



UNIVERSIDADE CEUMA
REITORIA
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE

THAÍS DE MELO CASTELO BRANCO

**Perfil da Microbiota Endógena Após Exposição a Solo Contaminado
com Resíduo de Óleo Automotivo**

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda

São Luís
2020

THAÍS DE MELO CASTELO BRANCO

**Perfil da Microbiota Endógena Após Exposição a Solo Contaminado
com Resíduo de Óleo Automotivo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente da Universidade CEUMA, como requisito para obtenção do grau de Mestra em Meio Ambiente.

Orientador: Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda

São Luís
2020

UNIVERSIDADE CEUMA
REITORIA
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE

Folha de aprovação da Dissertação de THAÍS DE MELO CASTELO BRANCO
defendida e aprovada pela Comissão Julgadora em
30/07/2020

Thaís de Melo Castelo Branco

Nome do Avaliador Externo
1º Titular

Nome do Avaliador Externo ou Interno
2º Titular

Nome do Avaliador Interno
3º Titular

Rita de Cássia Mendonça de Miranda
Presidente da Comissão

Prof. Dr. Fabrício Brito Silva
Pró-Reitor de Pós- Graduação, Pesquisa e Extensão

Resumo

Os hidrocarbonetos de petróleo quando entram em contato com o ambiente seja por meio de derramamentos acidentais em todas as fases da cadeia petrolífera ou devido ao descarte incorreto dos resíduos gerados por seus derivados, causam danos muitas vezes irreversíveis. Todos os tipos de poluentes originados na indústria petrolífera acarretam um perigo para o meio ambiente e organismos vivos. Existem diversas estratégias que visam a recuperação de ambientes aquáticos e terrestres contaminados com petroderivados. Dentre as técnicas biológicas, a biorremediação ganha destaque por conta do uso de organismos biológicos para reverter a contaminação química, explorando os sistemas dos agentes biológicos, em especial de fungos e bactérias. Os fungos filamentosos merecem destaque devido a um de seus mecanismos de ação, a secreção enzimática. Diante disso, o objetivo desse estudo foi estabelecer condições otimizadas de tratamento biológico para solos impactados com resíduo de Óleo Lubrificante Automotivo Contaminado (OLUC). Para isso foi utilizado um solo contaminado com resíduo hidrocarbônico bioaumentado com fungo *Penicillium simplicissimum*. O tratamento proposto foi realizado durante 8 semanas, onde foram avaliados por meio de titulação volumétrica a quantidade de Carbono (C) liberada dentro dos microcosmos, perfil de degradação das frações do contaminante, identificação molecular da comunidade fungica e bacteriana do solo e também foram realizados testes de toxicidade para avaliar o efeito mutagênico do óleo no decorrer do tratamento. O resultado da atividade biológica mostrou que a quantidade de C liberada foi maior no início do tratamento, tendo se mantida estável entre a terceira e sétima semana e, por fim decaiu nos últimos dias de medição do processo. No entanto, o perfil molecular sinalizou um aumento da comunidade fungica no final do processo e um decaimento da comunidade bacteriana, contudo o fungo inoculado para auxiliar no processo de degradação do contaminante não foi detectado na identificação a nível molecular. Os testes de toxicidade mostraram que o tratamento aplicado não tornou o ambiente menos tóxico, pelo contrário, com o passar dos dias alterações como Micronúcleos ficaram mais frequentes. Tais resultados evidenciam que em certos casos a própria microbiota endógena é capaz de atuar na biodegradação desde que estimulada da forma certa. Outro ponto de destaque no estudo é que o bioprocessamento dentro do tempo estabelecido não é sugerido como técnica eficaz na recuperação do ambiente contaminado, pois torna o contaminante inicial mais tóxico ao final do processo, mostrando que o acompanhamento dessas técnicas é fundamental e mais que isso, no caso do óleo lubrificante, a melhor forma é conscientizar a população sobre o descarte correto, pois ele é um resíduo perigoso de difícil tratamento.

Palavras chaves: recuperação, solo, ambiente e xenobióticos,

Abstract

When petroleum hydrocarbons come into contact with the environment, either through accidental spills at all stages of the oil chain or due to the incorrect disposal of waste generated by its derivatives, they cause damage that is often irreversible. All types of pollutants originating in the oil industry pose a danger to the environment and living organisms. There are several strategies aimed at recovering aquatic and terrestrial environments contaminated with petroleum products. Among biological techniques, bioremediation is highlighted due to the use of biological organisms to reverse chemical contamination, exploring the systems of biological agents, especially fungi and bacteria. Filamentous fungi are noteworthy due to one of their mechanisms of action, enzyme secretion. Therefore, the objective of this study was to establish optimized conditions for biological treatment for soils impacted with contaminated automotive lubricating oil (OLUC) residue. For that, a soil contaminated with bio-increased hydrocarbon residue with the fungus *Penicillium simplicissimum* was used. The proposed treatment was carried out for 8 weeks, where the amount of Carbon (C) released inside the microcosms was evaluated by volumetric titration, the degradation profile of the contaminant fractions, molecular identification of the soil's fungal and bacterial community and were also carried out toxicity tests to assess the mutagenic effect of the oil during treatment. The result of the biological activity showed that the amount of C released was greater at the beginning of the treatment, having remained stable between the third and seventh week and, finally, decreased in the last days of the process measurement. However, the molecular profile signaled an increase in the fungal community at the end of the process and a decay of the bacterial community, however the fungus inoculated to assist in the process of degradation of the contaminant was not detected in the identification at the molecular level. Toxicity tests showed that the treatment applied did not make the environment less toxic, on the contrary, with the passage of days, changes as Micronuclei became more frequent. Such results show that in certain cases the endogenous microbiota itself is capable of acting on biodegradation provided it is stimulated in the right way. Another point of emphasis in the study is that the bioprocess within the established time is not suggested as an effective technique in the recovery of the contaminated environment, as it makes the initial contaminant more toxic at the end of the process, showing that the monitoring of these techniques is fundamental and more than that, in the case of lubricating oil, the best way is to make the population aware of the correct disposal, as it is a hazardous waste that is difficult to treat.

Key words: recovery, soil, environment and xenobiotic

Agradecimentos

Começo ressaltando que agradecer a todos que participaram deste trabalho, diretamente ou indiretamente, é difícil pois foram muitas forças que se somaram para que hoje ele esteja se concretizando.

Em primeiro lugar devo agradecer ao meu Senhor e meu Pastor que guia em todos meus passos e me mostra os caminhos a seguir, embora muitas vezes eu erre. Obrigada, Pai, por não desistir da sua filha!

Aos meus pais, João Santana e Maria do Rosário e minha irmã Lizy por acreditarem em mim e terem permitido que eu saísse de perto deles para buscar meus sonhos. Obrigada, sem vocês eu não estaria aqui!

Ao meu marido e amigo Tiago Moura por me apoiar e incentivar a crescer sempre! Obrigada, você foi e é fundamental para mim!

Jamais poderia deixar de registrar aqui o apoio dos mestres que encontrei, em especial à minha orientadora Rita de Cássia, que com sua experiência ofereceu a mim mais que orientação de mestrado, mas também conselhos que levarei comigo. Obrigada!

Meus amigos que foram a alegria e os ouvidos quando precisei, Pedro, Rayane e Elinaura. Obrigada!

Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram em todas as fases desse trabalho e que me ensinaram mais que eu a eles. Obrigada!

E finalmente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) por acreditar nesse estudo e financiá-lo.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização físico-química do solo usado no estudo.....	28
Tabela 2. Quantidade total de microrganismos identificados na análise molecular para fungos e bactérias	29
Tabela 3. Quantidade de microrganismos classificados por ordem, família, gênero e espécie para fungos e bactérias das amostras T0 e T4	30
Tabela 4. Índice de Aberrações	31

Lista de Figuras

Figura 1. Compostos de Petróleo majoritários presentes no Resíduo de Óleo Automotivo.....	29
Figura 2. Taxa de respiração basal dos microrganismos nos reatores de solo contaminado com óleo usado no período de 8 semanas.....	30
Figura 3. A- Tratamento T0 no dia 1 com células saudáveis; B- T2 com um Micronúcleo (MN); C- T3 com MN e Anáfase com Ponte; D- C-Metáfase com Quebra e MN. As setas na figura indicam as aberrações.....	32
Figura 4. Percentual do Índice Mitótico dos Controles e após 8 semanas de Tratamentos do Resíduo de Óleo Usado em Oficina Mecânica.....	32
Figura 5. Percentual de sobrevivência das larvas de <i>Tenebrio molitor</i> ao longo de 10 dias.....	33

Lista de Abreviaturas

BaCl₂ Brometo de Cloro

CO Carbono Orgânico

HCl Ácido Clorídrico

HTP Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

HPA Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

PBS *Phosphate buffered saline*

MN Micronúcleo

MO Matéria Orgânica

OLUC Óleo Lubrificante Contaminado

NaOH Hidróxido de Sódio

U Umidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Petróleo	14
2.2 Ambientes Contaminados	15
2.3 Técnicas de Recuperação.....	16
2.3.1 Biorremediação	17
2.4 Microrganismos Degradadores	19
2.4.1 Fungos Filamentosos	20
3 CAPÍTULO I: Perfil de Microbiota Endógena Após Exposição a Solo Contaminado com Resíduo de Óleo Automotivo	22
4 CONCLUSÕES.....	36
5 REFERÊNCIAS	37
Atividades Desenvolvidas no período.....	41
ANEXO A: Normas para submissão na Revista	41

1 INTRODUÇÃO

O avanço da tecnologia e dos processos industriais faz com que a busca por fontes de energia para mantê-lo se dê de maneira rápida e, muitas vezes, sem mensurar suas consequências. Combustíveis fósseis, especialmente produtos à base de petróleo, contribuem para a fonte primária de energia para as indústrias e para a vida cotidiana em todo o mundo (NAIDU et al, 2018). Os produtos oriundos do petróleo são as principais fontes de energia que, desde 1990, atenderam a mais de 30% da demanda mundial de energia (SAAD et al., 2018; GARCIA, 2016).

Derivados do petróleo como gasolina, diesel ou lubrificantes são usados em volumes mais altos na sociedade moderna, em comparação com outros produtos químicos de preocupação ecológica. O petróleo e seus derivados são liberados no meio ambiente durante os processos de extração, armazenamento, transporte e produção de petróleo. Alguns compostos de petróleo são conhecidos por terem efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (ZHANG et al., 2018). Esse disputado óleo é encontrado em reservatórios onshore ou offshore e requer alta tecnologia para sua exploração.

A composição química do petróleo depende do reservatório e do processo de formação pelo qual ele passou ao decorrer de milhares de anos, tendo nesses fatores os responsáveis pela qualidade do mesmo. O petróleo é formado durante a decomposição de vários precursores, como material orgânico, fósseis, etc., durante milhões de anos. Devido às variações extremas nas moléculas precursoras, a composição física e química do petróleo não é uniforme entre os locais de um mesmo campo em aspectos moleculares, o óleo de petróleo é composto de mistura complexa de hidrocarbonetos com componentes orgânicos de quantidades insignificantes contendo hidrogênio, oxigênio, enxofre e nitrogênio e componentes metálicos. Adicionalmente, a composição molecular de óleo do petróleo bruto é de três classes de compostos como saturados, aromáticos e heteroátomos (NAIDU et al., 2018).

O Brasil é detentor de enormes reservas marítimas e terrestres, sendo os reservatórios do Pré-Sal as mais recentes descobertas. Para tal exploração que se dá em águas ultraprofundas há a necessidade de tecnologia de ponta que o país já desenvolve e aperfeiçoa ao longo dos anos (PETROBRAS, 2018). Entretanto há grandes riscos associados a todas as fases de processamento do petróleo, desde a exploração, passando pelo refino e transporte dos derivados. Atividades antrópicas, como escoamentos industriais e municipais; atividades offshore e onshore da indústria do petróleo, bem

35 como derrames acidentais causam poluição de hidrocarbonetos de petróleo. Esta poluição
36 afeta o meio ambiente e representa risco à saúde, direto ou indireto, a seres humanos e
37 animais (VARJANI, 2017).

