



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**ANDRWEY AUGUSTO GALVÃO VIANA**

**AVALIAÇÃO DE FENAZINAS SINTÉTICAS NA BIODEGRADAÇÃO DE  
ÓLEOS PESADO POR *Pseudomonas aeruginosa* TGC04**

**JOÃO PESSOA**

**2024**

**ANDRWEY AUGUSTO GALVÃO VIANA**

**AVALIAÇÃO DE FENAZINAS SINTÉTICAS NA BIODEGRADAÇÃO DE  
ÓLEOS PESADO POR *Pseudomonas aeruginosa* TGC04**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

JOÃO PESSOA

2024

**Catálogo na publicação Seção de  
Catálogo e Classificação**

V614a Viana, Andrwey Augusto Galvão.

Avaliação de fenazinas sintéticas na biodegradação  
de óleos pesado por *Pseudomonas aeruginosa* TGC04 /  
Andrwey Augusto Galvão Viana. - João Pessoa, 2024.  
50 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. Biotecnologia. 2. Biodegradação. 3. Bioaumento  
alóctone. 4. Metossulfato de fenazina. 5.  
Hidrocarbonetos policíclicos. I. Gomes, Ulrich  
Vasconcelos da Rocha. II. Título.

UFPB/BC

CDU 577(043)

**ANDRWEY AUGUSTO GALVÃO VIANA**

**AVALIAÇÃO DE FENAZINAS SINTÉTICAS NA BIODEGRADAÇÃO DE  
ÓLEOS PESADO POR *Pseudomonas aeruginosa* TGC04**

**BANCA EXAMINADORA**



Documento assinado digitalmente  
**ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES**  
Data: 29/02/2024 14:08:03-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (DB/UFPB)

**Orientador/ Presidente**



Documento assinado digitalmente  
**ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA**  
Data: 29/02/2024 19:38:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adna Crisitina Barbosa de Sousa (DBCM/UFPB)

**Examinadora Interna**



Documento assinado digitalmente  
**ELIANA FLAVIA CAMPORESE SERVULO**  
Data: 29/02/2024 15:38:30-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Flavia Camporese Servulo (Dsc IM/UFRJ)

**Examinadora Externa**



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por todas oportunidades até o dia de hoje, e aos meus pais Roseane Galvão Viana e João Batista Viana dos Santos por todo o apoio incondicional, pela educação, confiança e amor em mim atribuído para concluir mais um etapa nessa minha trajetória de vida.

Ao meu brilhante orientador, Ulrich Vasconcelos, pela amizade, pela confiança, pelo aprendizado, pelo ensinamento, pelo carinho, você me chamou de volta para o mundo acadêmico e assim construímos uma história de anos de muita verdade e cumplicidade, seu olhar para ciência me faz acreditar em dias melhores.

A Vinicius Novo por todo o carinho, ajuda, suporte e amor nos dias de luta e de glória, obrigado pelo apoio e por deixar essa minha etapa mais leve e tranquila, você foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos de bancada e de laboratório Alex Rique, Camilla Farias e Jéssica Dantas, a amizade de vocês foram essenciais nesse momento e com muita dificuldade, gargalhadas e trocas de idéias deixaram os meu dois anos de mestrado mais calorosos e felizes.

Aos amigos Denison Carvalho, Jéssica Carvalho, Abenildo Neto, Edilma Tavares e Paula Cristina muito obrigado pela ajuda e acolhimento, o apoio de vocês foi muito importante nessa caminhada.

A Universidade Federal da Paraíba e a PROPESQ pelo fomento desta pesquisa (Chamada Interna Produtividade em Pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB nº 03/2020, processo # PVI13656-2020).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro concedido a presente pesquisa

VIANA, Andrwey Augusto Galvão. Adição de metossulfato de fenazina na biodegradação de óleo pesado por *Pseudomonas aeruginosa* TGC04. João Pessoa, 2024. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2024.

## RESUMO

Entre 2019 e 2020, 40% da zona costeira do Brasil sofreu o mais extenso derramamento de óleo em zona tropical da história, causando impactos negativos a todos os níveis da cadeia trófica, bem como aos serviços ecossistêmicos marinhos. Muitas bactérias podem ser usadas na remoção do óleo, mas *Pseudomonas aeruginosa* é notoriamente potencial porque é capaz de degradar hidrocarbonetos (HC) logo após a exposição ao óleo. Estudos prévios deram indícios de que a piocianina (PYO) e outras fenazinas intermediárias auxiliam o processo de transformação de HC pela bactéria. Este estudo objetivou verificar o efeito do metossulfato de fenazina (PMS), na biodegradação do óleo de solo arenoso por bioaumento alóctone com *P. aeruginosa* TGC04. Os microcosmos foram preparados contendo 50 g de areia fina e 150 g de areia de praia contaminada com óleo pesado. O pré-inóculo foi preparado em 100 g de areia pasteurizada e suplementada com 0,5% (m/m) de bagaço de malte de cevada, na qual foi adicionado 5 mL da suspensão bacteriana, enriquecida com 10 µmol/L de PMS e incubada à 29±1°C por 10 dias. Após, porções do inóculo foram adicionados aos microcosmos (1:10; 1:100 e 1:1000). Os hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) foram reduzidos em até ≈49%, enquanto os 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos prioritários (HPAs), entre ≈37 e 56%. *P. aeruginosa* TGC04 preferencialmente degradou os HPA de 4-6 anéis (80-89%), mas os HPA de 2-3 anéis foram removidos em até ≈37%. Na presença do PMS houve redução significativa dos HC, contudo as maiores taxas de remoção diária de HC foram observadas na condição 1:100 sem PMS. Sementes de *Zea mays* foram plantadas no solo e o desenvolvimento da planta foi observado por 15 dias, sendo determinadas reduções importantes dos parâmetros biofísicos da planta. Como contribuição, este estudo expande o conhecimento de que a atividade hidrocarbonoclastica de *P. aeruginosa* não é aumentada pela adição de fenazinas exógenas, mas favorece a remoção de HPA de 4-6 anéis e que o bioaumento alóctone é uma estratégia de interesse nos primeiros momentos de um acidente de derramamento de óleo.

**Palavra-chave:** Biodegradação, Bioaumento alóctone, Metossulfato de fenazina, Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

VIANA, Andrwey Augusto Galvão. Adição de metossulfato de fenazina na biodegradação de óleo pesado por *Pseudomonas aeruginosa* TGC04. João Pessoa, 2024. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2024.

### ABSTRACT

Between 2019 and 2020, 40% of Brazil's coastal areas suffered the most extensive oil spill in a tropical zone in history, causing negative impacts at all levels of the food chain, as well as marine ecosystem services. Many bacteria can be used in oil removal, but *Pseudomonas aeruginosa* is notoriously potential because it is capable of degrading hydrocarbons (HC) shortly after exposure to oil. Previous studies have shown that pyocyanin (PYO) and other intermediate phenazines help the HC transformation process by bacteria. This study aimed to verify the effect of phenazine methosulfate (PMS) on the biodegradation of sandy soil oil by allochthonous bioaugmentation with *P. aeruginosa* TGC04. Microcosms were prepared containing 50 g of fine sand and 150 g of beach sand contaminated with heavy oil. The pre-inoculum was prepared in 100 g of pasteurized sand and supplemented with 0.5% (w/w) of barley malt bagasse, to which 5 mL of the bacterial suspension was added, enriched with 10  $\mu\text{mol/L}$  of PMS and incubated at  $29\pm 1^\circ\text{C}$  for 10 days. Afterwards, portions of the inoculum were added to the microcosms (1:10; 1:100 and 1:1000). Total petroleum hydrocarbons (TPH) were reduced by up to  $\approx 49\%$ , while the 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) were reduced by between  $\approx 37$  and  $56\%$ . *P. aeruginosa* TGC04 preferentially degraded 4-6 ring HPA (80-89%), but 2-3 ring HPA were removed by up to  $\approx 37\%$ . In the presence of PMS there was a significant reduction in HC, however the highest rates of daily HC removal were observed in the 1:100 condition without PMS. *Zea mays* seeds were planted in the soil and plant development was observed for 15 days, determining important reductions in the plant's biophysical parameters. As a contribution, this study expands the knowledge that the hydrocarbonoclastic activity of *P. aeruginosa* is not increased by the addition of exogenous phenazines, but favors the removal of 4-6 ring HPA and that allochthonous bioaugmentation is a strategy of interest in the early stages of an oil spill accident.

**Keyword:** Biodegradation, Allochthonous bioaugmentation, Phenazine methosulfate, Polycyclic aromatic hydrocarbons.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estruturas químicas dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos prioritários da USEPA .....	<b>13</b>
<b>Figura 2</b> – Estrutura do núcleo das fenazinas.....	<b>15</b>
<b>Figura 3</b> – Rota de produção da piocianina.....	<b>16</b>
<b>Figura 4</b> – Linhagem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC04 acrescidos em ágar cetrimida. ....	<b>20</b>
<b>Figura 5</b> – Etapas da produção da piocianina em agar cetrimida.....	<b>20</b>
<b>Figura 6</b> – Quantificação da piocianina em base sólida.....	<b>21</b>
<b>Figura 7</b> – Reator elaborado para a preparação do pré-inóculo.....	<b>22</b>
<b>Figura 8</b> – Produção de piocianina na presença de fenazinas exógenas.....	<b>25</b>
<b>Figura 9</b> – Efeito do metossulfato de fenazina na redução dos hidrocarbonetos (%)..	<b>27</b>
<b>Figura 10</b> – Germinação da semente <i>Zea mays</i> após 15 dias de cultivo. ....	<b>29</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Caracterização das amostras de solo e bagaço de malte de cevada.....	<b>24</b>
<b>Tabela 2</b> – Percentual de redução dos hidrocarbonetos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC04 (p = 0,02). .....	<b>26</b>
<b>Tabela 3</b> – Taxa de remoção diária dos hidrocarbonetos (p= 0,01). Os números em negrito representam as maiores taxas, comparado à mesma condição com ou sem metossulfato de fenazina.....	<b>27</b>
<b>Tabela 4</b> – Ensaio de ecotoxicidade com <i>Zea mays</i> . .....	<b>28</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>12</b>
2.1 ÓLEO EXTRAPESADO E EFEITOS NA MICROBIOTA APÓS EXPOSIÇÃO .....	12
2.2 BIOAUMENTO COMO ESTRATÉGIA DE BIORREMEDIAÇÃO .....	13
2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
2.4 FENAZINAS.....	15
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1 SOLO E CONTAMINANTE.....	19
4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC04.....	19
4.3 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIOCIANINA .....	20
4.4 PRÉ-INÓCULO .....	21
4.5 ENSAIO DE BIOAUMENTO .....	22
4.6 TESTE DE ECOTOXICIDADE.....	22
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	23
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO E DO SUPLEMENTO DO PRÉ-INÓCULO .....	24
5.2 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIOCIANINA .....	25
5.3 REMOÇÕES DOS HIDROCARBONETOS TOTAIS DO PETRÓLEO (TPH) E DOS 16 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) .....	25
5.4 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE .....	28
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
6.1 BIOAUMENTO ALÓCTONE .....	30
6.2 PAPEL DAS FENAZINAS .....	33
6.3 AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE.....	35
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>APÊNDICE A – RESUMO PUBLICADO EM CONGRESSO .....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O litoral brasileiro vivenciou um considerável derramamento de óleo extrapesado entre os anos de 2019 e 2020, um material denso, caracterizado por elevado teor de hidrocarbonetos de alta cadeia carbônica. Esses hidrocarbonetos são persistentes, representando um sério risco para a saúde ambiental, na qual essa situação demanda ações efetivas, principalmente por prejudicar as atividades microbianas essenciais para a recuperação da água e do solo (Cavalcanti *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2015).

