado 5 mL de água destilada, medindo-se no condutímetro.

O sensor foi limpo com água destilada a cada nova medição, e foi usado como teste padrão água destilada.

3.2.6. Conservação das amostras

As amostras recolhidas foram guardadas no frigorífico a 4°C.

Nota¹: No fim da recolha da amostra composta de cada local, fez-se um questionário informativo sobre o local, como apresentado na figura 7.

Questionário informativo de análise do solo e da amostra recolhida

Informações Gerais

Nome: _____

Identificação da amostra: _____

Data da amostra: _____

Propriedade: _____

Localidade: _____

Coordenadas: _____

Informações sobre a área amostrada

Quantidade recolhida: _____

Vegetação nativa:

Não Sim

Vegetação circundante: _____

Relevo: _____

Cor: Vermelha Amarela Cinza Preta Castanha

Textura: Argilosa Arenosa Calcário Humoso Siltoso

Turfosos/Pantanosos Granulados

Terreno: Homogéneo Heterogéneo

Tipo de ambiente/habitat circundante:

Salobro Salgado Doce/Fluvial

Temperatura da amostra composta: _____

Temperatura ambiente: _____

pH da amostra composta: _____

Condutividade da amostra composta: _____

OBSERVAÇÕES: _____

Figura 7: Questionário informativo para descrição do local de recolha das amostras.

Foi feito um registo em fotografia da recolha das amostras recolhidas, podendo se visualizar nas imagens em anexo II, nomeadamente o local de colheita, o local abrangente, forma de coleta, o procedimento prático desenvolvido em campo e o respetivo preenchimento do questionário para cada local.

O registo fotográfico dos frascos onde foram guardadas encontram-se na figura 9.



Figura 8: Sinalizadores adaptados para sinalizar o ponto de recolha de cada amostra simples, numerado de 1 a 10.



Figura 9: Exemplo de como foram guardadas as amostras compostas de cada local, em frascos de vidro, devidamente identificados como já referido no procedimento de amostragem. (Na fotografia estão os frascos das três primeiras amostras recolhidas, rio Trancão, Praia do Cais das Colinas e Praia de Algés)

3.3. Seleção dos organismos hidrocarbonoclasticos

Para realizar este estudo foi necessário preparar os meios, especificamente, meio BH (meio líquido), meio LB (meio líquido), meio BH + Agar Nutritivo (10%) (meio sólido), e solução de cloreto de sódio (0,9% NaCl (m/V)).

I. Preparação do meio BH – meio líquido

Foi necessário fazer um volume total de meio BH de 750 mL de acordo com o fabricante (HIMEDIA):

- Suspender 23,27 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 minutos, arrefecer até 45°C-50°C, homogeneizar bem e distribuir pelos recipientes.

II. Preparação do meio LB – meio líquido

De meio LB foi necessário fazer um volume total de 50 mL. de acordo com o fabricante (nzytech):

- Suspender 50 g de BH 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 minutos, arrefecer o mais rápido possível, e distribuir pelos recipientes.

III. Preparação do meio BH – meio sólido

Para fazer o meio sólido, foi necessário fazer um volume total de meio BH de 600 mL, preparado de acordo com as ordens do fabricante (descrito em I.), adicionando-se 10% de Agar Nutritivo, que tem como função solidificar o meio, esta solução foi feita num frasco Schott.

IV. Preparação da solução de Cloreto de Sódio (NaCl)

Preparou-se esta solução com concentração de 0,9% (m/V).

V. Preparação do meio seletivo para identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Este meio fez-se num frasco Schott, pesou-se 75,9 g de CN Agar Base – meio de cultura desidratado, adicionou-se 1500 ml de água destilada e 15 ml de glicerol, aqueceu-se até ferver. Esperou-se por 1 minuto, e esterilizou-se em autoclave por 15 minutos a 121°C. Na câmara de fluxo laminar, plaqueou-se as placas de Petri e deixou-se secar. Depois de secas, agrupou-se as placas, selou-se com *parafilm* e guardou-se no frigorífico a 4°C.

VI. Preparação da solução de DCPIP – Indicador redox

Tendo sido a concentração do DCPIP de 2%, consoante o número de *ependorfs* necessários, o volume a aplicar em cada foi de 30 µl, colocou-se a aquecer até ferver, esterilizou-se no autoclave a 121°C por 15 minutos e deixou-se arrefecer. Tem-se como observação que a solução tem como característica um azul-escuro concentrado.

VII. Distribuição das amostras

Para iniciar o estudo da seleção dos organismos hidrocarbonoclásticos e posteriormente o seu crescimento, foi feita uma logística da distribuição de meios necessários pelas amostras de cada local, tendo ocorrido da seguinte forma:

- Na seleção dos organismos hidrocarbonoclásticos, para cada amostra de cada local distribui-se 2 Erlenmeyers com 100 ml de meio BH;
- Posteriormente, para estimular o crescimento dos organismos, para cada amostra de cada local distribui-se 2 Erlenmeyers com 5 ml de meio LB;
- De seguida, para crescimento em meio sólido, posterior caracterização morfológica e seleção de colónias, plaqueou-se placas de Petri com meio BH + Agar Nutritivo, após autoclavado no frasco Schott, sendo que para cada amostra de cada local foram atribuídas 6 placas, levando aproximadamente 15 ml;
- Os poluentes, gasolina (G), hexano (H) e tolueno (T) foram manuseados na Hotte.

Após o crescimento e seleção de colónias, das placas de cada local, estas foram transferidas para o meio LB para estimular o seu crescimento e só realizar os crescimentos em meio BH, tendo o poluente como única fonte de carbono, assim os estudos em placas serviram para identificação das características morfológicas e identificação de *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Todos os Erlenmeyers e placas com meio preparados foram guardados no frigorífico a 4°C.

3.3.1. Seleção e crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos

- Após a recolha das três amostras da margem Norte, procedeu-se ao seu tratamento, preparando-se uma amostra solo lavada com NaCl, e outra amostra de solo intacta, ou seja, uma solução diluída e outra mais concentrada, isto para cada local.
- Primeiramente foi pesado em copos de vidro 1 g e 10 g de cada amostra, identificando devidamente os copos, sendo que às 10 g de cada amostra foi adicionado 100 ml de solução salina, agitou-se e deixou-se repousar por 15 minutos. A esta etapa deu-se o nome de “lavagem do solo”.
- Cada amostra teve dois Erlenmeyers, identificados da seguinte forma: Erlenmeyer com solução de meio BH com suspensão solo – Meio BH + Suspensão, Local da Amostra, data e nome do estudante; Erlenmeyer com solução de meio BH com solo.
- Às amostras com 1 g de solo foram adicionadas a um dos Erlenmeyers com meio BH, agitando-se de seguida, para mistura do meio com o solo, repetindo-se para da local.
- Após os 15 minutos, e verificando se que o solo estava totalmente repousado, dentro do possível dependendo do tipo de amostra de solo, pipetou-se de cada amostra 1 ml da solução em suspensão e adicionou-se ao segundo Erlenmeyer disponível com meio BH.
- De seguida, colocou-se todos os Erlenmeyers na incubadora a 30°C, com agitação de 180 rpm, durante 1 semana.

O mesmo procedimento foi repetido para as amostras da margem Sul.

3.3.1.1. Crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos em meio líquido

- Antes de se realizarem crescimentos microbianos em meio BH com a adição do poluente, foram sempre realizados crescimentos de 24h em meio LB.
- Antes de se ter iniciado o próximo passo, retirou-se do frigorífico os Erlenmeyers com meio LB, para não estarem tão frios e haver um possível choque térmico nos organismos em meio BH.

Nota²: A partir desta fase do procedimento, todas as etapas laboratoriais que se seguiram foram realizadas na câmara de fluxo laminar, sendo que antes de se iniciar os procedimentos laboratoriais foi sempre necessário proceder à limpeza e desinfeção da mesma, de forma a não haver qualquer tipo de contaminação do trabalho prático que se desenvolveria de seguida, podendo adulterar os resultados, desta forma seguiram-se os seguintes pontos:

- 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%.

Durante os procedimentos, houve o cuidado de ter sempre presente, um toalhete/papel embebido em etanol para limpeza, quando necessário.

Para efetuar os procedimentos laboratoriais, adotaram-se ainda as regras de uso de equipamentos de proteção individual, como habitual num laboratório de Engenharia Biológica e Química, uso de luvas e de bata pessoal.

- Após a realização deste procedimento de limpeza laboratorial, retirou-se da incubadora todos os Erlenmeyers com a solução de meio BH com as amostras de solo e suspensão de solo, colocando-se na câmara de fluxo laminar.
- Destes Erlenmeyers pipetou-se 500 µl de solução para os Erlenmeyers com meio LB, incubando-os de seguida a 30°C, com agitação de 180 rpm, deixando overnight (O/N).
- Os Erlenmeyers com meio LB mais solução foram identificados da seguinte forma: para as amostras com solo – Meio LB + Amostra (Solo), data, nome do estudante; para as amostras com suspensão do solo – Meio LB + Amostra (Suspensão), data, nome do estudante.
- Os Erlenmeyers iniciais com solução de meio BH mais amostra solo e suspensão foram colocados no frigorífico a 4°C.
- Após incubação O/N, e dando início ao estudo da curva de crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos, levou-se o inóculo para a câmara de fluxo laminar, pipetou-se 200 µl, que correspondeu a 2% de concentração de inóculo, para os respetivos Erlenmeyers de cada local, e a cada um dos três Erlenmeyers distribuídos por cada local adicionou-se o respetivo poluente, gasolina, hexano e tolueno, adicionando-se 250 µl de poluente, correspondente a 0,5% (V/V) de concentração.
- Agitou-se e retirou-se de cada Erlenmeyer 100 µl de solução para cada poço da microplaca de leitura do espectrofotómetro, fazendo-se duplicados para a média dos pontos de leitura e formação do gráfico da curva de crescimento.
- No espectrofotómetro, procedeu-se a leitura da densidade ótica a 600 nm;
- O estudo e crescimento dos organismos fez-se por sete a dez dias, tendo-se feito a primeira medição logo antes de se colocar a incubar, a 30°C, com agitação de 180 rpm.
- A microplaca de leitura do espectrofotómetro de 96 poços teve a seguinte organização da figura 10:

Legenda: A_G – Nome do local da amostra com o poluente gasolina; A_H – Nome do local da amostra com o poluente hexano; A_T – Nome do local da amostra com o poluente tolueno;

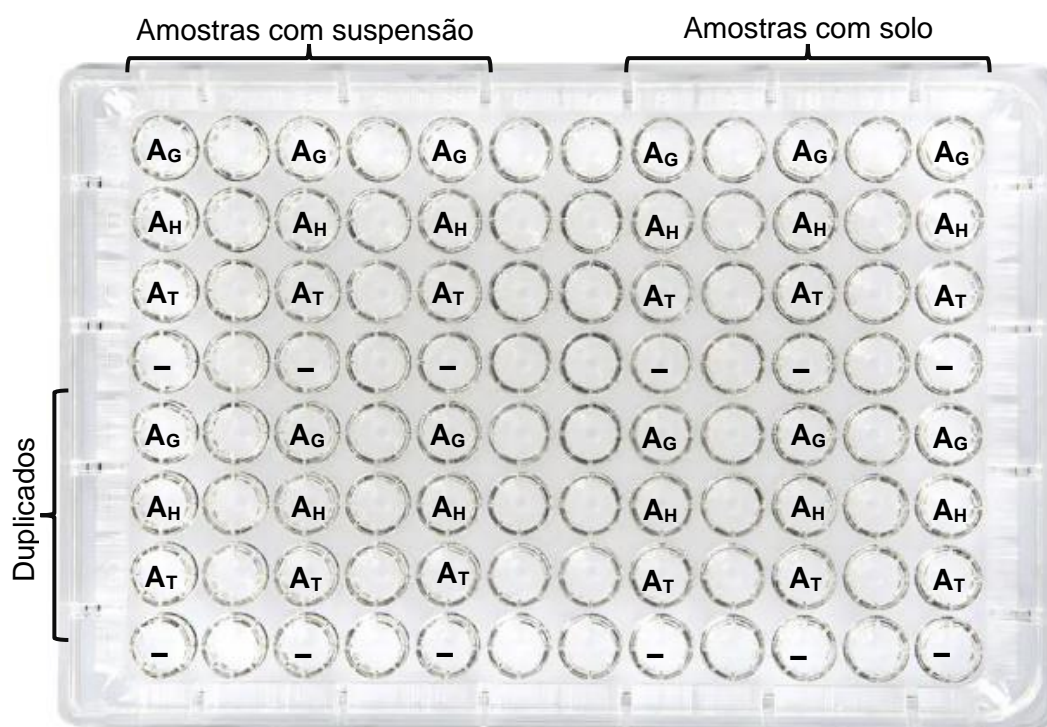


Figura 10: Distribuição das amostras pela microplaca (adaptado de Direct Industry, 2022).

- Após a primeira medição até ao fim dos dias de incubação, realizaram-se várias medições da solução de 2 a 4 horas de intervalo, reutilizando a mesma placa, lavando com água destilada, deixar secar e colocar nos UV's da câmara de fluxo laminar.
- Sempre após cada leitura, selou-se os Erlenmeyers e colocou-se os na incubadora novamente, até ao fim do período de incubação.

3.3.1.2. Crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos em meio sólido

- A cada local foram atribuídas seis placas de Petri com o meio BH mais agar nutritivo (meio sólido), tendo sido divididas por grupos de duas, com o mesmo poluente com diferentes concentrações, uma com concentração do poluente em 0,4%, que correspondeu a 200 µl, e outra com concentração em 0,8%. Inicialmente, com o auxílio de um espalhador, espalhou-se o poluente, que foi sempre o primeiro a ser adicionado na placa.
- De seguida, dos Erlenmeyers com inóculo (meio LB com crescimento dos organismos da amostra de cada local) pipetou-se 100 µl para cada placa do respetivo local da amostra pipetada, com o auxílio de um espalhador, espalhou-se o líquido por toda a placa.

- Após este procedimento, as placas foram colocadas na estufa a 30°C, primeiramente viradas com a tampa para cima, para que não escorresse nenhum líquido da solução que ainda não tivesse aderido ao meio, e após 1h, inverteram-se as placas, para evitar que possíveis gotas de condensação caíssem no meio.
- As placas foram deixadas na estufa por 24h, após este tempo verificou-se se as placas continham já algum crescimento de colónias, as que tinham foram guardadas no frigorífico a 4°C, as que não tiveram, voltaram a ser postas na estufa por mais 24h, tendo ido também para o frigorífico após este tempo.

3.4. Caracterização morfológica e bioquímica dos organismos

Depois da observação das placas, foram escolhidas para cada local, por cada tipo de amostra (suspensão ou solo) e por cada poluente (independentemente da concentração do poluente), as placas de Petri com os melhores resultados a nível do crescimento das colónias de bactérias.

3.4.1. Caracterização morfológica dos organismos

A caracterização morfológica foi com base no que foi referenciado no ponto 2.2.3., e permitiu diferenciar os tipos de organismos degradantes de hidrocarbonetos que estavam presentes nas placas de Petri através apenas da sua visualização.

3.4.2. Caracterização bioquímica dos organismos

De modo a diferenciar os organismos bacterianos, e como já explicado e referido no ponto 2.2.4., o teste bioquímico testado neste trabalho foi a coloração de Gram, lembrando que o que diferencia os organismos em dois grupos é a coloração final que adquirem: bactérias Gram negativas (obtendo-se uma coloração roxa) e Gram positivas (obtendo-se uma coloração rosa).

Primeiramente, organizou-se na bancada todo o material preciso a este método, tendo sido: laminas de vidro, ansa de inoculação de aço inoxidável, de forma a ser mais prático utilizou-se um copo de vidro de 2000 ml, para descartar os líquidos, e outro copo de vidro de 500 ml para colocar água da torneira/corrente, ou caso seja preferível usar a água da torneira diretamente, um recipiente pra armazenamento das laminas de vidro após usadas para o método, papel absorvente, isqueiro ou fósforos, bico de Bunsen, água destilada, álcool a 96%, solução de violeta cristal, solução de Lugol, safranina, pinça de madeira e microscópio.

- Acendeu-se o bico de Bunsen, desinfetando e esterilizando à chama a ansa e a lâmina de um lado e de outro com o auxílio da pinça.
- Retirou-se as placas escolhidas para o método do frigorífico e abriu-se à volta da chama a placa de Petri para manter a esterilidade do ambiente como numa câmara de fluxo laminar. Coletou-se com a ansa a colónia pretendida e realizou-se a técnica do esfregaço de forma oval, fina e uniforme na lâmina.

- Secou-se o esfregaço passando o lado oposto do mesmo 5x de forma rápida por cima da chama.
- De seguida, colocando por baixo o copo de vidro para descarte, cobriu-se a lâmina na zona do esfregaço, primeiro com solução violeta cristal e deixou-se escorrer, de forma a não ficar muito concentrada a coloração, e aguardou-se por 1 minuto.
- A seguir lavou-se rapidamente com água destilada para retirar o excesso, e adicionou-se solução de Lugol, deixou-se escorrer e aguardou-se por 1 minuto.
- Logo depois, de forma gotejante, passou-se álcool a 96% durante 30 segundos, e passou-se com água corrente muito rapidamente.
- Cobriu-se novamente a lâmina com safranina e deixou-se escorrer o excesso, aguardou-se 30 segundos.
- Por fim, lavou-se a lâmina com água destilada e deixou-se secar sem esfregar, quando já seca observou-se ao microscópio na objetiva 4x e 10x, visto a 40x já ser uma demasiada ampliação e correndo o risco de tocar e comprometer o esfregaço.
- Depois de concluído o método, guardou-se as lâminas no recipiente de armazenamento e guardou-se no frigorífico a 4°C.

3.5. Identificação para *Pseudomonas aeruginosa* usando um meio seletivo

A identificação dos organismos neste meio seletivo, foram as mesmas que se analisou no estudo e análise da caracterização morfológica e bioquímica, tendo sido retiradas do meio com inóculo, ou seja, dos Erlenmeyers com meio LB e respetiva amostra de cada local.

Depois de decorridos os procedimentos referidos, na câmara de fluxo laminar, adicionou-se 0,1 ml do inóculo das colónias de interesse na placa de Petri, e com um espalhador, espalhou-se o líquido.

Identificou-se da mesma forma como as placas anteriores já referidas, agrupou-se com *parafilm* e colocou-se na estufa a 37°C durante 48h.

Decorridos os dois dias, colocou-se placa a placa, registando os respetivos resultados, no transiluminador sob luz UV a 360 nm, para se verificar a fluorescência das bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

3.6. Estudo da biodegradabilidade

Na câmara de fluxo laminar, distribuíram-se os *ependorfs* necessários pelo suporte e identificou-se cada um com o nome do respetivo inóculo, dos Erlenmeyers retirou-se 1,5 ml da suspensão celular para o respetivo *ependorf* e centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 rpm.

- Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1,5 ml de solução de NaCl 0,9% (m/V) e ressuspendeu-se o pellet na solução salina até ficar homogeneizado.
- À amostra para o estudo com biossurfactante, juntou-se mais 2 tubos para o teste em branco do biossurfactante (BS), para este estudo foram realizados

duplicados. O biossurfactante e emulsificante escolhido para este trabalho prático foi o Tween 80 (C₆₄H₁₂₅O₂₆) com densidade de 1,08 g/ml. A suspensão celular foi retirada dos tubos preparados com a mesma e após a sua homogeneização com a solução salina.

- A composição e ordem das substâncias dos tubos mencionados no parágrafo anterior encontra-se nas tabelas 2 à 6 e nos esquemas das figuras 11 e 12, para melhor organização e percepção, em relação à distribuição das amostras pela microplaca a figura 13 demonstra a disposição realizada:

Tabela 2 – Composição do tubo de análise sem biossurfactante

Estudo da biodegradabilidade sem biossurfactante – tubo de análise			
	Constituintes	Volume (µl)	Concentração (%) (V/V)
1º	Poluente (G, H ou T)	12	0,8
2º	Meio BH	1428	-
3º	DCPIP	30	2
4º	Suspensão celular	30	2

Os tubos de teste branco tanto para a suspensão celular como para o hidrocarboneto têm a mesma composição e ordem das substâncias no estudo com e sem biossurfactante.

Tabela 3 – Composição do tubo do teste branco da suspensão celular

Estudo da biodegradabilidade sem biossurfactante – teste BSC			
	Constituintes	Volume (µl)	Concentração (%) (V/V)
1º	Meio BH	1440	-
2º	DCPIP	30	2
3º	Suspensão celular	30	2

Tabela 4 – Composição do tubo do teste branco do hidrocarboneto

Estudo da biodegradabilidade sem biossurfactante – teste BH		
Constituintes	Volume (µl)	Concentração (%) (V/V)
1º Meio BH	1458	-
2º DCPIP	30	2
3º Poluente (G, H ou T)	12	0,8

Tabela 5 – Composição do tubo de análise com biossurfactante

Estudo da biodegradabilidade sem biossurfactante – teste de análise		
Constituintes	Volume (µl)	Concentração (%) (V/V)
1º Poluente (G, H ou T)	12	0,8
2º Meio BH	1425,3	-
3º DCPIP	30	2
4º Biossurfactante	2,7	0,002 g/ml
5º Suspensão celular	30	2

Tabela 6 – Composição do tubo de teste branco do biossurfactante

Estudo da biodegradabilidade sem biossurfactante – teste BS		
Constituintes	Volume (µl)	Concentração (%) (V/V)
1º Meio BH	1428	-
2º DCPIP	30	2

Estudo da biodegradabilidade sem biossurfactante – teste BS

Constituintes	Volume (µl)	Concentração (%) (V/V)
3º Biossurfactante	2,7	0,002 g/ml

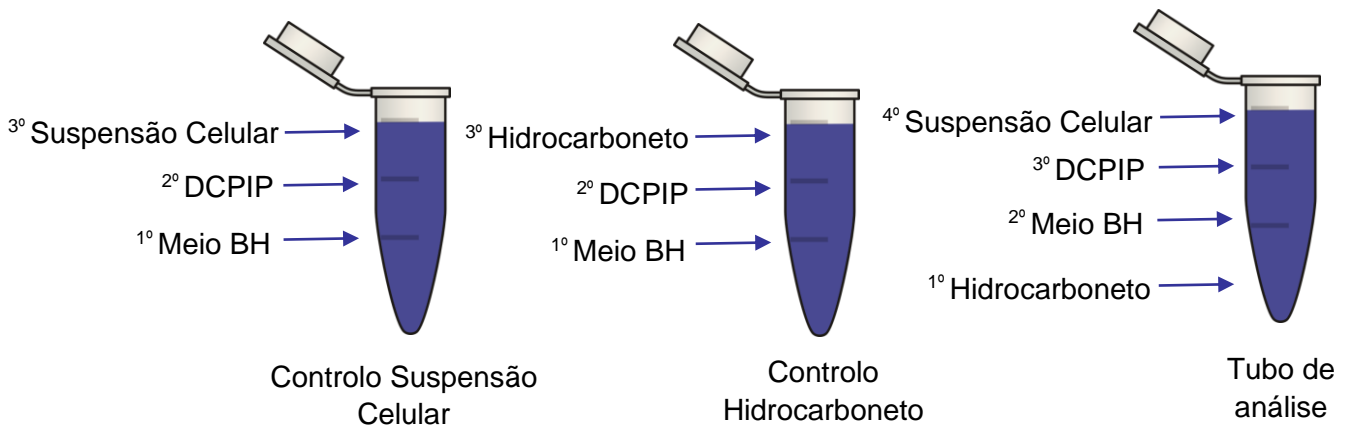


Figura 12: Esquema da ordem de adição das substâncias aos *ependorfs* no estudo da biodegradabilidade.