38 Os hidrocarbonetos de petróleo geralmente são lançados no ambiente por meio
39 de derramamentos acidentais de produtos brutos ou refinados ou por meio do descarte
40 indevido. As duas formas acarretam um perigo para o meio ambiente e organismos vivos
41 (ESPOSITO et al, 2016). Óleos lubrificantes usados por veículos automotivos são
42 especialmente perigosos no momento do descarte pois configuram como resíduos de
43 tratamento difícil devido a sua composição química (NAIDU et al, 2018).

44 Existem diversas estratégias que visam a recuperação de ambientes aquáticos e
45 terrestres contaminados com petroderivados; como as técnicas físicas, químicas e
46 biológicas. Dentre as técnicas biológicas, a biorremediação ganha destaque por conta do
47 uso de organismos biológicos para limpar a poluição química, explorando os sistemas dos
48 agentes biológicos –fungos, bactérias e leveduras. O processo reduz as concentrações e /
49 ou a toxicidade dos compostos químicos, modificando a estrutura química do poluente
50 em produtos finais inócuos. Ele se esforça para acelerar o processo de biodegradação
51 natural e restaurar as condições iniciais com impacto mínimo sobre os ecossistemas
52 existentes (BALL et al., 2017).

53 Os fungos filamentosos merecem destaque pois um de seus mecanismos de ação,
54 a secreção enzimática, possui a característica peculiar de não especificidade, permitindo
55 a degradação de uma ampla variedade de componentes do petróleo e seus derivados
56 (MARCO-URREA et al., 2015). O gênero *Penicillium* é bastante conhecido e reportado
57 na literatura por seu mecanismo de ação que possibilita uma alta capacidade de utilização
58 de hidrocarbonetos como fonte de energia (MARCO-URREA et al. 2015; VARJANI,
59 2017; AL-HAWASH et al., 2017).

60 A problemática oriunda da destinação incorreta após o uso dos derivados de
61 petróleo, e sua relação com a contaminação do solo e lençol freático, atingindo, além do
62 meio ambiente, a saúde humana, desperta a necessidade de estudos e trabalhos que
63 venham a identificar o conhecimento de métodos eficazes de recuperação dessas áreas
64 contaminadas. Diante do exposto, esse trabalho visa estudar de maneira aprofundada o
65 mecanismo da biorremediação e sua eficiência quanto à degradação de resíduo
66 automotivo.

67

68 2 Referencial teórico

69 2.1 Petróleo

70

71 O termo petróleo foi usado para nomear o óleo cru, um líquido pegajoso escuro,
72 composto por uma mistura complexa cujo peso molecular é bastante variado e é usado
73 como matéria-prima para a produção de derivados do petróleo. Uma fração majoritária
74 dos componentes do petróleo é composta de Hidrogênio e Carbono, os hidrocarbonetos
75 de petróleo, sendo estes compostos por misturas de componentes não aquosos e
76 hidrofóbicos, tais como n-alcano, naftenos, aromáticos, compostos orgânicos de enxofre,
77 compostos orgânicos de nitrogênio e hidrocarbonetos contendo oxigênio (fenóis) (CHEN,
78 2016 e AL-JAWARI, 2014).

79 O óleo cru contém mais de 30 hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) (AL-
80 JAWARI, 2014). Estruturalmente, os HPAs são formados pela fusão de três ou mais
81 benzenerantes, diminuindo assim sua biodisponibilidade e biodegradabilidade, de baixo
82 (3 a 4 anéis) a alto peso molecular (4 a 7 anéis). Eles estão na lista de prioridades de
83 substâncias perigosas compilada pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA),
84 devido ao alto risco para a saúde humana e os ecossistemas (GODOY et al., 2016).

85 A composição e conseqüentemente a toxicidade dos derivados de petróleo variam
86 amplamente, dependendo de seu arranjo molecular e concentração, fatores influenciados
87 diretamente pelo reservatório de origem do petróleo (CHUKWURA et al., 2016).

88 O óleo lubrificante automotivo é um dos derivados mais produzidos, colocando
89 o Brasil, segundo dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e
90 Biocombustíveis- ANP (2011), em quinto lugar mundial na sua produção. Segundo a
91 Resolução nº 362/2005 CONAMA, o resíduo gerado pelo óleo lubrificante deve ser
92 redirecionado por meio de Centros de Coleta às empresas autorizadas a realizar a sua
93 reciclagem, que consiste no rerrefino, para o reaproveitamento do óleo base que compõe
94 85% do óleo lubrificante contaminado (OLUC). Entretanto, no Brasil existem somente
95 12 empresas autorizadas a realizar a atividade do rerrefino desse óleo, de acordo com a
96 ANP (2019), e nenhuma delas está localizada no Nordeste.

97 O OLUC é classificado de acordo com a Associação Brasileira de Normas
98 Técnicas ABNT/NBR 10.004/04 como resíduo sólido Classe I, ou seja, apresenta
99 periculosidade devido às características de inflamabilidade, toxicidade, corrosividade
100 entre outros e necessitam de um tratamento especial após sua utilização.

101 1

0

1

102 2.2 Ambientes Contaminados

103 Os acidentes com a poluição por óleo tornaram-se fenômenos comuns e causam
104 catástrofes ecológicas e sociais. A crescente demanda global por energia nos últimos anos
105 resultou na deterioração da água e do solo pela poluição da indústria petrolífera (CHEN
106 et al., 2016; AL-HAWASH et al., 2018). As contaminações ocorrem devido a vazamentos
107 de depósitos de armazenamento subterrâneos e acima do solo, derramamento durante o
108 transporte, acidentes com petroleiros, vandalização de tubulações e processos industriais
109 (CHIKERE, 2018; ALARCON et al., 2017).

110 A contaminação de solos e aquíferos por derramamentos de petróleo bruto
111 consiste em uma grande preocupação tendo em vista que se trata de uma poluição
112 persistente e generalizada, constituindo riscos ambientais e de saúde. As complexas
113 substâncias químicas contidas do petróleo têm efeitos carcinogênicos, mutagênicos,
114 neurotóxicos e imunotóxicos, entrando nos seres humanos por contato, inalação ou
115 ingestão (BISOONI et al., 2018; CHIKERE et al., 2018).

116 A liberação desses produtos químicos persistentes, bioacumulativos e tóxicos no
117 solo danifica os sistemas biológicos que nele habitam, incluindo microrganismos e
118 plantas. Algumas frações tanto do petróleo cru como derivados e os resíduos desses são
119 tóxicas para organismos vivos (AL-JAWARI, 2014). Geralmente, no solo,
120 microrganismos e plantas são danificados ou alterados por qualquer contato com o óleo
121 cru e além da concentração de 3% torna-se cada vez mais tóxico para biota do solo e
122 crescimento das culturas. O derrame de petróleo bruto põe em perigo a saúde pública,
123 contamina a água potável, destrói os recursos naturais e perturba a economia.
124 (CHUKWURA et al., 2016; CHIKERE et al., 2018).

125 De acordo com Ma et al. (2018) entre os poluentes antrópicos do solo, os
126 hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos presentes também nos derivados e resíduos deles
127 são dois componentes principais que foram relatados por serem recalcitrantes e
128 prejudiciais à saúde. Os hidrocarbonetos alifáticos são facilmente degradados, mas
129 grandes cadeias alifáticas ramificadas não são; portanto, persistem no ambiente.

130 Da mesma forma, os hidrocarbonetos aromáticos são difíceis de degradar devido
131 às suas cadeias complexas e requerem atenção significativa. Em experiências in vitro, os
132 resultados mostraram que os hidrocarbonetos policíclicos (HPAs) são carcinogênicos,
133 citotóxicos, genotóxicos e tóxicos para o ambiente além de possuírem tendência à
134 bioacumulação. Os HPAs são compostos de anéis aromáticos fundidos e resistem de
135 forma relativa à biodegradação (MA et al., 2018; BALL et al., 2019).

136 Como os hidrocarbonetos de petróleo são compostos por uma combinação de
137 moléculas alifáticas e aromáticas com comprimento de cadeia diferente, é altamente
138 provável que metabólitos secundários sejam formados em exposição pós-ambiental
139 também e / ou durante os processos de remediação. Além disso, a interação desses
140 metabólitos com componentes abióticos de matrizes ambientais e de receptores
141 biológicos é difícil de ser avaliada por métodos analíticos. Portanto, além dos resultados
142 analíticos da concentração de contaminantes em moléculas ambientais contaminadas,
143 devem ser incluídos dados toxicológicos para bioensaios específicos para avaliar a
144 qualidade dos modelos ambientais contaminados. Assim, a fim de avaliar os perigos de
145 um contaminante para os receptores ecológicos, análises ecotoxicológicas são sugeridas.
146 Para avaliar a toxicidade, bioensaios utilizando organismos teste padrão são amplamente
147 seguidos (NAIDU et al., 2018).

148 Atualmente, dentre as espécies mais utilizadas como organismos testes no
149 biomonitoramento ambiental se destacam: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zeamays*,
150 *Tradescantia* spp., *Nicotianatabacum*, *Crepiscapillaris* e *Hordeumvulgare* (GRANT,
151 1994). Dentre as espécies mais utilizadas como sistemas teste, *A. Cepa* se destaca pela
152 facilidade de se observar danos nos cromossomos e alterações nos ciclos celulares, pelo
153 fato de que o cromossomo deste vegetal é grande e em número reduzido ($2n=16$). Por
154 isso, este sistema teste tem se mostrado eficaz na detecção de químicos ambientais
155 (FISKESJO, 1985). A espécie *A. cepa* tem sido considerada pela “Royal Swewish
156 Academy of Science” (FISKEJÖ, 1985) e pelo “Gene-ToxProgram” (GRANT, 1982)
157 como um material-teste padrão para detecção de possíveis danos genéticos resultantes da
158 poluição ou do uso de químicos ambientais.

159 159

160 2.3 Técnicas de Recuperação

161 As técnicas de recuperação de áreas afetadas podem ser realizadas no local que
162 ocorreu a contaminação (*in situ*) ou fora dele (*ex situ*), nesta última o solo contaminado é
163 escavado e levado a outro local onde as condições podem ser controladas. Dentre os
164 muitos métodos convencionais de descontaminação, há os físico-químicos, que foram
165 desenvolvidos baseados na engenharia, tais como lavagem do solo, inativação química e
166 incineração. Outras técnicas físico-químicas conhecidas são dispersão, diluição, sorção,
167 volatilização, etc. (VARJANI E SRIVASTAVA, 2015).

168 Essas tecnologias são caras e em muitos casos apenas transferem o contaminante
169 de uma fase para outra ou em outras situações

170 elas não são capazes de alcançar a completa degradação dos contaminantes tornando-os
171 ainda mais insustentáveis ao meio ambiente (SPADA et al., 2017). Os custos crescentes
172 e a eficiência limitada desses tratamentos físico-químicos tradicionais estimularam o
173 desenvolvimento de tecnologias alternativas para aplicações em campo, particularmente
174 com base nas capacidades de remediação biológica de plantas e microrganismos
175 (VARJANI, 2017).

176

177 **2.3.1 Biorremediação**

178 Quando os acidentes envolvendo derramamento de petróleo ou o descarte
179 incorreto dos resíduos dos derivados ocorrem em terra, a degradação dos hidrocarbonetos
180 por microrganismos indígenas, especificamente fungos e bactérias, ocorre naturalmente
181 através, por exemplo, de volatilização, no entanto, este é um processo lento devido à baixa
182 população microbiana em atividade. Portanto, é um desafio encontrar um método eficaz
183 e eficiente para remediar esses solos poluídos (AMYOT et al., 2019; CHEN et al., 2016).