A propriedade desses compostos de se adsorverem facilmente à matéria orgânica da água e do solo, bem como aos agregados do solo, reduz drasticamente a atividade microbiana, gerando atrasos no processo de mitigação dos hidrocarbonetos (Orgiazzi *et al.*, 2015; Watanebe *et al.*, 2003). No entanto, sob condições adequadas, esses compostos podem ser assimilados pela microbiota, e um gerenciamento otimizado dessas condições pode acelerar a taxa de biodegradação, através do processo conhecido como biorremediação (Helmy *et al.*, 2015).

Destacando-se no contexto da biorremediação, a *Pseudomonas aeruginosa*, uma espécie-chave deste processo, oferece versatilidade na produção de diferentes metabólitos, com atenção para as fenazinas. Estes compostos heterocíclicos nitrogenados possuem inúmeras propriedades físico-químicas e participam de diferentes atividades fisiológicas. A piocianina, em particular, um pigmento azul produzido por *P. aeruginosa* é a fenazina específica e fundamental para o metabolismo da bactéria. Além de suas funções conhecidas, como reações redox, captação de ferro, atividade antimicrobiana e respostas densidade celular dependentes, há evidências de que a piocianina possa desempenhar papel na assimilação de hidrocarbonetos (Mangwani *et al.*, 2015; Das P *et al.*, 2013).

O interesse recente e ainda pouco explorado sobre a função da piocianina e dos metabólitos intermediários fenazínicos nos processos de transformação de hidrocarbonetos motivou estudos adicionais. Ocorre que a piocianina não é sintetizada em grande quantidade durante a fase logarítmica de crescimento e a adição de fenazinas exógenas podem auxiliar o processo de remoção do óleo no solo.

Sendo assim, este estudo teve como intuito principal verificar o efeito de fenazinas exógenas na biodegradação do óleo de solo arenoso por bioaumento alóctone com *P. aeruginosa* TGC04

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ÓLEO EXTRAPESADO E EFEITOS NA MICROBIOTA APÓS EXPOSIÇÃO

Embora diferentes alternativas energéticas tenham sido desenvolvidas e difundidas ao longo das últimas décadas, a dependência dos combustíveis fósseis ainda é imperativa na sociedade moderna e infelizmente com ela, grandes vazamentos ainda são uma triste e dramática realidade (Silva *et al.*, 2021). Durante quase dez meses entre 2019 e 2020, registrou-se o vazamento de toneladas de óleo cru numa faixa cerca de 3000 Km da costa brasileira (Araújo *et al.*, 2021; Lessa *et al.*, 2021). O óleo possuía propriedades semelhantes ao óleo extrapesado (Oliveira *et al.*, 2020; Zacarias *et al.*, 2021; Nobre *et al.*, 2022) e causou prejuízos multifatoriais e é considerado o maior acidente da história do Brasil, no Atlântico Sul (Pena *et al.*, 2020; Estevo *et al.*, 2021), bem como ficou conhecido como um dos maiores desastres envolvendo derramamento de óleo cru no mundo, cujas consequências serão sentidas por muitas décadas (Batista dos Anjos *et al.*, 2023).

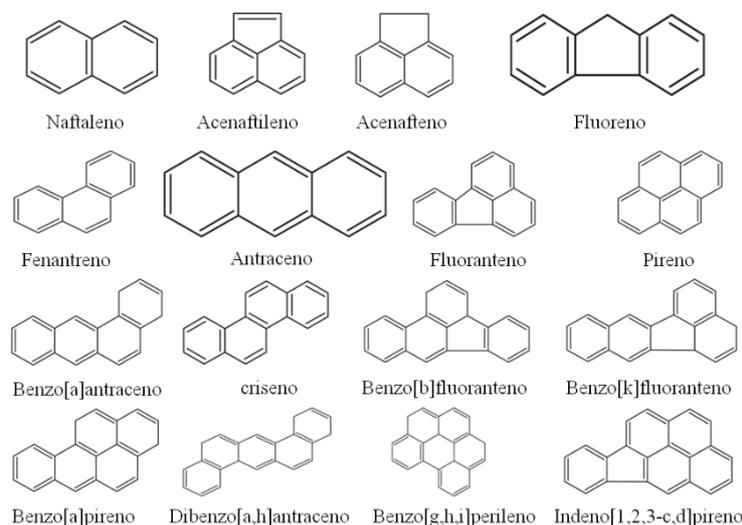
O óleo extrapesado é caracterizado pela presença de diversos hidrocarbonetos, exibindo densidade superior a 0,90 g/mL, viscosidade elevada e uma significativa quantidade de carbono em relação ao hidrogênio. Suas características incluem índices elevados de hidrocarbonetos aromáticos, parafina, enxofre, nitrogênio e metais pesados, além de um ponto de ebulição substancialmente mais alto em comparação com os óleos leves. No entanto, a natureza desafiadora de seus compostos derivados, especialmente os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), resulta em impactos negativos quando derramado no ambiente. Isso ocorre porque reduz significativamente a atividade microbiana autóctone, crucial para a recuperação de áreas contaminadas (Olsen e Ramzel., 1992; Watanabe *et al.*, 2003; Orgiazzi *et al.*, 2015).

Os hidrocarbonetos, em particular os policíclicos aromáticos, são compostos danosos ao ambiente podendo apresentar elevada toxicidade, efeitos carcinogênicos e mutagênicos (Abdel-shafy; Mansour 2016), no qual a agencia ambiental estadunidense (USEPA) lista dezesseis HPAs prioritários (**Figura 1**).

Os HPAs formam um grupo de moléculas, caracterizadas pela presença de dois ou até mais de vinte anéis aromáticos ou cicloalcanos, condensados e rearranjados em inúmeras configurações (Kim *et al.*, 2013). Dentro dos contaminantes orgânicos presentes no ambiente, os HPAs são os mais comuns e os mais investigados quanto aos seus efeitos biológicos (Azevedo *et al.*, 2013). São classificados em dois grupos de acordo com o número de anéis: de baixa massa molecular, dotados de dois ou três anéis e de alta massa

molecular, com quatro ou mais anéis (Daugulis; McCracken, 2003).

**Figura 1** – Estruturas químicas dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos prioritários da USEPA



**Fonte:** Vasconcelos, 2011.

Em situações de vazamento de óleo de grande amplitude, observa-se uma alteração da razão C:N:P na área do acidente (Jacques *et al.*, 2007). A exposição aos hidrocarbonetos promove mudanças drásticas na microbiota autóctone (Sarkar *et al.*, 2016) e uma comunidade hidrocarbonoclástica se torna dominante em seguida (Teramoto *et al.*, 2013). Os microrganismos são as entidades majoritariamente envolvidas na transformação de hidrocarbonetos na natureza (Baek *et al.*, 2004), porém optar pelo processo de desintoxicação natural não parece ser a decisão mais apropriada uma vez que as zonas costeiras são áreas muito frágeis (Disner e Torres, 2020), o que necessita intervenção de alguma natureza.

## 2.2 BIOAUMENTO COMO ESTRATÉGIA DE BIORREMEDIAÇÃO

Biorremediação refere-se ao processo destinado a acelerar a taxa de biodegradação de uma ampla variedade de contaminantes, visando a rápida recuperação de um determinado sítio. Além disso, a biorremediação representa uma alternativa atrativa e economicamente viável, baseando-se no estímulo da atividade metabólica microbiana para a conversão dos xenobióticos em metabólitos de menor toxicidade, bem como na produção de biomassa (Chaîneau *et al.*, 2005).

Entre os métodos de biorremediação para os casos em que a microbiota esteja inibida ou inativada, caracterizando a necessidade mais enérgica de intervenção após o

vazamento de óleo, sobressai-se a abordagem de bioaumentação. Essa técnica envolve a introdução de uma linhagem particular ou de um ou vários organismos em consórcio, com o propósito de intensificar a atividade biológica em um sistema específico (Herrero e Stuckey, 2015; Shah, 2017; Szaja, 2018), proporcionando, dessa forma, uma facilitação no processo de remediação.

Em um cenário de contaminação, a intervenção emergencial pode exigir a inoculação de alta densidade celular de microrganismos alóctones hidrocarbonoclasticos competentes quando a população autóctone não está capaz de manter uma degradação eficiente do contaminante (Brzeszcz *et al.*, 2020). O bioaumentação é baseado na sobrevivência celular e na manutenção da atividade catabólica do inoculante frente aos hidrocarbonetos de petróleo (Nowak and Mrozik, 2016). A técnica é muito efetiva nos estágios iniciais do processo (Woźniak-Karczewska *et al.*, 2019), quando cerca de 70 a 75% dos hidrocarbonetos do petróleo podem ser transformados entre cerca de 30 e 100 dias (Cavalcanti *et al.*, 2019).

O bioaumentação tem se destacado como uma estratégia eficaz para aprimorar o tratamento de contaminantes (Zhang *et al.*, 2017), otimizando o catabolismo de compostos específicos (Herrero e Stuckey, 2015). Essa abordagem não apenas contribui significativamente para a remoção de contaminantes na matriz contaminada (Cavalcanti, 2019) como também desempenha um papel fundamental na redução do tempo e dos custos associados ao tratamento (Speight e El-Gendy, 2018; Skinder *et al.*, 2020).

### 2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Por sua constituição, as bactérias Gram-negativas são mais promissoras em termos de tratamento por bioaumentação (Abena *et al.*, 2019) e *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie hidrocarbonoclastica mais importante (Ojewumi *et al.*, 2018). *P. aeruginosa* é um bacilo ubíquo, monotríquico, não fermentador, que mede 0,5 x 1,5 µm, tendo a água doce e solo como *habitat* preferenciais (Viana *et al.*, 2017).

Além disso, uma de suas maiores características é a notável plasticidade metabólica, que permite a permanência em ambientes desfavoráveis, tais como solos contaminados, ambientes aquáticos poluídos e condições adversas de temperatura. Por conta desta característica, *P. aeruginosa* utiliza mais de 90 moléculas como fonte de carbono e energia, o que confere vantagens seletivas, reforçando sua reputação de resiliente (Scott-Thomaz, 2010). Nesse cenário, a *P. aeruginosa* emerge como uma ferramenta versátil para aplicações biotecnológicas diversas, como a produção de

metabólitos atóxicos ou de baixa toxicidade ambiental. Destaca-se, por exemplo, seu potencial na síntese industrial de biossurfactantes, como os ramnolipídios (Corrêa *et al.*, 2015), ampliando suas aplicações para a descontaminação de áreas afetadas por diversos xenobióticos, incluindo petroderivados (Aislabe, 2006) e herbicidas (Leonel, 2018).