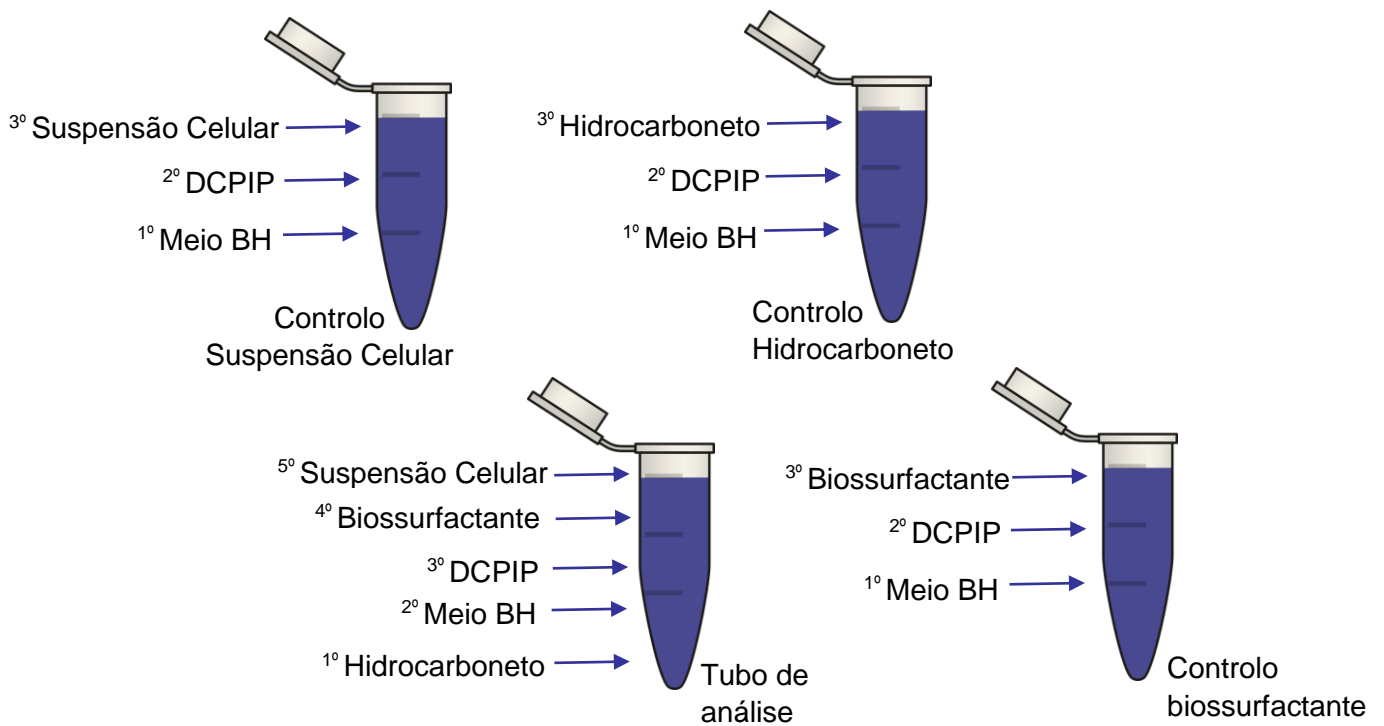


Figura 11: Esquema da ordem de adição das substâncias aos *ependorfs* no estudo da biodegradabilidade.

- Antes da adição da suspensão celular, tanto no estudo com como no sem biossurfactante, levou-se ao vórtex os *ependorfs* para haver homogeneização das substâncias e só depois se adicionou a suspensão celular, para não haver destruição do próprio.



Figura 13: Distribuição das amostras pela microplaca, no estudo a biodegradabilidade (adaptado Direct Industry, 2022).

- Passados os primeiros cinco dias fez-se uma leitura da absorvância de cada tubo, no comprimento de onda de 604 nm, retirando para a leitura nos poços da microplaca 20 μ l de solução, e dada a alta concentração que a solução continha teve de se fazer uma diluição de 1:10, adicionando 180 μ l de água destilada, perfazendo assim um volume total de 200 μ l. Antes de retirar o volume final para o poço da microplaca, agitou-se o *ependorf* 2 vezes, e ressuspendeu-se 3 vezes a solução.
- Após o procedimento, voltou-se a colocar os tubos da mesma forma de agrupamento continuando a incubação. A placa teve a disposição das amostras que se encontra esquematizada na figura 14 (a adição das linhas de água de destilada nos poços serviu para com a sua leitura fazer a média de cada valor lido, dado se ter feito uma diluição, tem de se contabilizar e retirar o valor da água para obter o valor de concentração da solução):

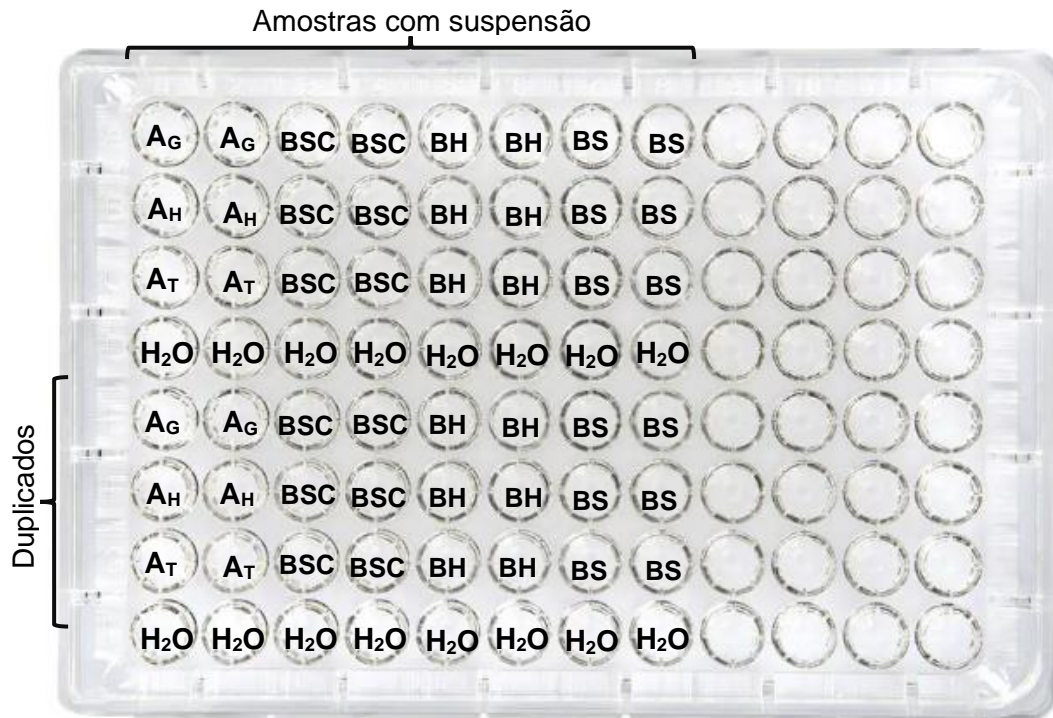


Figura 14: Esquema da distribuição das amostras pela microplaca (adaptado de Direct Industry, 2022).

Voltou-se a fazer nova leitura ao 10º dia e ao 15º dia, da mesma forma que foi feita ao fim do 5º dia de incubação.

- Finalizado o período de incubação dos *ependorfs* guardou-se no frigorífico a 4°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos locais de recolha das amostras de solo

Após a recolha das amostras simples e formação da amostra composta, antes de se guardar no respetivo frasco mediu-se a temperatura ambiente, a da amostra, o pH e a condutividade, estando o valor das medições anotado na tabela 7, para cada local do estuário do rio Tejo.

Tabela 7 – Descrição dos locais onde se efetuaram a recolha das amostras, anotando-se as coordenadas, a temperatura de ambiente (Tambiente) e a de amostra (Tamostra), o pH e condutividade, respetivamente

Local	Zona	Coordenadas	Tambiente (°C)	Tamostra (°C)	pH	Condutividade (mS/cm)
Praça Mar da Palha, Sacavém, Lisboa	rio Trancão	38°47'45"N9°05'29"W	24,6	24,9	7,0	8,00
Perto do Cais das Colinas, Praça do Comércio, Lisboa	Praia do Cais das Colinas	38°42'23"N9°08'13"W	21,3	21,9	6,5	4,08
Praia de Algés, Carnaxide, Cascais, perto do Caminho Marítimo de Algés	Praia de Algés	38°41'45"N9°13'52"W	20,0	20,5	6,0	3,03
Rua da Praia, nº 15, Samouco, Alcochete	Praia Fluvial de Alcochete	38°43'41"N9°00'40"W	30,4	28,1	6,0	8,54
Praia Fluvial de Alburrica, Alburrica, Barreiro	Praia Fluvial da Alburrica	38°39'26"N9°05'18"W	31,9	30,9	6,0	3,55
Praia Trafaria, Trafaria, Almada	Praia da Trafaria	38°40'26"N9°14'22"W	30,3	28,5	6,0	3,90

A técnica de biorremediação *in situ* que se aplicou neste estudo foi a atenuação natural com bioestimulação, de forma a estudar a atividade microbiana nativa, sem haver intervenção de outros fatores no processo.

Das seis amostras compostas recolhidas de cada local, em relação à sua coloração a amostra do Cais das Colinas, Algés, Alburrica e Trafaria foram relativamente semelhantes, apresentando uma mistura de grãos de areia de cores entre amarelo, cinza e castanho, com textura arenosa e a mistura da areia parcialmente homogênea. Já as amostras de Trancão e Alcochete apresentaram coloração mais cinza, preto e castanho, com textura argilosa e arenosa.

No que se refere às características químicas das amostras, com o auxílio da tabela 7, foram distintas, em termos do pH, os locais Algés, Alcochete, Alburrica e Trafaria tiveram que 6,0; e para Trancão e Cais das Colinas 7,0 e 6,5, respetivamente, classificando-se no geral como amostras com pH ácido. A temperatura a que a amostra foi retirada foi relativa, oscilando entre os 20,0°C e os 30,9°C. Por fim, já em laboratório foi medida a condutividade de cada amostra tendo-se observado 8,00 mS/cm, para Trancão, 4,08 mS/cm para Cais das Colinas; 3,03 mS/cm para Algés; 8,54 mS/cm para Alcochete, 3,55 mS/cm para Alburrica, e por último, 3,90 mS/cm para Trafaria, analisando-se que a amostra composta da Praia Fluvial de Alcochete foi a que apresentou maior condutividade, significando ser a amostra com mais salinidade, e a menor a de Algés.

Assim sendo, as características físico-químicas que as amostras de cada local possuem devem-se principalmente às propriedades mineralógicas dos detritos/sedimentos provenientes dos meios aquáticos e dos meios terrestres circundantes, à humidade e ao conteúdo de matéria orgânica (Guimarães, 2016).

4.2. Crescimento dos organismos hidrocarbonoclásticos em meio líquido

Os resultados obtidos em relação ao crescimento microbiano de cada local vão ser divididos por margem Norte e Sul, apresentando as figuras com os gráficos de resultados para ambos os dois tipos de amostra de cada local.

4.2.1. Margem Norte

Na margem Norte estão representados nos gráficos das figuras 15, 16 e 17, os resultados do rio Trancão, da Praia Fluvial do Cais das Colinas e da Praia de Algés, para ambas as amostras com suspensão e com solo.

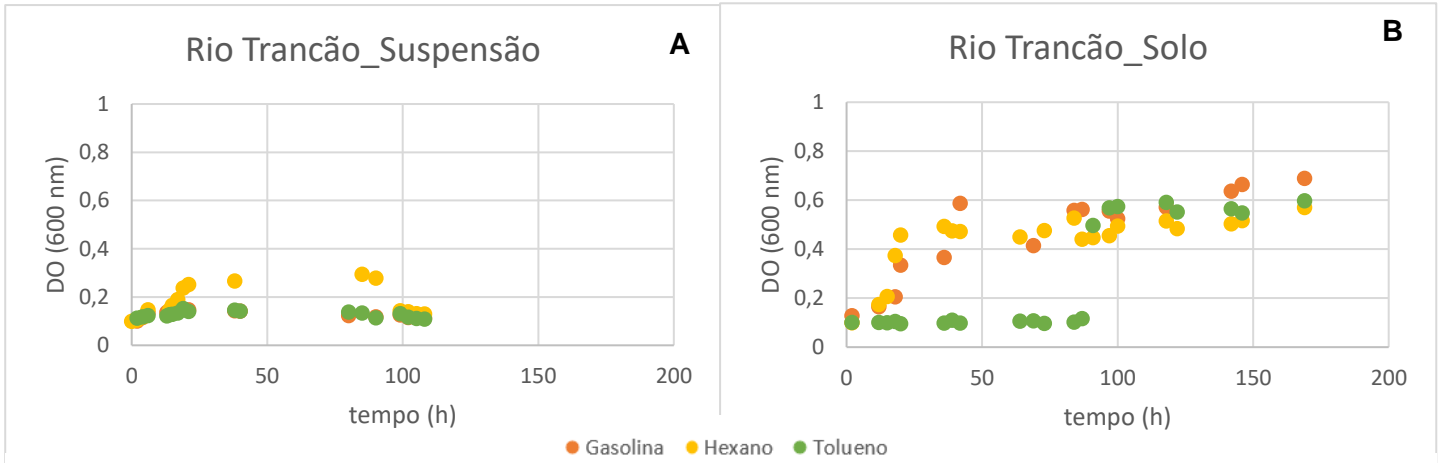


Figura 15: **A** – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH do rio Trancão. **B** – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH do rio Trancão.

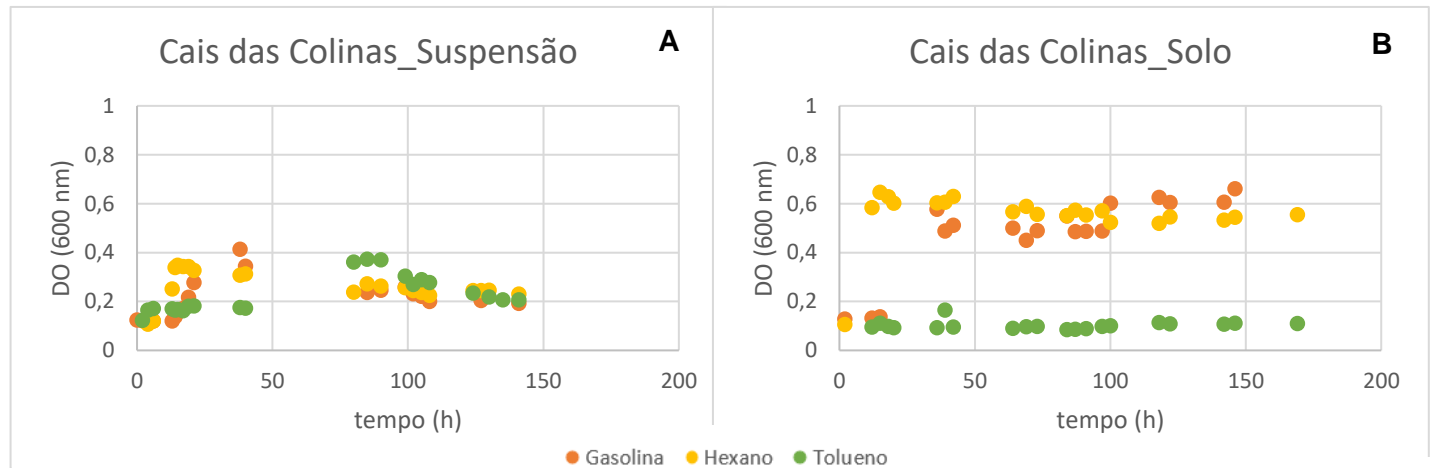


Figura 16: **A** – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH da Praia Fluvial do Cais das Colinas; **B** – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia Fluvial do Cais das Colinas.

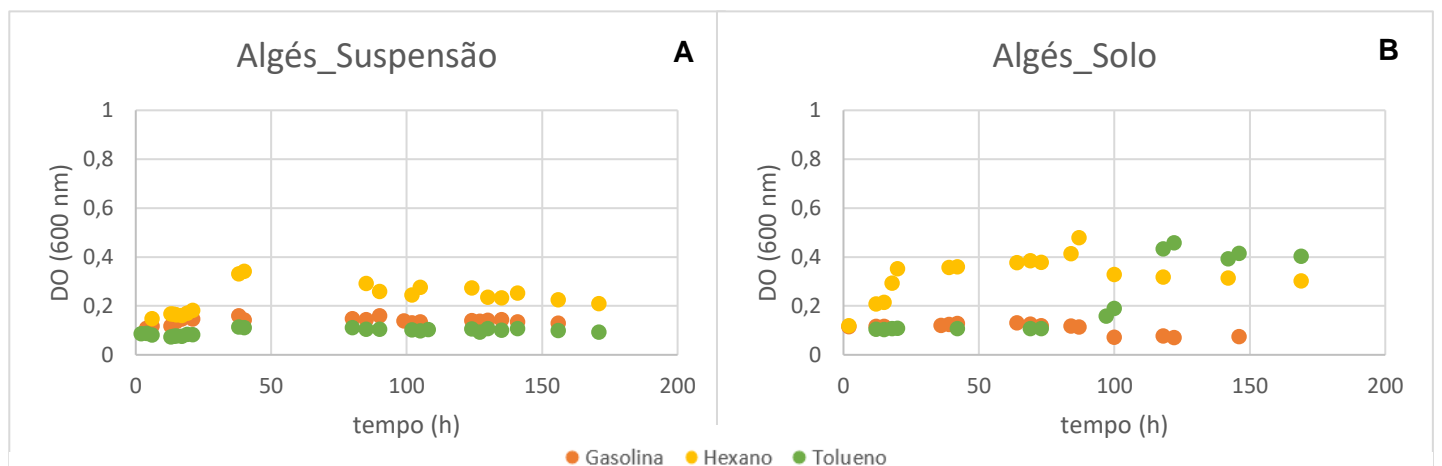


Figura 17: **A** – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH da Praia de Algés; **B** – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia de Algés.

Depois da seleção dos organismos com possível potencial de biorremediação de hidrocarbonetos, iniciou-se a monitorização do comportamento da população microbiana ao longo do processo de atenuação natural mais acelerado, em meio controlado, podendo designar-se pela prática de biorremediação pela técnica de bioestimulação. Comparando os gráficos das figuras 15, 16 e 17, de ambas as amostras, os resultados que se obtiveram em termos do crescimento dos organismos hidrocarbonoclasticos foram mais elevados na amostra com solo, ou seja, a mais concentrada, do que na amostra diluída, a em suspensão.

Inicialmente, começou-se por medir a densidade ótica da amostra desde a introdução do inóculo em meio BH durante, aproximadamente, 10 dias, no comprimento de onda de 600nm, realçando que a concentração de poluente adicionada a cada inóculo no meio BH líquido foi de 0,5% (V/V), construindo-se assim as curvas de crescimento microbiano das figuras acima.

Observando os gráficos **A** das três figuras, para a amostra com suspensão, dos três locais da margem Norte as curvas de crescimento de Algés e do Cais das Colinas são as que têm maior crescimento de população microbiana, e por último o rio Trancão que não teve curvas muito significativas. Para os três locais consegue-se distinguir a fase log, lag, estacionária e de declínio. Dos três locais os crescimentos decorreram mais facilmente na presença do hexano, seguindo-se a gasolina e por fim o tolueno.

Referente aos gráficos **B**, para as amostras com solo, o local rio Trancão foi o que aparenta ter um maior crescimento de bactérias na biorremediação dos três poluentes, em relação aos outros locais, prolongando a fase estacionária, não havendo sinal da formação da fase de declínio, o mesmo ocorreu, embora com menos intensidade, na presença da gasolina e do hexano no Cais das Colinas, e em Algés no caso do hexano e do tolueno.

Nas amostras com solo, a curva de crescimento para o tolueno foi praticamente nula no caso do Cais das Colinas e o mesmo para o poluente gasolina em Algés.

No geral, as curvas de crescimento da população microbiana das amostras com solo dos locais da margem Norte foram mais manifestantes do que nas amostras com suspensão, onde o crescimento não foi muito significativo ou quase nulo, possivelmente por não terem sobrevivido ou não haver número suficiente de microrganismos presentes nas amostras devido a terem sofrido lavagem, logo não houve mais crescimento. Contudo, os valores foram relativamente baixos em relação ao que era esperado, dado que são zonas de bastante tráfego marítimo, além de existirem zonas de descarga de esgoto perto desses locais que leva a haver uma maior possibilidade de o local estar contaminado, e ter maior diversidade de microrganismos.

4.2.2. Margem Sul

Na margem Sul estão representados nos gráficos das figuras 18, 19 e 20, os resultados do Praia Fluvial de Alcochete, da Praia Fluvial da Alburrica e da Praia da Trafaria, para ambas as amostras com suspensão e com solo.

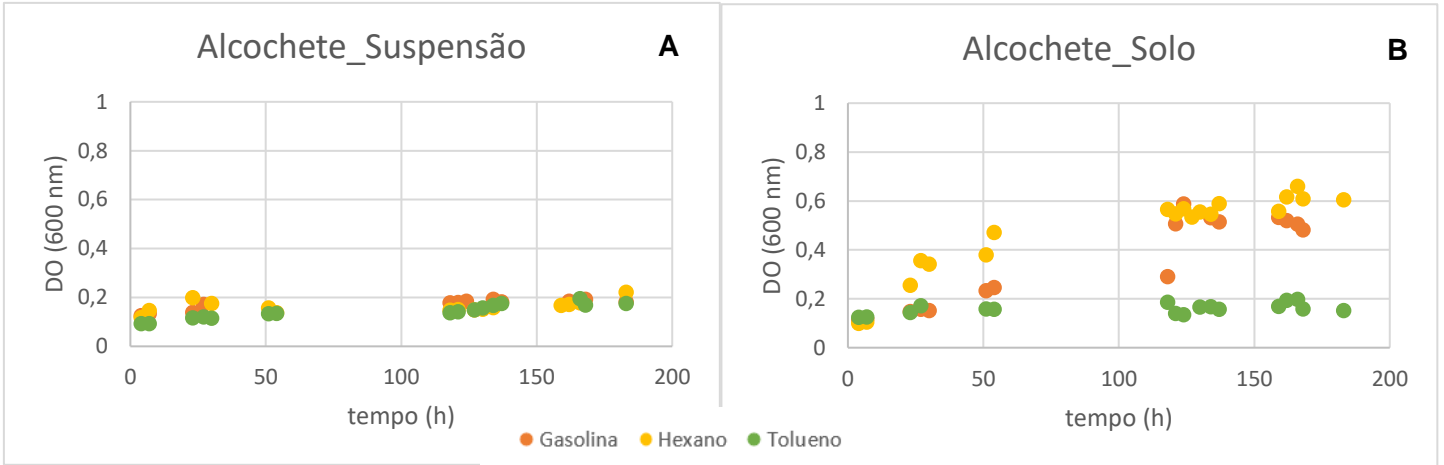


Figura 18: **A** – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH da Praia Fluvial da Alcochete; **B** – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia Fluvial da Alcochete.