184 Segundo Bisognin et al. (2018) para atenuar essa problemática têm sido realizadas
185 inúmeras pesquisas de remediação de sítios contaminados por hidrocarbonetos, com
186 destaque para as técnicas de biorremediação, por serem consideradas mais seguras, menos
187 onerosas e menos agressivas ao meio ambiente. Tal técnica é superior aos métodos físicos
188 e químicos de remediação de solos contaminados (ALARCON et al., 2017). Entre uma
189 variedade de métodos de remediação, a biorremediação tem sido reconhecida como uma
190 tecnologia de limpeza econômica para tratar solos poluídos e sedimentos (CHEN et al.,
191 2016).

192 O processo de biorremediação é uma transformação ou degradação mediada por
193 microrganismos de contaminantes em substâncias não perigosas ou menos perigosas. É
194 uma abordagem atraente para a limpeza de hidrocarbonetos do ambiente porque é uma
195 técnica de fácil manutenção, aplicável em grandes áreas, econômica e leva à completa
196 destruição do contaminante. A principal razão para este conceito é que a maioria das
197 moléculas no petróleo bruto e no produto refinado são biodegradáveis (CHUKWURA et
198 al., 2016).

199 A biodegradação pode ocorrer de forma intrínseca ou natural, isto é, sem qualquer
200 interferência de tecnologias ativas de remediação. Existem dois tipos principais de
201 tecnologias de biorremediação: bioaumentação e bioestimulação (CHEN et al., 2016), a
202 primeira consistindo na inoculação de microrganismos autóctones ou alóctones e a
203 segunda é a adição de nutrientes, oxigênio e surfactantes (BISOGNIN et al., 2018). A

204 bioaumentação ou bioampliação é uma das práticas mais importantes para a
205 biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos (ALARCON et al., 2017).

206 Segundo Atlas (1981), a introdução de microrganismos exógenos que sintetizam
207 os hidrocarbonetos no meio ambiente após acidentes que envolvem contaminação
208 aumenta a rapidez das taxas de biorremediação e de biodegradação de 3 a 5 vezes em
209 relação a ação apenas da natureza.

210 A remediação de sítios contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
211 (HPA) tem sido objeto de estudos significativos em todo o mundo. A taxa e extensão da
212 degradação do HPA são determinadas pelo número de anéis aromáticos presentes; HPAs
213 de alto peso molecular com quatro ou mais anéis aromáticos (por exemplo, pireno,
214 antraceno) apresentam uma biodisponibilidade baixa e são menos suscetíveis à
215 degradação microbiana devido às suas propriedades hidrofóbicas. Embora os
216 hidrocarbonetos de petróleo representem uma fonte de carbono significativa para os
217 micróbios do solo, suas altas concentrações podem levar a uma depleção de nutrientes
218 essenciais do solo, como fósforo e nitrogênio, resultando na redução do crescimento
219 microbiano e da utilização de carbono, o que dificulta o processo de biodegradação em
220 solos poluídos. Geralmente, é importante manter as características químicas, físicas e
221 biológicas ideais do solo, assim como os nutrientes essenciais, para melhorar o
222 crescimento microbiano e a eficiência de degradação (BALL et al., 2019).

223 O sucesso da biorremediação depende da biodegradabilidade inerente do
224 poluente, da acessibilidade dos microrganismos em degradar o contaminante e da
225 otimização da atividade biológica (AL-HAWASH et al., 2018). No entanto, a eficácia da
226 biorremediação através da ação microbiana é geralmente limitada pela baixa
227 disponibilidade e solubilidade de hidrocarbonetos de petróleo devido à sua
228 hidrofobicidade e adsorção em partículas do solo e ao seu intemperismo (ALARCON et
229 al., 2017).

230 Existem alguns contaminantes que são facilmente biodegradáveis por
231 microrganismos do que outros, mas no caso dos hidrocarbonetos de petróleo, muitas das
232 áreas contaminadas têm uma mistura complexa de compostos orgânicos, desta forma, a
233 maioria não será metabolizada na mesma taxa, dependendo do grau de concentração do
234 xenobiótico e da qualidade das espécies de catalisador utilizadas no processo (LUZ et al.,
235 2016).

236 Características abióticas influenciam no progresso da biorremediação, como pH,
237 umidade, temperatura e o tipo de solo. Este último influencia diretamente no processo de

238 biorremediação. Segundo estudos de caracterização físico-química de solos maranhenses,
239 há a predominância da textura arenosa. Essa textura tem como características a
240 permeabilidade, uma alta propensão à erosão e uma baixa capacidade de retenção de água
241 e nutrientes (MUNIZ et al., 2018; MIRANDA et al., 2018).

242 O pH se constitui em importante regulador da fertilidade do solo, por manter uma
243 estreita relação com a disponibilidade de cátions, saturação de bases, saturação de
244 alumínio, capacidade de troca de cátions e influenciar grandemente diferentes processos
245 e atividades no solo, tais como, precipitação, solubilidade, formação de agregados,
246 infiltração de água, atividade microbiana, etc. (MUNIZ et al., 2018).

247 Uma vez ajustados os fatores bióticos e abióticos, a biodegradação desempenha
248 um papel importante na destruição dos contaminantes. Todos os organismos vivos
249 catalisam reações metabólicas e contribuem para a atividade biótica geral, com cada
250 microrganismo ocupando um nicho específico e desempenhando funções específicas na
251 natureza. Esses processos metabólicos também participam da degradação de compostos
252 xenobióticos, que é o principal mecanismo envolvido na transformação biológica
253 (MARCO-URREA et al., 2015).

254

255 **2.4 Microrganismos Degradadores**

256 Bactérias e fungos desempenham um papel dominante nos processos de
257 biorremediação (MARCO-URREA et al., 2015). Algumas bactérias do solo são capazes
258 de produzir surfactantes que favorecem a emulsificação de hidrocarbonetos. Assim, a
259 adesão de células microbianas a substratos hidrofóbicos permite que eles sejam usados
260 como co-substrato e fonte de carbono para satisfazer o metabolismo microbiano. Os
261 biosurfactantes fazem parte de um grupo de moléculas e metabólitos secundários com
262 superfícies ativas que possuem uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica, dando-lhes
263 a capacidade de atuar na interface de diferentes compostos hidrofóbicos (ALARCON et
264 al., 2017).

265 Existem mais de 60 gêneros de bactérias aeróbias (como *Bacillus*, *Geobacillus*,
266 *Burkholderia*, *Mycobacterium* e *Ralstonia*), algumas famílias de bactérias anaeróbias
267 (como *Desulfobulbaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae*, *Anaerolineaceae*,
268 *Deferribacteres*, *Rhodospirillaceae* e *Magnetovibrio*), e uma grande número de fungos
269 ligninolíticos e não ligninolíticos (como *Bjerkandera*, *Irpex*, *Lentinus*, *Polyporus*,
270 *Penicillium*, *Aspergillus* e *Candida*) que têm a capacidade de degradar o petróleo. A
271 habilidade dos fungos em secretar enzimas, especialmente aquelas envolvidas na

272 decomposição da lignina, tem um grande efeito na degradação dos hidrocarbonetos de
273 petróleo, especialmente nos HPAs. Comparado com enzimas não específicas de fungos
274 (como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase), enzimas bacterianas são menos
275 eficazes em lidar com compostos hidrofóbicos recalcitrantes. Além disso, a estrutura das
276 hifas dos fungos lhes confere uma notável capacidade de penetrar na matriz do solo e
277 degradar os poluentes. No entanto, o uso de fungos devido ao seu crescimento lento e alta
278 necessidade de oxigênio apresenta certas limitações (MEHDI et al., 2018).

279 Devido a essas inúmeras particularidades dos fungos, a aplicação da
280 micorremediação na resolução da degradação ambiental está crescendo rapidamente,
281 apresentando-se como um método econômico de limpar locais poluídos (CHIKERE et
282 al., 2018). Micorremediação, termo descrito por Pinza et al. (1998), é o uso do sistema
283 fúngico para catalisar a destruição ou transformação de vários produtos químicos em
284 formas menos nocivas. Sabe-se que as enzimas extracelulares não específicas que são
285 secretadas pelos fungos são responsáveis pela degradação da lignina (Bar e Aust, 1994).
286 Esses mecanismos estão envolvidos na degradação de uma ampla gama de poluentes,
287 como hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs).
288 Foi relatado que muitos fungos metabolizam componentes do petróleo bruto em dióxido
289 de carbono (CO₂). Sabe-se que as frações alifáticas e algumas aromáticas são os
290 componentes mais degradáveis, enquanto as resinas e os asfaltenos são resistentes à
291 biodegradação (ATLAS, 1981; CHIKERE et al., 2018).

292 292

293 **2.4.1 Fungos Filamentosos**

294 Os fungos são provavelmente o segundo grupo mais comum de organismos, em
295 termos de biodiversidade, em nosso planeta, eles respondem por até 75% da biomassa
296 microbiana do solo e suas hifas podem se transformar em microporos entre o solo e
297 através de lacunas de ar. Estão entre os principais decompositores de polímeros vegetais,
298 como celulose, hemiceluloses e lignina. Assim como as bactérias, os fungos têm a
299 capacidade de mineralizar, liberar e armazenar vários elementos e íons e acumular
300 materiais tóxicos. A capacidade dos fungos para formar redes miceliais estendidas, a
301 baixa especificidade de enzimas catabólicas de fungos e independência do uso de
302 poluentes como substrato de crescimento, torna-os bem adaptados para a biorremediação
303 (LI et al., 2019).

304 Eles são relatados na literatura por modificar a permeabilidade do solo, troca de
305 íons do solo e desintoxicar o solo contaminado. Os micélios dos fungos são responsáveis

306 pela degradação dos poluentes. Eles secretam as enzimas extracelulares que quebram a
307 lignina, sendo estas compostos orgânicos constituídos de longas cadeias de carbono e
308 hidrogênio, estruturalmente semelhantes a muitos poluentes orgânicos. No entanto os
309 estudos envolvendo a identificação da diversidade fúngica que está envolvida na
310 biodegradação de poluentes estão tendo a devida atenção apenas na última década
311 (CHIKERE et al., 2018).

312 Os fungos também demonstraram a capacidade de degradar e mineralizar fenóis,
313 compostos fenólicos halogenados, hidrocarbonetos de petróleo, compostos aromáticos
314 policíclicos e bifenilos policlorados. Muitos pesquisadores estudaram o papel dos fungos
315 no processo de biodegradação de produtos petrolíferos e os mais comuns que foram
316 registrados como biodegradadores pertencem aos seguintes gêneros: *Alternaria*,
317 *Aspergillus*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*,
318 *Gliocladium*, *Mucor*, *Pleurotus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Rhizopus*,
319 *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Talaromyces* e *Torulopsis* (CHUKWURA et al., 2016;
320 BALL et al., 2017).

321 Outra vantagem da utilização de fungos é a relativa economia, já que eles podem
322 ser cultivados em uma série de resíduos agrícolas ou florestais baratos, como espigas de
323 milho e serragem. Mais ainda, a sua utilização é uma abordagem gentil e não agressiva
324 (CHUKWURA et al., 2016). Diante de todas as características citadas acima, os fungos
325 são amplamente sugeridos em processos de biorremediação.