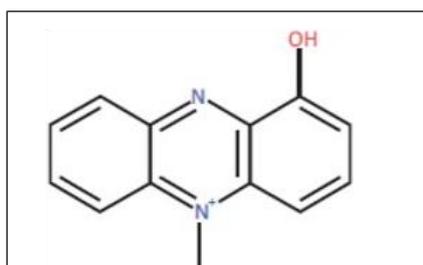
Ela é abundante em solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, assumindo papel-chave ecológico na desintoxicação do solo (Crone *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021). Em complemento, *P. aeruginosa* exibe uma versatilidade fisiológica e metabólica, que resultam no aumento da biodisponibilidade dos contaminantes (Zhao *et al.*, 2018), assim como de sua assimilação, podendo transformar hidrocarbonetos parafínicos (Karamalidis *et al.* 2010), naftenos (Shekhar *et al.*, 2015), aromáticos (Zhang *et al.* 2015) e policíclicos aromáticos (Filinov *et al.* 2010).

## 2.4 FENAZINAS

*P. aeruginosa* é proficiente na produção de uma miríade de metabólitos secundários (Depke *et al.*, 2020). Alguns deles, como as fenazinas, são moléculas sintetizadas sob situações de estresse ambiental, incluindo condições limitantes de nutrientes, exposição à moléculas complexas, estresse oxidativo e competição (Arruda *et al.*, 2019).

As fenazinas, caracterizadas por sua natureza pigmentada, atividade redox, composição nitrogenada e estrutura aromática e heterocíclica com derivados carboxi-, hidroxil- e metil-substituídos (**Figura 2**), representam um grupo de metabólitos secundários encontrados em diversas bactérias do solo, abrangendo tanto Gram-negativas, como *Pseudomonas* spp., além de actinobactérias Gram-positivas, como *Streptomyces* spp. (Laursen *et al.*, 2004; Jimenez *et al.*, 2012; Guttenberger *et al.*, 2017). Para *P. aeruginosa* destaca-se a produção da piocianina (PYO), o ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), a 1-hidrofenzina (1-OH-PHZ), a fenazina-1-carboxiamida (PCN) e as piorrubinas (Mavrodi *et al.*, 2001; Saranya *et al.*, 2012; Abu *et al.*, 2013).

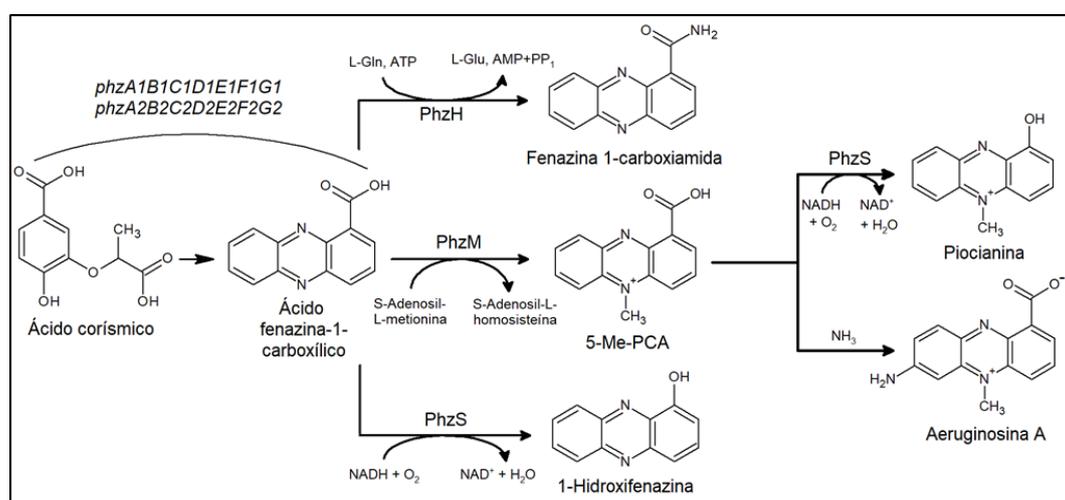
**Figura 2** – Estrutura do núcleo das fenazinas.



Fonte: Rada *et al.*, 2013.

A fenazina específica da *P. aeruginosa* é a piocianina, sua produção é controlada por *quorum-sensing*, um processo regulado pela densidade celular, que envolve a secreção e a assimilação de substâncias conhecidas como autoindutores (Mavrodi *et al.*, 2001). A síntese da PYO se inicia na via do ácido chiquímico, tendo como precursor esse ácido. Dois operons, contendo sete genes, regulam a conversão do ácido corísmico em ácido fenazina-1-carboxílico. Os genes *phzM* e *phzS* desempenham papel crucial no controle das duas reações que conduzem à formação da piocianina. Primeiramente, ocorre a produção do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína, com a catálise da metiltransferase fenazina-específica (PhzM), uma enzima classificada como S-adenosilmetionina transferase metil-dependente. Em seguida, esse produto é submetido à catálise pela mono-oxigenase flavina-dependente (PhzS), que promove a hidroxilação da betaína do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico em 1-hidróxi-5-metil fenazina, resultando na PYO, uma fenazina natural (**Figura 3**) (Mavrodi *et al.*, 2001; Jayaseelan; Ramaswamy; Dharmaraj, 2014).

**Figura 3** – Rota de produção da piocianina.



Fonte: Adaptado de Abu *et al.*, 2013; Mavrodi *et al.*, 2001.

A PYO destaca-se por sua função como uma molécula sinalizadora dos sistemas de *quorum-sensing* (Gonçalves e Vasconcelos, 2021) e oferecem vantagens que contribuem com a manutenção de *P. aeruginosa*, por meio de diferentes mecanismos, em que a produção de metabólitos fenazínicos auxiliam na competitividade e virulência de seus produtores (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Mazzola *et al.*, 1992).

Nessa perspectiva, a PYO está associada ao mecanismo de resposta às altas pressões seletivas exercidas pelo ambiente (Bahari *et al.* 2017) e sob esta óptica, a PYO

e outras fenazinas podem desempenhar um papel crucial nos processos que envolvem a degradação do óleo, baseando-se na premissa de que a PYO age como carreador de elétrons na presença de oxigênio e ao formar radicais livres pode atacar os hidrocarbonetos cíclicos e saturados (Abdelaziz *et al.*, 2022).

Há relato da utilização de hexano e tolueno como substratos para a síntese de PYO (Ozidal *et al.*, 2019). Adicionalmente, a correlação entre a síntese de PYO e a produção de biosurfactantes foi relatada pela primeira vez por Das e Ma (2013), quando cultivada em meio mineral, produziu cerca de 10 µg/mL, coincidindo com índices de emulsificação de três petroderivados, que variaram entre 60 e 75%. Uma segunda linhagem produtora de aproximadamente 5 µg/mL, refletiu índices de emulsificação entre 25 e 40%. Em complemento, nosso grupo de estudo observou que a diferença cerca de 60 vezes entre as concentrações produzidas de PYO por diferentes isolados de *P. aeruginosa* resultou num aumento de 65% da remoção de pireno e 45% de antraceno de um solo arenoso. Além disso, foi verificada uma elevada correlação entre a síntese de PYO e a emulsificação de uma mistura de óleo lubrificante (Viana *et al.*, 2018). Seguindo essa premissa, a inclusão de fenazina exógena em um ensaio de remoção de hidrocarbonetos pode estimular um aumento na produção de PYO, potencializando a atividade hidrocarbonoclástica de *P. aeruginosa* e, por conseguinte, aprimorando a eficácia da biorremediação em ambientes contaminados.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da adição de fenazina exógena, na redução dos teores de hidrocarbonetos de um solo de praia contaminado por óleo, empregando bioaumento alóctone com *Pseudomonas aeruginosa* TGC04.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar a fenazina exógena [metossulfato de fenazina e/ou fenazina] a partir da quantificação de piocianina;
- Avaliar a degradação dos 16 HPAs prioritários e dos TPH com e sem adição da fenazina exógena selecionada;
- Realizar teste de ecotoxicidade do solo após o tratamento.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SOLO E CONTAMINANTE

A areia da praia contaminada com o óleo cru foi coletada em 2019, na faixa litorânea do município de Tamandaré (Pernambuco, Brasil) e misturada com areia grossa de praia, isenta de contaminação por hidrocarbonetos. Foram realizados 10 ensaios de caracterização físico-química nas amostras de areia, a saber: carbono orgânico total, nitrogênio total, fósforo total, argila, silte, areia grossa, areia fina, capacidade de retenção da água, TPH e HPAs, juntamente com as características do bagaço de malte de cevada (BMC), utilizado como um bioestimulante na preparação do pré-inóculo.

### 4.2 *Pseudomonas aeruginosa* TGC04

A linhagem foi originalmente obtida de solo de posto de gasolina e está registrada no cadastro brasileiro de patrimônio genético e conhecimento associado (#A404D65) e na coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, sob cadastro UFPEDA 1063B (**Figura 4**). Para a aclimação ao contaminante, foi preparada uma suspensão em NaCl 0,85%, com turbidez padronizada em 0,4 a 600 nm (Cawley et al., 2019) e 1 mL da suspensão foi transferido para 100 mL de meio mineral, composto por (mg/L):  $K_2HPO_4$  (500);  $(NH_4)_2SO_4$  (500);  $MgSO_4$  (500),  $FeCl_2$  (10);  $CaCl_2$  (10); NaCl (25);  $MnCl_2$  (0,1),  $ZnSO_4$  (0,01), extrato de levedura (500) e duas gotas de solução de complexo B, pH  $7,2 \pm 0,2$  (Del'Arco e de França, 2001), suplementado com 10  $\mu g/mL$  de metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma-Aldrich, China) e adicionado com 1% de areia contaminada (m/v). O sistema foi incubado sob agitação de 150 rpm, à  $29 \pm 1^\circ C$  por 5-7 dias. Com a emulsificação do óleo, nova alíquota de 1 mL foi transferida para novo frasco até atingir 10% (w/v).

**Figura 4** – Linhagem *Pseudomonas aeruginosa* TGC04 acrescidos em ágar cetrimida.

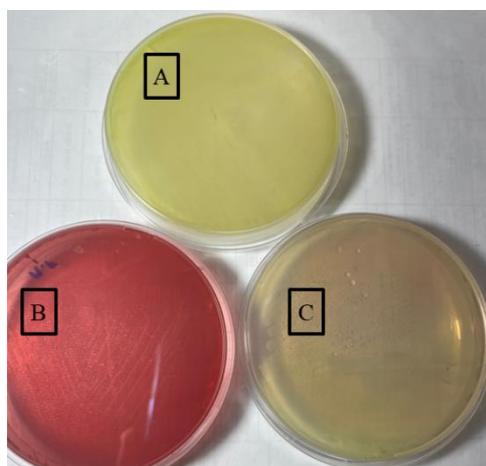


Fonte: autoria própria (2023)

#### 4.3 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIOCIANINA

Foram testadas duas fenazinas exógenas sintéticas: Metossulfato de Fenazina (PMS) (Sigma-Aldrich China; lote #SYN1371310, pureza 90%) e Fenazina (PNZ) (Sigma-Aldrich Ucrânia; lote #MKCG5144, pureza 98%). As respectivas soluções estoques foram preparadas de em solução de DMSO 1% de modo que nos ensaios fossem testadas três concentrações: 1, 5 e 10  $\mu\text{mol/L}$ . As soluções foram adicionadas a 20 mL de ágar cetrimida, em placas de Petri e em seguida, a linhagem foi inoculada por espalhamento e incubada por 72h à  $29\pm 1^\circ\text{C}$  (**Figura 5**).