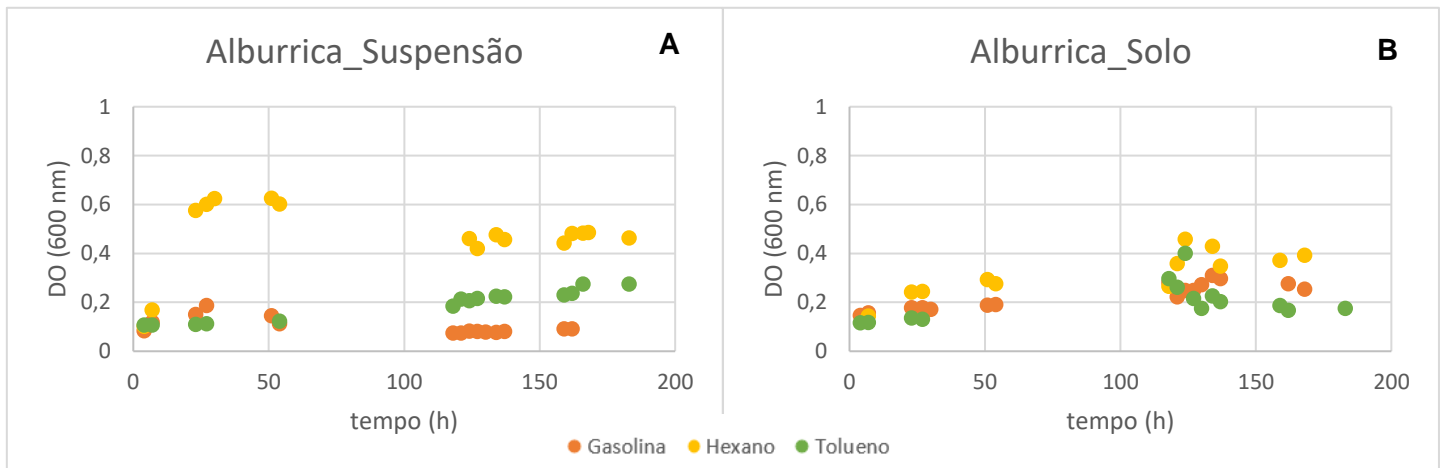


Figura 19: **A** – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão em meio BH da Praia Fluvial de Alburrica; **B** – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia Fluvial de Alburrica.

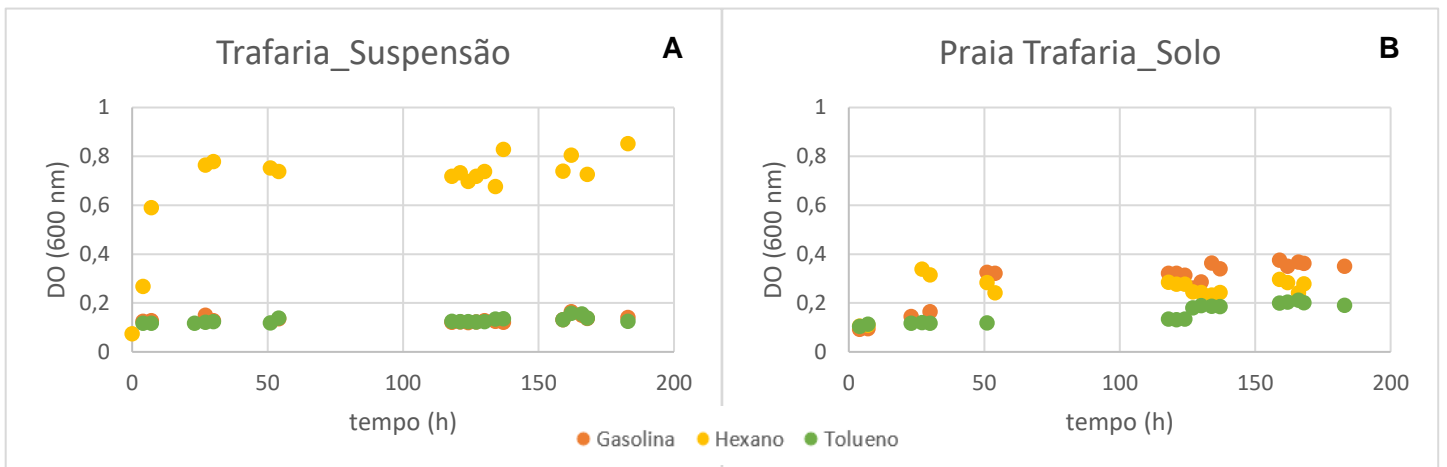


Figura 20: **A** – Curva de crescimento microbiano da amostra em suspensão da Praia da Trafaria; **B** – Curva de crescimento microbiano da amostra com solo em meio BH da Praia da Trafaria.

No mesmo seguimento de pensamento das amostras das margem Norte, observando os gráficos **A** das três figuras 18, 19 e 20, para a amostra com suspensão, dos três locais da margem Sul as curvas que maiores crescimentos imprimiu é na Alburrica. As curvas de Alcochete para os três poluentes foram quase de crescimento nulo não tendo havido biorremediação dos hidrocarbonetos por parte dos microrganismos, pois não se desenvolveram. As fases de uma curva de crescimento, nestes gráficos não é muito perceptível, e o mesmo para as da Trafaria, tirando exceção para o hexano.

Salienta-se que nestes três gráficos não aparenta haver fase de decaimento, havendo a continuação da fase estacionária, como no caso dos três poluentes para Alcochete, o mesmo se verifica para a Alburrica, apesar de o hexano e o tolueno terem curvas de crescimento mais significativos comparado à gasolina, e ao hexano na Trafaria. Isto revela que aparentemente a atividade microbiana tende a ser tardia e lenta, necessitando-se de mais tempo para que se haja adaptação e se consiga visualizar todas as fases de uma curva de crescimento dos microrganismos presentes.

Nos três locais houve maior crescimento microbiano na presença de hexano. Porém as curvas do gráfico de Alcochete apresentam uma fase exponencial mais tardia, o que reflete uma maior necessidade de adaptação, dos microrganismos, ao meio simulado.

Referente aos gráficos **B**, para as amostras com solo, sem dúvida que o local da Trafaria foi o que aparenta ter um formato das curvas de crescimento para cada poluente mais bem conseguido, havendo mais biorremediação, em relação aos outros locais, prolongando a fase estacionária que também ocorre nas curvas de Alcochete, não havendo sinal da formação da fase de declínio. O mesmo comportamento foi observado, embora com menos intensidade, para o crescimento na presença de hexano nas amostras recolhidas na Alburrica.

Nas amostras com suspensão, as curvas de crescimento na presença dos três poluentes foram praticamente nulas no caso de Alcochete, para a gasolina e tolueno na Trafaria, e para a gasolina na Alburrica.

Já nos gráficos **B** com solo, com o tolueno teve-se uma biorremediação muito pouco significativo em Alcochete e na Alburrica.

No geral, as curvas das amostras com suspensão dos locais da margem Sul demonstram haver maior crescimento e biorremediação pelas bactérias, do que nas amostras com solo, onde o crescimento não foi muito significativo ou quase nulo, o contrário do que se constou na margem Norte, a única exceção foi em Alcochete. Contudo, de modo geral os valores foram relativamente baixos em relação ao que era esperado, principalmente para a Trafaria devido ao facto de estar bastante perto de uma indústria, além do fator tráfego marítimo existente no estuário do Tejo.

4.2.3. Estudo das velocidades de crescimento na fase exponencial

O tempo em que ocorre a fase exponencial, a taxa de crescimento específica (μ) é um dado importante a ser analisado em crescimentos, pois é definida como uma medida do número de gerações formadas numa população em crescimento exponencial, por unidade de tempo.

Sendo representada pela inclinação apresentada na regressão linear na fase exponencial do crescimento dos organismos.

Na figura 21 tem-se o exemplo de um gráfico representativo do estudo feito referente aos dados de uma das amostras estudadas, obtendo-se a regressão linear realizada para a fase de crescimento exponencial para todas as amostras em cada hidrocarboneto, com as respetivas equações e R^2 calculado.

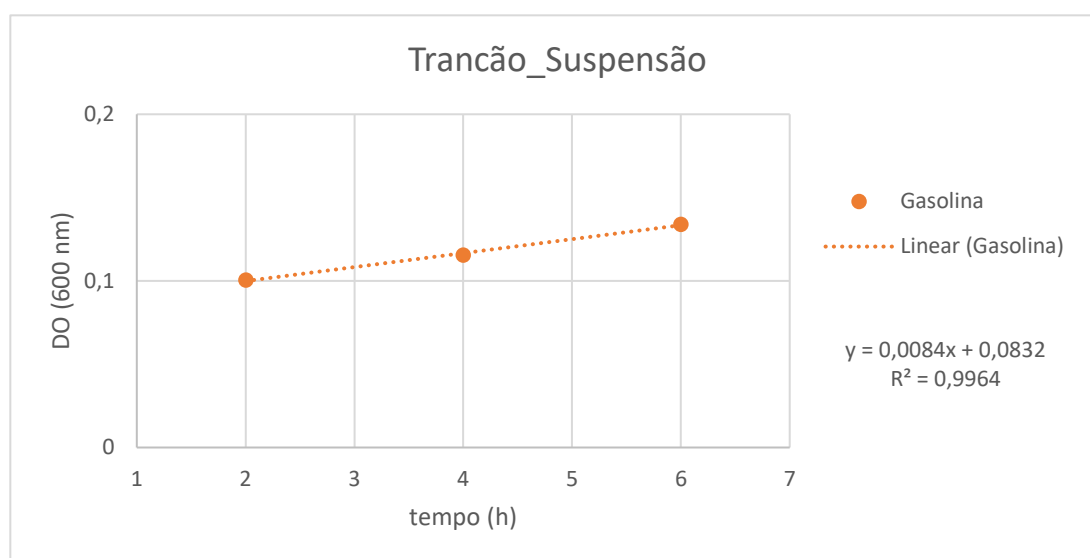


Figura 21: Regressão linear da densidade ótica em função do tempo da amostra em suspensão do rio Trancão, com a respetiva função linear e R^2 .

Para uma melhor compreensão e organização dos resultados alcançados, na tabela 8 e 9, respetivamente margem Norte e margem Sul, apresentam-se as taxas específicas de crescimento de cada local para cada tipo de amostra (suspensão e solo) na presença dos três poluentes, a D.O. máxima atingida e o respetivo tempo em que ocorreram.

Tabela 8 – Resultados alcançados das taxas específicas de crescimento de cada tipo de amostra de cada local da margem Norte, em cada poluente em meio BH e tempo de D.O., os valores numéricos a negrito marcam a taxa específica maior registada.

		Locais	Poluentes	D.O. Máximo	Hora da D.O. máxima (h)	Tempo de duração da fase log (h)	Taxa de crescimento específica - μ (h^{-1})
Amostras Margem Norte	Suspensão	Trancão	Gasolina	0,134	6	2 - 6 = 4	0,0084
			Hexano	0,251	21	13 - 21 = 8	0,0151
			Tolueno	0,152	19	13 - 19 = 6	0,0048

	Locais	Poluentes	D.O. Máximo	Hora da D.O. máxima (h)	Tempo de duração da fase log (h)	Taxa de crescimento específica - μ (h^{-1})
Solo	Trancão	Gasolina	0,687	64	18 - 64 = 46	0,0092
		Hexano	0,459	20	12 - 20 = 8	0,0374
		Tolueno	0,570	97	87 - 97 = 10	0,0467
Suspensão	Cais das Colinas	Gasolina	0,228	21	14 - 21 = 7	0,0192
		Hexano	0,251	13	4 - 13 = 9	0,0166
		Tolueno	0,374	85	40 - 85 = 45	0,0045
Solo	Cais das Colinas	Gasolina	0,512	42	20 - 42 = 22	0,0194
		Hexano	0,629	18	2 - 18 = 16	0,0335
		Tolueno	0,093	36	12 - 36 = 24	0,0
Suspensão	Algés	Gasolina	0,169	19	13 - 19 = 6	0,0070
		Hexano	0,342	40	17 - 40 = 23	0,0082
		Tolueno	0,114	38	15 - 38 = 23	0,0017
Solo	Algés	Gasolina	0,131	64	18 - 64 = 46	0,0004
		Hexano	0,480	87	18 - 87 = 69	0,001
		Tolueno	0,459	122	93 - 122 = 29	0,0122

Tabela 9 – Resultados alcançados das taxas específicas de crescimento, de cada tipo de amostra, de cada local da margem Sul, em cada poluente em meio BH e D.O., os valores numéricos a negrito marcam a taxa específica maior registada.

		Locais	Poluentes	D.O. Máximo	Hora da D.O. máxima (h)	Tempo de duração da fase log (h)	Taxa de crescimento específica - μ (h^{-1})
Amostras Margem Sul	Suspensão	Alcochete	Gasolina	0,201	51	4 - 51 = 47	0,0014
			Hexano	0,176	30	4 - 30 = 26	0,0153
			Tolueno	0,134	51	4 - 51 = 47	0,0009
	Solo	Alcochete	Gasolina	0,588	124	4 - 124 = 120	0,0032
			Hexano	0,566	118	4 - 118 = 114	0,004
			Tolueno	0,172	27	4 - 27 = 23	0,0018
	Suspensão	Alburrica	Gasolina	0,139	51	4 - 51 = 47	0,0069
			Hexano	0,601	27	4 - 27 = 23	0,0229
			Tolueno	0,214	121	30 - 121 = 91	0,0012
	Solo	Alburrica	Gasolina	0,282	118	30 - 118 = 88	0,0014
			Hexano	0,611	127	7 - 127 = 120	0,0023
			Tolueno	0,401	124	54 - 124 = 70	0,0032
	Suspensão	Trafaria	Gasolina	0,149	27	4 - 27 = 23	0,0003
			Hexano	0,779	30	0 - 30 = 30	0,0172
			Tolueno	0,138	54	23 - 54 = 31	0,0004
Solo	Trafaria	Gasolina	0,325	51	7 - 51 = 44	0,0053	

Locais	Poluentes	D.O. Máximo	Hora da D.O. máxima (h)	Tempo de duração da fase log (h)	Taxa de crescimento específica - μ (h^{-1})
	Hexano	0,749	23	4 - 23 = 19	0,0359
	Tolueno	0,134	118	30 - 118 = 88	0,0003

Analisando os declives, as taxas de crescimento específico, começando pelo local rio Trancão, na mostra com suspensão, verificamos que entre os 3 poluentes (gasolina, hexano e tolueno) o valor mais alto obtido foi na presença do hidrocarboneto hexano ($0,0151 h^{-1}$), verificando-se assim que existe um maior número de gerações de organismos hidrocarbonoclásticos na presença deste poluente, em comparação com os restantes, seguindo-se a gasolina ($0,0084 h^{-1}$) e depois o tolueno ($0,0048 h^{-1}$).

Na amostra com solo, do mesmo local, observa-se entre os três poluentes o valor mais alto obtido foi na presença do hidrocarboneto tolueno ($0,0467 h^{-1}$), verificando-se assim que existe um maior número de gerações de organismos hidrocarbonoclásticos na presença deste poluente, em comparação com os restantes, seguindo-se a hexano ($0,0374 h^{-1}$) e depois a gasolina ($0,0092 h^{-1}$).

Comparando entre os dois tipos de amostra, obtiveram-se nas amostras com solo taxas de crescimento específico muito mais elevadas em relação às amostras com suspensão, principalmente no tolueno, seguindo-se o hexano.

No local da Praia do Cais das Colinas, na amostra com suspensão obteve-se maior taxa na gasolina, e menor no hexano; já na amostra com solo sucedeu-se o oposto, a maior taxa foi no hexano, e nula no tolueno, ficando por intermédio a gasolina. Neste local, o tolueno teve resultados mais baixos dado o que já se explicou no ponto anterior, a complexidade e toxicidade do tolueno é bastante alta, o que dificulta a adaptação dos organismos a um meio com este poluente, não havendo grandes taxas de crescimento.

Em Algés, na amostra com suspensão, o resultado da taxa de crescimento mais elevada foi no hexano, e menor no tolueno; em relação à amostra com solo, a taxa maior foi no tolueno, ao contrário do que se verificou na amostra diluída, e menor na gasolina, sendo que comparando o valor obtido na gasolina da amostra diluída esta teve maior biorremediação.

Nas amostras da Praia Fluvial de Alcochete, tanto em suspensão como em solo, teve-se a maior taxa de crescimento no hexano, seguindo-se a gasolina, e com uma taxa mais baixa no tolueno.

Das amostras da Praia Fluvial da Alburrica, com suspensão, o valor mais alto foi na presença de hexano, seguindo-se na gasolina, e com menos taxa de crescimento no tolueno; na amostra com solo, o resultado obtido com maior taxa de biorremediação foi no tolueno ao contrário do que se viu na amostra diluída, seguindo-se o hexano, e menor taxa na gasolina.

Por fim, nas amostras da Praia Trafaria, foi na presença de hexano que se obteve registo de maior taxa de crescimento, seguindo-se o tolueno e a gasolina; na amostra com solo, foi no hexano, e menor no tolueno, o oposto na amostra diluída.

Comparando, com o auxílio das tabelas acima, a maior taxa de crescimento específico obtida foi na amostra com solo do rio Trancão, no valor de $0,0467 \text{ h}^{-1}$ e uma D.O. máxima de 0,569; porém a amostra que obteve a D.O. mais elevada foi a amostra em suspensão da Praia Trafaria, no valor de 0,779.

A duração da fase exponencial, já relatada no tópico anterior, em quase todos os crescimentos divergiram bastante uns dos outros.

Existem três exceções, as do crescimento da Praia do Cais das Colinas – amostra em suspensão, Praia de Algés – amostra em suspensão e Praia Fluvial de Alcochete – amostra em suspensão, podendo ser justificado pelo facto de não ser uma amostra tão concentrada, dado ter passado pelo processo de lavagem, ao contrário das amostras com solo.

Dados obtidos num estudo anterior revelaram que as densidades óticas máximas atingidas foram superiores às conseguidas neste trabalho na Alburrica, bem como os tempos correspondentes às D.O.'s máximas ocorreram mais cedo do que os alcançados neste estudo. No que diz respeito às taxas de crescimento específico no geral, para os três poluentes, foram superiores às obtidas no presente trabalho (Almeida, 2021). Estes resultados podem se justificar por possivelmente ter havido uma maior contaminação e/ou presença de mais microrganismos na amostra, na altura de recolha em que ocorreu este estudo, o facto de ter sido outro operador a fazer a recolha, o modo de amostragem de como foi feita a recolha das amostras, a altura do ano, entre outros fatores.

4.3. Seleção e caracterização das colónias de bactérias

De forma a se poder selecionar e caracterizar a forma morfológica, bioquímica e microscópica das colónias de bactérias conseguidas de cada uma das amostras, realizou-se o estudo em meio sólido.

4.3.1. Caracterização morfológica dos organismos

As concentrações de poluente usado em cada amostra, em suspensão e com solo, para cada local foram de 0,4% e 0,8%, mantidas a 30°C. Perante os resultados obtidos, registou-se em fotografia as placas, procedendo-se à sua caracterização. Na figura 22 visualiza-se os resultados do crescimento de colónias de dois tipos, identificando-os da seguinte forma: Tipo #1 e Tipo #2.

Em todas as amostras de cada local, e para cada concentração dos três poluentes adicionados, houve crescimento de colónias, tendo sido as placas com melhor crescimento e definição das colónias, e consoante à concentração de cada poluente (0,4% ou 0,8%), as escolhidas para prosseguirem para a caracterização bioquímica.

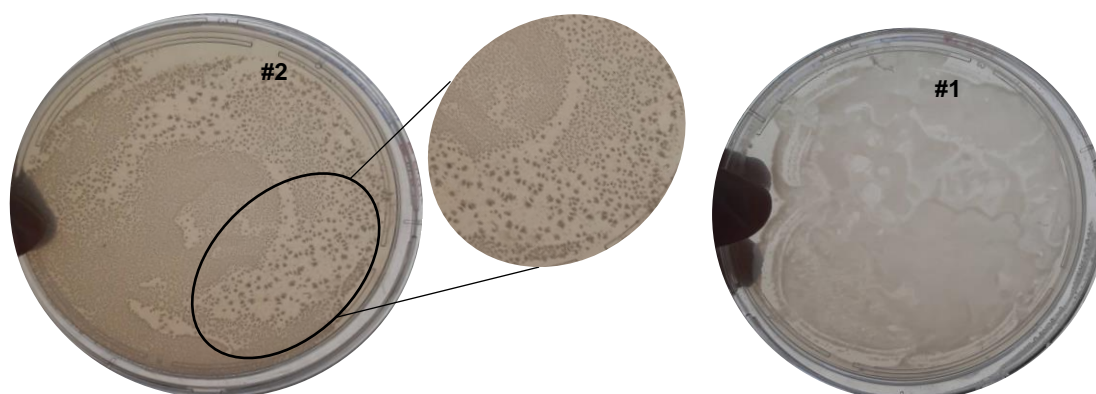


Figura 22: Observação de dois exemplos de crescimento das colónias obtidas no estudo para caracterização morfológica, em meio BH com Agar nutritivo, tendo se obtido dois tipos de colónias tipo #1 e tipo #2.

A tabela 12, caracteriza os dois tipos diferentes da mesma colónia que se formaram.

Tabela 10 – Caracterização morfológica das colónias que se obteve do estudo realizado

Local da amostra	Tipo #1	Tipo #2
Tamanho	Grande	Média (2 a 5 mm) e pequena (2 mm)
Forma	Irregular	Circular
Elevação	Elevada	Elevada
Margem	Ondulada	Inteira
Estrutura	Suave	Suave
Cor	Pigmentada (branca/bege)	Pigmentada (branca/bege)
Brilho	Opaca	Opaca

As colónias com o morfótipo #1 surgiram tanto na margem Norte como na margem Sul, e em ambos os dois tipos de amostras, com solo e com suspensão, desta forma, houve crescimento de colónias no Cais das Colinas e em Algés, na Alburrica e na Trafaria. As colónias do morfótipo #2 surgiram no Trancão, para ambos os dois tipos de amostra, o mesmo ocorreu em Alcochete. Destaca-se que na amostra com suspensão da Alburrica também foram detetados pequenos aglomerados de colónias do morfótipo #2.

4.3.2. Coloração de Gram

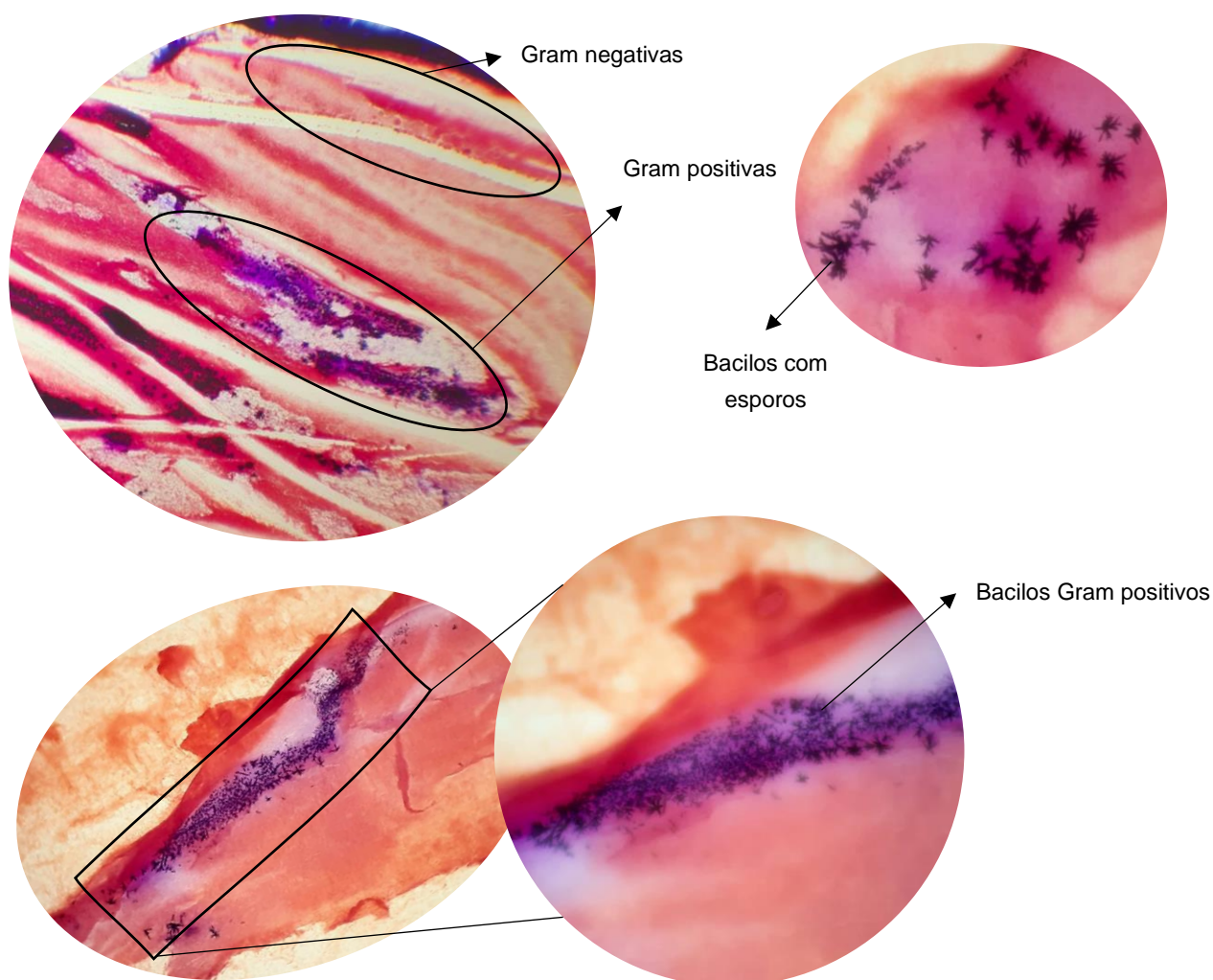


Figura 23: Exemplo dos resultados obtidos do estudo da coloração de Gram obtidos, imagens retiradas ao microscópio a 4x e 10x.