326326

327327

328 **Capítulo I: Artigo a ser Submetido na Revista International Biodeterioration &**
329 **Biodegradation**

330 **Perfil da Microbiota Endógena Após Exposição a Solo**
331 **Contaminado com Resíduo de Óleo Automotivo**

332
333 O avanço da tecnologia e dos processos industriais faz com que a busca por
334 fontes de energia aconteça de forma rápida e, muitas vezes, sem mensurar suas
335 consequências. Combustíveis fósseis, especialmente produtos à base de petróleo,
336 contribuem para a fonte primária de energia para as indústrias e para a vida cotidiana em
337 todo o mundo (NAIDU et al, 2018). O petróleo e seus derivados são as principais fontes
338 de energia que, desde 1990, atenderam a mais de 30% da demanda mundial de energia
339 (SAAD et al., 2018; GARCIA, 2016).

340 Produtos petrolíferos como gasolina, diesel ou lubrificantes são usados em
341 volumes mais altos na sociedade moderna, em comparação com outros produtos químicos
342 de preocupação ecológica. O petróleo e seus derivados são liberados no meio ambiente
343 durante os processos de extração, armazenamento, transporte e produção de petróleo.

344 Alguns compostos de petróleo são conhecidos por terem efeitos carcinogênicos,
345 mutagênicos e teratogênicos (ZHANG et al., 2018). Esse disputado óleo é encontrado em
346 reservatórios onshore ou offshore e requer alta tecnologia para sua exploração.

347 O Brasil é detentor de enormes reservas marítimas e terrestres. Para que seu óleo
348 seja explorado há a necessidade de tecnologia de ponta que o país já desenvolve e
349 aperfeiçoa ao longo dos anos (PETROBRAS, 2018). Entretanto há grandes riscos
350 associados a todas as fases de processamento do petróleo, desde a exploração, passando
351 pelo refino, transporte dos derivados até o momento do descarte dos resíduos destes. A
352 contaminação oriunda do descarte incorreto afeta o meio ambiente e representa risco à
353 saúde, direto ou indireto, a todas as formas de vida no planeta Terra (VARJANI, 2017).

354 Os hidrocarbonetos de petróleo geralmente entram no meio ambiente por meio
355 de derramamentos acidentais de produtos brutos ou refinados ou por meio do descarte
356 indevido. Ambos os tipos de poluentes acarretam um perigo para o meio ambiente e
357 organismos vivos (ESPOSITO et al, 2016). Óleos lubrificantes usados por veículos
358 automotivos são especialmente perigosos no momento do descarte pois configuram como
359 resíduos de tratamento difícil devido a sua composição química (NAIDU et al, 2018).

360 Existem diversas estratégias que visam a recuperação de ambientes aquáticos e
361 terrestres contaminados com petroderivados; como as técnicas físicas, químicas e

362 biológicas. Dentre as técnicas biológicas, a biorremediação ganha destaque por conta do
363 uso de organismos biológicos para limpar a poluição química, explorando os sistemas dos
364 agentes biológicos –fungos, bactérias e leveduras. O processo reduz as concentrações e /
365 ou a toxicidade dos compostos químicos, modificando a estrutura química do poluente
366 em produtos finais inócuos. Ele se esforça para acelerar o processo de biodegradação
367 natural e restaurar as condições iniciais com impacto mínimo sobre os ecossistemas
368 existentes (BALL et al., 2017).

369 Os fungos filamentosos merecem destaque pois um de seus mecanismos de ação,
370 a excreção enzimática, possui a característica peculiar de não especificidade, permitindo
371 a degradação de uma ampla variedade de componentes do petróleo e seus derivados
372 (MARCO-URREA et al., 2015). O gênero *Penicillium* é bastante conhecido e reportado
373 na literatura por seu mecanismo de ação que possibilita uma alta capacidade de utilização
374 de hidrocarbonetos como fonte de energia (MARCO-URREA et al. 2015; VARJANI,
375 2017; AL-HAWASH et al., 2017).

376 A problemática oriunda da destinação incorreta após o uso dos derivados de
377 petróleo, e sua relação com a contaminação do solo e lençol freático, atingindo, além do
378 meio ambiente, a saúde humana, desperta a necessidade de estudos e trabalhos que
379 venham a identificar o conhecimento de métodos eficazes de recuperação dessas áreas
380 contaminadas. Diante do exposto, esse trabalho visa estudar de maneira aprofundada o
381 mecanismo da biorremediação e sua eficiência quanto à degradação de resíduo
382 automotivo.

383 **2.MATERIAL E MÉTODOS**

384 **Microrganismo**

385 Foi utilizado um fungo filamentoso identificado como *Penicillium*
386 *simplissimum*, armazenado na micoteca da Universidade Ceuma. Esse fungo foi isolado
387 de solo contaminado com agroquímico.

388 **Coleta e Caracterização Físico-química do Solo**

389 O solo usado nesse estudo foi proveniente de compostagem e livre de
390 contaminação, cedido pelo Laboratório de Práticas Ambientais da Universidade
391 CEUMA.

392 Com o objetivo de se conhecer as propriedades físico-químicas do solo foram
393 realizadas análises do mesmo para se determinar a Granulometria, Matéria orgânica
394 (MO), Potencial Hidrogeniônico (pH), Carbono orgânico (CO) e umidade (H) de acordo
395 com metodologia preconizada pelo Manual de Análises de Solos da EMBRAPA (2017).

396 **Caracterização do Resíduo**

397 Foi utilizado resíduo automotivo como fonte hidrocarbônica, cedido por oficina
398 mecânica localizada na cidade de São Luís-MA, Brasil. O resíduo foi caracterizado
399 quanto seus compostos hidrocarbônicos por Cromatografia Gasosa acoplado a
400 Espectrometria de Massa (CG/MS). Adaptado de Luz, 2010.

401 Uma amostra do resíduo foi fracionada (técnica *Clean up* de acordo com United
402 States Environmental Protection Agency – U.S EPA) em coluna vertical separativa de
403 vidro de tamanho 30mm x 10.5mm a fim de se identificar as frações de Hidrocarbonetos
404 Totais de Petróleo (HTP). A coluna foi empacotada com sílica ativada a 800°C e
405 condicionada com 20 mL de hexano. Após o condicionamento foram transferidos 20 mg
406 do extrato oleoso e eluídos com 12mL de hexano. As primeiras frações foram coletadas.
407 Em seguida, a coluna foi tratada com 15 mL 1:1 (v/v) de benzeno/hexano e foram
408 coletadas as frações seguintes. As frações foram misturadas na proporção 1;1, e a mistura
409 foi utilizada para análise de HTP.

410 **Avaliação da Atividade Biológica**

411 A atividade biológica do solo durante o processo de degradação foi avaliada por
412 meio da respiração basal do mesmo, medida a cada 7 dias durante 8 semanas. Para tal foi
413 realizada titulação volumétrica utilizando método proposto por Aleff (1995). A
414 metodologia foi realizada em microcosmos contendo o solo, umidade ajustada e 250µL
415 de óleo lubrificante contaminado. Para avaliação do Dióxido de Carbono (CO₂)
416 demandado foram colocados nos frascos pequenos recipientes contendo 40ml de
417 Hidróxido de Sódio (NaOH). Durante o período de incubação (8 semanas), o conteúdo
418 dos recipientes foi regularmente substituído e, após a adição de 10 ml de Brometo de
419 Cloro (BaCl₂) e 2 gotas de fenolftaleína, titulado em Ácido Clorídrico (HCl), para
420 determinar as concentrações de CO₂. A taxa de respiração em mg de C-CO₂ evoluído foi
421 calculada por meio da equação 1:

422 4
$$C (Resp) = (B - V) \times M \times 6 \times \left(\frac{V_1}{V_2}\right) \text{ equa. 1}$$

423 2
424 2

423 Onde B é o volume de HCl usado para titular o branco, V o volume de HCl utilizado
424 para titular a amostra, M a molaridade real de HCl, 6 é a massa atômica do C (12) dividida
425 pelo número de mols de CO₂ que reagem com o NaOH (2), V1 a quantidade de NaOH
426 usado nos frascos e V2 a quantidade de NaOH usada na titulação.

427 **Identificação Molecular**

428 Foram realizadas duas identificações moleculares do DNA total do solo para
429 bactérias e fungos; uma no T0 (início, dia 01) e outra no T4 (final, dia 60) no experimento
430 em solo, com a finalidade de identificar as bactérias e fungos que atuaram em conjunto
431 com o microrganismo inoculado.

432 Foram realizados os ensaios moleculares de amplificação e sequenciamento
433 genômico da região 16S do DNA ribossomal bacteriano (rDNA) e da região ITS para
434 fungos. A extração de DNA do solo foi realizada através do uso de Kit de extração
435 (FastDNA® SPIN Kit for Soil) da BIO-101- Califórnia, EUA) baseando-se na extração
436 direta. Amostras de 0,5g de solo em solução fisiológica foram previamente
437 homogeneizadas e utilizadas para a extração de DNA nesse kit. As amostras foram
438 filtradas e em seguida recolhidas em tubos de Eppendorf para aplicação das sequências
439 de reagentes do *Kit* de extração FastDNA®.

440 A pureza do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1%
441 (m/v). Amostras de DNA (5 µL) foram misturadas com 5µL de corante para eletroforese
442 e aplicadas nos géis. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 90 V em tampão
443 TBE 0,5x pelo período de uma hora e meia e, em seguida, corados com brometo de etídio
444 e fotografados sob luz U.V. em um sistema de captura de imagem (IMAGO, B & L
445 Systems). Posteriormente, foi realizado o sequenciamento dos fragmentos obtidos.

446 446

447 **Avaliação da toxicidade**

448 A fim de avaliar os danos ambientais causados pelo óleo lubrificante contaminado
449 e, possivelmente, pelos compostos intermediários de degradação foram realizados testes
450 de ecotoxicidade.

451 451

452 *Modelo Allium cepa*

453 A toxicidade do tratamento ao longo do período do experimento foi avaliada
454 através dos ensaios com sementes de *Allium cepa* (variedade Baia Periforme) submetidas,
455 continuamente, à germinação em placas de Petri contendo substrato extraído do solo em
456 análise. Após este período foram coletadas raízes com aproximadamente 1,5 cm de
457 comprimento, sendo as mesmas fixadas, em Carnoy 3:1. O meristema da raiz foi utilizado
458 para confecção das lâminas e avaliação do potencial tóxico das amostras, pelos testes de
459 aberração cromossômica e aberração nuclear. As lâminas foram cuidadosamente
460 preparadas, após uma lavagem cuidadosa do material, como descrito por Matsumoto et
461 al. (2006) e coradas pela reação de Feulgen (MELLO & VIDAL, 1978), conforme
462 descrito, os meristemas previamente fixados em Carnoy (3:1) foram lavados com água
463 destilada, em três baterias de cinco minutos cada. O material foi então hidrolizado em
464 HCl 1mol/L a 60°C por 10 minuto, seguidos de novos banhos de cinco minutos em água
465 destilada. O excesso de água foi removido das raízes com papel de filtro, as raízes foram
466 transferidas para uma câmara escura em frascos contendo reativo de Schiff, por
467 aproximadamente 2h. Após este período, as sementes foram novamente lavadas, até a
468 total retirada do reagente. As lâminas foram então preparadas com uma gota de carmin
469 acético (2%) e posteriormente, recoberta com uma lâminula. As lamínulas foram
470 cuidadosamente removidas em nitrogênio líquido e montadas em Entelan para serem
471 examinadas em microscópio de luz.

472 Através da análise microscópica, foram visualizadas ao menos 2.000 células de
473 cada tratamento para um resultado estatístico mais preciso. Assim possibilitando a
474 identificação de aberrações cromossômicas (efeito genotóxico) e micronúcleos (efeito
475 mutagênico) em todos os estágios da mitose (interfase, prófase, metáfase, anáfase e
476 telófase).

477 Com o objetivo de investigar se o óleo lubrificante teria efeito citotóxico, nesta
478 etapa também foi calculado o Índice Mitótico através da equação 2.