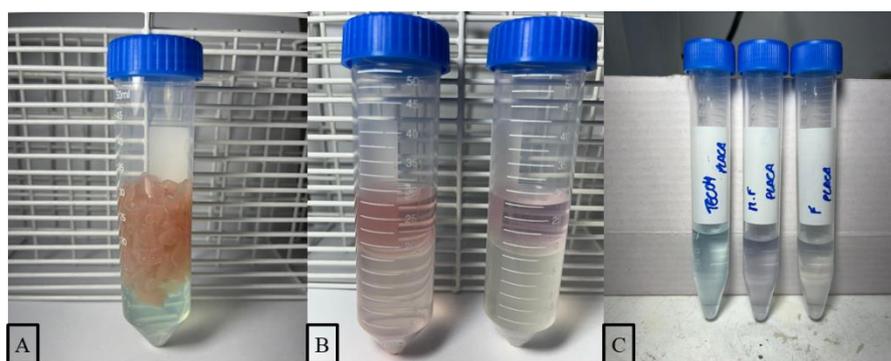
**Figura 5** – Etapas da produção da piocianina em ágar cetrimida. Sem adição de fenazina (A), adição de Metossulfato de Fenazina (B) e adição de Fenazina (C).



Fonte: autoria própria (2023)

A quantificação de PYO foi realizada por extração em base sólida (Abou *et al.*, 2018), com modificações. O ágar foi cortado em pequenos cubos e transferido para tubos contendo 20 mL de clorofórmio. Após agitação por 10 minutos, a fase orgânica foi separada e 10 mL de solução de HCl 0,2 mol/L foi adicionada. Seguida de nova agitação, a fase contendo PYO protonada (rosa) foi cuidadosamente neutralizada com tris-HCl 1,5 mol/L até retomar a cor azul. A concentração de PYO, em  $\mu\text{g/mL}$ , foi determinada pela aplicação do valor da densidade óptica (OD) a 580 nm (Química U2M), da fase neutralizada à equação construída com base na curva padrão:  $\text{PYO} = [\text{OD}_{580} - 6 \times 10^{-4}] \div 14,026$  ( $r = 0,9999$ ), preparada com PYO 98% (Merck KGaA, Alemanha) (**Figura 6**). Uma vez conhecida a concentração de piocianina em  $\mu\text{g/mL}$ , foi realizada a conversão considerando o volume do cilindro formado com o ágar na placa (20 ml).

**Figura 6** – Quantificação da piocianina em base sólida. Ágar submerso em clorofórmio (A), Fase contendo piocianina protonada (B) e fase neutralizada com tris-HCl (C).



Fonte: autoria própria (2023)

#### 4.4 PRÉ-INÓCULO

O pré-inóculo foi preparado com adaptações à estratégia descrita por Innemanová *et al.* (2018). A modificação foi em razão da suplementação da areia com bagaço de malte de cevada, que foi caracterizado quanto os teores de Carbono Orgânico Total, Nitrogênio Total e Fósforo Total. Inicialmente em um reator de escala reduzida (**Figura 7**), 100 g da areia de praia foram pasteurizadas à 60°C por 30 minutos (Franco-Hernández *et al.*, 2003). Após, misturou-se o BMC esterilizado 0,5% (m/m) à areia contaminada e 5 mL do inóculo (aproximadamente  $10^4$  UFC/mL), preparado em caldo MWY (500 mg/L de extrato de levedura e água mineral *quantum sufficit*, com ou sem adição de 0,1 mL de PMS 10  $\mu\text{mol/L}$ ). A mistura foi incubada à  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10 dias com o teor de umidade mantido de 60 a 70% da capacidade de retenção de água do solo, corrigido com água destilada

esterilizada e ao final dos dez dias, a densidade celular (UFC/g) aumentou duas unidades logarítmicas.

**Figura 7** – Reator elaborado para a preparação do pré-inóculo.



**Fonte:** autoria própria (2023)

#### 4.5 ENSAIO DE BIOAUMENTO

Foram preparados microcosmos com capacidade para 400 mL, preenchidos com 200 g de solo pasteurizado, distribuídos em duas camadas: 50 g de areia grossa como base, completados com 150 g de areia de praia contaminada com o óleo cru (Sundaram *et al.*, 2013). Em seguida, porções do pré-inóculo (razão inóculo areia:óleo de 1:10; 1:100 e 1:1000) foram transferidas para os microcosmos e misturadas novamente.

Os microcosmos foram incubados à 29°C por 21 dias e as concentrações residuais do TPH dos 16 HPAs foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa nos laboratórios da Brasil - Mérieux NutriSciences, Paulista-PE. As perdas abióticas foram conhecidas em microcosmos contendo a mesma quantidade de solo, mantido esterilizado pela adição de solução de nitrato de prata 10% m/m (Vasudevan e Rajaram, 2001). A quantificação celular no solo foi realizada por *pour plate* e expressa em UFC/g.

#### 4.6 TESTE DE ECOTOXICIDADE

O teste avaliou a germinação de sementes de *Zea mays* (tamanho=12,0±0,9 mm) e *Cucumis anguria* (tamanho=1,4±0,3 mm) e o desenvolvimento da planta. Após 21 dias do ensaio, alíquotas de 15g do solo pós ensaio do bioaumento, foram tomadas dos

microcosmos e 5 sementes, previamente higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 2%, e verificadas quanto a integridade do tegumento, foram plantadas. A incubação ocorreu por 15 dias em ambiente fechado à 25 °C, com rega controlada e fotoperíodo 12/12. Com 15 dias de cultivo foram determinados padrões biofísicos de biomassa úmida, altura das plantas, e o número de folhas viáveis para calcular os percentuais de redução desses parâmetros (Dourado-Neto *et al.*, 2003). O controle do teste foi realizado em matriz arenosa sem contaminação por hidrocarbonetos, e contendo uma razão C:N:P de 100:40:40.

#### 4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

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

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO E DO SUPLEMENTO DO PRÉ-INÓCULO

Dos parâmetros analisados na areia contaminada com óleo (ACO) empregado neste estudo (**Tabela 1**), o TPH atingiu um valor significativo na concentração de 25.900 mg/Kg. A análises dos 16 HPAs revelou a presença desses compostos em diferentes concentrações, destacando-se o fenantreno (25,6 mg/Kg), criseno (13,5 mg/Kg) e pireno (13,0 mg/Kg), indicando a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em níveis variados. A razão C:N foi aproximadamente 1:737, indicando uma proporção muito alta de carbono em relação ao nitrogênio. A razão C:N:P inicial nos microcosmos no momento da inoculação da *P. aeruginosa* TGC04 era de 100:0,1:0,003.

**Tabela 1** – Caracterização das amostras de solo e bagaço de malte de cevada.

Parâmetros	Resultados			Referência
	ACO	ANC	BMC	
Carbono Orgânico Total (% m/m)	25976	0,74	1200	USEPA 9060
Nitrogênio Total (mg/Kg)	35,2	31,8	497,10	USEPA 315.2
Fósforo Total (mg/Kg)	< 1	3,04	421	USEPA 365.3
Argila (%)	0,99	0,80	---	ISO 13320: 2009
Silte (%)	1,29	6,40	---	
Areia grossa (%)	1,86	60,10	---	
Areia fina (%)	95,86	32,70	---	
Capacidade de Retenção de Água (%)	16,2	30,1	---	Cavalcanti et al. (2019)
TPH (mg/Kg)	25900	---	---	USEPA 8015
Gasolina (mg/Kg)	< 134	---	---	
Querosene (mg/Kg)	320	---	---	
Diesel (mg/Kg)	5160	---	---	
Óleo Lubrificante (mg/Kg)	20400	---	---	
16 HPAs (mg/Kg)	75,83	---	---	USEPA 8270
Acenafteno (mg/Kg)	< 0,27	---	---	
Acenaftileno (mg/Kg)	< 0,27	---	---	
Antraceno (mg/Kg)	3,47	---	---	
Fenantreno (mg/Kg)	25,6	---	---	
Fluoreno (mg/Kg)	4,13	---	---	
Naftaleno (mg/Kg)	2,67	---	---	
Benzo[a]antraceno (mg/Kg)	7,94	---	---	

Benzo[a]pireno (mg/Kg)	3,36	---	---
Benzo[b]fluoranteno (mg/Kg)	< 0,27	---	---
Benzo[g,h,i]perileno (mg/Kg)	< 0,27	---	---
Benzo[k]fluoranteno (mg/Kg)	< 0,27	---	---
Criseno (mg/Kg)	13,5	---	---
Dibenzo[a,h]antraceno (mg/Kg)	< 0,27	---	---
Fluoranteno (mg/Kg)	< 0,27	---	---
Indeno[1,2,3, c-d]pireno (mg/Kg)	< 0,27	---	---
Pireno (mg/Kg)	13,0	---	---

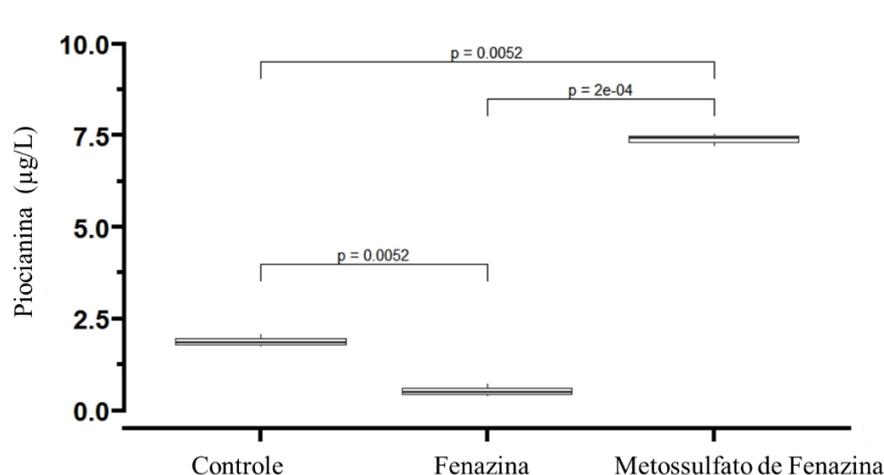
ACO – Areia contaminada por óleo; ANC – Areia não contaminada; BMC – Bagaço de malte de cevada

Fonte: Autor (2024)

## 5.2 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIOCIANINA

Inicialmente foi verificada a capacidade de produção de PYO por *P. aeruginosa* TGC04 na presença das fenazinas exógenas (**Figura 8**). Houve apenas a produção de PYO nos meios contendo 10  $\mu\text{mol/L}$  de PMS ( $7,37 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$ ) e PNZ ( $0,54 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$ ). Sem as fenazinas exógenas foi produzido  $1,90 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$  de PYO. Desta forma foi escolhido o PMS para os ensaios de degradação.