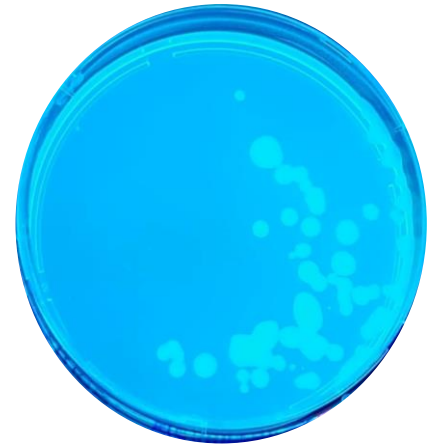
Após a caracterização morfológica das colónias, realizou-se a caracterização bioquímica através do método da coloração de Gram, os resultados obtidos estão exemplificados na figura 23. Os resultados foram os mesmos em quase todas as placas, onde se constou a presença de Bacilos Gram positivos e Gram negativos, ou seja, uma mistura de ambas as bactérias, para os dois tipos de amostra, com suspensão e com solo, em todos os locais de ambas as margens do rio Tejo. No entanto houve as seguintes exceções, para o caso da amostra com solo do rio Trancão na presença de gasolina e tolueno resultaram apenas Gram negativas, em Algés na amostra em suspensão para o hexano registou-se apenas Gram positivas.

Identificou-se nos resultados obtidos o tipo de bactéria, maioritariamente, com formato de bacilos e, alguns estreptobacilos/bacilos com esporos.

4.4. Identificação para *Pseudomonas* usando um meio seletivo

De forma a saber se mais sobre os organismos que se estudou e selecionou nas amostras recolhidas, fez-se por meio seletivo, a identificação de *Pseudomonas*, selecionando os crescimentos de valor mais elevado conseguidos nas placas de todos os locais para cada concentração de poluente e tipo de amostra.

A medição no comprimento de onda 360 nm corresponde à verificação da fluorescência de determinadas bactérias quando é realizada a seleção de colónias específicas e inoculadas em meios seletivos, como o caso do meio seletivo de *Pseudomonas* CN Agar Base (PanReac AppliChem, 2020).



Dos resultados obtidos a maioria teve crescimento, sinalizando à luz UV (360 nm) a bactéria pretendida, podendo se verificar através da figura 24 um dos resultados obtidos nas placas de Petri.

Figura 24: Exemplo de resultado obtido, para identificação de *Pseudomonas aeruginosa* usando meio seletivo, neste caso exemplo da amostra da Praia Fluvial da Alburrica em suspensão, para a concentração de 0,4% gasolina.

No que se refere aos resultados, as tabelas 13 e 14 resumem de forma mais perceptível a caracterização microscópica das colónias que se obteve.

Tabela 11 – Caracterização microscópica para identificação de *Pseudomonas*, em cada tipo de amostra da margem Norte, para cada poluente na respetiva concentração

		Locais	Poluentes	Concentração (%)	Forma	Gram	Morfótipo	Identificação <i>Pseudomonas</i>
Amostras Margem Norte	Suspensão	Trancão	Gasolina	0,8	Bacilos	+ / –	#2	Sim
			Hexano	0,8	Bacilos	+	#2	Não
			Tolueno	0,4	Bacilos	+ / –	#2	Sim
	Solo	Trancão	Gasolina	0,4	Bacilos	–	#2	Sim
			Hexano	0,4	Bacilos	+ / –	#2	Sim
			Tolueno	0,8	Bacilos	–	#2	Sim
	Suspensão	Cais das Colinas	Gasolina	0,8	Bacilos	+ / –	#1	Sim
			Hexano	0,4	Bacilos	+ / –	#1	Sim
			Tolueno	0,4	Bacilos	+ / –	#1	Sim
	Solo	Cais das Colinas	Gasolina	0,8	Bacilos	+ / –	#1	Sim
			Hexano	0,8	Bacilos	+ / –	#1	Sim

	Locais	Poluentes	Concentração (%)	Forma	Gram	Morfótipo	Identificação <i>Pseudomonas</i>
Suspensão	Algés	Tolueno	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Sim
		Gasolina	0,8	Bacilos	+	#1	Não
		Hexano	0,8	Bacilos	+	#1	Não
		Tolueno	0,4	Bacilos	+	#1	Não
Solo	Algés	Gasolina	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Sim
		Hexano	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Sim
		Tolueno	0,4	Bacilos	-	#1	Sim

Tabela 12 – Caracterização microscópica para identificação de *Pseudomonas*, em cada tipo de amostra da margem Sul, para cada poluente na respetiva concentração

	Locais	Poluentes	Concentração (%)	Forma	Gram	Morfótipo	Identificação <i>Pseudomonas</i>	
Amostras Margem Sul	Suspensão	Alcochete	Gasolina	0,4	Bacilos	+ / -	#2	Não
			Hexano	0,4 e 0,8	Bacilos	+ / -	#2	Não
			Tolueno	0,4 e 0,8	Bacilos	+ / -	#2	Não
	Solo	Alcochete	Gasolina	0,8	Bacilos	+ / -	#2	Sim
			Hexano	0,4	Bacilos	+ / -	#2	Sim
			Tolueno	0,8	Bacilos	+ / -	#2	Sim
	Suspensão	Alburrica	Gasolina	0,4	Bacilos	+ / -	#1 e #2	Sim
			Hexano	0,4	Bacilos	+ / -	#1 e #2	Sim
			Tolueno	0,8	Bacilos	+ / -	#1 e #2	Sim
	Solo	Alburrica	Gasolina	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Sim
			Hexano	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Sim
			Tolueno	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Sim
	Suspensão	Trafaria	Gasolina	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Sim
			Hexano	0,8	Bacilos	+ / -	#1	Sim
			Tolueno	0,8	Bacilos	+ / -	#1	Sim
Solo	Trafaria	Gasolina	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Sim	
		Hexano	0,8	Bacilos	+ / -	#1	Não	
		Tolueno	0,4	Bacilos	+ / -	#1	Não	

Com os registos das tabelas 13 e 14, e interligando os resultados, constata-se que no Trancão e em Alcochete, locais paralelos no estuário do rio Tejo, teve-se apenas crescimento de colónias do morfótipo #2, e nos restantes locais crescimento do morfótipo #1, e a presença dos dois tipos na amostra com suspensão da Alburrica.

Como já referido, todas as colónias apresentaram forma Bacilos, e no que respeita à coloração de Gram, na margem Sul teve-se presença de bactérias Gram negativas e positivas, na margem Norte, verificou-se o mesmo resultado, à exceção do rio Trancão, que na amostra em suspensão na presença de hexano apenas existem bactérias Gram positivas, e na amostra com solo, para a gasolina e tolueno, apenas Gram negativas. E em Algés, na amostra com suspensão, na presença de cada poluente, só se verificou bactérias Gram positivas, e Gram negativas apenas na amostra com solo na presença de tolueno.

Posto isto, das colónias analisadas para identificar *Pseudomonas*, e com base na reunião de todos os resultados obtidos referentes à caracterização microscópica das colónias, comprova-se que há presença destas bactérias na maioria das amostras, identificando-se o morfótipo #1 como *Pseudomonas spp.* ou *aeruginosa*. O morfótipo #2 será outro género de bactéria, sendo bactérias Gram positivas.

Ainda assim, registou-se Gram positivas com morfótipo #1 sem presença de *Pseudomonas*, e Gram negativas com morfótipo #2 identificando-se presença de *Pseudomonas*, a incongruência nestes resultados pode se dever ao facto de poder ter havido alguma contaminação e/ou algum erro na preparação da amostra.

4.5. Estudo da biodegradabilidade

Na análise da biodegradabilidade, como já referido no procedimento 3. foi realizada utilizando o indicador redox DCPIP. Quando é adicionado ao meio de cultura, atua como um aceitador de eletrões durante o processo de metabolização, onde os microrganismos oxidam o hidrocarboneto. A cor muda de azul (estado oxidado) para incolor (estado reduzido) significando que houve degradação do poluente. Porém na observação dos tubos do estudo da biodegradabilidade ao longo dos quinze dias, não se detetou alteração da cor, mantendo a cor azul-escuro, não se podendo concluir pela cor se houve ou não degradação.

Para o estudo do efeito da adição de biossurfactantes na taxa de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos adicionou-se o biossurfactante e emulsificante Tween 80, um detergente solubilizante de proteínas. Este estudo foi realizado apenas com uma amostra, da Praia Trafaria, amostra em suspensão, escolhida pelo facto de ter tido os melhores resultados, nas leituras de densidade ótica, nos três poluentes, em comparação com as outras.

Para o cálculo da percentagem/taxa de biodegradação recorreu-se à fórmula seguinte (1):

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

Em relação ao denominador (Absorvância do poluente) foi feita uma média de todos os valores obtidos das amostras de cada local para cada poluente.

Os cálculos necessários, como também o tratamento e análise dos resultados foram feitos através do Excel.

Relembrando que foram feitos duplicados de cada tubo como descrito no procedimento e as leituras obtidas ter se feito a respetiva média.

Devido à presença de emulsificantes e biossurfactantes, a densidade e viscosidade da amostra a analisar dificulta a passagem do laser, sendo necessária uma D.O. ligeiramente mais elevada para conseguir realizar a leitura, assim a medição para obtenção da taxa de biorremediação realizou-se no comprimento de onda de 604 nm (Implen, 2022).

Abordando-se qual dos locais teve a maior taxa de degradação de entre os três poluentes, por parte dos microrganismos presentes na suspensão da amostra, tem-se como base os mapas com as taxas de biodegradação obtidos nas figuras 25 e 26, que se seguem, tanto para as amostras em suspensão, como para as com solo, respetivamente.

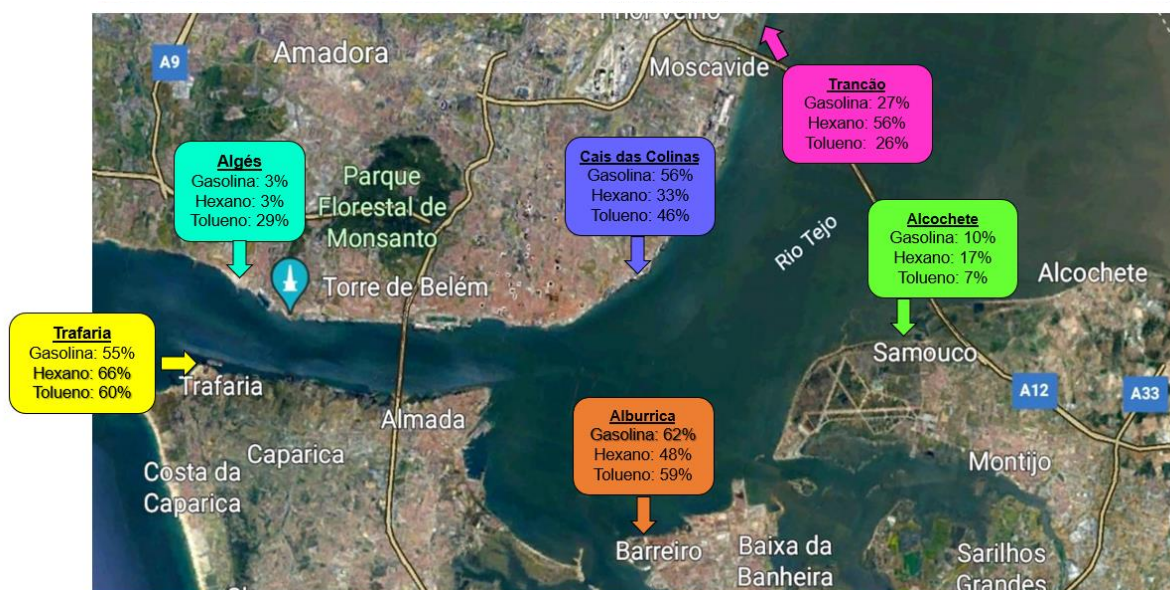


Figura 25: Mapa com sinalização dos seis locais de recolha das amostras efetuada no estuário do rio Tejo, com os resultados das taxas de biodegradabilidade para os três poluentes em cada local, das amostras em suspensão.

Visualizando a figura 25, para as amostras em suspensão, o local que no geral teve taxas de biorremediação maiores terá sido a Praia da Trafaria, onde as taxas para o hexano e tolueno são superiores em relação aos outros locais, só a gasolina é que teve uma taxa de degradação mais elevada na Praia Fluvial da Alburrica.

O local com taxas mais baixas foi na Praia de Algés, apesar de a taxa para o tolueno ser a menor na Praia Fluvial de Alcochete, onde os microrganismos não tiveram tanta capacidade de degradação do hidrocarboneto.

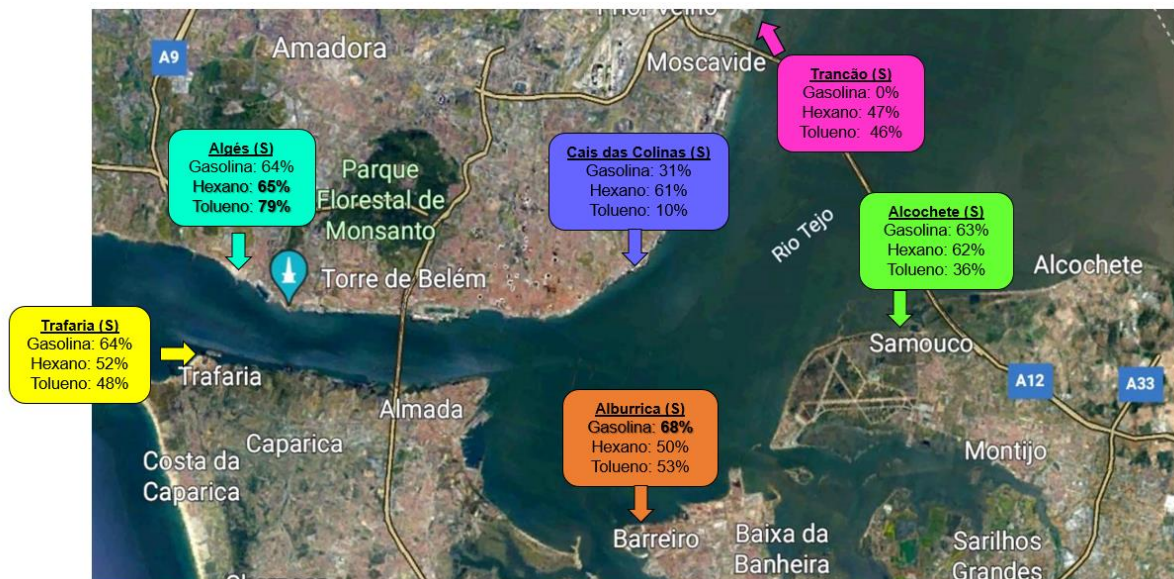


Figura 26: Mapa com sinalização dos seis locais de recolha das amostras efetuada no estuário do rio Tejo, com os resultados das taxas de biodegradabilidade para os três poluentes em cada local, das amostras com solo.

Com a figura 26, reflete-se que das amostras com solo, o local que teve taxas de biorremediação maiores terá sido na Praia de Algés, onde as taxas para o hexano e tolueno são superiores em relação aos outros locais, só a gasolina é que teve um valor mais elevado na Praia Fluvial da Alburrica com 68% de capacidade de degradação.

Os locais com taxas mais baixas para as amostras com solo foram no rio Tranfão e na Praia Fluvial do Cais das Colinas.

Em relação aos resultados do trabalho de 2021 (Almeida, 2021), pode se concluir que as taxas de biorremediação no presente trabalho foram bastante superiores, constatando-se para a colónia 8, no poluente gasolina tem-se uma diferença aproximadamente de 15,83%, e 27,47% no hexano; já na colónia 9 a gasolina tem uma diferença aproximadamente de 15,68%, e 21,99% no hexano.

Os resultados obtidos neste estudo sustentam-se no artigo realizado por Haijun Liu (H. Liu et al., 2022), onde além de o estudo ter consistido principalmente no comportamento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* como degradadora de hidrocarbonetos, foi testado e analisado determinadas amostras de um lago de água doce, (a diferença entre este estudo e o do presente documento), contaminado por óleo e petróleo bruto. Em que após a investigação desta cepa em meio contaminado com estes poluentes exibiu maior eficiência de biodegradação para *n*-alcanos de C13 a C15 com taxas de degradação de 87-100%, utilizando totalmente alquilciclohexano e alquiltolueno como fonte única de carbono.

A capacidade de degradação desta cepa potência quando isolada, conseguindo assimilar contaminantes indigeríveis do petróleo bruto sob diferentes condições, neste caso

hidrológicas. Constatou-se que a sua capacidade de degradação diminui com o aumento do peso molecular do poluente/hidrocarboneto.

Com isto revê-se no presente estudo que os resultados apesar de semelhantes no geral, foram inferiores dada as taxas de biorremediação que a investigação de Liu atingiu, provavelmente, devido a ter havido fatores diferentes, nomeadamente a origem das amostras, as metodologias em si praticadas, entre outras variáveis. Contudo, ambos os estudos comprovam a capacidade da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* de degradar os hidrocarbonetos.

Referente a cada local em concreto, no rio Trancão com as percentagens de biodegradação obtidas neste local, analisando as amostras em suspensão em cada poluente, o que teve maior percentagem de biorremediação foi o hexano.

Nas amostras com solo, as percentagens de biorremediação obtidas para o hexano e o tolueno foram relativamente idênticas. No caso da taxa de biorremediação da gasolina não houve registo.

Comparando os dois tipos de amostra a que obteve resultados mais elevados de degradação foi as amostras com solo, tendo tido maior percentagem de biodegradação no hexano e tolueno com 47% e 46%, respetivamente, e na amostra com suspensão na gasolina com 27%.

No Cais das Colinas, as percentagens de biodegradação obtidas, analisando as amostras em suspensão, a maior taxa de biorremediação foi na gasolina, seguindo-se o tolueno e o hexano.

Comparando os dois tipos de amostra, a amostra com suspensão teve resultados superiores em relação à capacidade de degradação da gasolina e do tolueno com uma diferença de 25% e 36%, respetivamente, nas taxas de degradação do hexano, a amostra com solo obteve um valor maior do que na com suspensão com 28% de diferença.

Na Praia de Algés, analisando as amostras em suspensão em cada poluente, o que teve maior percentagem foi o tolueno com 29%.

Nas amostras com solo, inicialmente as percentagens de degradação foram muito altas, sendo a mais elevada a do tolueno, entre a gasolina e o hexano os valores são bastante semelhantes.

Comparando os dois tipos de amostra, a amostra com solo obteve resultados bastante mais elevados.

Em Alcochete, as percentagens de biodegradação obtidas para as amostras em suspensão, no geral nos três poluentes foram bastante baixas, tendo sido a taxa mais alta a do hexano de 17%.

Nas amostras com solo, a taxa mais baixa foi no tolueno de 36%, e bastante equivalentes as taxas de gasolina e hexano.

Comparando os dois tipos de amostra a que obteve resultados superiores foi a amostra com solo para os três hidrocarbonetos.

Na Praia da Alburrica, as taxas de degradação, nas amostras em suspensão, tiveram maior percentagem na gasolina com 62%, seguindo o tolueno e o hexano.

Nas amostras com solo, a taxa maior foi na gasolina com 68%, tendo os outros poluentes tido percentagens semelhantes e altas.

Relativamente aos dois tipos de amostras, ambas obtiveram taxas de biorremediação bastante semelhantes, significando que a comunidade de microrganismos do local tem elevada capacidade de degradar os poluentes do meio, mesmo na lavagem do solo.

As taxas de biodegradação obtidas para a Praia da Trafaria, contrastando os dois tipos de amostra ocorre a mesma situação que na Praia da Alburrica, em que as taxas de biorremediação são bastante análogas.

Na amostra em suspensão, a gasolina foi a que teve menor taxa comparando com o hexano e tolueno, tendo registado 55%, mesmo em relação à amostra com solo.

Já na presença de hexano e tolueno os valores foram superiores aos da amostra com solo. Na amostra com solo a taxa mais elevada foi obtida para a gasolina com 64%, e na amostra em suspensão no poluente hexano, com 66%.

Realizando a comparação da percentagem de todos os locais em relação ao mesmo poluente nos dois tipos de amostra, visualizando as figuras 25 e 26, das amostras em suspensão, a taxa de biorremediação maior que se teve foi na Praia Fluvial da Alburrica com uma capacidade de biodegradação por parte das bactérias de 62%, seguindo-se a Praia Fluvial do Cais das Colinas e na Praia da Trafaria, já o valor mais baixo foi obtido na Praia de Algés e na Praia Fluvial de Alcochete.

A taxa de biorremediação de Trancão foi intermédia, que comparando com a da amostra do solo na presença da gasolina, não se obteve valor.

Nas amostras com solo a taxa maior foi a da Alburrica, seguindo-se bastante equivalentes à de Algés, Trafaria e Alcochete, ficando intermédia a do Cais das Colinas.

Equiparando ambos os tipos de amostra, as taxas do solo foram superiores às em suspensão em todos os locais, exceto no Trancão.

O local que teve resultados mais elevados foi a amostra com solo da Alburrica, significando que a suspensão da amostra com solo deste local foi capaz de degradar 68% do hexano.

Na figura 25, das taxas de biorremediação anotadas para o hexano, em relação às amostras em suspensão, a taxa de biorremediação maior que se teve foi na Trafaria, sucedendo-se o Trancão, a mais baixa foi a de Algés.

Nas amostras com solo, figura 26, a taxa mais elevada foi a de Algés, e no geral todas foram superiores às das amostras em suspensão, retirando as amostras da Trafaria e do Trancão que foram maiores nas amostras em suspensão.

O local que teve resultados mais elevados na presença de hexano foi a amostra em suspensão da Trafaria com 66% de degradação.

Para as taxas das medições realizadas aos dois tipos de amostra de todos os locais, no tolueno, das amostras em suspensão, a taxa de biorremediação maior que se adquiriu foi na Praia da Trafaria, de seguida a Praia Fluvial da Alburrica, as restantes taxas dos restantes locais foram valores intermédios e o mais baixo em Alcochete.

Nas amostras com solo a taxa maior foi a de Algés, com 79% de degradação do tolueno, e a mais baixa no Cais das Colinas apenas com 10%.

Equiparando ambos os tipos de amostra, as taxas do solo foram superiores às em suspensão em todos os locais, relativamente ao tolueno, salvo a da Praia Fluvial do Cais das Colinas, Alburrica e Trafaria, que foi superior na amostra em suspensão.