479 479

480 4
$$IM (\%) = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{número total de células}} \times 100 \quad \text{equa. 2}$$

8
0

481 4
8
1

482 Os resultados obtidos foram comparados ao controle negativo por meio do software
483 *GraphPad Prism* admitido um nível de significância de $p < 0,05$.

484 484

485 485

486 *Toxicidade Aguda com a larva de Tenebrio molitor*

487 A toxicidade aguda foi avaliada empregando modelo *in vivo* da larva
488 *Tenebrio molitor*, onde com auxílio de uma seringa, foram inoculados 10 µL do controle
489 com Tampão Salino-Fosfato (*Phosphate buffered saline* –PBS) em 10 larvas e 10 µL do
490 óleo lubrificante extraído do solo em mais 10 larvas para cada tempo que deseja se avaliar
491 (T0-1° dia, T1- 15° dia, T2- 30° dia, T3-45° dia e T4-60° dia). Todas as larvas foram
492 acondicionadas em placas devidamente identificadas, onde foram mantidas em
493 temperatura ambiente por um período de dez dias e a cada 24h foram quantificadas as
494 larvas mortas ou que não responderam a estímulos. Os resultados obtidos foram
495 comparados, observado a discrepância entre os dados analisados, através de teste de
496 significância ($p < 0,05$), além disso, foi montado gráfico da curva de sobrevivência usando
497 o teste de Kaplan-Meier utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

498 498

499 **Análises estatísticas**

500 Os resultados serão analisados estatisticamente quanto a diferenças significativas
501 por meio do teste de Log Rank utilizando análise de variância (ANOVA) para verificar a
502 associação entre as variáveis. O nível de correlação entre os parâmetros testados será
503 avaliado de acordo com o Índice de Correlação de Spearman. O nível de significância de
504 95% será considerado significativamente diferente ($p < 0,05$).

505 505

506 **RESULTADOS**

507 **Caracterização Físico-química do Solo**

508 A Tabela 1 apresenta a caracterização físico-química do solo usado nesse estudo,
509 podendo ser classificado fisicamente com base na granulometria como Franco Arenoso
510 de acordo com o Diagrama Triangular de Feret ou Triângulo de Classe Textural. Quanto
511 ao pH, foi avaliado em 6,8. O solo apresentou com teor de matéria orgânica mediano
512 (51,98%) e baixa quantidade de carbono orgânico (22,75%).

513 513

514 **Tabela 1:** Caracterização físico-química do solo usado no estudo

Caracterização	%
----------------	---

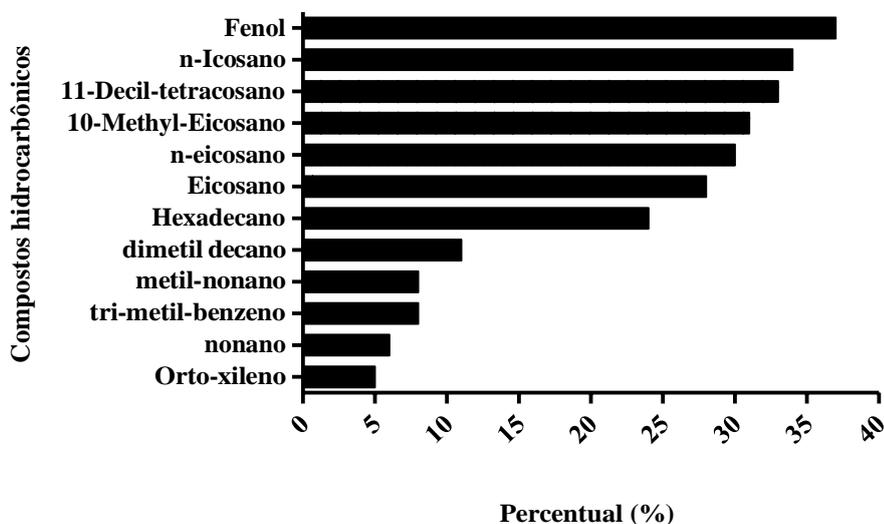
MO	51,98
U	34,00
CO	22,75
Areia	81,00
Argila	19,00

515 515

516 **Caracterização do resíduo**

517 A caracterização do resíduo quanto aos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo por
518 meio de Cromatografia gasosa pode ser visualizada na Figura 1.

519 Observa-se que o composto predominante é o fenol constituindo 38% de todo
520 resíduo, seguido por compostos hidrocarbônicos constituídos por ligações secundárias
521 com dez ou mais átomos de carbono. Os compostos aromáticos como orto-xileno e tri-
522 metil-benzeno, constituídos de anel benzênico, estão entre os que apresentam menores
523 percentuais na composição do resíduo.



524 524

525 525

526 **Figura 1:** Compostos de Petróleo majoritários presentes no Resíduo de Óleo

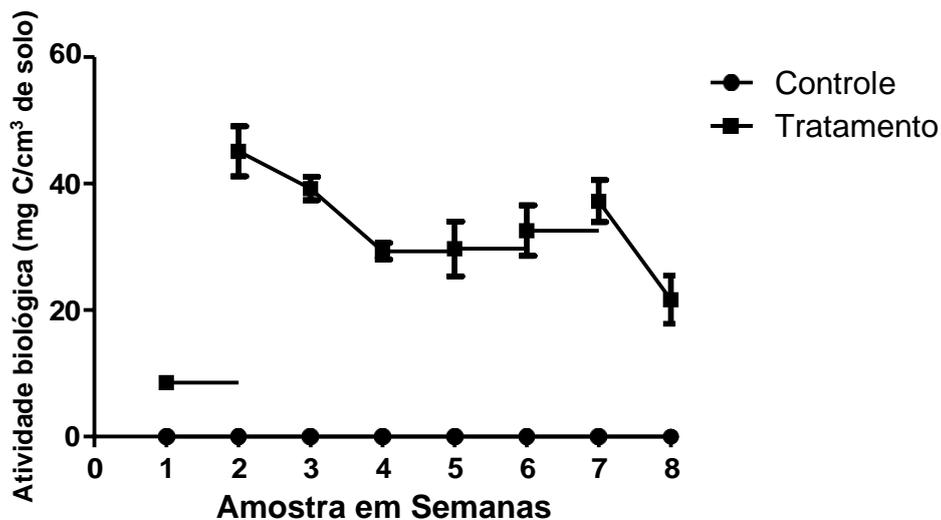
527 Automotivo.

528 528

529 **Ensaio de biodegradação e Avaliação da atividade biológica**

530 Na figura 2 abaixo, pode-se observar o perfil da atividade biológica por meio da
 531 liberação de Carbono (C) em mg/cm^3 da primeira semana até a oitava, período de
 532 tratamento do solo contaminado.

533 Nos tratamentos avaliados (T1, T2 e T3), observou-se que a atividade biológica
 534 se dividiu em três fases: um crescimento da primeira para a segunda semana, após tal
 535 comportamento a atividade biológica entra na segunda fase apresentando níveis
 536 praticamente constantes e na última fase já na oitava semana esses níveis decaem. As
 537 demandas de CO_2 nos frascos variaram de $8,568 \text{ mg}/\text{cm}^3$ a $49,694 \text{ mg}/\text{cm}^3$.



538 538

539 **Figura 2:** Taxa de respiração basal dos microrganismos nos reatores de solo contaminado
 540 com óleo usado no período de 8 semanas.

541 541

542 Perfil Microbiológico

543 O perfil molecular do solo foi analisado no início (dia 1) e ao final (dia 60)
 544 do tratamento de bioaugmentação. A importância de tais análises é evidenciada nos
 545 resultados abaixo que apontam a abundância (Tabela 2) e riqueza (Tabela 3) de cada
 546 amostra tanto para fungos quanto para bactérias.

547 **Tabela 2:** Quantidade total de microrganismos identificados na análise molecular para
 548 fungos e bactérias

	Quantidade Total de Microrganismos	
	T0	T4
Bactérias	6.687	3.934
Fungos	63.999	78.558

549

	Bactérias		Fungos	
	T0	T4	T0	T4
Ordem	27	29	21	19
Família	81	78	34	31
Gênero	215	188	57	66
Espécie	596	467	114	130

550 **Tabela 3:** Quantidade de microrganismos classificados por ordem, família, gênero e
551 espécie para fungos e bactérias das amostras T0 e T4.

552

553 Na Tabela 2 percebe-se que a quantidade total de bactérias presentes na amostra
554 T0 é 9,57 vezes menor que a quantidade fungos, já em T4 o número de bactérias diminui
555 e passa a ser 19,96 vezes menor que os fungos. Outro ponto a se observar na Tabela 2 é
556 que em T4 é perceptível que a quantidade de fungos em relação a T0 aumenta 18,54%.

557 Os gêneros *Aspergillus spp.*, *Thermomyces spp.*, *Lomentospora spp.*, *Scytalidium*
558 *spp.*, *Stachybotrys spp.* e *Scedosporium spp.* obtiveram maior abundância, representando
559 85% da amostra do dia 1 do tratamento.

560 A Tabela 3 mostra que apesar do maior número de fungos presentes na amostra,
561 mas a diversidade de espécies é menor que nas bactérias. Outro fator a se observar é que
562 o número de espécies de bactérias diminui no decorrer do tratamento. Alguns gêneros
563 fungicos são detectados apenas em T4, como é o caso do *Penicillium spp* e o *Thricoderma*
564 *spp.*