**Figura 8** – Produção de piocianina na presença de fenazinas exógenas.



Fonte: autoria própria (2024)

## 5.3 REMOÇÕES DOS HIDROCARBONETOS TOTAIS DO PETRÓLEO (TPH) E DOS 16 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

Após três semanas, nas condições deste estudo sobre o efeito da adição de PMS na degradação dos hidrocarbonetos, verificou-se uma redução entre aproximadamente 37 e 56% dos 16 HPAs (**Figura 9 I**) nas três razões inóculo: areia testadas, observando-se o

consumo preferencial por HPAs de 4-6 anéis ( $\approx 80-89\%$ ,  $p=0,02$ ), mas não acelerou o tratamento comparando-se aos microcosmos sem PMS (**Figura 9 III**). Benzo[a]fluoranteno foi o HPA menos assimilado, enquanto os demais foram degradados, com destaque aos dois HPAs mais concentrados no areia: criseno e pireno.

Para os HPAs de 2-3 anéis (**Figura 9 IV**), o tamanho do inóculo e a presença do PMS foram fatores importantes que influenciaram na remoção destes hidrocarbonetos, entre cerca de 14 e 38% ( $p=0,01$ ). Os HPAs de 2-3 anéis mais prevalentes eram fenantreno, fluoreno e antraceno, e praticamente foram todos removidos. Por outro lado, naftaleno não foi transformado, sugestivo de que não estava biodisponível (**Tabela 2**). Adicionalmente, os resultados com os HPAs de 2-3 anéis foram semelhantes a todos os 16 HPAs juntos.

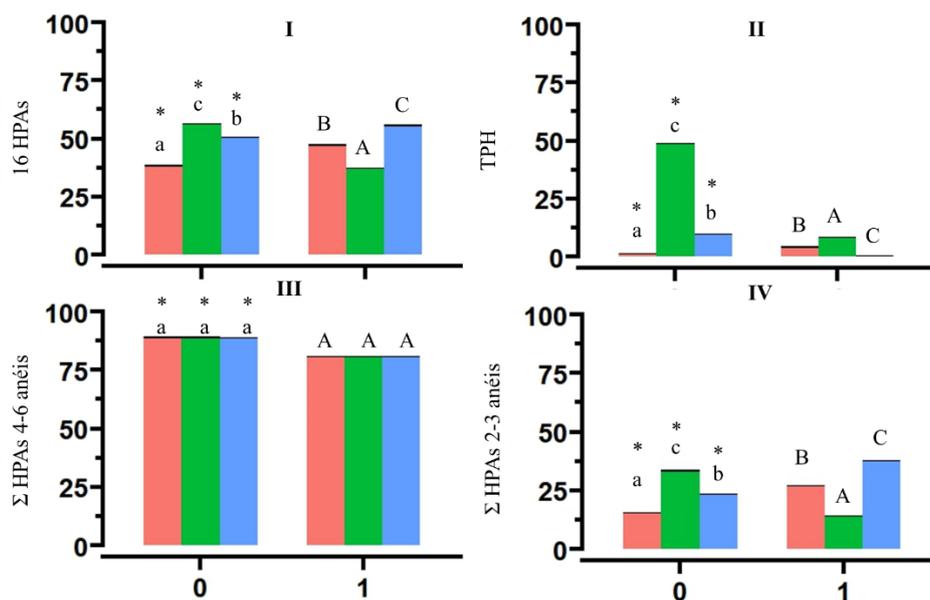
Os TPH foram menos transformados pela linhagem *P. aeruginosa* TGC04 (**Figura 9 II**) e somente na condição 1:100 sem PMS verificou-se o maior percentual de degradação (aproximadamente 50%). Adicionalmente, os resultados mais significativos foram observados nos tratamentos sem PMS e a condição 1:100 de inoculante: areia favoreceu a maior redução dos teores de hidrocarbonetos totais.

**Tabela 2** – Percentual de redução dos hidrocarbonetos por *Pseudomonas aeruginosa* TGC04 ( $p = 0,02$ ).

Tratamentos	$\Sigma 16$ HPAs	$\Sigma$ HPAs 4-6 anéis	$\Sigma$ HPAs 2-3 anéis	TPH	PYO ( $\mu\text{g/L}$ )
1:10 (PMS)	47,3 $\pm$ 0,1	81,0 $\pm$ 0,1	27,1 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,1	7,37 $\pm$ 0,10
1:10	38,4 $\pm$ 0,1	89,1 $\pm$ 0,1	15,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,90 $\pm$ 0,10
1:100 (PMS)	37,4 $\pm$ 0,1	81,0 $\pm$ 0,1	14,2 $\pm$ 0,1	8,4 $\pm$ 0,1	7,37 $\pm$ 0,10
1:100	56,4 $\pm$ 0,1	89,1 $\pm$ 0,1	33,5 $\pm$ 0,1	49,0 $\pm$ 0,1	1,90 $\pm$ 0,10
1:1000 (PMS)	55,8 $\pm$ 0,1	80,9 $\pm$ 0,1	37,8 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	7,37 $\pm$ 0,10
1:1000	50,7 $\pm$ 0,1	89,0 $\pm$ 0,1	23,7 $\pm$ 0,1	9,8 $\pm$ 0,1	1,90 $\pm$ 0,10

$\Sigma 16$  HPAs – Soma dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos;  $\Sigma 4-6$  HPAs – Soma dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com 4 a 6 anéis;  $\Sigma 2-3$  HPAs – Soma dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com 2 a 3 anéis; TPH – Hidrocarbonetos Totais de Petróleo; PYO – Piocianina; PMS – Metossulfato de Fenazina; Razão inóculo:areia de 1:10, 1:100 e 1:1000.

Fonte: Autor (2024)

**Figura 9** – Efeito do metossulfato de fenazina na redução dos hidrocarbonetos (%).

Razão inóculo:areia de 1:10 (vermelho), 1:100 (verde) e 1:1000 (azul). Os números indicam presença (1) e ausência (0) de PMS nos microcosmos: I (p= 0,01); e II (p= 0,01); III (p= 0,01); IV (p= 0,02).

Fonte: autoria própria (2023)

Observando a **Tabela 3**, nos microcosmos contendo PMS, os 16 HPAs tiveram as maiores taxas de remoção diária, levados pelos HPAs de 4-6 anéis, nas condições 1:1000 e 1:10.

**Tabela 3** – Taxa de remoção diária dos hidrocarbonetos (p= 0,01). Os números em negrito representam as maiores taxas, comparado à mesma condição com ou sem metossulfato de fenazina.

Tratamentos	Taxa de degradação ( $\pm 0.10$ mg/Kg)			
	$\Sigma$ 16 HPAs	$\Sigma$ HPAs 2-3 anéis	$\Sigma$ HPAs 4-6 anéis	TPH
1:10 (PMS)	<b>2,25</b>	<b>1,29</b>	3,86	<b>0,20</b>
1:10	1,82	0,74	<b>4,24</b>	0,06
1:100 (PMS)	1,78	0,68	3,86	0,40
1:100	<b>2,69</b>	<b>1,60</b>	<b>4,24</b>	<b>2,33</b>
1:1000 (PMS)	<b>2,66</b>	<b>1,80</b>	3,85	0,03
1:1000	2,41	1,13	<b>4,23</b>	<b>0,47</b>

Fonte: Autor (2024)

Na condição 1:10 a taxa de remoção diária do TPH foi 3,3 vezes maior que nos microcosmos sem PMS. Por outro lado, nas condições sem a fenazina exógena foram registradas as maiores taxas de remoção diária: na condição 1:1000 a diferença na remoção do TPH alcançou 15,6 vezes e na condição 1:100, a diferença foi de 5,8 vezes. Ressalta-se ainda que nesta condição foram observadas as maiores taxas de degradação diária de todos os hidrocarbonetos testados.

As perdas abióticas foram observadas em 10 e 40%, respectivamente para os 16 HPAs e TPH, implicando que a linhagem *P. aeruginosa* TGC04 lidou com as frações mais pesadas do óleo. Adicionalmente, populações na matriz arenosa ao final do tratamento eram de aproximadamente  $10^6$  UFC/g de areia e cerca de  $10^9$  UFC/g/mm<sup>2</sup>, respectivamente, não tendo sido alteradas possivelmente por ainda estarem na fase estacionária.

#### 5.4 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

O teste de ecotoxicidade foi realizado com o intuito de verificar o grau de toxicidade do óleo residual e metabólitos após os 31 dias totais gastos no ensaio (10 + 21). Apenas germinaram as sementes de milho (*Z. Mays*), porém a planta teve um desenvolvimento prejudicado como apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Ensaio de ecotoxicidade com *Zea mays*.

Tratamento	Altura (mm)	Biomassa (g)	Redução da altura (%)	Redução da biomassa
1:10 (PMS)	95,0±1,9	1,13±5,87	34,8±1,9	59,9±0,2
1:10	90,0±7,4	1,29±1,36	66,7±7,4	59,6±0,0
1:100 (PMS)	70,0±2,8	1,19±0,45	75,0±2,8	63,0±0,0
1:100	65,0±1,9	1,19±2,11	75,9±1,9	62,0±0,1
1:1000 (PMS)	160,0±3,7	1,78±0,60	40,7±3,7	45,7±0,0
1:1000	175,0±5,6	1,84±1,66	35,2±5,6	46,0±0,1
Controle	270,0±3,0	3,32±0,12	—	—

Elongação relativa (p = 0,01); biomassa relativa (p= 0,01); redução na altura (p= 0,01); e redução da biomassa (p= 0,02)

Fonte: Autor (2024)

Já o maxixe-do-norte (*C. Anguria*) se mostrou mais sensível que o milho, germinando apenas no grupo controle, alcançando altura média de 70±2 mm e 0,150±0,01g da biomassa, enquanto o grupo controle de *Z. mays* mediu a média de 120±30 mm de altura e 3,320±0,120 g de biomassa.

Ressalta-se que se observou em *Z. mays* uma redução significativa dos parâmetros analisados em comparação com o controle (**Figura 10**). Apenas no número de folhas viáveis todos os tratamentos tiveram mesmo percentual de redução,  $33,3 \pm 0,1\%$ .

**Figura 10** – Germinação da semente *Zea mays* após 15 dias de cultivo. Grupo Controle (A), Razão areia:óleo 1:1000 (B), Razão areia:óleo 1:100 (C) e Razão areia:óleo 1:10 (D).



Fonte: autoria própria (2023)

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 BIOAUMENTO ALÓCTONE

A biodegradação de hidrocarbonetos é um processo complexo que requer microrganismos metabolicamente capazes. O objetivo do trabalho foi fundamentado na hipótese de que as fenazinas exógenas podem estimular a produção de PYO e com isso, aumentar a degradação de hidrocarbonetos do petróleo por agir nas respostas da *P. aeruginosa* na presença de óleo em ambiente rico de oxigênio. O potencial hidrocarbonoclástico bem como o uso de *P. aeruginosa* na biorremediação de solos contaminados por óleo é muito difundido (Suwardi *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019), contudo há pouquíssima informação sobre a associação da degradação dos hidrocarbonetos e fenazinas (Viana *et al.*, 2018, Das e Ma, 2013).