4.5.1. Comparação dos valores obtidos com e sem bio-surfactante

Devido ao tempo disponível para se avaliar a diferença dos resultados e atividade microbiana com a adição de bio-surfactante, optou-se por realizar este procedimento apenas na amostra que tivesse tido as melhores taxas de biodegradabilidade na maioria dos poluentes, tendo sido a amostra da Praia da Trafaria em suspensão a escolhida. As taxas de biorremediação adquiridas com e sem surfactante estão descritas na figura 27.



Figura 27: Mapa com sinalização do local de recolha da amostra efetuada na Praia da Trafaria, com os resultados das taxas de biodegradabilidade para os três poluentes com e sem bio-surfactante, nas amostras em suspensão e da amostra com solo se bio-surfactante.

Tendo em atenção o estudo da adição do biossurfactante, na amostra em suspensão com biossurfactante, as taxas são mais altas a nível de degradação/biorremediação dos hidrocarbonetos, comparando com a amostra com suspensão sem biossurfactante do mesmo local, constatando-se assim que a adição de um biossurfactante e ainda tendo uma parte emulsificante na sua constituição, como é o caso do que se adicionou nesta amostra, possui uma vantagem maior no poder de biorremediação, potenciando os níveis de degradação.

Assim, com a figura 27, dá-se conta de que mesmo em relação aos resultados da amostra com solo, para com a amostra em suspensão com biossurfactante, os resultados foram ligeiramente superiores para a gasolina, e muito mais elevados no hexano e tolueno, sendo que, caso se tivesse adicionado biossurfactante à amostra com solo, potenciar-se-ia as taxas de biorremediação para esse local e tipo de amostra ainda mais.

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES FUTURAS

Ao longo dos anos o ser humano tem vindo a desenvolver atividades antropogénicas no estuário do rio Tejo. Atualmente, as que apresentam maior relevância para este estudo são nomeadamente o tráfego marítimo, devido ao comércio marítimo e às atividades marítimo-turísticas bem como os portos náuticos, implementados em todos os seis locais escolhidos para recolha de amostras, e as indústrias, como a SILOPOR da área alimentar perto da Praia da Trafaria.

Depreende-se que existem diversas vantagens que colocam o método da biorremediação *in situ*, as técnicas de atenuação natural, como é no caso deste trabalho, e a bioestimulação, na vanguarda, pois é possível utilizar diferentes tipos de organismos; pode ser realizado no próprio local de contaminação; haver simplicidade de manutenção e de baixo custo; a possibilidade de destruição parcial e mesmo total dos contaminantes, tendo a capacidade de degradar quase todos os tipos de contaminantes (resíduos permanentes e hidrocarbonetos); o poder ser associada a outros tratamentos físico-químicos, de modo a aumentar a eficiência da biodegradação; e também maior aceitação por parte da sociedade, comparado com outros processos existentes.

No entanto, apresenta as suas desvantagens, no caso de ocorrer em temperaturas baixas, pode inibir o metabolismo dos microrganismos prejudicando a eficiência do processo; a possibilidade de inexistir microrganismos nativos ou não adequados aos contaminantes em causa; a possibilidade do sistema entrar em anaerobiose, caso o processo se prolongue no tempo; o facto de a biorremediação ser por vezes imprevisível, por se tratar de sistemas biológicos e qualquer variação (ao nível do pH, da temperatura e da concentração de nutrientes) afetar a biorremediação; os processos *in situ* além de serem lentos, também podem ser difíceis de monitorizar (e no caso das técnicas em método *ex situ* requerem grandes áreas), e também de obter resultados mais rápidos comparativamente a outros processos físico-químicos.

Este estudo permitiu avaliar a atividade microbiana nativa em condições que simula o meio poluído.

Conclui-se que, de modo geral, em todas as amostras se conseguiu obter uma curva de crescimento microbiana, destacando-se a amostra do rio Trancão, o poluente tolueno foi o que apresentou menores resultados na curva de crescimento, dada à sua toxicidade, a capacidade de degradação por parte dos microrganismos é mais lenta até se notar atividade. Serve também de justificação o facto de se ter poucas repetições práticas, e dado a manifestação da atividade microbiana ser demorada, necessitar-se-ia de mais tempo para obter resultados mais sólidos.

Porém, apesar das seis amostras de solos estudadas apresentarem características físico-químicas diferentes e terem sido obtidas em locais distintos na margem Norte e Sul do

estuário do rio Tejo foi evidente que a quantidade de microrganismos com potencial hidrocarbonoclástico é reduzida, uma vez que as amostras de solo que foram lavadas previamente não revelaram crescimento microbiano significativo.

No que concerne às taxas de crescimento específicas da amostra do solo do rio Trancão com solo e da Praia da Trafaria, em suspensão, foram os melhores resultados alcançados, com uma densidade ótica bastante superior aos anteriores, visto os microrganismos terem conseguido adaptar-se ao meio poluído e dessa forma degradar os poluentes existentes.

Conclui-se que, estes resultados se podem fundamentar principalmente no facto da concentração usada, a toxicidade e a complexidade do hidrocarboneto dificultar o desenvolvimento de organismos, fazendo com que a fase exponencial seja mais tardia, podendo esse ser o fator para taxas de crescimento mais baixas; e a variabilidade de resultados pode ser devida ao facto de se ter poucas repetições.

Com isto, os crescimentos ao terem sido baixos, esperava-se que houvesse um maior número da população microbiana na margem Norte, principalmente nas amostras do rio Trancão, por haver relatos de ser um rio bastante poluído, mesmo tendo já havido limpezas e projetos de recuperação do mesmo. O local de onde foi recolhida a amostra foi relativamente perto do desaguar do rio Trancão. Outra razão que sustenta o facto de não se esperar estes resultados é de que o rio transportar os nutrientes para o mar, levando a uma maior diversidade de microrganismos. O mesmo se aplica para o Cais das Colinas, dado ser um local bastante poluente por parte não só do tráfego marítimo, mas também por haver uma saída de esgoto direta para o rio Tejo. Na margem Sul seria para a amostra da Praia da Trafaria, uma vez que a amostra recolhida foi praticamente ao lado da indústria SILOPOR, que levaria a haver mais abundância de vários tipos de microrganismos, dada a atividade de descarga e armazenamento entre outros serviços, de granéis alimentares.

Dado estes factos, não foi possível encontrar mais variedade de colónias de microrganismos hidrocarbonoclásticos, pois presumia-se ter um maior número de tipos de colónias diferentes, tendo-se observado e distinguido apenas dois tipos de colónias.

Das colónias obtidas verificou-se que na maioria todas pertenciam à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ou *spp.* de morfótipo #1, Gram negativa na forma de bacilos. Apesar de não ter havido um isolamento desta bactéria, seria interessante numa perspetiva futura, repetir-se o procedimento para confirmação dos resultados e, realizar um teste para descobrir de que estirpe em específico se trata, bem como isolá-la de forma a estudar por completo o seu comportamento e capacidade de degradação dos principais componentes do petróleo. O mesmo se pode fazer para descobrir se as bactérias Gram positivas de morfótipo #2 se trata do género *Bacillus*.

No estudo da biodegradabilidade, nas amostras com suspensão obtiveram-se melhores resultados na Praia da Alburrica, seguindo-se a Praia da Trafaria, a Praia do Cais das Colinas, e não tão significativos o rio Trancão, a Praia Fluvial de Alcochete e a Praia de Algés. Dentro deste estudo, investigou-se a adição de biossurfactante numa amostra, comprovando que a adição deste componente estimula a melhores taxas de biodegradação, tendo sido testado na amostra com suspensão da Praia da Trafaria.

Dado estes resultados, os biossurfactantes são diversas entidades com vastas aplicações de biodegradação e biorremediação que têm como função auxiliar os microrganismos na degradação dos contaminantes tóxicos. Com base nos estudos existentes, e com o trabalho prático desenvolvido nesta dissertação, comprovou-se que existe um melhor desempenho por parte dos microrganismos biodegradantes de poluentes com a adição de biossurfactantes ao meio, pois estes proporcionam maior biodegradabilidade e baixam a toxicidade do contaminante facilitando a atividade e disponibilidade microbiana para esse efeito.

Nas amostras com solo, o local que teve as taxas de biodegradabilidade mais elevadas foi a Praia de Algés, que comparativamente à amostra em suspensão, verifica-se uma grande discrepância, podendo-se justificar pelo facto da amostra com solo ser mais concentrada em microrganismos do que a em suspensão que passou pelo processo de lavagem, ficando assim mais diluída. De seguida segue-se a Praia da Alburrica, que em relação à amostra em suspensão, as taxas são ligeiramente maiores, e o mesmo ocorre com os locais seguintes. O fator que pode explicar este fenómeno é a diluição das amostras em relação às que não passaram pela lavagem.

Outras possíveis explicações dos resultados obtidos nas percentagens de biodegradação terem descido é devido à solução não estar homogénea, ter mais sedimento que outras, tendo sido este fator o mais difícil de ultrapassar sendo o poluente hidrofóbico. No entanto, para prevenir esta limitação adicionou-se o emulsificante, que facilitou na mistura entre as duas fases.

Conclui-se ainda que, ao adicionar o biossurfactante com a adição do emulsificante, potencia-se o processo de biodegradabilidade, em que a taxa de remediação aumenta, por parte dos microrganismos, pois as fases não ficam tão dispersas, estando uma fase incorporada na outra, e havendo assim mais homogeneidade da solução em si.

Como trabalho futuro, e de forma a aprimorar e complementar o trabalho realizado, sugerem-se as seguintes propostas:

- Aumento do tempo de análise de cada objetivo e das variáveis avaliadas, com o propósito de uma análise mais ampla das técnicas efetuadas, neste caso a atenuação natural e bioestimulação, como também da atividade microbiana, considerando o tipo de solo e aspetos construtivos para melhorar as técnicas aplicadas.
- Além disso, a quantidade do poluente como análise em estudo, pode-se quantificar o poluente no início adicionado ao meio, pois pode ter interferência na concentração do contaminante que inicialmente esteja presente.
- Verificar quais as espécies predominantes de microrganismos nativos do solo em estudo e a sua quantidade.
- A biorremediação foi eficiente na degradação dos hidrocarbonetos estudados neste trabalho, porém esta técnica e método de biorremediação pode ser aplicada em tratamentos de solos contaminados com outros poluentes, como pesticidas, metais pesados, sendo então hipóteses interessantes para se testar.
- No trabalho em causa, utilizaram-se microrganismos nativos do solo. Todavia, em trabalhos futuros, poderiam ser aplicadas bactérias específicas do contaminante ou mesmo fungos ou plantas. Posteriormente, seria interessante comparar os vários

microrganismos e verificar qual das espécies seria mais eficiente na degradação dos contaminantes.

- Com isto, sugere-se com estas propostas, ao realizar-se um estudo mais aprofundado sobre os microrganismos em causa, que possibilitam a biodegradação dos contaminantes, a criação de uma biblioteca genómica.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abena, M., Li, T., & Shah, MN. (2019). Biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) em solos altamente contaminados por atenuação natural e bioaumentação. *Quimiosfera*.
- Acosta-González, A., & Marqués, S. (2016a). Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Curr Opin Biotechnol*, 24–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.010>
- Acosta-González, A., & Marqués, S. (2016b). Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Curr Opin Biotechnol*, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.010>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2000). *Chemical and physical information*. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp72-c3.pdf>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2020). *n-Hexane*. Center for Disease Control and Prevention - GOV. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp113-c3.pdf>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2021). *Gasoline - The Environmental Health*. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/TF.asp?id=467&tid=83>
- Almeida, S. (2021). *Hydrocarbon Bioremediation Studies*. Instituto Politécnico de Setúbal - Escola Superior de Tecnologia do Barreiro.
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015a). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 31–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015b). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 31–41.
- Amer, R., Mapelli, F., Gendi, H., Barbato, M., Goda, D., Corsini, A., Cavalca, L., Fusi, M., Bori, S., Daffonchio, D., & Abdel-Fattah, Y. (2015). Bacterial Diversity and Bioremediation Potential of the Highly Contaminated Marine Sediments at El-Max District (Egypt, Mediterranean Sea). *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 1–14. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/981829>
- American Society for Microbiology. (2019). *Protocolos de Coloração de Gram*. American Society for Microbiology.
- Amruta, P. (2022a). *Biosparging - In Situ Bioremediation Technique*. PREPP. <https://prepp.in/news/e-492-biosparging-in-situ-bioremediation-technique-environment-notes>

- Amruta, P. (2022b). *Bioventing - In Situ Bioremediation Technique - Environment Notes*. PREPP. <https://prepp.in/news/e-492-bioventing-in-situ-bioremediation-technique-environment-notes#Concept>.
- Amruta, P. (2022c). *Ex Situ Bioremediation Techniques*. PREPP. <https://prepp.in/news/e-492-ex-situ-bioremediation-techniques-environment-notes>
- Andrade, J., Augusto, F., & Jardim, I. (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, 1–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000300002>
- Aryal, S. (2022). Gram Staining: Principle, Procedure, Interpretation, Examples and Animation. *Microbiology*.
- Aubé, J., Senin, P., Bonin, P., Pringault, O., Jeziorski, C., Bouchez, O., Klopp, C., Guyoneaud, R., & Goñi-Urriza, M. (2020). Meta-omics Provides Insights into the Impact of Hydrocarbon Contamination on Microbial Mat Functioning. *Microbial Ecology*, 286–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00248-020-01493-x>
- Australian GOV. (2022, August). *Toluene (methylbenzene)*. Australian Government - DCCEEW. <https://www.dcceew.gov.au/environment/protection/npi/substances/fact-sheets/toluene-methylbenzene>
- Auti, A. M., Narwade, N. P., Deshpande, N. M., & Dhotre, D. P. (2019). Microbiome and imputed metagenome study of crude and refined petroleum-oil-contaminated soils: Potential for hydrocarbon degradation and plant-growth promotion. *Indian Academy of Sciences*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9936-9> (
- Baruah, R., Mishra, S., Kalita, D., Silla, Y., Chauhan, P., Singh, A., & Boruah, H. (2017). Assessment of bacterial diversity associated with crude oil-contaminated soil samples from Assam. *Int. J. Environ. Sci. Technol*, 2155–2169. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1294-2>
- Becarelli, S., Siracusa, G., Chicca, I., Bernabei, G., & Gregorio, S. (2021). Ascomycetes versus Spent Mushroom Substrate in Mycoremediation of Dredged Sediments Contaminated by Total Petroleum Hydrocarbons: The Involvement of the Bacterial Metabolism. *Water*, 1–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w13213040>
- Becker, J. G., Berardesco, G., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (2001). Successional changes in an evolving anaerobic chlorophenol-degrading community used to infer relationships between population structure and system-level processes. *Appl Environ Microbiol*, 5705–5714. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5705-5714.2001>
- Brakstad, O. G., Davies, E. J., Ribicic, D., Winkler, A., Brønner, U., & Netzer, R. (2018). Biodegradation of dispersed oil in natural seawaters from Western Greenland and a Norwegian fjord. *Polar Biology*, 2435–2450. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00300-018-2380-8>

- Cafaro, P. (2014). Avoiding Catastrophic Climate Change: Why Technological Innovation is Necessary but not Sufficient. In *Ethics and Emerging Technologies* (pp. 424–438). https://doi.org/10.1057/9781137349088_28
- Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (2007). *Soil Sampling and Methods of Analysis* (M. R. Carter & E. G. Gregorich, Eds.). Canadian Society of Soil Science. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781420005271>
- Catarino, S. R. (2016). *Biorremediação*. Universidade de Coimbra.
- Chang, Y.-T., Chao, W.-L., Chen, H.-Y., Li, H., & Boyd, S. (2020). Characterization of a sequential UV PhotolysisBiodegradation Process for Treatment of Decabrominated Diphenyl Ethers in Sorbent/Water Systems. *Microorganisms*, 1–5. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms8050633>
- Chicca, I., Becarelli, S., Bernabei, G., Siracusa, G., & Gregorio, S. (2022). Innovative Culturomic Approaches and Predictive Functional Metagenomic Analysis: The Isolation of Hydrocarbonoclastic Bacteria with Plant Growth Promoting Capacity. *Water Research*, 1–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w14020142>
- Chikere, C., Tekere, M., & Adeleke, R. (2019). Enhanced microbial hydrocarbon biodegradation as stimulated during field-scale landfarming of crude oil-impacted soil. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 100–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100177>
- Cordazzo, J. (2000). *Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas*. UFSC – Florianópolis.
- Daghio, M., Aulenta, F., Vaiopoulou, E., Franzetti, A., Arends, J., Sherry, A., Suárez-Suárez, A., Head, I., Bestetti, G., & Rabaey, K. (2017). Electrobioremediation of oil spills. *Water Research*, 351–370. <https://doi.org/Water Research>
- Delille, D., Duval, A., & Pelletier, E. (2008). Biopilhas piloto altamente eficientes para tratamento de fertilização no local de solo subantártico contaminado com óleo diesel. *Tecnologia Cold Reg Sci.*, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2007.09.003>
- 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. *Microorganisms*, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>
- Denby, D. (1996, May). *Dichlorophenolindophenol*. Chemistry Review. <https://www.chemeurope.com/en/encyclopedia/Dichlorophenolindophenol.html>
- Direct Industry. (2022). *Microplaca de 96 pozos PrimeSurface® MS-9096SZ*. PHC. <https://www.directindustry.es/prod/phc-europe-bv-phcbi/product-69508-2341366.html>
- Duarte, A. C., Cachada, A., & Rocha-Santos, T. (2018). Chapter 1 - Soil and Pollution: An Introduction to the Main Issues. In A. C. Duarte, A. Cachada, & T. Rocha-Santos (Eds.),

- Soil Pollution* (pp. 1–28). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-849873-6.00001-7>
- Espinoza, A., Daghighi, M., Palma, E., Aulenta, F., & Franzetti, A. (2020). Structure and Functions of Hydrocarbon-Degrading Microbial Communities in Bioelectrochemical Systems. *Water*, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w12020343>
- European Environment Agency. (2007). *Europe's Environment – The Fourth Assessment. European Communities* (European Environment Agency, Ed.; p. 411). European Environment Agency.
- Fester, T., Giebler, J., Wick, L. Y., Schlosser, D., & Kästner, M. (2014). Plant-microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. *Opin. Biotechnol.*, 168–175. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.017>
- Finotti, A. R., Caicedo, N. O. L., & Rodriguez, M. T. R. (2001). Contaminações Subterrâneas com Combustíveis Derivados de Petróleo: Toxicidade e a Legislação Brasileira. *RBRH - Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 26–46.
- Fogaça, M. N. (2007). *Avaliação da capacidade de biodegradação de substâncias oleaginosas por Candida viswanathii*. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.
- Fonseca, M. R. (2021). proTEJO alerta para poluição no estuário do Tejo e eutrofização das águas vindas de Espanha. *Mediatejo.Net*.
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., & Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 4781–4791. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>
- Gayathiri, E., Prakash, P., Karmegam, N., Varjani, S., Awasthi, M., & Ravindran, B. (2022). Biosurfactants: Potential and Eco-Friendly Material for Sustainable Agriculture and Environmental Safety—A Review. *Agronomy*, 1–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/agronomy12030662>
- Gaylarde, C. C., Bellinaso, M. D. L., & Manfio, G. P. (2005). Biorremediação. *Meio Ambiente - Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 36–43.
- Gaylarde, P., Crispim, C., Neilan, B., & Gaylard, Dr. C. (2005). Cyanobacteria from Brazilian Building Walls Are Distant Relatives of Aquatic Genera. *OMIS: A Journal of Integrative Biology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/omi.2005.9.30>
- Gertler, C., Bargiela, R., Mapelli, F., Han, X., Chen, J., Hai, T., Amer, R., Mahjoubi, M., Malkawi, H., Magagnini, M., Cherif, A., Abdel-Fattah, Y., Kalogerakis, N., Daffonchio, D., Ferrer, M., & Golyshin, P. (2015). Conversion of Uric Acid into Ammonium in Oil-Degrading Marine Microbial Communities: a Possible Role of Halomonads. *Microbial Ecology*, 724–740. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0606-7>

- Gkorezis, P., Daghighi, M., Franzetti, A., Hamme, J. D. van, Sillen, W., & Vangronsveld, J. (2016). The Interaction between Plants and Bacteria in the Remediation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01836>
- Goswami, R. K., Agrawal, K., Shah, M. P., & Verma, P. (2021). Bioremediation of heavy metals from wastewater: A current perspective on microalgae-based future. *Letters in Applied Microbiology*, 1–5. <https://doi.org/10.1111/lam.13564>
- Groffman, P., Thijs, S., Imperato, V., Kowalkowski, L., Portillo-Estrada, M., Gawronski, S. W., & Vangronsveld, J. (2019). *Characterisation of the Carpinus betulus L. Phyllosphere Microbiome in Urban and Forest Areas*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01110>
- Guo, Y., Rene, E. R., & Wang, J. (2020). Biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos e influência de fatores ambientais durante a co-compostagem de lodo de esgoto e resíduos florestais verdes. *Tecnologia Bioresour* .
- Hazardous Chemicals and Occupational Diseases. (2022). *n-Hexane*. Hazard Agents. <https://haz-map.com/Agents/105>
- Hidalgo, K., Sierra-Garci, I., Dellagnezze, B., & Oliveira, V. (2020). Metagenomic Insights Into the Mechanisms for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Oil Supply Chain. *Frontiers in Microbiology*, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561506>
- Higashioka, Y., Kojima, H., Sato, S., & Fukui, M. (2008). Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, xylM, C23O, and bcr genes. *Journal of Applied Microbiology* . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04198.x>
- Howard, P. H. (1990). Toluene. In P. H. Howard (Ed.), *Handbook of environmental fate and exposure data for organica chemicals* (Lewis Publishers Inc, pp. 435–444).
- Hubel Verde. (2021). *Solo - Plano de fertilização informado*. Análises Laboratoriais - Solo. <https://www.hubel.pt/pt/hv/services/solo/>
- Ibrar, M., & Zhang, H. (2020). Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants. *Sci Total Environ*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136400>
- Imam, A., Suman, S., Ghosh, D., & Kanaujia, P. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.023>
- Implen. (2022). *The OD600 Basics*. OD600. <https://www.implen.de/od600-diluphotometer/od600/>
- Instituto Nacional de Recursos Biológicos. (2019). *Colheita de amostras de terra em parcelas com culturas arbóreas e arbustivas*.

https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/3colheita_de_amostras_de_terra_em_culturas_arboreas_e_arbustivas.pdf

- Jariyal, M., Yadav, M., Singh, N. K., Yadav, S., Sharma, I., Dahiya, S., & Thanki, A. (2020). Microbial remediation progress and future prospects. In M. Jariyal, M. Yadav, N. K. Singh, S. Yadav, I. Sharma, S. Dahiya, & A. Thanki (Eds.), *Bioremediation of Pollutants* (pp. 187–214). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-819025-8.00008-9>
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut*, 71–84. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>
- Jovens Repórteres para o Ambiente. (2021). *DESSI – A poluição e a apanha de bivalves no Tejo*. Jovens Repórteres Para o Ambiente. <https://jra.abae.pt/plataforma/artigo/dessi-a-poluicao-e-a-apanha-de-bivalves-no-tejo/>
- Joye, S., Teske, A., & Kostka, J. (2014). Microbial Dynamics Following the Macondo Oil Well Blowout across Gulf of Mexico Environments. *BioScience*, 766–777. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/biosci/biu121>
- Kebede, G., Tafese, T., Abda, E., Kamaraj, M., & Assefa, F. (2021). Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts. *Journal of Chemistry*, 2–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2021/9823362>
- Kim, H. S., Kim, K. R., Kim, W. I., Owens, G., & Kim, K. H. (2017). Influence of Road Proximity on the Concentrations of Heavy Metals in Korean Urban Agricultural Soils and Crops. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 260–268. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00244-016-0344-y>
- Knapik, K., Bagi, A., Krolicka, A., & Baussant, T. (2020). Metatranscriptomic Analysis of Oil-Exposed Seawater Bacterial Communities Archived by an Environmental Sample Processor (ESP). *Microorganisms*, 1–21. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8050744>
- Konieczna, M., Olzog, M., Naether, D., Chrzanowski, Ł., & Heipieper, H. (2018). Membrane Fatty Acid Composition and Cell Surface Hydrophobicity of Marine Hydrocarbonoclastic *Alcanivorax borkumensis* SK2 Grown on Diesel, Biodiesel and Rapeseed Oil as Carbon Sources. *Molecules*, 1–8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3390/molecules23061432>
- Koo, H., Mojib, N., Thacker, R., & Bej, A. (2012). Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution. *FEMS Microbiol*, 77–86. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01270.x>
- Koo, H., Mojib, N., Thacker, R. W., & Bej, A. K. (2014). Comparative analysis of bacterial community-metagenomics in coastal Gulf of Mexico sediment microcosms following exposure to Macondo oil (MC252). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 993–1009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10482-014-0268-3>