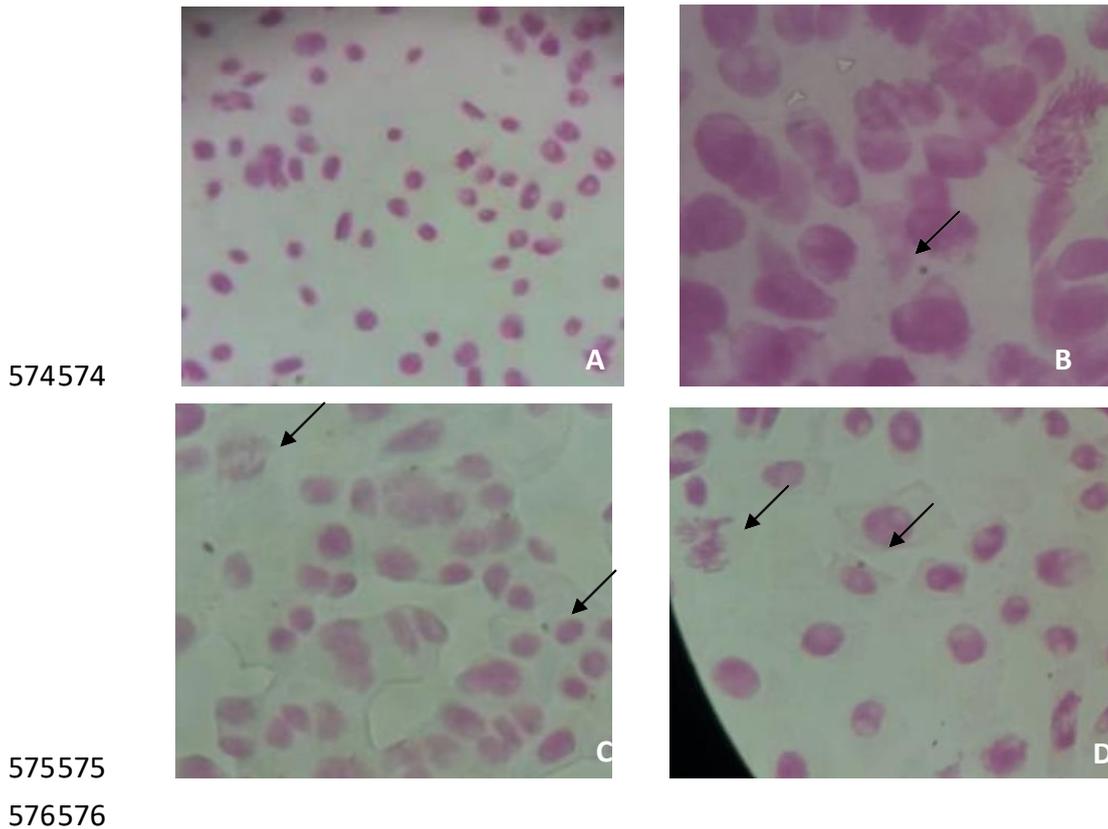
565565

566 **Avaliação da Toxicidade**

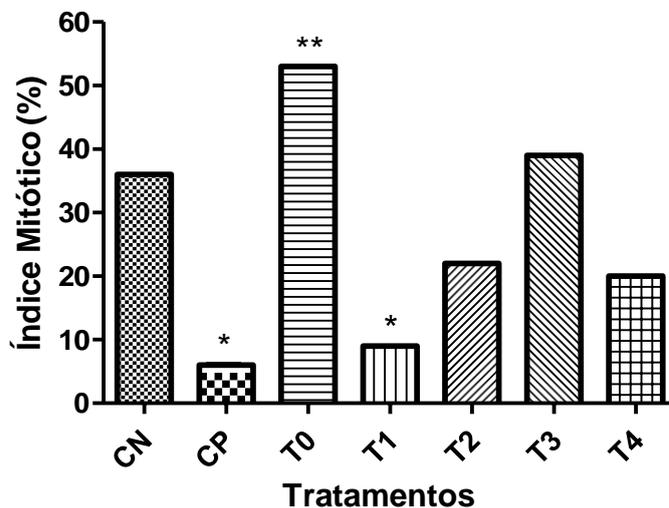
567 **Citotoxicidade *Allium cepa***

568 A figura 3 mostra as células em diferentes tratamentos evidenciando aqueles em
569 que apareceram Micronúcleos e Aberrações cromossômicas. Já na figura 4 e Tabela 4 são
570 mostradas por meio de um gráfico de porcentagem o Índice Mitótico das células ao
571 decorrer de 8 semanas, colocando de acordo com a estatística quais tratamentos foram
572 afetados significativamente quanto a divisão celular no decorrer do tempo.

573573



577 **Figura 3:** A- Tratamento T0 no dia 1 com células saudáveis; B- T2 com um Micronúcleo
 578 (MN); C- T3 com MN e Anáfase com Ponte; D- C-Metáfase com Quebra e MN. As setas
 579 na figura indicam as aberrações.



580
 581 **Figura 4** – Percentual do Índice Mitótico dos Controles e após 8 semanas de
 582 Tratamentos do Resíduo de Óleo Usado em Oficina Mecânica.
 583 ** $p < 0.05$; * $p < 0.01$

584 **Tabela 4:** Índice de Aberrações

Controle	Controle	T0	T1	T2	T3	T4
----------	----------	----	----	----	----	----

	Negativo		Positivo				
Ponte	0	0	0	0	0	0,00124	0,00187*
Quebra Cromossômica	0	0,00090	0	0	0,00093*	0,00083	0,00037*
Perda	0	0	0	0	0,00046*	0,00041	0,00037*
Broto	0	0	0	0,00050	0	0	0
Célula Multipolar	0	0	0	0	0	0	0,00150*
C-Metáfase	0	0	0	0	0	0	0
Poliploide	0	0	0	0	0,00510*	0	0,00075*
Micronúcleo	0	0,01625**	0	0,00050**	0,00325*	0,00124**	0,00375**

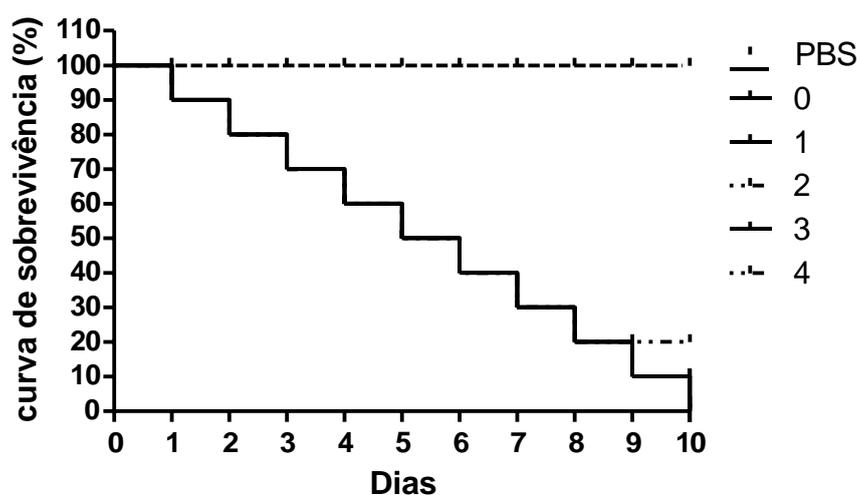
585 *P<0.05 **P<0.01

586

587 Toxicidade Aguda com a larva de *Tenebrio molitor*

588 Os perfis de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* quando submetidas ao
589 contato com o resíduo in natura (T0) e os resíduos tratados podem ser visualizados na
590 Figura 5. Os resultados demonstraram que a taxa de sobrevivência das larvas frente ao
591 resíduo in natura e todos os tratamentos com exceção do T2 foi de 0%, ou seja, nenhuma
592 larva sobreviveu ao final dos dez dias de experimento.

593 **Figura 5:** Percentual de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* ao longo de 10 dias.



594

595 A análise estatística pelo teste de Log Rank foi realizada para avaliar o nível de
596 relação entre as amostras quanto ao parâmetro toxicidade aguda. Após o ensaio de

597 toxicidade aguda, foi constatado que existe uma diferença estatística significativa ($p <$
598 $0,05$) entre os tratamentos e o PBS com $p < 0.001$. Associando esse dado com o
599 quantitativo de sobrevivência das larvas pode-se concluir que todos os tratamentos
600 apresentam toxicidade aguda.

601601

602 **DISCUSSÃO**

603 Nesse trabalho se observou que a comunidade microbiana presente na amostra de 604
solo foi capaz de utilizar o resíduo de óleo automotivo adicionado ao experimento como
605 fonte de carbono, isto se deve ao fato da capacidade desses organismos se adaptarem as
606 condições diferenciadas do solo contaminado por compostos tóxicos por possuírem um
607 aparato metabólico que permite a produção de compostos como enzimas e surfactantes
608 que permitem a quebra minimizando a recalcitrância dos compostos hidrocarbônicos.
609 (Gusmão et al. 2011; Santos, 2019). Estudos mostraram que vários contaminantes
610 perigosos podem ser degradados por fungos. Alguns gêneros são relatados com mais
611 frequência pela literatura como os *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cunninghamella*
612 *echinulata*, *Talaromyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Gliocladium* spp., *Penicillium* spp.,
613 *Cladosporium* spp. e *Geotrichum* spp. (Al-Hawashi, 2017; Atlas, 1981, Chikere, 2018).

614 Para Montes et al. (2017) a comunidade microbiana endógena de um solo é capaz
615 de degradar compostos hidrocarbônico desde que as condições sejam propícias para isso.
616 Caso o solo necessite de um enriquecimento um dos elementos que podem ser
617 adicionados a fim de possibilitar melhores resultados é o Fósforo (P). A adição de
618 nutriente no solo com a finalidade de possibilitar uma melhor ação microbiana é uma
619 técnica denominada bioestimulação e é utilizada em tratamento de solo contaminado. Ball
620 et al. (2019) observaram que a comunidade bacteriana presente no solo elevou sua
621 atividade de biodegradação após a adição de vegetais como estimulantes, contudo o
622 estudo alerta que há o risco dos compostos intermediários tornarem-se mais tóxicos que
623 as moléculas originais, como ocorreu no presente trabalho.

624 Um fator que influencia no sucesso de um biotratamento é o tipo de solo que se
625 trabalha. Lima et al. (2019) e Camacho-Montealegre et al. (2019) observaram que
626 algumas propriedades do solo se sobressaem na avaliação da qualidade do mesmo, sendo
627 a percolação e a capacidade de adsorção umas das principais variáveis que afetam o
628 processo de degradação, pois interfere na disponibilidade do substrato aos
629 microrganismos. O pH é outro fator importante, pois ele influencia diretamente na
630 comunidade microbiana. Fungos conseguem crescer e se adaptar a pH mais ácido que as

631 bactérias, além de tolerar altas variações de pH, podendo crescer na faixa de pH que
632 variam de 1,5 a 11.

633 A análise molecular evidenciou mudanças na comunidade microbiana quando se
634 compara o início e o fim do tratamento. Quando o grupo microbiano estudado eram os
635 fungos, a quantidade inicial foi 18,54% menor que a final, sugerindo que o contaminante
636 presente no solo e seus metabólitos de degradação selecionaram os organismos resistentes
637 a nova condição, permitindo que eles se sobressaíssem em relação aos demais, além do
638 que possibilitou a detecção de outros gêneros não identificados inicialmente, aumentando
639 a riqueza da amostra. Este fato pode estar diretamente relacionado a capacidade dos
640 fungos em produzir enzimas oxidativas, que permite metabolizar o contaminante e utilizar
641 como fonte nutricional (Ji et al., 2016).

642 Montes et al. (2017) observaram que a adição de gasolina a diferentes tratamentos
643 com inóculos de distintas bactérias causou mudanças na comunidade presente
644 inicialmente no estudo. Em complemento, Camacho-Montealegre et al. (2019)
645 perceberam que novas condições impostas ao ambiente por contaminação de petróleo
646 bruto selecionaram negativamente populações microbianas, causando a diminuição ou
647 eliminação delas, contudo constataram também que as novas condições podem funcionar
648 como estimuladoras para o desenvolvimento de outras populações.

649 Neste trabalho observou-se a presença de gêneros de fungos filamentosos
650 patogênicos. Este fato é preocupante pois sugere que estes microrganismos podem estar
651 se sobressaindo aos demais, sendo predominante em uma comunidade microbiana.

652 Fungos patogênicos como *Lomenstopora prolificans* são encontrados tanto no
653 início como no final do tratamento, sendo neste último em maior número, fato
654 preocupante tendo em vista que esse fungo é reportado na literatura como multirresistente
655 e de difícil tratamento quando causa doenças em pessoas imunossuprimidas (Tintelnot et
656 al., 2015). Além do que *Aspergillus fumigatus* e *Scedosporium apiospermum*, organismos
657 patogênicos também repetem o mesmo comportamento do fungo citado anteriormente,
658 evidenciando que a nova condição imposta ao ambiente foi propícia ao desenvolvimento
659 desses organismos que causam doenças em seres humanos, demonstrando a
660 contaminação ser um problema ambiental e também um problema de saúde.

661 No perfil molecular do tratamento da amostra T4 são identificados gêneros como
662 *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.* e *Trichoderma spp.* que não foram encontrados na análise
663 do primeiro dia, corroborando com os trabalhos que os apontam como potenciais
664 degradadores de petroderivados (Hijri et al., 2017; Maranhão e Santos, 2018). Resultado

665 este complementado pela atividade biológica que mostra uma adaptação da comunidade
666 ao contaminante, sugerindo que a população fungica foi a que mais se adaptou.

667 O teste de toxicidade com as larvas *Tenébio molitor* mostrou que o contato de
668 organismos detentores de estrutura semelhante a de seres humanos com o resíduo de óleo
669 lubrificante usado/contaminado causam riscos de intoxicação aguda. Complementando
670 esse resultado o teste *Allium cepa* mostrou o aparecimento de alterações cromossômicas
671 ao longo do período do tratamento de biorremediação, com agravamento dessas
672 aberrações após as 8 semanas do processo, onde foram percebidos em maior quantidade
673 micronúcleos (MN), que podem passar de geração para geração por meio da divisão
674 celular e causar alterações mutagênicas nos organismos vivos que entrarem em contato
675 com aquele ambiente contaminado.