Após um vazamento de óleo, o aumento da matéria orgânica no solo causada pelos hidrocarbonetos resulta num desequilíbrio de nutrientes e novas gerações de microrganismos hidrocarbonoclásticos podem ser impedidas de crescer, proporcionando um cenário que possibilita o tratamento por bioaumento (Leys *et al.*, 2005). Contudo, a taxa de crescimento, a capacidade de utilizar substratos específicos e a habilidade de superar a competitividade natural são fatores determinantes da microbiota para o sucesso do bioaumento de solos contaminados por hidrocarbonetos (Zhu *et al.*, 2015; Duquenne *et al.*, 1999). Novos modelos de bioaumento podem minimizar certas limitações do processo (Fernandez *et al.*, 2019) e algumas estratégias adotadas, como o bioaumento alóctone garantem bons resultados (Chen *et al.*, 2019), como demonstrado por este estudo.

O bioaumento não é indicado para tratamentos prolongados, porém é uma estratégia mais efetiva se aplicado na fase inicial e mais crítica da intervenção após o vazamento (Woźniak-Karczewska *et al.*, 2019). Há relato de que os HPA podem ser removidos em até 75% dentro de 30 a 100 dias aplicando o bioaumento (Cavalcanti *et al.*, 2019). Assim, baseado no fato de que a linhagem *P. aeruginosa* TGC04 removeu mais de 80% dos HPAs de 4-6 anéis em 21 dias, conclui-se que a seleção do microrganismo é vital para um tratamento bem-sucedido. Brzeszcz *et al.* (2020) observaram uma redução de quase 87% do óleo, atribuindo o resultado ao potencial hidrocarbonoclástico microbiano, bem como sua persistência às condições hostis. Porque a composição da microbiota pode variar entre tipos de solos, assim como ao longo das fases da

biorremediação de sítios contaminados por óleo, a escolha mais apropriada do agente é um ponto crítico no processo (Radwan *et al.*, 2019). Logo, com a introdução de um inóculo pré-adaptado aumenta as chances de resultados positivos.

O contato da microbiota com o contaminante, aliado ao aumento da biomassa, impulsiona uma elevação na taxa de transformação. Nesse contexto, o cometabolismo emerge como a rota metabólica preferencial na degradação microbiana dos HPAs no solo. A concentração do cossustrato desempenha um papel crucial, influenciando diretamente os efeitos sinérgicos ou antagônicos no processo (Baggi, 2000). No ensaio, o bioestímulo proporcionado pelo BMC visou disponibilizar nutrientes, promovendo o acesso da microbiota aos hidrocarbonetos e favorecendo o crescimento de *P. aeruginosa*. Resíduos industriais, como o BMC, têm se destacado como adjuvantes eficazes na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos, agregando valor e garantindo uma destinação mais nobre a materiais com pouco apelo comercial (Vasconcelos, 2011). Embora o BMC tenha sido utilizado em condições mínimas neste estudo, visando ser um fator de crescimento da biomassa, seu potencial para reaproveitamento pode ser explorado em uma escala mais ampla.

*Pseudomonas* spp. são bactérias particularmente interessantes no bioaumento porque exibem características cruciais para o rumo do processo: 1) são abundantes no solo; 2) de fácil cultivo e com alta taxa de crescimento incluindo na presença de substratos não convencionais; 3) de fácil manipulação e reintrodução no solo; e 4) com notória versatilidade metabólica e produção de metabólitos ativos (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003). Na literatura há exemplo de que *P. aeruginosa* apresenta os requisitos cruciais em termos de catabolismo de óleo sendo disparadamente promissora em triagens de linhagens hidrocarbonoclásticas (Chikere e Fenibo, 2018). Ressalta-se que embora a PYO possa alterar a composição da diversidade microbiana e/ou do consórcio e resulte na diminuição do percentual de remoção de hidrocarbonetos, culturas axênicas de *P. aeruginosa* produzem resultados por vezes melhores e não menos efetivos que culturas mistas (Norman *et al.*, 2004).

Ilori e Amund (2000) a descreveram como a única a degradar 13 hidrocarbonetos dentre quatro diferentes espécies investigadas. Mittal e Singh (2009) observaram que quatro linhagens de *P. aeruginosa* degradaram 20% de compostos aromáticos em 60 dias numa triagem com 20 isolados. Shekhar *et al.* (2014) descreveram o crescimento de *P. aeruginosa* na presença de cinco tipos de hidrocarbonetos aromáticos em concentrações de até 5% por 10 dias, quando observaram um efeito mais tóxico à célula, porém não

biocida. Já Bello-Akinosho *et al.* (2016) discutiram sobre *P. aeruginosa* melhor contribuir para o retorno da fertilidade do solo agrícola contaminado por hidrocarbonetos (20:1 e 200:1), dentre quarenta e quatro isolados testados.

No presente estudo foi observada uma alta taxa de degradação diária dos HPAs pela *P. aeruginosa* TGC04. Isto possivelmente ocorreu em função do inóculo ter se mantido por mais tempo na fase estacionária de crescimento porque utiliza diferentes vias metabólicas alternativas que interagem ao metabolismo basal (Frimmersdorf *et al.*, 2010). Com isso, o inoculante pode tolerar compostos mais tóxicos do óleo, como os HPAs com 4-6 anéis e comumente estas moléculas tornam-se fontes de carbono preferenciais (Vasconcelos *et al.*, 2013). Karamalidis *et al.* (2010), ao contrário do nosso estudo, observaram preferência por HPAs com 3 anéis e só a partir do 21º dia os demais HPAs começaram a ser degradados. Por outro lado, Salam *et al.* (2011) verificaram que duas linhagens de *P. aeruginosa* degradaram 90 a 92% de diferentes hidrocarbonetos em 21 dias, demonstrando mais afinidade ao pireno e ao óleo cru, registrando uma taxa de remoção diária de 4,32 a 4,38%, valores aproximados ao que vimos neste estudo com os HPAs de 4-6 anéis.

A degradação de moléculas mais recalcitrantes, tais como HPAs de 4-6 anéis ocorre via cometabolismo, em que os HPAs de 4 anéis ou HPAs de 2-3 anéis biodisponíveis podem ser utilizados como cossustratos (Vasconcelos *et al.*, 2013). A taxa de degradação de HPAs é maior quando a contaminação ocorre em misturas de HPAs. Sawulski *et al.* (2015) observaram que em 20 dias, a assimilação de fenantreno contribuiu para a remoção do fluoranteno. Da mesma forma, benzo[a]pireno foi removido na presença de HPAs de 4 anéis. Em completo, os HPAs de 4-6 anéis são mais tóxicos do que os HPAs de 2-3 anéis, mas a indução de enzimas que degradam os hidrocarbonetos mais pesados acaba servindo para remoção dos hidrocarbonetos mais leves, fenômeno descrito para tratamentos utilizando culturas puras (Sawulski *et al.*, 2015). Silva *et al.* (2009) observaram que após 12 semanas (perda abiótica = 20%), o pireno foi rapidamente consumido e participou da remoção de HPAs com mais de 5 anéis. Por outro lado, embora naftaleno, antraceno e fenantreno tenham sido mais removidos que os HPAs de 4-6 anéis, verificou-se concentrações residuais do naftaleno, como também observado no presente estudo, atribuindo isto ao fato da molécula ter ficado menos biodisponível.

Innemanová *et al.* (2018) descreveram uma redução de 72% dos HPAs de 5-6 anéis em 4 meses e como observado no presente trabalho, o inoculante mais concentrado gerou resultados menos positivos em termos de degradação, isto porque o inóculo fica limitado,

porém ainda se desconhece o mecanismo de como isso pode ocorrer. Em outra investigação, foi verificado que não houve diferença entre o inóculo livre ou englobado de *P. aeruginosa* Spet e os HPAs foram reduzidos em até 89% em 191 dias (Karamalidis *et al.*, 2010), o que torna uma vantagem econômica à metodologia empregada no presente estudo.

O TPH por outro lado, não foi consumido na proporção como HPAs. Haghollahi *et al.* (2016) verificaram redução de 70% do TPH em areia, entretanto, após 270 dias. Os autores assumiram o resultado ao fato de que em solos arenosos a taxas de degradação de TPH é alta porque são solos porosos, permitindo a transferência de oxigênio, bem como o bioacesso e que em poros < 3 mm praticamente esta propriedade se desfaz. Neste sentido, supomos que o TPH no presente estudo foi menos consumido pelas características da massa de óleo encrustada nos aglomerados.

A complexidade química do óleo extrapesado é um desafio ainda maior pela baixa disponibilidade dos hidrocarbonetos, mas cabe ressaltar que *P. aeruginosa* TGC04 alcançou 50% da redução de TPH em um tempo significativamente menor que estudos prévios a este (Haghollahi *et al.*, 2016; Lladó *et al.*, 2012).

## 6.2 PAPEL DAS FENAZINAS

Areias da praia são sítios cuja microbiota assume papel-chave no equilíbrio do ecossistema costeiro (Disner e Torres, 2020). A contaminação por óleo altera drasticamente a razão C:N:P do solo e em resposta ao estresse nutricional instalado, *P. aeruginosa* sintetiza diferentes fenazinas utilizando níveis intracelulares de ATP (Özcan e Kahraman, 2015). Além de gerar energia para a célula, as fenazinas conferem vantagem seletiva de crescimento para seus produtores (Blankenfeldt *et al.*, 2004). Isto contribui para os microrganismos produtores de fenazinas, como *P. aeruginosa*, se tornarem dominantes após um episódio de vazamento de óleo (Norman *et al.*, 2004).

As fenazinas participam da regulação de *fitness* entre as espécies (Fitzpatrick, 2009), ou seja, as relações ecológicas negativas que garantem o equilíbrio naquele microsistema. Além disso, protegem as células da toxicidade dos hidrocarbonetos, por diferentes mecanismos (Costa *et al.*, 2015). Como dito anteriormente, a PYO é a principal fenazina produzida por *P. aeruginosa*, e embora não haja comunicação de que exista uma correlação da síntese do pigmento com sua resiliência em ambientes hostis, as linhagens que mais produzem PYO parecem ser mais significativamente resistentes a compostos

tóxicos (Finlayson e Brown, 2011). Em complemento, os mecanismos pelos quais a PYO participa da transformação dos hidrocarbonetos ainda não foram totalmente desobertos, sendo acreditadas duas hipóteses: a primeira trata da geração de compostos reativos de oxigênio ou de radicais livres que atacam os hidrocarbonetos (Jabłońska *et al.*, 2023). A segunda hipótese atribui à PYO o papel de fator terminal de sinalização de *quorum sensing* da *P. aeruginosa* na síntese de biosurfactantes que aumentam a área de contato do óleo, bem como sua assimilação e metabolização em intermediários do ciclo do ácido cítrico, importantes para produção de biomassa e energia (Dietrich *et al.*, 2006), enquanto os açúcares necessários no processo provêm da gliconeogênese (Das e Chandran, 2011).