- Kryptou, E., Scortti, M., Grundström, C., Oelker, M., Luisi, B. F., Sauer-Eriksson, A. E., & Vázquez-Boland, J. (2019). Control of Bacterial Virulence through the Peptide Signature of the Habitat. *Cell Rep. Cell Reports*, 1815–1827. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.073>
- Kubicki, S., Bollinger, A., Katzke, N., Jaeger, K.-E., Loeschcke, A., & Thies, S. (2019). Marine Biosurfactants: Biosynthesis, Structural Diversity and Biotechnological Applications. *Mar Drugs*. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md17070408>
- Laczi, K., Kis, Á., Horváth, B., Maróti, G., Hegedüs, B., Perei, K., & Rákhely, G. (2015). Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*, 9745–9759. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6936-z>
- Li, J., Hu, A., Bai, S., Yang, X., Sun, Q., Liao, X., & Yu, C.-P. (2021). Characterization and Performance of Lactate-Feeding Consortia for Reductive Dechlorination of Trichloroethene. *Microorganisms*, 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms9040751>
- Lin, C., Cheruiyot, N. K., Bui, X.-T., & Ngo, H. H. (2022). Composting and its application in bioremediation of organic contaminants. *Bioengineered*, 1073–1089. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2017624>
- Lin, C., Liu, J., Wang, R., Wang, Y., Huang, B., & Pan, X. (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Soils of Kunming, China: Concentrations, Distribution, Sources, and Potential Risk. Soil and Sediment Contamination. *An International Journal*, 753–766. <https://doi.org/doi.org/10.1080/15320383.2013.768201>
- Liu, H., Yang, G., Jia, H., & Sun, B. (2022). Crude Oil Degradation by a Novel Strain *Pseudomonas aeruginosa* AQNU-1 Isolated from an Oil-Contaminated Lake Wetland. *Processes*, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pr10020307>
- Liu, J., Bacosa, H. P., & Liu, Z. (2017). Potential Environmental Factors Affecting Oil-Degrading Bacterial Populations in Deep and Surface Waters of the Northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02131>
- Lofthus, S., Netzer, R., Lewin, A. S., Heggeset, T. M. B., Haugen, T., & Brakstad, O. G. (2018). Biodegradation of n-alkanes on oil–seawater interfaces at different temperatures and microbial communities associated with the degradation. *Biodegradation*, 29(2), 141–157. <https://doi.org/10.1007/S10532-018-9819-Z>
- Lu, Y., Zheng, G., & Zhou, W. (2019). O condicionamento por biolixiviação aumentou a biodisponibilidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos para promover sua remoção durante a co-compostagem de lodos de esgoto industriais e municipais. *Sci Total Environment*.
- Malla, M., Dubey, A., Yadav, S., Kumar, A., Hashem, A., & Abd_Allah, E. (2018). Understanding and Designing the Strategies for the Microbe-Mediated Remediation of

- Environmental Contaminants Using Omics Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01132>
- Mariano, A. P. (2006). *Avaliação do potencial de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminadas com óleo diesel*. Universidade Estadual Paulista.
- Mariano, A. P., Angelis, D., & Bonotto, D. (2007, June 29). Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 296–303.
- Marietou, A., Chastain, R., Chastain, R., Scoma, A., Hazen, T. C., & Bartlett, D. H. (2018). The Effect of Hydrostatic Pressure on Enrichments of Hydrocarbon Degrading Microbes From the Gulf of Mexico Following the Deepwater Horizon Oil Spill. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389%2Fmicb.2018.00808>
- Meagher, R. B. (2000). Fitorremediação de poluentes orgânicos elementares tóxicos. *Curr Opin Plant Biol*, 153–162. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00054-0)
- Meded, C., & Lilley, C. (2015). Classificação morfológica das colónias. In *Square Space*. Square Space. <https://images.squarespace-cdn.com/content/v1/5e835102ce5ae323e8b4094d/1597247723849-LIY6RB28REAMTPJUPYNU/Colony+Morphologies+%282%29.jpeg?format=1000w>
- Merck, (2021) *n-Hexane*. https://www.merckmillipore.com/PT/en/product/n-Hexane,MDA_CHEM-109687?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- Michas, A., Vestergaard, G., Trautwein, K., Avramidis, P., Hatzinikolaou, D., Vorgias, C., Wilkes, H., Rabus, R., Schloter, M., & Schöler, A. (2017). More than 2500 years of oil exposure shape sediment microbiomes with the potential for syntrophic degradation of hydrocarbons linked to methanogenesis. *Microbiome*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0337-8>
- Miri, S., Naghdi, M., Brar, S., & Martel, R. (2019). Recent biotechnological advances in petroleum hydrocarbons degradation under cold climate conditions: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 553–586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1552070>
- Mohan, S. V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R. A., & Shimizu, Y. (2006). Bioremediation technologies for treatment of PAHcontaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 347–374. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s11157-006-0004-1>
- Mohan, S. v., Sirisha, K., Rao, N. C., Sarma, P. N., & Reddy, S.J. (2004). Degradação de solo contaminado com clorpirifós por reator de bioslurry operado em modo lote sequencial: monitoramento de bioprocesso. *J Perigo Mater*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.05.037>

- Montanarella, L., Badraoui, M., Chude, V., & Baptista, I. (2015). *Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report* (L. Montanarella, M. Badraoui, V. Chude, & I. Baptista, Eds.). FAO - Food And Agriculture Organization of the United Nations.
- Mukherjee, A., & Chattopadhyay, D. (2017). Exploring environmental systems and processes through next-generation sequencing technologies: insights into microbial response to petroleum contamination in key environments. *Nucleus*, 175–186. <https://doi.org/10.1007/s13237-016-0190-3>
- Murray, P. R. (2018). Acinetobacter, Pseudomonas e Bactérias relacionadas. In Elsevier (Ed.), *Microbiologia Médica Básica* (7ª, pp. 386–388). Elsevier.
- National Library of Medicine. (2021). *n-Hexane*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexane#section=Information-Sources>
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Norf, H., & Kalogerakis, N. (2013). Biorremediação ex situ aprimorada de areia de praia contaminada com petróleo bruto por suplementação com nutrientes e ramnolipídios. *Mar Pollut Bull*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.038>
- Oliveira, J. S., Araújo, W. J., Figueiredo, R. M., Silva-Portela, R. C., Guerra, A., Araújo, S., Minnicelli, C., Carlos, A., Vasconcelos, A., Freitas, A., & Agnez-Lima, L. (2017). Biogeographical distribution analysis of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing genes suggests that near-equatorial biomes have higher abundance of genes with potential for bioremediation. *BMC Microbiology*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1077-4>
- Oliveira, V., Gomes, N., Cleary, D., Almeida, A., Silva, A., Simões, M., Silva, H., & Cunha, A. (2014). Halophyte plant colonization as a driver of the composition of bacterial communities in salt marshes chronically exposed to oil hydrocarbons. *FEMS Microbiol*, 647–658. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12425>
- Omrani, R., Spini, G., & Saidane, D. (2018). Modulation of microbial consortia enriched from different polluted environments during petroleum biodegradation. *Biodegradation*, 187–205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10532-018-9823-3>
- Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valencia, R., Rojas, C., & Seeger, M. (2018). Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>
- Ozaki, N., Nakazato, A., & Nakashima, K. (2017). Carga e remoção de PAHs, compostos de fragrância, triclosan e toxicidade por processo de compostagem de lodo de esgoto. *Sci Total Environment*, 860–866.
- Pandey, R., Sharma, P., Rathee, S., Singh, H., Batish, D., Krishnamuthy, B., & Kohli, R. (2021). Isolation and characterization of a novel hydrocarbonoclastic and biosurfactant producing bacterial strain: *Fictibacillus phosphorivorans* RP3. *3 Biotech*, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13205-021-02655-5>

- PanReac AppliChem. (2020). *Pseudomonas CN Agar Base (EN ISO 16266) (Dehydrated Culture Media) for microbiology - ITW Reagents*. Microbiologia - ITW Reagents.
- Pepper, I. L., Gerba, C. P., & Gentry, T. J. (2015). Part V: Remediation of Organic and Metal Pollutants. In I. L. Pepper, C. P. Gerba, & T. J. Gentry (Eds.), *Environmental Microbiology* (3ª, pp. 3–8). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00001-6>
- Philip, J. C., & Atlas, R. M. (2005). Biorremediação de solos e aquíferos contaminados. *Imprensa Da Sociedade Americana de Microbiologia (ASM)*, 139–236.
- Pinho, M. T. (2010). *Biorremediação de solos contaminados com produtos petrolíferos* [Ramo Tecnologias de Proteção Ambiental]. Politécnico do Porto.
- Popek, E. (2003). *Sampling and Analysis of Environmental Chemical Pollutants* (E. Popek, Ed.). A Complete Guide.
- Portugal, Á. de. (2015). *Despoluição do Estuário do Tejo*. Boas Práticas. <https://www.adp.pt/pt/sustentabilidade/boas-praticas/despoluicao-do-estuario-do-tejo/?id=234>
- Procop, G. W. (2016). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (JonesS & Bartlett Pub, Ed.). Koneman's.
- Reynolds, J. (2021). *Bacterial Colony Morphology*.
- Rochat, T., Bohn, C., Morvan, C., Lam, T. N. le, Razvi, F., Pain, A., Toffano-Nioche, C., Ponien, P., Jacq, A., Jacquet, E., Fey, P. D., Gautheret, D., & Boulloc, P. (2018). The conserved regulatory RNA RsaE down-regulates the arginine degradation pathway in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*, 8803–8816. <https://doi.org/10.1093/nar/gky584>
- Rodrigues, C. (2019). *Curva de crescimento microbiano*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Curva-de-crescimento-microbiano-A-curva-com-a-descricao-das-quatro-fases-B_fig1_332973757
- Roy, A., Sarkar, J., Dutta, A., Sarkar, A., Sarkar, P., Gupta, A., Mohapatra, B., Pal, S., & Kazy, S. (2018). Petroleum hydrocarbon rich oil refinery sludge of North-East India harbours anaerobic, fermentative, sulfate-reducing, syntrophic and methanogenic microbial populations. *BMC Microbiology*, 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12866-018-1275-8>
- Sanches, R. (2009). *Seleção de micro-organismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos e biodiesel*. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas.
- Sanni, G. O., Coulon, F., & Mcgenity, T. J. (2015). Dynamics and distribution of bacterial and archaeal communities in oil-contaminated temperate coastal mudflat mesocosms. *Environmental Science and Pollution Research*, 15230–15247. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4313-1>

- Sarkar, D., Hansdah, R., & Sarkar, A. (2022). Chapter 11 - Microbial bioprospecting in development of integrated biomass based biorefineries. In M. P. Shah & P. Verma (Eds.), *Bioprospecting of Microbial Diversity* (pp. 257–257). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90958-7.00002-9>
- Sarkar, J., Saha, A., Roy, A., Bose, H., Pal, S., Sar, P., & Kazy, S. K. (2020). Development of nitrate stimulated hydrocarbon degrading microbial consortia from refinery sludge as potent bioaugmenting agent for enhanced bioremediation of petroleum contaminated waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1–17.
- Sathiyarayanan, G., Saibaba, G., Kiran, G., Yang, Y.-H., & Selvin, J. (2017). Marine sponge-associated bacteria as a potential source for polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews Microbiology*, 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/1040841x.2016.1206060>
- Scientific Bioprocessing. (2021). What are the Stages of the Bacterial Growth Curve? *Scientific Bioprocessing*. https://www.scientificbio.com/blog/what-are-the-stages-of-the-bacterial-growth-curve/?fbclid=IwAR3zyi_Z7AUkJuD3SJ6IDqYRzi6vMW3m24FXImKu_6JHolkeKeVSrZrE8E0
- Sengupta, K., & Pal, S. (2021). A review on microbial diversity and genetic markers involved in methanogenic degradation of hydrocarbons: futuristic prospects of biofuel recovery from contaminated regions. *Environmental Science and Pollution Research*, 40288–40307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-021-13666-3>
- Siegrist, J. (2022). Identification of Microorganisms Based on Color. *Microbiology Focus - Merck*. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/cytology-and-microscopy/color-identification-microorganisms>
- Silva-Castro, G. A., Uad, I., Rodríguez-Calvo, A., González-López, J., & Calvo, C. (2015). Resposta da microbiota autóctone de solos poluídos por diesel a tratamentos agrícolas. *Res. Ambiente*, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.11.009>
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2019). *Gram Stain Protocols*. <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>
- Smulek, W., Sydow, M., Zabielska-Matejuk, J., & Kaczorek, E. (2020). Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH - A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109843>
- Smulek, W., Sydow, M., Zabielska-Matejuk, J., & Kaczorek, E. (2020). Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH – A case study of long-term contaminated industrial area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109843>

- Stapleton, R. D., & Sayler, G. S. (1998). Assessment of the Microbiological Potential for the Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons in a Shallow Aquifer System. *Microb Ecol*, 349–361. <https://doi.org/10.1007/s002489900121>
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep38828>
- Suzuki, O., & Watanabe, K. (2005). *Drugs and Poisons in Humans* (T. M. Heidelberg, Ed.). Springer.
- Tabatabaee, A., Mazaheri, A. M., Noohi, A. A., & Sajadian, V. A. (2005). Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. Iranian Journal of Environmental Health. *Science and Engineering*, 6–12.
- Taketani, N., Taketani, R., Leite, S., Melo, I., Lima-Rizzo, A., Andreote, F., & Cunha, C. (2021). Application of extracellular polymers on soil communities exposed to oil and nickel contamination. *Brazilian Journal of Microbiology*, 651–661. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s42770-021-00428-z>
- Thakur, K., Chownk, M., Kumar, V., Purohit, A., Vashisht, A., Kumar, V., & Yadav, S. (2019). Bioprospecting potential of microbial communities in solid waste landfills for novel enzymes through metagenomic approach. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11274-020-02812-7>
- Thermo Fisher. (2022). *Detergents for Protein Solubilization*. Protein Extraction. https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/protein-biology/protein-purification-isolation/cell-lysis-fractionation/detergents-protein-solubilization.html?gclid=CjwKCAjw1ICZBhAzEiwAFfvFhNq2TLK_hJ-ZrVVzhRRICqUb-ZJrjxz4VELjQUOUz_TGv5sFMPBp9RoCswQQAuD_BwE&ef_id=CjwKCAjw1ICZBhAzEiwAFfvFhNq2TLK_hJ-ZrVVzhRRICqUb-ZJrjxz4VELjQUOUz_TGv5sFMPBp9RoCswQQAuD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!525544357848!e!!g!!tween-80!13368767883!123500397576&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con
- Thijs, S., Sillen, W., Rineau, F., Weyens, N., & Vangronsveld, J. (2016). Towards an enhanced understanding of plant-microbiome interactions to improve phytoremediation: Engineering the metaorganism. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00341/ABSTRACT>
- ThomasGareth, Cameron, T., Campo, P., Clark, D., Coulon, F., Gregson, B., Hepburn, L., McGenity, T., Miliou, A., Whitby, C., & McKew, B. (2020). Bacterial Community Legacy Effects Following the Agia Zoni II Oil-Spill, Greece. *Frontiers in Microbiology*, 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01706>
- United States Environmental Protection Agency. (2008). *EPA's Report on the Environment*.

- Vempatapu, B. P., & Kanaujia, P. K. (2017). Monitoring petroleum fuel adulteration: A review of analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.04.011>
- Verasoundarapandian, G., Wong, C.-Y., Shaharuddin, N., Gomez-Fuentes, C., Zulkharnain, A., & Ahmad, S. (2021). A Review and Bibliometric Analysis on Applications of Microbial Degradation of Hydrocarbon Contaminants in Arctic Marine Environment at Metagenomic and Enzymatic Levels. *Environmental Research and Public Health*, 1–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph18041671>
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview M. Vidali. *Pure and Applied Chemistry*, 1163–1172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Vidali, M. (2009). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Vieira, D., & Fernandes, N. (2012a). Bactérias: morfologia e estruturas. In *Microbiologia Geral* (pp. 37–49). Instituto Federal de Educação.
- Vieira, D., & Fernandes, N. (2012b). *Microbiologia Geral*.
- Relatório do Estado do Ambiente 2007, (2008).
- Walker, C. H. (2012). *Principles of Ecotoxicology* (C. H. Walker, Ed.; 4th ed.). Taylor & Francis Group.
- Wang, L., Fan, D., Chen, W., & Terentjev, E. M. (2015). Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports*, 1–9. <https://doi.org/doi:10.1038/srep15159>.
- Wang, L., Fan, D., Terentjev, E. M., & Chen, W. (2015). Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep15159>
- Widada, J., & Omori, H. N. (2002). Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1072-y>
- Wu, B., Deng, J., Niu, H., Liang, J., Arslan, M., El-Din, M., Wang, Q., Guo, S., & Chen, C. (2021). Establishing and Optimizing a Bacterial Consortia for Effective Biodegradation of Petroleum Contaminants: Advancing Classical Microbiology via Experimental and Mathematical Approach. *Water*, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w13223311>
- Zakaria, N., Convey, P., Gomez-Fuentes, C., Zulkharnain, A., Sabri, S., Shaharuddin, N., & Ahmad, S. (2021). Oil Bioremediation in the Marine Environment of Antarctica: A Review and Bibliometric Keyword Cluster Analysis. *Microorganisms*, 1–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms9020419>

Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A., & Gedalanga, P. (2018). Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microb Biotechnol*, 833–847. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300>

ANEXOS

Anexo I – Tabela dos microrganismos capazes de biodegradar hidrocarbonetos

Métodos de Biorremediação	Técnicas de Biorremediação	Poluentes	Espécies de microrganismos	Referências
----------------------------------	-----------------------------------	------------------	-----------------------------------	--------------------

<p><i>In situ</i> – Natural attenuation + bioaugmentation + biostimulation</p>	<p>Bacterial biorremediation</p>	<p>Hydrocarbon contaminants (aliphatic, aromatic, and polyaromatic hydrocarbons)</p>	<p><i>Staphylococcus sp.</i>, <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Marinobacter sp.</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Xanthomonas sp.</i> <i>Rhodococcus sp.</i> <i>Brevibacillus sp.</i>, <i>Nocardiodes sp.</i> <i>A. Borkumensis</i> <i>Stenotrophomonas sp.</i> <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>, <i>Rhodococcus sp.</i> <i>Roseovarius sp.</i> <i>Stenotrophomonas sp.</i> <i>Alcaligenes xylooxidans</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>; <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Gordonia sp.</i> <i>Aeromonas sp.</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens An6</i> <i>Bacillus sp. DQ02</i> <i>Sphingomonas sp.</i> <i>Comamonas sp.</i> <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Burkholderia sp.</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Entereobacter cloacae</i> <i>Baciullus pumilus</i> <i>Micrococcus sp.</i></p>	<p>(Kebede et al., 2021)</p>
--	----------------------------------	--	--	------------------------------

<p><i>In situ</i> - bioaugmentation/ Phytoremediation</p>	<p>Bacterial bioremediation and phylo</p>	<p>Crude and refined petroleum-oil</p>	<p><i>Proteobacteria</i> - <i>Staphylococcus</i> <i>Chloroflexi</i> - <i>Mycobacterium</i> <i>Verrucomicrobia</i> - <i>Wolbachia</i> <i>Thermi</i> - <i>Desemzia</i> <i>Firmicutes</i> - <i>Nesterenkonia</i> <i>Planctomycetes</i> - <i>Brevibacterium</i> <i>Acidobacteria</i> - <i>Agrobacterium</i> <i>Gemmatimonadetes</i> - <i>Tissierella_Soehngenia</i> <i>Actinobacteria</i> - <i>Gordonia</i> <i>TM7</i> - <i>Paracoccus</i> <i>SBR1093</i> - <i>Chryseobacterium</i> <i>Chlorobi</i> <i>Bacteroidetes</i> - <i>Pseudomonas</i> <i>Cyanobacteria</i> - <i>Acinetobacter</i> <i>WS6</i> – <i>Sphingomonas</i> <i>Other</i> - <i>Microbacterium</i></p>	<p>(Auti et al., 2019)</p>
---	---	--	---	----------------------------

<i>In situ</i> - Biostimulation	Bacterial Bioremediation	Oil and nickel and EPS	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodococcus</i>	(Taketani et al., 2021)
<i>In situ</i> - Biostimulation	Bacterial Bioremediation	Crude oil	<i>Mycobacterium</i> <i>Alcanivorax</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptomyces</i> <i>Escherichia genus</i> <i>Escherichia fergusonii</i> KLU01 <i>Actinobacteria phylum</i>	(J. S. Oliveira et al., 2017)

<p><i>In situ</i> - Biostimulation</p>	<p>Bacterial Bioremediation</p>	<p>Petroleum hydrocarbons</p>	<p><i>Fictibacillus phosphorivorans</i> RP3 <i>Bacillus cereus</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains NY3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains ATCC 2007 <i>Rhodococcus</i> sp. <i>Serratia marcescens</i> C11S1 <i>S. marcescens</i> C7S3A <i>Citrobacter freundii</i> CCC4DS3 <i>Raoultella ornithinolytica</i> C5S3 <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> CCC10S1 <i>Stenotrophomonas pavanii</i> C5S3FN <i>Enterobacter cloacae</i> <i>E. hormaechei</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Bacillus subtilis</i></p>	<p>(Pandey et al., 2021)</p>
--	---------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------

<i>In situ</i> - Biostimulation	Bacterial Bioremediation	Diesel oil	<i>Arthrobacter</i> <i>Achromobacter</i> <i>Bacillus</i> <i>Lysinibacillus</i> <i>Microbacterium</i>	(Chicca et al., 2022)
<i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation	Bacterial Bioremediation	Petroleum hydrocarbons	<i>Dietzia maris</i>	(Miri et al., 2019)
		Crude oil hydrocarbons	<i>Chryseobacterium spp.</i> <i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i>	

		Arabian light crude oil (0.05%) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)	<i>Sphingopyxis flavimaris</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Marinobacter antarcticus</i> <i>Oleispira antarctica</i> <i>Rhodococcus sp. ice-oil-488s</i> <i>Sulfitobacter sp</i> <i>Hyphomonas rosenbergii</i>	
		Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	<i>Cycloclasticus</i> <i>Pseudomonas</i>	
		Crude oil	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	
		PAH	<i>Cycloclasticus</i> <i>Rhodocyclaceae bacterium</i>	

		Phenol	<i>Penicillium commune</i> <i>Aspergillus fumigates</i> <i>Penicilliumrugulosum</i>	
		Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	<i>Alternaria maritima</i> <i>Penicillium rugulosum</i> <i>Penicillium waksmanii</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Penicilliumchrysogenum</i> <i>Mucor sp.</i>	
		Petroleum hydrocarbon(13,300 mg/kgdry soil)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Rhodococcus cercidiphyllus</i> <i>Arthrobacter sulfurous</i> <i>Pimelobacter simplex</i>	