676 Dentre todos os compostos constituintes do resíduo é importante destacar a
677 toxicidade do fenol, que é o composto predominante, por ter sua estrutura química
678 formada por um anel benzênico ligada a duas hidroxilas este composto é extremamente
679 estável e de difícil degradação pela maioria dos organismos biológicos que possuem essa
680 capacidade. Além do fenol, os demais compostos aromáticos presentes no resíduo
681 contribuem para a toxicidade elevada dele. O que pode explicar o aumento da comunidade
682 fungica ao decorrer do tratamento, pois estes conseguem se adaptar melhor a
683 hidrocarbonetos aromáticos que outros organismos, como as bactérias por exemplo.

684 De acordo com Bidoia et al. (2019) é possível sugerir que os brotos nucleares
685 encontrados no presente estudo possam estar relacionados a compostos hidrocarbônicos
686 específicos, como o Benzeno e o Xileno presentes na composição do contaminante aqui
687 avaliado. De acordo com o resultado da composição do óleo lubrificante, a presença de
688 compostos pesados, com cadeias carbônicas grandes e aromáticos pode ser explicada por
689 se tratar de um resíduo de óleo que já passou por um processo térmico quando utilizado
690 em motor de automóvel. Os brotos nucleares são alterações genotóxicas que podem ser
691 derivadas de eliminação de material genético amplificado, quebras cromossômicas,
692 pontes e rearranjos cromossômicos (Serrano-Garca e Montero-Montoya 2001; Shimizu et
693 al. 2000; Fernandes et al. 2007).

694 Mazzeo (2009) constatou que o processo de biodegradação por microrganismos,
695 da mistura aquosa do BTEX foi eficiente na diminuição dos efeitos genotóxico e
696 mutagênico, indicando que os compostos da mistura foram degradados em metabólitos
697 não tóxicos para as células. Em contrapartida, Machado (2013) obteve resultados
698 semelhantes ao deste estudo ao testar efluente proveniente do separador de água e óleo

699 do Terminal Petroquímico, onde foi evidenciado que derivados do petróleo apresentam
700 potencial risco a danos celulares e genéticos. Marcano et al. (2004) e Chandra et al. (2005)
701 também usaram MN e Aberrações Cromossômicas como parâmetros de mutagenicidade.
702

703 **4 CONCLUSÕES**

704

705 De acordo com o estudo, ficou comprovado por meio da análise metagenômica
706 que o fungo inoculado no dia 1 do tratamento não apareceu ao final do mesmo, resultado
707 esse que aponta que em certas situações o processo de bioaumentação não se faz
708 necessário, tendo assim, nos próprios microrganismos endógenos uma comunidade capaz
709 de se adaptar melhor a nova condição estabelecida e predominar quando comparada a
710 organismos inoculados. Além disso, o tratamento de bioaumentação aplicado em 8
711 semanas se mostrou insuficiente para tornar o composto menos tóxico, sugerindo que um
712 maior período de tempo poderia ser mais indicado para obtenção de resultados
713 satisfatórios.

714 A riqueza dos solos brasileiros é tamanha que, em determinados casos de
715 contaminação, a microbiota local é capaz de degradar o contaminante desde que
716 estimulada da maneira correta. Outro ponto relevante levantado nesse estudo foi que os
717 bioprocessos para contaminantes como o óleo lubrificante usado/contaminado podem não
718 ser a melhor opção, já que há a possibilidade de transformar o composto inicial em
719 metabólito secundário mais tóxico. Tal resultado destaca a importância do descarte
720 correto desse resíduo perigoso, pois fica evidente o problema não somente da
721 contaminação do solo e, conseqüentemente, de lençóis freáticos com composto de tão
722 difícil tratamento, quanto o problema causado às pessoas que entram em contato com esse
723 ambiente que correm riscos de desenvolverem mutações celulares.

724

5 REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 10.004. **Resíduos Sólidos -
classificação.** Rio de Janeiro, 2004.

ALARCON, A. et al. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils
polluted with weathered petroleum hydrocarbons. **Applied Soil Ecology**, p.17-134. 2017

ALEF, K.; NANNIPIERI, D. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry.**
London, Inglaterra. 1995.

- AL-HAWASH, A.B.; ALKOORANEE, J.T.; ZHANG, J.; SUN, J.; ZHANG, X.; MA, F. Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq, **Biotechnology Reports**, p. 1-18, 2017.
- 725 AMYOT, M. Local fungi, willow and municipal compost effectively remediate
726 petroleum-contaminated soil in the Canadian North. **Chemosphere**, p. 47-55. 2019.
- 727 ANP (**Agência Nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis**). Disponível em:
728 <http://www.anp.gov.br/?pg=57890>. 2011;2018.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiology Review**, n. 45, p. 80-209, 1981.
- BALL, A.S. et al. Effect of biostimulation on the distribution and composition of the microbial community of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated landfill soil during bioremediation. **Geoderma**, v. 338, p. 216-225, 2019.
- BALL, A.S.; POI, G.; ABURTO-MEDINA, A.; MOK, P.C. Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium. **Ecological Engineering**, v.102, p. 64-71, 2017.
- BIDOIA, E.D. Comparative study of phytotoxicity and genotoxicity of soil contaminated with biodiesel, diesel fuel and petroleum. **Ecotoxicology**, v. 28, p. 449-456, 2019.
- BISOGNIN, R. P et al. Analysis of microbial potential of a biopile in soil bioremediation contaminated by petroleum hydrocarbons. **Engenharia Sanitaria Ambiental**, v.23, n.3, p.517-526, 2018.
- CAMACHO-MONTEALRE, C.M. et al. Microbial diversity and bioremediation of rhizospheric soils from Trindade Island – Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 236, p. 358-354, 2019.
- CHEN, L. et al. Bioaugmentation and bioestimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p.158-164, 2016.
- CHIKERE, C.B et al. Fungal diversity associated with crude oil-impacted soil undergoing in-situ bioremediation. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 10, p 148-152, 2018.
- CHUKWURA, E. I. Hydrocarbon Degradation Potentials of Fungi Associated with Oil-Contaminated Soil from Selected Mechanic Workshops in Awka, Anambra State, Nigeria. **Frontiers in Environmental Microbiology**, v.6, p. 38-44, 2016.
- CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução n.º 362 de 2005.
- ESPOSITO, D. H.; AGNELLO, M.; BAGARDC, E.D. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation,

phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. **Science of the Total Environment**, p. 693–703, 2016.

FERNANDES, T.C.C., MAZZEO D., MARIN-MORALES, M. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic Biochem Physiol**, v. 88:252–259, 2007.

729 FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, **Hereditas**,
730 v.102, p. 99-112, 1985.

GARCIA, C.; BATISTA, F.; HERNANDEZ, T.; MORRIS, B.E.L. The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. **Journal of Proteomics**, v.135, p.162-169, 2016.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v. 99, p. 273- 291, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

GODOY, P.; GARCIA-ROMERA, I.; ARANDA, E. Exploring the potential of fungi isolated from PAH-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. *Environmental Science Polluted Research*, 2016.

GUSMÃO, N.B.; SILVA, M.G. ; ALMEIDA, D. G. ; **MIRANDA, R. C. M. ; MACIEL, C. C. S.** Produção da Enzima Lignina Peroxidase por Fungos Filamentosos Utilizando Óleo Diesel como Substrato. *Scientia Plena*, v. 7, p. 1-7, 2011.

INGARAMO, O.E. Indicadores físicos de la degradación del suelo. La Coruña, Universidade da Coruña, 2003. 298p. (Tese de Doutorado).

JI, Y. et al. Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 414–424, 2016.

LI, X.; LI, Y.; ZHAO, X.; ZHANG, X.; ZHAO, Q.; WANG, X.; LI, Y. Restructured fungal community diversity and biological interactions promote metolachlor biodegradation in soil microbial fuel cells. **Chemosphere**, 2019.

LIMA, C.G.R.; BERTAO, E. F. ; RICARDI, A. M. Análise Multitemporal do Uso e Cobertura da Terra e Potencial de Degradação do Solo na Microbacia do Córrego Laranja Azeda Município de Pereira Barreto, SP. **REVISTA CIENTÍFICA ANAP BRASIL**, v. 12, p. 54-71, 2019.

LUZ, E.L.P. et al. Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation. **Geama Journal**, p. 482-491, 2016.

LUZ, L.P. Estudo da viabilidade de uso da técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCXGC) no estudo de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) em sedimentos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Orientador: Elina Bastos Camarão, 2010.

MA, F.; AL-HAWASH, A. B.; ZHANG, X. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v.44, p. 71–76, 2018.

MACHADO, A. **Avaliação do Potencial Mutagenico do Efluente do Terminal Petroquimico Almirante Soares Dutra Atraves do Sistema de Teste Allium cepa**. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. 16

MANUAL DE MÉTODOS DE ANÁLISE DE SOLOS, EMBRAPA, 3ª Ed, Brasília, 2017.

MARANHO, L.T.; SANTOS, J.J. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 104-113, 2018.

MARCANO, L., CARRUYO, I., DEL CAMPO, A., MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa*. **Environmental Research**, v. 94, 221–226, 2004.

MARCO-URREA, E. et al. Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. **New Biotechnology**, 2015.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARINMORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148- 158, 2006.

MAZZEO, D.; FERNANDES, T.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85:13–18, 2011.

MELO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência E Cultura**, v. 30: 665-676, 1978.

MIRANDA, R.C et al. Biodegradação de óleo diesel por leveduras isoladas nas proximidades do porto de suape, no estado de Pernambuco – Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 147-152, 2007.

MONTES, E.R, TOTOLA, M.R. A new biostimulation approach based on the concept of remaining P for soil bioremediation. **Journal of environmental management**, v.207, p. 417-422. 10.1016/j.jenvman.2017.11.061. 2017.

MONTES, E.R. et al. Changes in the microbial community during bioremediation of gasoline-contaminated soil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 48, p. 342-351, 2017.

NAIDU, R. et al. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 175–193, 2018.

PETROBRAS – **Petróleo Brasileiro S.A.** Disponível em <http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-deatuacao/exploracao-e-producao-de-petroleo-e-gas/pre-sal/>, 2018.

Protocolo de clean-up de amostras, **United States Environmental Protection Agency – U.S EPA**

REICHERT, J.M.; REINERT, D.J. & BRAIDA, J.A. Qualidade do solo e sustentabilidade

SANTOS, S.C. Biosurfactantes: potenciais agentes biorremediadores Biosurfactants: potential bioremediation agentes. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n 5 Edição Especial, 2019.

SERRANO-GARCA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental Mol Mutagenicity**, v. 38,38–45, 2001.

SHIMIZU N, SHIMURA T, TANAKA T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat Res Mol Mech Mutagen**, v. 448, 81–90, 2000.

TINTELNOT, K. et al. Prevalência de *Scedosporium* espécies e *Lomentospora prolificans* em pacientes com Fibrose fibrosis num ensaio multicêntrico por utilização de um meio seletivo. **Journal of Cistics Fibrosis**, 14, 237-241, 2015.

VARJANI, S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p.277–286, 2017.

SAAD, S.M et al. Planning and optimising petroleum supply chain. *Procedia Manufacturing*, v. 17, p. 803–810, 2018.

ZHANG, M.; GAO, S.; LIANGA, J. Petroleum contamination evaluation and bacterial community distribution in a historic oil field located in loess plateau in China. **Applied Soil Ecology**, 2018.