A PYO também participa da formação de biofilmes que protege *P. aeruginosa* dos efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos (Das *et al.*, 2013). O crescimento do biofilme depende de ferro e compostos redox ativos como as fenazinas podem ajudar a aumentar a biodisponibilidade de  $Fe^{2+}$  (McRose *et al.*, 2023). O metal ocorre em zonas costeiras e o ferro age como barreira retendo e acumulando espécies químicas como o fósforo (Charette e Sholkovitz, 2002). Além disso, o conteúdo de calcáreo da areia auxilia no depósito e transporte do ferro, proporcionando um cenário em que é possível a persistência da microbiota nestes sítios. Ressalta-se que um estudo prévio identificou que o conteúdo do ferro na área do acidente é por volta de 5000 mg/Kg (Mirlean *et al.*, 2013).

O PMS foi adicionado no intuito de disponibilizar fenazina no início do crescimento do pré-inóculo, bem como estimular a produção de PYO pela *P. aeruginosa* TGC04. A introdução de um mediador redox exógeno de fenazina foi usada porque na fase log de crescimento das bactérias a produção de fenazinas é baixa em razão da repressão catabólica resultante da depleção das fontes de C e N; e da mudança de vida planctônica para sésil (Denning *et al.* 2003). O PMS é análogo da 5-Me-PCA intermediário da PYO, e em concentrações baixas não é tóxica, permitindo o desenvolvimento de colônias, tolerância aos hidrocarbonetos e formação de biofilmes de *P. aeruginosa* em ambientes com limitações de oxigênio (Sporer *et al.*, 2018).

A função do PMS é servir como acceptor primário de elétrons em uma reação redox, resultando na geração de superóxido e hidroxila (Jahn *et al.*, 2020). Estes radicais livres além de reduzirem NAD(P)H intracelular em NAD(P) (Yamaki e Muratsubaki, 2012), também podem agir nas células sensíveis, reduzindo o crescimento de competidores (Wang e Coates, 2017).

Os radicais livres promovem ataque nucleofílico nos hidrocarbonetos, especialmente aromáticos e aromáticos condensados, desestabilizando a molécula

(Unglaube *et al.*, 2020), o que pode explicar a maior redução de HPA relativo ao TPH. Os nossos resultados basearam nossa hipótese que deverá ser averiguada em trabalhos futuros. Radicais livres são produtos gerados em processos aeróbicos em *P. aeruginosa*. Um ciclo redox mediado pelo NADPH é regulado por fenazinas, reduzindo o potencial redox destruidor dos radicais livres. Com isso a PYO também regula o metabolismo primário durante fase log de crescimento de *P. aeruginosa* e mantém a célula estável no ambiente, prolongando a fase estacionária. A PMS adicionada pode ter promovido ataque nucleofílico mas também aumentou o estresse oxidativo e para neutralizar os radicais livres formados, *P. aeruginosa* TGC04 pode ter utilizado PMS como acceptor de elétrons do NADPH, obtendo os meios para garantir produção de biomassa e energia, mas dando uma aparente desaceleração da taxa de degradação, comparado aos microcosmos sem PMS. Esta hipótese pode ser usada para aprofundar a pesquisa sobre a cinética de biorremediação das frações do TPH.

### 6.3 AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE

Os hidrocarbonetos absorvidos pelas plantas desenvolvidas em solos contaminados por óleo promovem mudanças nos seus parâmetros biofísicos e fisiológicos (Brennan *et al.*, 2014). *C. anguria* apenas germinou e cresceu no controle enquanto *Z. mays* se desenvolveu, porém, de forma não satisfatória comparada ao controle. *C. anguria* é um bom indicador de fertilidade em testes de ecotoxicidade com solos contaminados por hidrocarbonetos (Shulze *et al.*, 2019). Há duas razões importantes para este achado. A primeira diz respeito ao tipo e tamanho das sementes, i.e., sementes pequenas, claras e com dois cotilédones (*C. anguria*) são mais sensíveis que sementes maiores, de monocotiledôneas (*Z. mays*), isto porque a semente de milho apresenta maior conteúdo de amido como reserva energética. Em complemento, o processo de germinação depende menos de fatores externos, contudo os compostos voláteis presentes na região da raiz podem impedir o desenvolvimento da planta (Cavalcanti *et al.*, 2016). Além disso, os hidrocarbonetos impedem absorção de nutrientes por causarem ruptura da raiz ou redução da disponibilidade de água e oxigênio (Serrana-Calvo *et al.*, 2021).

Sabe-se que a resposta da planta varia com a concentração de hidrocarbonetos no solo (Baek *et al.*, 2004). Quando ela é  $< 5\text{g/Kg}$  de óleo no solo, há estímulo no crescimento, porém quando a concentração é  $> 50\text{ g/Kg}$  de óleo no solo, observa-se uma significativa redução no crescimento da planta. Nossos resultados foram em acordo com

o estudo de Serrana-Calvo *et al.* (2021) que analisaram o crescimento do milho em solos contaminados por 13 HPAs. Embora que na presente pesquisa tenha sido removida grande parcela de HPAs, a não redução do teor do TPH promoveu um cenário suficiente para alterar parâmetros biofísicos do milho, sugestivo de que mais tempo seria necessário até que a toxicidade do solo pudesse ser reduzida.

## 7. CONCLUSÕES

*P. aeruginosa* TGCO4 demonstrou elevado potencial para ser empregado como agente de biorremediação de sistemas de solo contaminados com óleo cru extrapesado. Como contribuição ampliamos com evidências de que a adição de fenazina exógena não potencializa a atividade hidrocarbonoclástica de *P. aeruginosa* TGC04, contudo, favorece a transformação de HPAs, mais significativamente aqueles com 4 a 6 anéis. Nas condições empregadas nesse estudo, os ensaios de ecotoxicidade revelaram uma redução da toxicidade na matriz arenosa tratada, mas impactos na germinação e desenvolvimento de plantas foram observados.

É importante notar que esses resultados não podem ser usados para prever o desempenho em campo, mas indicam que a melhor abordagem na remoção de HPAs parece ser o bioaumento alóctone, estimulando a produção de PYO e que PMS pode servir como associação de estratégia química ao tratamento biológico.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-SHAFY, H.I.; MANSOUR, M.SM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egypt J Petrol.** v. 25, n. 1, p. 107-123, 2016.

ABDELAZIZ, A.A. *et al.* A purified and lyophilized *Pseudomonas aeruginosa* derived pyocyanin induces promising apoptotic and necrotic activities against MCF-7 human breast adenocarcinoma. **Microb Cell Fact.** v. 21, n. 1, p. 262, 2022.

ABENA, M.T.B. *et al.* Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. **Chemosphere.** v. 234, p. 864-874, 2019.

ABU, E.A. *et al.* Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiology.** v. 159, n. Pt\_8, p. 1736-1747, 2013.

AISLABIE, J.; SAUL, D.J.; FOGHT, J.M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles.** v. 10, p. 171-179, 2006.

ARAÚJO, K.C. *et al.* Oil spill in northeastern Brazil: Application of fluorescence spectroscopy and PARAFAC in the analysis of oil-related compounds. **Chemosphere.** v. 267, p. 129154, 2021.

ARRUDA, R.R.A. *et al.* Activity of two exometabolites produced by *Escherichia coli* on the synthesis of pyocyanin. **Int J Adv Eng Res Sci.** v. 6, n. 7, 2019.

AZEVEDO, J.A.H.; ARAÚJO, R.S.; SILVA, G.M.M. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos atmosféricos de fontes automotivas: uma breve revisão. **Holos.** v. 1, p. 102-114, 2013.

BAEK, K-H. *et al.* Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. **J Environ Sci Health, Part A.** v. 39, n. 9, p. 2465-2472, 2004.

BAGGI, G. Ecological implications of synergistic and antagonistic interactions among growth and non growth analogs present in mixture. **Annal Microbiol.** v. 50, n. 2, p. 103-116, 2000.

BAHARI, S. *et al.* Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. **J Global Antimicrob Resist.** v. 10, p. 21-28, 2017.

BATISTA DOS ANJOS, R. *et al.* Evaluation of toxicity for mysidopsis juniae species in cases of oil spill in the brazilian potiguar basin. **Revista Foco.** v. 16, n. 4, 2023.

BELLO-AKINOSHO, M. *et al.* Potential of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial isolates to contribute to soil fertility. **BioMed Res Int.** v. 2016, 2016.

BLANKENFELDT, W. *et al.* Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. **Proceed Nat Acad Sci.** v. 101, n. 47, p. 16431-16436, 2004.

BRENNAN, A. *et al.* Effects of biochar and activated carbon amendment on maize growth and the uptake and measured availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and potentially toxic elements (PTEs). **Environ Pollut.** v. 193, p. 79-87, 2014.

BRZESZCZ, J. *et al.* Hydrocarbon removal by two differently developed microbial inoculants and comparing their actions with biostimulation treatment. **Molecules.** v. 25, n. 3, p. 661, 2020.

CAVALCANTI, T.G. *et al.* Use of agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. **Waste Biomass Valor.** v. 10, p. 205-214, 2019.

CAWLEY, A. *et al.* Microbiology insights into boosting salivary defences through the use of enzymes and proteins. **J Dentistry.** v. 80, p. S19-S25, 2019.

CHARETTE, M.A.; SHOLKOVITZ, E.R. Oxidative precipitation of groundwater-derived ferrous iron in the subterranean estuary of a coastal bay. **Geophysic Res Let.** v. 29, n. 10, p. 85-1-85-4, 2002.

CHEN, Y-A. *et al.* Biodegradability and microbial community investigation for soil contaminated with diesel blending with biodiesel. **Process Safety Environ Protec.** v. 130, p. 115-125, 2019.

CHIKERE, C.B.; FENIBO, E.O. Distribution of PAH-ring hydroxylating dioxygenase genes in bacteria isolated from two illegal oil refining sites in the Niger Delta, Nigeria. **Sci Afr.** v. 1, p. e00003, 2018.

CHIN-A-WOENG, T.F.C; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**. v. 157, n. 3, p. 503-523, 2003.

CORRÊA, P.F. et al. Utilização de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. **Blucher Chem Eng Proceed**. v. 1, n. 2, p. 2847-2854, 2015.

COSTA, K.C. et al. Enzymatic degradation of phenazines can generate energy and protect sensitive organisms from toxicity. **MBio**. v. 6, n. 6, p. 10.1128/mbio. 01520-15, 2015.

CRONE, S. *et al.* The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. **APMIS**, v. 128, n. 3, p. 220-231, 2020.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnol Res Int**. v. 2011, 2011.

DAS, T. *et al.* Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. **PloS One**. v. 8, n. 3, p. e58299, 2013.

DAS, P.; MA, L.Z. Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. **Int Biodeter Biodegrad**. v. 85, p. 278-283, 2013.

DAUGULIS, A.J.; MCCRACKEN, C.M. Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp. **Biotechnol Let**. v. 25, p. 1441-1444, 2003.

DEL'ARCO, J.P.; DE FRANCA, F.P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. **Environ Pollut**. v. 112, n. 3, p. 515-519, 2001.

DENNING, G.M. *et al.* Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Molec Physiol**. v. 285, n. 3, p. L584-L592, 2003.