		Oil hydrocarbons	<i>Mycobacterium</i> <i>Gordonia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Aeromicrobium</i>
		Special Antarctic Blend (SAB) diesel fuel	<i>Arthroderma sp.</i> <i>Exophiala sp.</i> <i>Hypocreasp.</i> <i>Leptodontidium sp.</i>
		Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)	<i>Alcaligenes faeca-lis AFK2</i> <i>Cycloclasticus</i>
		PAH	<i>Pseudomonas borealis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
		Oil hydrocarbons	<i>Rhodotorula creatinivora</i>
		Phenol (10 mM)	<i>Arthrobactersp.</i>

		Crude oil (Arabianlight; 0.1%, v/v)	<i>Oleispira Antarctica</i>	
		Aromatic hydro-carbons, het-erocycles, aro-matic acids and alcohols	<i>Sphingomonas spp.</i>	
		JP8 jet fuel	<i>Pseudomonas spp.</i>	
		Oil hydrocarbons	<i>Rhodococcus spp.</i>	
		Aliphatic com-pounds and PAHs	<i>Pseudomonas spp. B17 & B18</i>	

		Hydrocarbon	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Alcanivorax borkumensis</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Pseudomonas citronellolis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Novosphingobium naphthalenivorans</i> <i>Burkholderia phenazinium</i> <i>Burkholderia glathei</i> <i>Acinetobacter bayly</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Acinetobacter baylyi</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Rhodotorula creatinivora</i> <i>Cryptococcus terreus</i>	
--	--	-------------	--	--

<p><i>In situ</i> - Natural attenuation + bioaugmentation + biostimulation</p>	<p>Bacterial Bioremediation</p>	<p>Petroleum</p>	<p><i>Oleispira antarctica</i> <i>Oleiphilus messinensi</i> <i>Thalassolituus oleivorans</i> <i>Cycloclasticus</i> genus <i>Bacillus</i> spp. <i>Rhodococcus</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Nocardioides</i> <i>Terrabacter</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Cycloclasticus</i> spp. <i>Halomonas</i> <i>Colwellia</i> <i>Marinomomas</i> <i>Salinisphaera</i> <i>Shewanella</i> <i>Alcanivorax</i> spp. <i>Dietzia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Geobacter</i> genus <i>Desulfitobacterium</i> <i>Cloacibacterium</i> spp. <i>Brevundimonas</i> <i>Cupriavidus</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Ralstonia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Spirochaeta</i></p>	<p>(Hidalgo et al., 2020)</p>
--	---------------------------------	------------------	---	-------------------------------

			<i>Sediminibacterium</i> <i>Syntrophomonas</i> <i>Syntrophus</i> <i>Acinebacter</i> <i>Alteromonas</i> <i>Rhodobacterium</i>	
--	--	--	---	--

	Bacterial Bioremediation	hydrocarbon contamination	<i>Alteromonadales</i> <i>Oceanospirillales</i>	
<i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation	Bacterial Bioremediation	hydrocarbon-contaminated soils	<i>Pseudomonas</i> strains <i>Rhodococcus</i> genus <i>Alcanivorax borkumensis SK2</i>	(Aubé et al., 2020)
<i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation	Bacterial Bioremediation	Crude oil and phenanthrene	<i>Alcaligenes aquatilis BU33N</i>	(Fuentes et al., 2014)
		Alkane	<i>Alcanivorax</i> sp. IO_7 <i>Alcanivorax</i> sp. 24	
		Toluene	<i>Cupriavidus metallidurans CH34</i>	
		Phenanthrene	<i>Cycloclasticus</i> sp. strain BG-2	
		Polycyclic aromatic hydrocarbons	<i>Cycloclasticus</i> sp. 78-ME	
		Naphthalene, phenanthrene, pyrene	<i>Cycloclasticus</i> sp. strain P1	
			<i>Flavobacterium</i>	
		Hexadecane	<i>Halomonas</i> sp. strain MCTG39a	
		Naphthalene	<i>Halomonas pacifica</i> strain Cnaph3	
		Crude oil	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	
Aliphatic alkanes	<i>Oleispira antarctica RB-8</i>			

		Phenanthrene and pyrene	<i>Pseudomonas aeruginosa N6P6</i>	
		Phenanthrene and pyrene	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes NP103</i>	
		Phenol, naphthalene, pentadecane	<i>Pseudomonas sp.</i>	
		Hexadecane	<i>Pseudomonas aeruginosa GOM1</i> <i>Thalassolituus</i>	
		Crude oil	<i>Ralstonia pickettii</i> <i>Bacillus subtilis LZ-2</i>	
		Aliphatic hydrocarbon	<i>Cladosporium</i>	

		Crude oil	<p> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus sclerotiorum</i> CBMAI 849 <i>Acremonium sclerotigenum</i> NIOSN-M109 <i>Aureobasidium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Cunninghamella</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> <i>Penicillium polonicum</i> <i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium mononematosum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Fusarium</i> <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Phialocephala</i> sp. <i>Agaricus bisporus</i> <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061 <i>Trametes versicolor</i> <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 106 <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Drechslera</i> <i>Lasiodiplodia</i> <i>Rhizopus</i> <i>Trichoderma</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Spirulina</i> <i>Chlorella</i> <i>Spirogyra</i> </p>	
--	--	-----------	---	--

			<i>Scenedesmus</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Chlorococcum</i> <i>Synechocystis</i> <i>Nannochloropsis</i> <i>Selenastrum</i>	
<i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation	Bacterial Bioremediation	Oil spills	<i>Brachybacterium sp</i> <i>Cytophaga sp.</i> <i>Sphingomonas sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	(Dell' Anno et al., 2021)

		Diesel hydrocarbon	<i>Moraxella saccharolytica</i> <i>Alteromonas Putrefaciens</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Pseudomonas fragi</i>	
		Degrades Hexachlorocyclohexae	<i>Sphingomonadaceae/Sphingomonas</i>	

		Degradation of PAHs Naphthalene and Phenanthrene	<i>Pseudomonas putida</i> strains <i>P. putida</i> G7 <i>P. aeruginosa</i> PaK1 <i>P. putida</i> BS202 <i>P. sp.</i> strain U2 <i>Rhodococcus sp.</i> <i>Pseudomonas putida</i> OUS82 <i>Alcaligenes faecalis</i> AKF2 <i>Nocardiodes sp.</i> KP7	
		Degradation of PAHs Pyren	<i>Mycobacterium sp.</i> PYR-1	
		Crude petroleum oil	<i>Neisseria elongate</i> <i>Acinetobacter</i> <i>faecalis</i> <i>Staphylococcus. sp</i>	

		Aromatic solvents viz., Benzene, toluene, ethylbenzene, Xylene (BTEX)	<i>Pseudomonas veronii</i> Strain 1YdBTEX2	
		Hydrocarbon degradation	<i>Arthrobactersp.</i> Strain SPG23	
		Trinitrotoluene	<i>Raoultella ornithinolytica</i> -TNT	
		Polyaromatic hydrocarbon	<i>Bacillus subtilis</i> SR1	
		Hydrocarbon-contaminated environments	<i>Plantibacter flavus</i> Strain 251	
		Dichloromethane	<i>Hyphomicrobium</i> sp. Strain GJ21	
<i>In situ</i> - Natural attenuation + bioaugmentation + biostimulation	Bacterial Bioremediation	Crude oil, diesel	<i>Oleispira antarctica</i> RB-8	(Malla et al., 2018)
		SAB diesel, lubricant	<i>Microbial community</i>	
		Diesel	<i>Bacterial community</i>	
		Lubricant oil, crude oil, diesel kerosene	<i>Oceanobacillus</i> sp.	
		Diesel	<i>Bacterial community</i>	
		Diesel, crude oil	<i>Microcosm</i>	
		Diesel	<i>Bacterial community</i>	

<p><i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation</p>	<p>Bacterial Bioremediation</p>	<p>Oil contaminated</p>	<p><i>Lysinibacillus sphaericus</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Lysinibacillus fusiformis</i> <i>Alkaligenes</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus altitudinis</i> <i>Bacillus safensis</i> <i>Bacillus tequilensis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus methylotrophicus</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus aryabhattai</i> <i>Bacillus badius</i> <i>Bacillus aerophilus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus stratosphericus</i> <i>Bacillus flexus</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas sp</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas koreensis</i> <i>Paenibacillus sp</i> <i>Sphingomonas</i></p>	<p>(Zakaria et al., 2021)</p>
--	---------------------------------	-------------------------	---	-------------------------------

			<i>Ralstonia</i> <i>Sphingobium</i> <i>Massilia</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Exiguobacterium sp</i>	
--	--	--	--	--

<i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation	Bacterial Bioremediation	Biosurfactants - Heteropolysaccharides	<i>A. calcoaceticus</i> RAG-1 (<i>Arthrobacter</i> RAG)	(Baruah et al., 2017)
		Trehalose, sucrose, and fructose, lipids	<i>Arthrobacter. sp.</i> , <i>Rhodococcus aurantiacus</i>	
		Mycobacterium sp., Nocardia sp.	<i>Trehalose dimycolates</i>	
		Lipopeptide	<i>Arthrobacter</i> MIS 38 <i>Bacillus atrophaeus</i> 5-2a <i>Pseudomonas fluorescence</i>	
		Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	
		Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> L2-1, <i>Bacillus sp.</i> AB-2	
		Sophorose lipids	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	
		Mannan-fatty acid	<i>Candida tropicalis</i>	
		Sophoros lipid	<i>Candida lipolytica</i> Y-917	
			<i>Torulopsis bombicola</i>	
Neutral lipids	<i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Nocardia erythropolis</i>			

		Protein-lipid -carbohydrate	<i>Corynebacterium hydrocarbolastus</i> <i>Corynebacterium lepus</i> Strain MM1 <i>Phaffia rhodozyma</i>
		Ornithine lipids	<i>Myroides</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Thibacillus</i> sp. <i>Agrobacterium</i> sp. <i>Cluconobacter</i> sp.
		Phospholipids	<i>Corynebacterium insidiosum</i>
		Proteins	<i>Ochrobactrum anthropi</i> HM-1 <i>Citrobacter freundii</i> HM-2 <i>Penicillium spiculisporum</i>
		Trehalosedicarynomycolate	<i>Rhodococcus erythropolis</i>

		Glycolipid	<i>Rhodococcus sp. ST-5</i> <i>Rhodococcus sp. H13-A</i> <i>Rhodococcus sp. 33</i>	
--	--	------------	--	--

<p><i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation</p>	<p>Bacterial Bioremediation</p>	<p>Polyaromatic hydrocarbons</p>	<p><i>Methanofollis tationis</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Shewanellasp. Asc-3</i> <i>Streptomycessp HKF-8</i> <i>Exiguobacterium sp. SH31</i> <i>S. atacamensis</i> <i>Deinococcus peraridilitoris</i> <i>Pseudomonas putidaATH-43</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia odorifera</i> <i>Chloroflexus aurantiacus</i> <i>Mastigocladussp</i> <i>Haloferax sp.</i> <i>Halomonas sp. KHS3</i></p>	<p>(Gayathiri et al., 2022)</p>
--	---------------------------------	--------------------------------------	---	---------------------------------

<p><i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation</p>	<p>Bacterial Bioremediation</p>	<p>Petroleum hydrocarbons</p>	<p><i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter venetianus</i> <i>Dietzia natronolimnaea</i> <i>Dietzia daqingensis</i> <i>Fusobacterium perfoetens</i> <i>Mycoplana</i> <i>Alcaligenes spp.</i> <i>Defluviobacter spp.</i> <i>Ochrobactrum spp.</i> <i>Stenotrophomonas acidaminiphila.</i> <i>Thermoanaerovibrio spp.</i> <i>Geotoga spp.</i> <i>Caulobacter henricii</i> <i>Porphyrobacter spp.</i> <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> <i>Brevundimonas auriantica</i></p>	<p>(Orellana et al., 2018)</p>
--	---------------------------------	-------------------------------	---	--------------------------------

Methanogens	Bacterial Bioremediation	Gas oil	<i>Achromobacter</i>	(Omrani et al., 2018)
		Phenanthrene	<i>Acidovorax</i>	
		Gas oil	<i>Acinetobacter</i>	
		Crude oil	<i>Actinomyces</i>	
		Alkanes; crude oil	<i>Alcanivorax</i>	
		Aniline	<i>Agromyces</i>	
		Crude oil	<i>Azotobacter</i>	
		Toluene; crude oil	<i>Bacillus</i>	
		Alkanes	<i>Brevibacterium</i>	
		Fuel oil	<i>Brevundimonas</i>	
		Diesel oil; crude oil; phenanthrene	<i>Flavobacterium</i>	
		Toluene	<i>Geobacter</i>	
		Alkanes; crude oil	<i>Gordonia</i>	
		Crude oil	<i>Lactobacillus</i>	
		Crude oil	<i>Marinobacter</i>	
		Pristane	<i>Muricauda</i>	
		Phenanthrene	<i>Mycobacterium</i>	
		Alkanes; crude oil	<i>Nocardia</i>	
		Phenanthrene; crude oil	<i>Nocardioides</i>	
		Phenanthrene	<i>Paenibacillus</i>	
Decane, pristane, n- hexadecane, benzene, toluene, p-xylene, biphenyl, naphthalene, anthracene, and phenanthrene	<i>Polycyclovorans</i>			
Gas; crude oil	<i>Pseudomonas</i>			
Phenanthrene; crude oil	<i>Rhodococcus</i>			
Toluene	<i>Sphingomonas</i>			

		Pyrene	<i>Stenotrophomonas</i>	
		Alkanes	<i>Streptomyces</i>	
		Phenanthrene	<i>Vibrio</i>	
<i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation	Bacterial Bioremediation	Petroleum Hydrocarbons	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Lambertella sp.</i>	(Thakur et al., 2019)
<i>In situ</i> - Natural attenuation + bioaugmentation + biostimulation	Bacterial and plant Bioremediation	petroleum hydrocarbons	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Becarelli et al., 2021)
		PAH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		naphthalene	<i>Burkholderia multivorans</i>	
		oil contamination	<i>Oceanospirillales</i>	

		alkanes	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 <i>Alcanivorax borkumensis</i> AP1 <i>Alcanivorax hongdengensis</i> A-11-3 <i>Acinetobacter</i> sp. M-1 <i>Alcanivorax dieselolei</i> B5 <i>Acinetobacter</i> strain DSM 17874 <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 <i>Gordonia</i> sp. TY-5 <i>Pseudomonas butanovora</i> <i>Dietzia</i> sp. Strain DQ12-45-1b <i>Pseudomonas putida</i> GPo1 <i>Gordonia</i> strain SoCg <i>Acinetobacter</i> sp. EB104 <i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 <i>Rhodococcus erythropolis</i> strain PR4	
--	--	---------	--	--

		PAH	<p> <i>Mycobacterium sp. strain PYR-1</i> <i>Rhodococcus sp. strain NCIMB12038</i> <i>Nocardioides sp. strain KP7</i> <i>Rhodococcus wratislaviensis IFP 2016</i> <i>Pseudomonas stutzeri AN10</i> <i>Mycobacterium spp</i> <i>Burkholderia sp. AA1</i> <i>Polaromonas naphthalenivorans CJ2</i> <i>Sphingomonas sp. strain LH128</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Ochrobactrum sp.,</i> <i>Acidovorax sp</i> <i>Novosphingobium sp. PCY</i> <i>Microbacterium sp. BPW</i> <i>Ralstonia sp. BPH</i> <i>Alcaligenes sp. SSK1B,</i> <i>Achromobacter sp. SSK4</i> <i>Thlaspi caerulescens</i> <i>Arabidopsis seeds</i> <i>Mimosa pudica</i> <i>Achillea millefolium</i> <i>Solidago canadensis</i> <i>Trifolium aureum</i> <i>Dactylis glomerata</i> <i>S. canadensis</i> </p>	
--	--	-----	---	--

	Plant			
--	-------	--	--	--

<i>In situ</i> - bioaugmentation	Bacterial bioremediation and Phytoremediation	Petroleum contamination	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Chloroflexi</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Sphingomonadaceaea</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Novosphingobium</i> <i>Chlorochromatium</i> <i>Acidovorax</i> <i>Caulobacteraceae</i> <i>Marmoricola</i> <i>Phenylobacterium</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Alicyclobacillus</i> <i>Alicyclobacillacea</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Caulobacter</i> <i>Oceanospirillales</i> <i>Cycloclasticus</i> <i>Colwellia</i> <i>Methanospirillum</i> <i>Methanosaeta</i> <i>Methanosarcina</i> <i>Caulobacterales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Desulfomicrobium</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Clostridiales</i> <i>Rhodocyclales</i> <i>Syntrophobacterales</i> <i>Methyloversatilis</i> <i>Gemmata</i> <i>Desulfovibrionales</i> <i>Spirochaetales</i> <i>Anaerolineales</i>	(Gkorezis et al., 2016)
-------------------------------------	--	-------------------------	---	-------------------------

			<i>Bacillus firmus</i> YHSA15 <i>B. cereus</i> MTCC 9817 <i>B. aquimaris</i> AT8	
--	--	--	--	--

<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Oil	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC <i>Microbacterium oxydans</i> CV8.4 <i>Rhodococcus erythropolis</i> SBUG 2052 <i>Planococcus</i> sp. Tibet-IX21 (Y8 <i>Nitratireductor</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Planococcus cereus</i> <i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus aquimaris</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Microbacterium oxydans</i>	
------------------------------------	--------------------------	-----	--	--

<p><i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation</p>	<p>Bacterial bioremediation</p>	<p>Petroleum</p>	<p><i>Rhodocyclaceae</i> <i>Xanthomonadaceae</i> <i>Syntrophaceae</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Pseudoxanthomonadaceae</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Bacillaceae</i> <i>Porphyromonadaceae</i></p>	<p>(Wu et al., 2021)</p>
--	---------------------------------	------------------	--	--------------------------

<p><i>In situ</i> - biostimulation</p>	<p>Bacterial bioremediation</p>	<p>Oil spills</p>	<p><i>Alcanivorax</i> <i>Cycloclasticus</i> <i>Oleibacter</i> <i>Oleiphilus</i> <i>Thalassolituus</i> <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Micromonas</i> <i>Thermomonospora</i> <i>Streptosporangia</i> <i>Streptomyces spp.</i> <i>Azospirillum brasilense</i> <i>Shinorhizobium meliloti</i> <i>Antarctic bacterium</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Aromatoleum aeromaticum</i></p>	<p>(J. Sarkar et al., 2020)</p>
--	---------------------------------	-------------------	--	---------------------------------

		PHB	<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Halomonas profundus sp</i>	
		PHA	<i>Vibrio sp.</i> <i>Alcanivorax borkumensis SK2</i>	

		PHB	<i>Saccharophagus degradans</i> ATCC <i>Pseudomonas guezenei</i> <i>Spirulina subsalsa</i> <i>Halomonas hydrothermalis</i> <i>Dinoroseobacter</i> sp. <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> <i>Saccharococcus thermophiles</i> <i>Syntrophococcus</i> sp. <i>Vibrio azureus</i> <i>Carnobacterium</i> sp <i>Synechococcus</i> sp <i>Phormidium</i> sp. <i>Bacillus megaterium</i> <i>Oceanimonas doudoroffii</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Nacardiopsis potens</i> <i>Vibrio proteolyticus</i>	
--	--	-----	---	--

<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Petroleum hydrocarbon rich oil (metagenomes)	<i>Coprothermobacter</i>	(ThomasGareth et al., 2020)
------------------------------------	--------------------------	---	--------------------------	--------------------------------

		Sulfate-reducing	<i>Fervidobacterium</i> <i>Treponema</i> <i>Syntrophus</i> <i>Thermodesulfovibrio</i> <i>Anaerolinea</i> <i>Syntrophobacter</i> <i>Anaerostipes</i> <i>Anaerobaculum</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanosaeta</i> <i>Thermoplasmatales</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Longilinea</i> <i>Geobacter</i>	
--	--	------------------	--	--

		Nitrate reducing	<i>Gordonia</i> <i>Novosphigobium</i>	
		Nitrogen fixing	<i>Azovibrio</i> <i>Rhodobacter</i>	
<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Alkane 1-monooxygenase	<i>Porticoccaceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i>	(Sathiyarayanan et al., 2017)
<i>In situ</i> - bioaugmentation + biostimulation	Bacterial bioremediation	Crude oil and PAHs	<i>Sphingopyxis</i> <i>Flavimaris</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Marinobacter antarcticus</i>	(Roy et al., 2018)

		Aromatic (Crude oil)	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> <i>Sediminicola luteus</i> <i>Microbulbifer pacificus</i> <i>Sphingopyxis flavimaris</i> <i>Thiobacillus thioparus</i>	
		Aromatic (Diesel oil)	<i>Cycloclasticus pugetii</i> <i>Novosphingobium nitrogenifigens</i> <i>Pibocella ponti</i> <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	
		PAHs	<i>Cycloclasticusa</i> <i>Pseudomonas</i>	
		Crude-oil	<i>Alcanivorax borkumensis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation			(Knapik et al., 2020)

<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Diesel oil	<i>Rhodococcus erythropolis PR4</i>	(Verasoundarapandian et al., 2021)
<i>In situ</i> - biostimulation	Phytoremediation	Hydrocarbon	<i>Papaver rhoeas</i> <i>Plantago lanceolata</i> <i>Erwinia herbicola</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Arabidopsis</i> <i>Rhizophagus irregulari</i>	(H. Liu et al., 2022)
<i>In situ</i> and shotgun sequencing	Bacterial bioremediation		<i>Euryarchaeota</i> <i>Clostridiales</i>	(Laczi et al., 2015)

<p><i>In situ</i> - biostimulation + bioaugmentation</p>	<p>Bacterial bioremediation</p>	<p>Crude oil in ONR7a medium and ASW medium</p>	<p><i>Acinetobacter venetianus</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Bacillus aerophilus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Bacillus sporothermodurans</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> <i>Marinobacter sp.</i> <i>Providencia sp.</i> <i>Pseudomonas knackmussii</i> <i>Pseudomonas sp</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Sphingomonas sp</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i></p>	<p>(Thijs et al., 2016)</p>
--	---------------------------------	---	--	-----------------------------

<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation:			
	Alphaproteobacteria	Oil-Degrading	<i>Jannaschia spp.</i> <i>Loktanella spp.</i> <i>Oceanicola spp.</i> <i>Paracoccus spp.</i> <i>Rhodobacter spp.</i> <i>Roseobacter spp.</i> <i>Roseovarius spp.</i> <i>Ruegeria spp.</i> <i>Ruegeria spp.</i> <i>Thalassospira spp.</i>	(Michas et al., 2017)
	Betaproteobacteria		<i>Acidovorax spp.</i> <i>Alcaligenes spp.</i> <i>Polaromonas spp.</i>	

	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas spp.</i> <i>Alcanivorax spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Azotobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>Chromohalobacter spp.</i> <i>Colwellia spp.</i> <i>Cronobacter spp.</i> <i>Cycloclasticus spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Gallibacterium spp.</i> <i>Haemophilus spp.</i> <i>Hahella spp.</i> <i>Halomonas spp.</i> <i>Idiomarina spp.</i> <i>Legionella spp.</i> <i>Marichromatium spp.</i> <i>Marinobacter spp.</i> <i>Marinobacterium spp.</i> <i>Marinomonas spp.</i> <i>Methylophaga spp.</i> <i>Microbulbifer spp.</i> <i>Moraxella spp.</i> <i>Oceanimonas spp.</i> <i>Oceanospirillum spp.</i> <i>Oleiphilus spp.</i> <i>Oleispira spp.</i> <i>Pantoea spp.</i> <i>Photobacterium spp.</i> <i>Pseudoalteromonas spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	
--	---------------------	--	--