Atividades Desenvolvidas no Período

- Artigo intitulado **Optimization of Bioremediation of Soil Contaminated with an Automotive Oil Residue by Fungi** aceito para análise na revista International Journal of Microbiology
- Artigo publicado na Revista Ceuma Perspectivas
- Artigo Aceito na Edição Especial da Revista Ciência e Natura
- Capítulo de livro
- Trabalho intitulado “Biodegradação de Hidrocarbonetos em Solo de Campo Petrolífero Contaminado com Diferentes Concentrações de óleo Cru e Sal” apresentado no Simpósio de Integração Acadêmica da Universidade Federal de Viçosa.
- Participação na Comissão Organizadora do Fórum de Meio Ambiente do Estado do Maranhão, Universidade CEUMA.
- Participação do Fórum de Meio Ambiente do Estado do Maranhão
- Registro de Patente

ANEXO A: Normas para submissão na Revista

GUIA PARA AUTORES

.

INTRODUÇÃO

Objetivos e escopo

A International Biodeterioration & Biodegradation publica artigos e revisões originais de pesquisa

causas biológicas de deterioração ou degradação.

- As causas podem ser macro ou microbiológicas, cujas origens podem ser aéreas, aquáticas ou terrestres.
- Os efeitos podem incluir corrosão, incrustação, podridão, decomposição, infecção, desfiguração, toxificação, enfraquecimento ou processos que liquefazem, desintoxicam ou mineralizam.
- Os materiais afetados podem incluir materiais naturais, sintéticos ou refinados [como metais, hidrocarbonetos e óleos, alimentos e bebidas, produtos farmacêuticos, celulose e madeira, plásticos e polímeros, fibras, papel, couro, resíduos ou qualquer outro material de importância comercial]; e estruturas ou sistemas [como edifícios, obras de arte, equipamentos de processamento etc.], bem como resíduos perigosos e inclui aspectos ambientais e de saúde ocupacional resultantes das atividades dos agentes biológicos descritos acima.

Documentos sobre todos os aspectos de causa, modo de ação, tratamento, proteção e prevenção, análise e

testes, desintoxicação, modernização, implicações comerciais, biocidas e substitutos e áreas relacionadas

são bem-vindos. Entretanto, trabalhos estritamente relacionados a aspectos de engenharia de biotecnologia

processos e aqueles que visam desenvolver ou avaliar modelos preditivos baseados em matemática

na concepção de processos biotecnológicos são excluídos.

Biodeterioração Internacional e Biodegradação é o Jornal Oficial das Sociedade de Biodeterioração e Biodegradação.

Tipos de papel

As contribuições podem ser artigos originais, artigos de revisão, estudos de caso, comunicações breves, relatórios de conferências ou reuniões, resenhas de livros ou notícias das próximas reuniões. O assunto e o conteúdo

Os artigos de revisão devem ser discutidos com os Editores antes da submissão à revista.

Observe que papéis de natureza rotineira e sem originalidade, novidade e exclusividade não serão

ser aceito para publicação.

Em geral, o manuscrito não deve exceder 10.000 palavras, ou cerca de 20 páginas impressas.

Lista de verificação de envio

Você pode usar esta lista para realizar uma verificação final do seu envio antes de enviá-lo ao diário para

Reveja. Consulte a seção relevante neste Guia para autores para obter mais detalhes.

Verifique se os seguintes itens estão presentes: Um autor foi designado como o autor correspondente, com detalhes de contato: • Endereço de e-mail • Endereço postal completo Todos os arquivos necessários foram enviados: Manuscrito: • Incluir palavras-chave • Todos os números (incluem legendas relevantes) • Todas as tabelas (incluindo títulos, descrição, notas de rodapé) • Verifique se todas as citações de figura e tabela no texto correspondem aos arquivos fornecidos • Indique claramente se a cor deve ser usada para quaisquer figuras impressas Arquivos de resumos gráficos / destaques (quando

aplicável) Arquivos suplementares (quando aplicável) Considerações adicionais • O manuscrito foi 'ortográfico' e 'gramatical'

Todas as referências mencionadas na lista de referências são citadas no texto e vice-versa

- Foi obtida permissão para uso de material protegido por direitos autorais de outras fontes (incluindo a Internet)

- É fornecida uma declaração de interesses concorrentes, mesmo que os autores não tenham interesses concorrentes para declarar

- As políticas do periódico detalhadas neste guia foram revisadas

- Sugestões de árbitros e detalhes de contato fornecidos, com base nos requisitos do diário

ANTES DE VOCÊ COMEÇAR

Ética na publicação

Consulte nossas páginas de informações sobre ética na publicação e diretrizes éticas para publicação em periódicos.

Declaração de interesse

Todos os autores devem divulgar qualquer relacionamento financeiro e pessoal com outras pessoas ou organizações

que poderiam influenciar inadequadamente (viés) seu trabalho. Exemplos de potenciais conflitos de interesse incluem

emprego, consultorias, propriedade de ações, honorários, testemunhos pagos de especialistas, pedidos de patentes /

registros e subsídios ou outros financiamentos. Os autores devem preencher a declaração de interesse

usando este modelo e faça o upload para o sistema de envio na etapa Anexar / Carregar Arquivos.

Se não houver interesse a declarar, escolha: 'Declarações de interesse: nenhuma' no modelo.

Esta declaração será publicada no artigo, se aceita. Mais Informações.

Declaração e verificação de envio

A submissão de um artigo implica que o trabalho descrito não tenha sido publicado anteriormente (exceto em

sob a forma de resumo, palestra publicada ou tese acadêmica, consulte 'Múltiplos, redundantes ou simultâneos

publicação 'para obter mais informações), que não está sendo considerado para publicação em outro lugar, que

sua publicação é aprovada por todos os autores e tácita ou explicitamente pelas autoridades responsáveis quando

o trabalho foi realizado e, se aceito, não será publicado em nenhum outro lugar da mesma forma, em

Inglês ou em qualquer outro idioma, inclusive eletronicamente, sem o consentimento por escrito do titular dos direitos autorais. Para verificar a originalidade, seu artigo pode ser verificado pelo serviço de detecção de originalidade Crossref

Verificação de similaridade.

Observe que as pré-impressões podem ser compartilhadas em qualquer lugar a qualquer momento, de acordo com a política de compartilhamento da Elsevier.

Compartilhar suas pré-impressões, por exemplo em um servidor de pré-impressão não contará como publicação prévia (consulte 'Múltiplas, publicação redundante ou simultânea "para obter mais informações).

Uso de linguagem inclusiva

A linguagem inclusiva reconhece a diversidade, transmite respeito a todas as pessoas, é sensível às diferenças, e promove a igualdade de oportunidades. O conteúdo não deve fazer suposições sobre as crenças ou compromissos de qualquer leitor; não contém nada que implique que um indivíduo seja superior a outro com base na idade, sexo, raça, etnia, cultura, orientação sexual, deficiência ou saúde doença; e use linguagem inclusiva por toda parte. Os autores devem garantir que a escrita esteja livre de preconceitos, estereótipos, gírias, referência à cultura dominante e / ou premissas culturais.

Aconselhamos a procurar neutralidade de gênero usando substantivos no plural ("clínicos, pacientes / clientes") como padrão / sempre que possível para evitar usar "ele, ela" ou "ele / ela". Recomendamos evitar o uso de descritores que se refiram a atributos pessoais como idade, sexo, raça, etnia, cultura, orientação sexual, deficiência ou saúde condição, a menos que sejam relevantes e válidos. Essas diretrizes servem como um ponto de referência para ajudar a identificar o idioma apropriado, mas não é de forma alguma exaustivo ou definitivo.

Alterações na autoria

Espera-se que os autores considerem cuidadosamente a lista e a ordem dos autores antes de enviar sua

manuscrito e fornecer a lista definitiva de autores no momento da submissão original.

Qualquer

adição, exclusão ou reorganização de nomes de autores na lista de autorias deve ser feita apenas

antes de o manuscrito ser aceito e somente se aprovado pelo editor da revista. Para solicitar tal

uma alteração, o Editor deve receber o seguinte do autor correspondente: (a) o motivo para a alteração na lista de autores e (b) confirmação por escrito (e-mail, carta) de todos os autores de que eles

concordar com a adição, remoção ou reorganização. No caso de adição ou remoção de autores,

isso inclui a confirmação do autor que está sendo adicionado ou removido.

Somente em circunstâncias excepcionais o Editor considerará a adição, exclusão ou reorganização de

autores após a aceitação do manuscrito. Enquanto o Editor considera a solicitação, a publicação

do manuscrito será suspenso. Se o manuscrito já foi publicado em uma edição on-line, quaisquer solicitações aprovadas pelo editor resultarão em uma retificação.

Serviço de transferência de artigos

Este periódico faz parte do nosso Serviço de transferência de artigos. Isso significa que, se o Editor achar que seu artigo é

mais adequado em uma de nossas outras revistas participantes, você pode ser solicitado a considerar a transferência

o artigo para um deles. Se você concordar, seu artigo será transferido automaticamente em seu nome

sem necessidade de reformatar. Observe que seu artigo será revisado novamente pela nova revista.

Mais Informações.

direito autoral

Após a aceitação de um artigo, os autores serão solicitados a concluir um 'Contrato de Publicação de Revista' (consulte mais informações sobre isso). Um e-mail será enviado ao autor correspondente confirmando o recebimento do manuscrito juntamente com um formulário 'Journal Publishing Agreement' ou um link para a versão online deste acordo.

Os assinantes podem reproduzir índices ou preparar listas de artigos, incluindo resumos para circulação dentro de suas instituições. É necessária permissão do Publicador para revenda ou distribuição fora da instituição e para todos os outros trabalhos derivados, incluindo compilações e traduções. E se trechos de outras obras protegidas por direitos autorais estão incluídos, o (s) autor (es) deve obter permissão por escrito dos proprietários dos direitos autorais e credite a (s) fonte (s) no artigo. A Elsevier pré-imprimiu formulários para uso pelos autores nesses casos. Para artigos de acesso aberto em ouro: Após a aceitação de um artigo, os autores deverão preencher um 'Contrato de licença exclusivo' (mais informações). Reutilização permitida a terceiros de acesso aberto a ouro artigos é determinado pela escolha do autor da licença de usuário. Direitos de autor Como autor, você (ou seu empregador ou instituição) tem certos direitos para reutilizar seu trabalho. Mais em formação. Elsevier suporta compartilhamento responsável Descubra como você pode compartilhar sua pesquisa publicada nas revistas Elsevier. Papel da fonte de financiamento Você é solicitado a identificar quem forneceu apoio financeiro para a condução da pesquisa e / ou preparação do artigo e descrever brevemente o papel do (s) patrocinador (es), se houver, no desenho do estudo; no a coleta, análise e interpretação dos dados; na redação do relatório; e na decisão de envie o artigo para publicação. Se a (s) fonte (s) de financiamento não teve esse envolvimento, isso deveria ser indicado.

Acesso livre Por favor, visite nossa página de acesso aberto para obter mais informações. Idioma (serviços de uso e edição) Por favor, escreva seu texto em bom inglês (o uso americano ou britânico é aceito, mas não uma mistura de estes). Os autores que sentem o manuscrito em inglês podem precisar de edição para eliminar possíveis erros gramaticais ou ortográficos e para estar em conformidade com o inglês científico correto, talvez você queira usar o inglês Serviço de edição de idiomas disponível nos serviços de autor da Elsevier. Submissão O envio para esta revista é totalmente online e você será guiado passo a passo pela criação e upload de seus arquivos. O sistema converte automaticamente os arquivos de origem em um único arquivo PDF do artigo, usado no processo de revisão por pares. Observe que, embora a fonte do manuscrito Quando os arquivos são convertidos em arquivos PDF no envio para o processo de revisão, esses arquivos de origem são necessários para processamento posterior após aceitação. Toda a correspondência, incluindo a notificação da decisão do Editor e pedidos de revisão, ocorre por e-mail, eliminando a necessidade de uma trilha de papel. O sistema de submissão online para Biodeterioração Internacional e Biodegradação pode ser acessado em <https://ees.elsevier.com/ibb>.