			<p><i>Psychromonas spp.</i> <i>Psychrobacter spp.</i> <i>Rheinheimeria spp</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Shewanella spp.</i> <i>Thalassolituus spp.</i> <i>Thalassomonas spp.</i> <i>Thiomicrospira spp.</i> <i>Thiorhodococcus spp.</i> <i>Vibrio spp.</i> <i>Xenorhabdus spp.</i> <i>Methylococcaceae</i> <i>Xanthomonadaceae</i></p>	
--	--	--	---	--

	Deltaproteobacteria		<i>Deltaproteobacteria</i>	
	Flavobacteria		<i>Chryseobacterium spp.</i> <i>Flavobacterium spp.</i>	
	Actinobacteria		<i>Actinobacteria</i>	
	Firmicutes		<i>Firmicutes</i>	
	Spirochaeta		<i>Leptospira spp</i>	
<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Oil/PAH	<i>Thalassolituus oleivorans</i> <i>Oleispira antarctica</i> <i>Oceaniserpentilla haliotis</i> <i>Spongiispira norvegica</i> <i>Cycloclasticus</i> <i>Colwellia</i>	(Amer et al., 2015)

<i>In situ</i> - biostimulation + bioaugmentation	Bacterial bioremediation	n-alkanes on oil	<i>Oceanospirillaceae</i> <i>Shewanella</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Piscirickettsiaceae</i> <i>Oleibacter</i> <i>Oleispira</i> <i>Colwellia</i> <i>Cycloclasticus</i> <i>Alteromonas</i> <i>Alteromonadaceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i>	(Gertler et al., 2015)
<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Diesel, Biodiesel and Rapeseed Oil	<i>Alcanivorax borkumensis SK2</i>	(Joye et al., 2014)

<i>In situ</i> - bioaugmentation	Phytoremediation	Sediment properties and hydrocarbon contamination	<i>H. portulacoides</i> <i>S. perennis ssp. perennis</i> <i>Acidimicrobiales</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Desulfobacterales</i>	(Lofthus et al., 2018)
<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Trichloroethene, TCE	<i>Dehalococcoides</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Desulforhabdus</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Methanofollis</i>	(Konieczna et al., 2018)

in situ - biostimulation	Bacterial bioremediation	Hydrocarbons	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Firmicutes</i> <i>Actinobacteria</i> <i>alpha and Betaproteobacteria</i> <i>Carpinus betulus</i>	(V. Oliveira et al., 2014)
<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Hydrocarbon	<i>Desulfobotulus</i> <i>belong</i> <i>Thauera</i> <i>Geobacter metallireducens</i> <i>G. grbiciae</i> <i>G. toluenoxydans</i> <i>G. daltonii</i> <i>Geobacter lovleyi</i>	(Li et al., 2021)

<i>In situ</i> - bioaugmentation	Bacterial bioremediation	Hydrocarbons (PAHs)	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Achromobacter sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Achromobacter sp</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Achromobacter sp</i> <i>Acidovorax spp.</i> <i>Novosphingobium spp</i> <i>Sphingomonas spp.</i>	(Groffman et al., 2019)
-------------------------------------	--------------------------	---------------------	---	-------------------------

<p><i>In situ</i> - biostimulation</p>	<p>Bacterial bioremediation</p>	<p>Oil</p>	<p><i>Oleibacter sp</i> <i>Chromatiales</i> <i>Alcanivorax</i> <i>Thalassolituus</i> <i>Cycloclasticus</i> <i>Roseobacter spp</i></p>	<p>(Espinoza et al., 2020)</p>
--	---------------------------------	------------	---	--------------------------------

<i>In situ</i> - bioaugmentation	Bacterial bioremediation	(n-alkanes, BTEX, naphthalenes and PAHs)	<i>Polaribacter</i> (Flavobacteriaceae) <i>Sulftobacter</i> (Rhodobacteraceae) <i>Colwellia</i> <i>Moratella</i> (Alteromonadales) <i>Persicirhabdus</i> (Verrucomicrobiaceae) <i>Synechococcus</i> <i>Ulvibacter</i> (Flavobacteriaceae) <i>Polaribacter</i> (Flavobacteriaceae) <i>Sulftobacter</i> (Rhodobacteraceae) <i>Pseudophaeobacter</i> (Rhodobacteraceae) <i>Litorimonas</i> (Hyphomonadaceae) <i>Cycloclasticus</i> (Piscirickettsiaceae)	(Chang et al., 2020)
-------------------------------------	--------------------------	---	--	----------------------

<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Oil	<i>Pseudomonas putida</i>	
------------------------------------	--------------------------	-----	---------------------------	--

<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation	Oil	<i>Exiguobacterium</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Halomonas</i> <i>Dyadobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Amphritea</i> <i>Oleibacter</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Marinobacter</i> <i>Vibrio</i> <i>Sulfitobacter</i> <i>Shewanella</i> <i>Fusibacter</i> <i>Piscirickettsiaceae</i> <i>Neptunomonas</i> <i>Lutimonas</i>	(Brakstad et al., 2018)
------------------------------------	--------------------------	-----	---	-------------------------

<i>In situ</i>	Bacterial bioremediation	Oil spills	<p><i>Gammaproteobacter</i> <i>Oceanospirillales</i> <i>Alcanivorax</i> <i>Alteromonadales</i> <i>Pseudomonadales</i> <i>Xhantomonadales</i> <i>Vibrionales</i> <i>Thiotrichales</i> <i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Rhodobacterales</i> <i>Citricella</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Thalassospira</i> <i>Tistrella</i> <i>Sphingomonadales</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Caulobacterales</i> <i>Actinobacteria</i> <i>Actinomycetales</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Dietzia</i> <i>Gordonia</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Cytophagales</i> <i>Firmicutes</i> <i>Bacillales</i></p>	(Koo et al., 2012)
----------------	--------------------------	------------	---	--------------------

<p><i>In situ</i> - biostimulation</p>	<p>Bacterial bioremediation</p>	<p>Crude oil</p>	<p><i>Pseudomonadaceae</i> <i>Alcanivoraceae</i> <i>Halomonadaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Vibrionaceae</i> <i>Aeromonadaceae</i> <i>Alteromonadaceae</i> <i>Chromatiaceae</i> <i>Idiomarinaceae</i> <i>Legionellaceae</i> <i>Methylococcaceae</i> <i>Moraxellaceae</i> <i>Oceanospirillaceae</i> <i>Pseudoalteromonadaceae</i> <i>Shewanellaceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i> <i>Comamonadaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Actinobacteria</i> <i>Firmicutes</i></p>	<p>(Koo et al., 2014)</p>
--	---------------------------------	------------------	--	---------------------------

<i>In situ</i> - biostimulation	Bacterial bioremediation:		
	Firmicutes	Toluene degradation, sulphate reduction	<i>Desulfotomaculum</i>
		Terephthalate degradation, acetogenesis	<i>Pelotomaculum</i>
		Acetogenesis	<i>Moorella</i>
		Acetogenesis, biohydrogenation	<i>Carboxydotherrmus</i>
			<i>Clostridium</i>
		Acetogenesis from fatty acid metabolism	<i>Sedimentibacter</i>
		Homoacetogenesis	<i>Acetobacterium</i>
		Fatty acid oxidation	<i>Syntrophomonas</i>
		Acetate utilization	<i>Thermoacetogenium</i>
		Degradation of hexadecane and BTEX, acetogenesis	<i>Acetobacterium</i>
		Hydrolysis of oil organics	<i>Caloramator</i>
		Alkane degradation, acetogenesis	<i>Anaerobranca</i>
		Hydrocarbon degradation, butyrate production	<i>Anaerostipes</i>
Fermentation	<i>Halanaerobium</i>		

		Hydrocarbon degradation, sulphate reduction	<i>Desulfobacterium</i> <i>Desulfuromonas</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfomicrobium</i>
		Alkane degradation, acetogenesis, sulphate reduction	<i>Desulfatibacillum</i>
		Degradation of hexadecane and BTEX, acetogenesis	<i>Desulfomonile</i> <i>Desulforhopalus</i> <i>Desulfatiferula</i>
		Benzene degradation	<i>Delftia</i>
		Fermentation, sulphate reduction	<i>Pelobacter</i>
		Hydrocarbon degradation	<i>Marinobacter</i>
		Phenanthrene, anthracene degradation	<i>Methylibium</i>
		Hydrocarbon degradation	<i>Pseudomonas</i>
		Oil degradation	<i>Syntrophus</i>
		Aromatic hydrocarbon degradation, N ₂ fixation	<i>Azoarcus</i>
		Hydrocarbon degradation	<i>Thauera</i>

		Hydrogen oxidation	<i>Hydrogenophaga</i>
		Hydrocarbon degradation	<i>Thalassolituus</i>
		Fermentation	<i>Plesiomonas</i>
		Alkane degradation, acetogenesis	<i>Smithella</i>
		Degradation of n-hexadecane, BTEX, 2-methylnaphthalene	<i>Syntrophorhabdus</i>
		Degradation of n-hexadecane, BTEX, 2-methylnaphthalene	<i>Syntrophobacter</i>
		Organic acid metabolism	<i>Geobacter</i>
		Organic acid metabolism	<i>Dechloromonas</i>
		Oil and benzene degradation	<i>Petrobacter</i>
		Alkane degradation	<i>Marinobacterium</i> <i>Colwellia</i> <i>Idiomarina</i> <i>Marteella</i> <i>Kordiimonas</i> <i>Tistrella</i>
	Thermotogae	Acetogenesis, biohydrogenation	<i>Kosmotoga</i>

		Hydrocarbon degradation, acetogenesis	<i>Thermotoga</i> <i>Mesotoga</i>
		Hydrocarbon degradation, fermentation	<i>Fervidobacterium</i>
Synergistetes		Organic acid fermentation, sulphate reduction	<i>Thermanaerovibrio</i>
		Fatty acid utilizing biohydrogenation	<i>Anaerobaculum</i>
Caldiserica		Fermentation	<i>Caldisericum</i>
Coprothermobacterota		Protein degradation, organic acid fermentation	<i>Coprothermobacter</i>
		Fermentation	<i>Coprothermobacter</i>
Deferribacteres		Fatty acid utilization	<i>Flexistipes</i>
Bacteroidetes		Metabolism of organic compound	<i>Cytophaga</i> <i>Petrimonas</i> <i>Anaerolinea</i>
Chloroflexi			
Actinobacteria		Hydrocarbon utilizing	<i>Longilinea</i> <i>Mycobacterium</i>
		Alkane degradation	<i>Brachybacterium</i>
Euryarchaeota		Long-chain alkane degradation	<i>Archaeoglobus</i>

		Methanogenesis from acetate	<i>Methanosaeta</i> <i>Methanosarcina</i>	
		Methanogenesis from H ₂ and CO ₂	<i>Methanogenium</i> <i>Methanocalculus</i> <i>Methanoculleus</i> <i>Methanothermobacter</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanospirillum</i> <i>Methanolinea</i> <i>Methanofollis</i> <i>Methanoregula</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanothermococcus</i>	

		<p>Methanogenesis from methanol or methylated compounds</p>	<p><i>Methanolobus</i> <i>Methanomethylivorans</i> <i>Methermicoccus</i> <i>Methanohalophilus</i> <i>Methanomassiliicoccus</i></p>	
--	--	---	--	--

ANEXO II – Informação sobre a recolha das amostras de solo

Rio Trancão – Margem Norte do Estuário do rio Tejo

Questionário de informações para análise do solo



Informações Gerais

Nome: Beatriz Santos

Identificação da amostra: Amostra Rio Trancão, 22/06/2022, Beatriz Santos (tese de mestrado)

Data da amostra: 22/06/2022 – Quarta-feira

Local: Praça Mar da Palha, Sacavém, Lisboa

Coordenadas: 38°47'45''N9°05'29''W

Informações sobre a área amostrada

Quantidade recolhida: Enchimento total do frasco

Vegetação nativa:

Não Sim

Vegetação circundante: Fucus vesiculosus, plantas rasteiras

Cor: Vermelha Amarela Cinza Preta Castanha

Textura: Argilosa Arenosa Calcário Humoso Siltoso

Turfoso/Pantanoso Granulado

Terreno: Homogéneo Heterogéneo

Tipo de ambiente/habitat circundante:

Salobro Salgado Doce/Fluvial

Temperatura da amostra: 24.9 °C

Temperatura ambiente: 24.6 °C

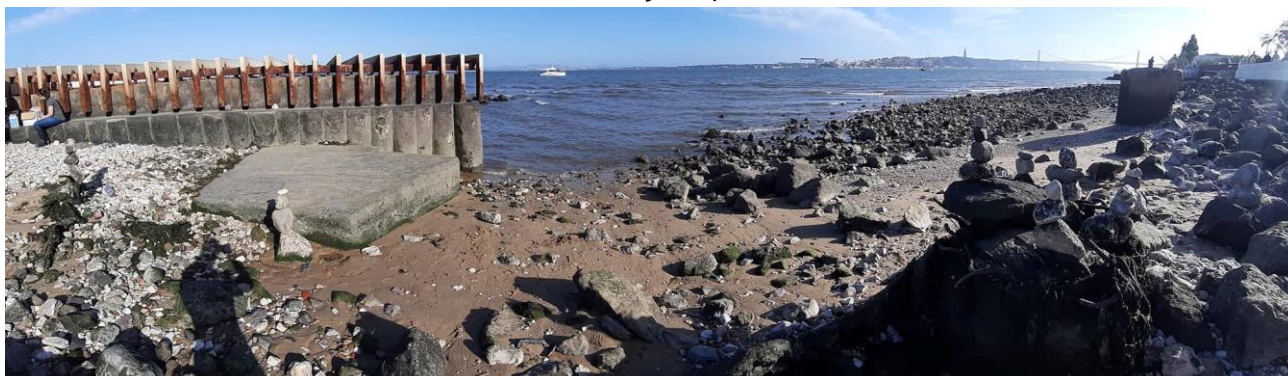
pH: 7

Condutividade: 8.00 mS/cm

OBSERVAÇÕES: Junção de 3 pontos do local, areia junto de arbustos rasteiros perto da zona intertidal/entremarés, areia húmida da zona intertidal, e areia do lodo zona intertidal; com alguns pedregulhos; presença de anelídeos oligoquetas.

Praia do Cais das Colinas – Margem Norte do Estuário do rio Tejo

Questionário de informações para análise do solo



Informações Gerais

Nome: Beatriz Santos

Identificação da amostra: Amostra Cais das Colinas, 22/06/2022, Beatriz Santos (tese de mestrado)

Data da amostra: 22/06/2022 – Quarta-feira

Local: Perto do Cais das Colinas, Praça do Comércio (Antigo Terreiro do Paço), Lisboa

Coordenadas: 38°42'23"N9°08'13"W

Informações sobre a área amostrada

Quantidade recolhida: Enchimento total do frasco

Vegetação nativa:

Não Sim

Vegetação circundante: –

Cor: Vermelha Amarela Cinza Preta Castanha

Textura: Argilosa Arenosa Calcário Humoso Siltoso

Turfoso/Pantanoso Granulado

Terreno: Homogéneo Heterogéneo

Tipo de ambiente/habitat circundante:

Salobro Salgado Doce/Fluvial

Temperatura da amostra: 21.9 °C

Temperatura ambiente: 21.3 °C

pH: 6.5

Condutividade: 4.08 mS/cm

OBSERVAÇÕES: Amostra composta da zona intertidal/entremarés; com alguns pedregulhos.

Praia de Algés – Margem Norte do Estuário do rio Tejo

Questionário de informações para análise do solo



Informações Gerais

Nome: Beatriz Santos

Identificação da amostra: Amostra Praia de Algés, 22/06/2022, Beatriz Santos (tese de mestrado)

Data da amostra: 22/06/2022 – Quarta-feira

Local: Praia de Algés, Carnaxide, Cascais, perto do Caminho Marítimo de Algés

Coordenadas: 38°41'45"N9°13'52"W

Informações sobre a área amostrada

Quantidade recolhida: Enchimento total do frasco

Vegetação nativa:

Não Sim

Vegetação circundante: –

Cor: Vermelha Amarela Cinza Preta Castanha

Textura: Argilosa Arenosa Calcário Humoso Siltoso

Turfoso/Pantanosos Granulado

Terreno: Homogéneo Heterogéneo

Tipo de ambiente/habitat circundante:

Salobro Salgado Doce/Fluvial

Temperatura da amostra: 20.0 °C

Temperatura ambiente: 20.5 °C

pH: 6.0

Condutividade: 3.03 mS/cm

OBSERVAÇÕES: Amostra composta da zona intertidal/entremarés.

Praia Fluvial de Alcochete – Margem Sul do Estuário do rio Tejo

Questionário de informações para análise do solo



Informações Gerais

Nome: Beatriz Santos

Identificação da amostra: Amostra Praia de Alcochete, 07/07/2022, Beatriz Santos (tese de mestrado)

Data da amostra: 07/07/2022 – Quinta-feira

Local: Rua da Praia, nº 15, Samouco, Alcochete

Coordenadas: 38°43'41"N9°00'40"W

Informações sobre a área amostrada

Quantidade recolhida: Enchimento total do frasco

Vegetação nativa:

Não Sim

Vegetação circundante: Sargassum fusiforme

Cor: Vermelha Amarela Cinza Preta Castanha

Textura: Argilosa Arenosa Calcário Humoso Siltoso

Turfosos/Pantanosos Granulados

Terreno: Homogéneo Heterogéneo

Tipo de ambiente/habitat circundante:

Salobro Salgado Doce/Fluvial

Temperatura da amostra: 28.1 °C

Temperatura ambiente: 30.4 °C

pH: 6

Condutividade: 8.54 mS/cm a T.amb. de 29.4°C

OBSERVAÇÕES: Junção de 2 pontos do local, areia húmida da zona intertidal, e areia do lodo zona intertidal, com algumas pedras de calibre pequeno e algumas carapaças de bivalves e crustáceos.

Praia Fluvial da Alburrica – Margem Sul do Estuário do rio Tejo

Questionário de informações para análise do solo



Informações Gerais

Nome: Beatriz Santos

Identificação da amostra: Amostra Praia Fluvial da Alburrica, 07/07/2022, Beatriz Santos (tese de mestrado)

Data da amostra: 07/07/2022 – Quinta-feira

Local: Praia Fluvial de Alburrica, Alburrica, Barreiro

Coordenadas: 38°39'26"N9°05'18"W

Informações sobre a área amostrada

Quantidade recolhida: Enchimento total do frasco

Vegetação nativa:

Não Sim

Vegetação circundante: -

Cor: Vermelha Amarela Cinza Preta Castanha

Textura: Argilosa Arenosa Calcário Humoso Siltoso

Turfosos/Pantanosos Granulados

Terreno: Homogéneo Heterogéneo

Tipo de ambiente/habitat circundante:

Salobro Salgado Doce/Fluvial

Temperatura da amostra: 30.9 °C

Temperatura ambiente: 31.9 °C

pH: 6

Condutividade: 3.55 mS/cm; a T.amb. de 29.4°C

OBSERVAÇÕES: Junção de 2 pontos do local, 2 zonas de areia húmida da zona intertidal, com presença de algumas pedras de calibre pequeno e algumas carapaças de bivalves e crustáceos.

Praia Trafaria – Margem Sul do Estuário do rio Tejo

Questionário de informações para análise do solo

Informações Gerais

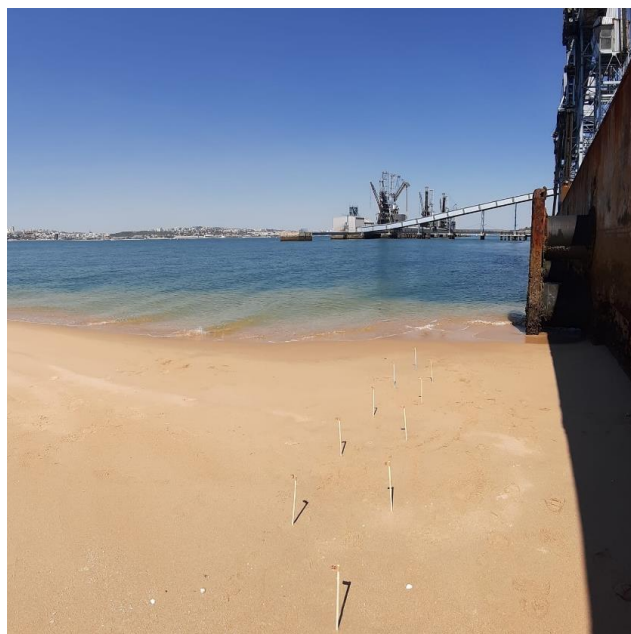
Nome: Beatriz Santos

Identificação da amostra: Amostra Praia Trafaria, 07/07/2022, Beatriz Santos (tese de mestrado)

Data da amostra: 07/07/2022 – Quinta-feira

Local: Praia Trafaria, Trafaria, Almada

Coordenadas: 38°40'26"N9°14'22"W



Informações sobre a área amostrada

Quantidade recolhida: Enchimento total do frasco

Vegetação nativa:

Não Sim

Vegetação circundante: -

Cor: Vermelha Amarela Cinza Preta Castanha

Textura: Argilosa Arenosa Calcário Humoso Siltoso

Turfoso/Pantanosos Granulado

Terreno: Homogéneo Heterogéneo

Tipo de ambiente/habitat circundante:

Salobro Salgado Doce/Fluvial

Temperatura da amostra: 28.5 °C

Temperatura ambiente: 30.3 °C

pH: 6

Condutividade: 3.90 mS/cm; a T.amb. de 29.4°C

OBSERVAÇÕES: Retirou-se apenas da zona de areia húmida, da zona intertidal até beira-mar, com presença de algumas carapaças de bivalves e crustáceos.

Rio Trancão – Fotografias do local da primeira amostra recolhida, no rio Trancão – Margem Norte do Estuário do rio Tejo. Neste local foram recolhidas amostras simples em três zonas diferentes, tendo os pontos sido marcados por sinalizadores (de 1 a 10), podendo visualizar-se nas fotos o procedimento da amostragem, desde a recolha das amostras simples, até à mistura para formação da amostra composta, de seguida a medição do pH e temperatura da mesma.



Cais das Colinas – Fotografias do local da segunda amostra recolhida, na Praia do Cais das Colinas – Margem Norte do Estuário do rio Tejo. Neste local foram recolhidas amostras simples em apenas uma zona, tendo os pontos sido marcados por sinalizadores (de 1 a 10), podendo visualizar-se nas fotos o procedimento da amostragem de forma geral.



Algés – Fotografias do local da terceira amostra recolhida, na Praia de Algés – Margem Norte do Estuário do rio Tejo. Neste local foram recolhidas amostras simples em duas zonas, tendo os pontos sido marcados por sinalizadores (de 1 a 10), podendo visualizar-se nas fotos o procedimento da amostragem de forma geral.



Alcochete – Fotografias do local da quarta amostra recolhida, na Praia Fluvial de Alcochete – Margem Sul do Estuário do rio Tejo. Neste local foram recolhidas amostras simples em duas zonas, tendo os pontos sido marcados por sinalizadores (de 1 a 10), podendo visualizar-se nas fotos o procedimento da amostragem de forma geral.



Alburrica – Fotografias do local da quinta amostra recolhida, na Praia Fluvial da Alburrica – Margem Sul do Estuário do rio Tejo. Neste local foram recolhidas amostras simples em duas zonas, tendo os pontos sido marcados por sinalizadores (de 1 a 10), podendo visualizar-se nas fotos o procedimento da amostragem de forma geral.



Trafaria – Fotografias do local da sexta amostra recolhida, na Praia Trafaria – Margem Sul do Estuário do rio Tejo. Neste local foram recolhidas amostras simples em apenas uma zona, tendo os pontos sido marcados por sinalizadores (de 1 a 10), podendo visualizar-se nas fotos o procedimento da amostragem de forma geral.