DEPKE, T. et al. Untargeted LC-MS metabolomics differentiates between virulent and avirulent clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biomolecules**. v. 10, n. 7, p. 1041, 2020.

DIETRICH, L.E.P. *et al.* The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molec Microbiol.** v. 61, n. 5, p. 1308-1321, 2006.

DISNER, G.R. *et al.* The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. **Rev Bras Gest Amb Sustent.** 2020.

DOURADO NETO, D. *et al.* Distribution and population of plants and maize grain yield. **Rev Bras Milho Sorgo.** <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v2n3p63-77>, 2003.

DUQUENNE, P. *et al.* Effect of carbon source supply and its location on competition between inoculated and established bacterial strains in sterile soil microcosm. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 29, n. 4, p. 331-339, 1999.

ESTEVO, M. *et al.* Immediate social and economic impacts of a major oil spill on Brazilian coastal fishing communities. **Marine Pollut Bull.** v. 164, p. 111984, 2021.

FERNANDEZ, M. *et al.* How the bacterial community of a tannery effluent responds to bioaugmentation with the consortium SFC 500-1. Impact of environmental variables. **J Environ Manag.** v. 247, p. 46-56, 2019.

FINLAYSON, E.A.; BROWN, P.D. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. **West Indian Med J,** p. 24-32, 2011.

FITZPATRICK, D.A. Lines of evidence for horizontal gene transfer of a phenazine producing operon into multiple bacterial species. **J Molec Evol.** v. 68, p. 171-185, 2009.

FRANCO-HERNÁNDEZ, O. *et al.* Dynamics of carbon, nitrogen and phosphorus in soil amended with irradiated, pasteurized and limed biosolids. **Bioresour Technol.** v. 87, n. 1, p. 93-102, 2003.

FRIMMERSDORF, E. *et al.* How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. **Environ Microbiol.** v. 12, n. 6, p. 1734-1747, 2010.

GONÇALVES, T.; VASCONCELOS, U. Colour me blue: the history and the biotechnological potential of pyocyanin. **Molecules.** v. 26, n. 4, p. 927, 2021.

GUTTENBERGER, N.; BLANKENFELDT, W.; BREINBAUER, R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. **Bioorganic Med Chem.** v. 25, n. 22, p. 6149-6166, 2017.

HAGHOLLAHI, A.; FAZAELIPOOR, M.H.; SCHAFFIE, M. The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. **J Environ Manag.** v. 180, p. 197-201, 2016.

HELMY, Q.; LAKSMONO, R.; KARDENA, E. Bioremediation of aged petroleum oil contaminated soil: from laboratory scale to full scale application. **Procedia Chem.** v. 14, p. 326-333, 2015.

HERRERO, M.; STUCKEY, D.C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: a review. **Chemosphere.** v. 140, p. 119-128, 2015.

HUANG, Y. *et al.* Alternating current enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils. **Environ Sci Pollut Res.** v. 28, n. 34, p. 47562-47573, 2021.

ILORI, M.O.N.; AMUND, D-I. Degradation of anthracene by bacteria isolated from oil polluted tropical soils. **Zeitschrift für Naturforschung C.** v. 55, n. 11-12, p. 890-897, 2000.

INNEMANOVA, P. *et al.* Bioaugmentation of PAH-contaminated soils: A novel procedure for introduction of bacterial degraders into contaminated soil. **Ecol Eng.** v. 118, p. 93-96, 2018.

ISO. **Particle size analysis—Laser diffraction methods.** 2009.

JABŁOŃSKA, J. *et al.* The two faces of pyocyanin-why and how to steer its production?. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 39, n. 4, p. 103, 2023.

JACQUES, R.J.S. *et al.* Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Ciênc Rural.** v. 37, p. 1192-1201, 2007.

JAHN, B. *et al.* Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. **J Biol Inorg Chem.** v. 25, p. 199-212, 2020.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 30, p. 1159-1168, 2014.

JIMENEZ, N.P., *et al.* The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Molec Biol Rev.** v. 76, n. 1, p. 46-65, 2012.

KARAMALIDIS, A.K. *et al.* Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. **Bioresour Technol.** v. 101, n. 16, p. 6545-6552, 2010.

KIM, K-H. *et al.* A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. **Environ Int.** v. 60, p. 71-80, 2013.

KOLESNIKOVAS, C.; OLIVEIRA, E.; DUARTE, U. Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. **Águas Subterrâneas.** v. 23, n. 1, p. 31-44, 2009.

LAURSEN, J.B.; NIELSEN, J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. **Chem Rev.** v. 104, n. 3, p. 1663-1686, 2004.

LEONEL, L.V. *et al.* Biorremediação do solo. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa,** v. 26, n. 51, p. 37-52, 2018.

LESSA, G.C. *et al.* The 2019 Brazilian oil spill: insights on the physics behind the drift. **J Marine Syst.** v. 222, p. 103586, 2021.

LEYS, N.M. *et al.* Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 66, p. 726-736, 2005.

LLADÓ, S. *et al.* A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. **Sci Total Environ.** v. 435, p. 262-269, 2012.

MANGWANI, N.; KUMARI, S.; DAS, S. Involvement of quorum sensing genes in biofilm development and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* N6P6. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 99, p. 10283-10297, 2015.

MAVRODI, D.V. *et al.* Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J Bacteriol.** v. 183, n. 21, p. 6454-6465, 2001.

MCROSE, D.L.; LI, J.; NEWMAN, D.K. The chemical ecology of coumarins and phenazines affects iron acquisition by pseudomonads. **Proceed Nat Acad Sci.** v. 120, n. 14, p. e2217951120, 2023.

MIRLEAN, N. *et al.* Sandy beaches contamination by arsenic, a result of nearshore sediment diagenesis and transport (Brazilian coastline). **Estuarine Coastal Shelf Sci.** v. 135, p. 241-247, 2013.

MITTAL, A.; SINGH, P. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. **Ind J Exp Biol.** v. 47, n. 9, p. 760-765, 2009.

NOBRE, P. *et al.* The 2019 northeast Brazil oil spill: scenarios. **Anais Acad Bras Ciênc.** v. 94, 2022.

NORMAN, R.S. *et al.* Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. **Appl Environ Microbiol.** v. 70, n. 7, p. 4004-4011, 2004.

NOWAK, A.; MROZIK, A. Facilitation of co-metabolic transformation and degradation of monochlorophenols by *Pseudomonas* sp. CF600 and changes in its fatty acid composition. **Water Air Soil Pollut.** v. 227, p. 1-13, 2016.

OJEWUMI, M.E. *et al.* Bioremediation: Data on *Pseudomonas aeruginosa* effects on the bioremediation of crude oil polluted soil. **Data Br.** v. 19, p. 101-113, 2018.

OLIVEIRA, O.M.C. *et al.* Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. **Marine Pollut Bull.** v. 160, p. 111597, 2020.

OLSEN, D.K.; RAMZEL, E.B. Heavy oil refining and transportation: effect on the feasibility of increasing domestic heavy oil production. **Fuel.** v. 71, n. 12, p. 1391-1401, 1992.

ORGIAZZI, A. *et al.* Soil biodiversity and DNA barcodes: opportunities and challenges. **Soil Biol Biochem.** v. 80, p. 244-250, 2015.

ÖZCAN, D.; KAHRAMAN, H. Pyocyanin production in the presence of calcium ion in *Pseudomonas aeruginosa* and recombinant bacteria. **Turk J Sci Technol**. v. 10, n. 1, p. 13-19, 2015.

OZDAL, M. et al. Enhancement of pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* via the addition of n-hexane as an oxygen vector. **Biocatal Agric Biotechnol**. v. 22, p. 101365, 2019.

PENA, P.G.L. et al. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public health emergency. **Cad Saúde Púb**. v. 36, p. e00231019, 2020.

RADA, B.; LETO, T.L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Trends Microbiol**. v. 21, n. 2, p. 73-81, 2013.

RADWAN, S.S.; AL-MAILEM, D.M.; KANSOUR, M.K. Bioaugmentation failed to enhance oil bioremediation in three soil samples from three different continents. **Sci Rep**. v. 9, n. 1, p. 19508, 2019.

SALAM, L.B. et al. Biodegradation of bonny light crude oil by bacteria isolated from contaminated soil. **Int J Agric Biol**. v. 13, n. 2, p. 245-250, 2011.

SARANYA, R.; JAYAPRIYA, J.; TAMILSELVI, A. Dyeing of silk fabric with phenazine from *Pseudomonas* species. **Color Technol**. v. 128, n. 6, p. 440-445, 2012.

SARKAR, J. et al. Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. **Front Microbiol**. v. 7, p. 1407, 2016.

SHAH, M.P.; BORASIYA, H. Bio-augmentation: a fantabulous technology in waste water treatment. **Int J Environ Sci Nat Res**. v. 1, n. 3, p. 93-95, 2017.

SAWULSKI, P. et al. Differential degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by indigenous microbial assemblages in soil. **Lett Appl Microbiol**. v. 61, n. 2, p. 199-207, 2015.

SCHULZE, C.C., et al. Verification of potential herbicide-biodegradation by two strains of *Bacillus safensis* recovered from sugarcane cultivation soil. **Int J Eng Res Appl**. V. 9, n. 12, p. 54-60, 2020.

SCOTT-THOMAS, A.J. *et al.* 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. **BMC Pulm Med.** v. 10, p. 1-10, 2010.

SERRANO-CALVO, R.; CUTLER, M.E.J.; BENGOUGH, A.G. Spectral and growth characteristics of willows and maize in soil contaminated with a layer of crude or refined oil. **Remote Sensing.** v. 13, n. 17, p. 3376, 2021.

SHEKHAR, S.K.; GODHEJA, J.; MODI, D.R. Hydrocarbon bioremediation efficiency by five indigenous bacterial strains isolated from contaminated soils. **Int J Curr Microbiol App Sci.** v. 4, n. 3, p. 892-905, 2015.

SKINDER, B.M.; UQAB, B.; GANAI, B.A. Bioremediation: a sustainable and emerging tool for restoration of polluted aquatic ecosystem. **Fresh Water Pollut Dynamic Remed.** p. 143-165, 2020.

SILVA, I.S. *et al.* Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. **Bioresour Technol.** v. 100, n. 20, p. 4669-4675, 2009.

SILVA, E.S.; PRAGANA, L.G.; VASCONCELOS, U. Photooxidation vs biodegradation: A short review on fate of heavy hydrocarbons after oil spill in sea water. **Int J Eng Res Appl.** v. 11, n. 5, p. 8-17, 2021.

SPEIGHT, J.G.; EL-GENDY, N.S. **Introduction to petroleum biotechnology.** Gulf Professional Publishing, 2017.

SPORER, A.J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* PumA acts on an endogenous phenazine to promote self-resistance. **Microbiology.** v. 164, n. 5, p. 790, 2018.

SUNDARAM, S.; DAS, M.T.; THAKUR, I.S. Biodegradation of cypermethrin by *Bacillus* sp. in soil microcosm and in-vitro toxicity evaluation on human cell line. **Int Biodeterior Biodegrad.** v. 77, p. 39-44, 2013.

SUWARDI, A.; RATNANINGSIH, R.; RINANTI, A. Bioremediation of petroleum hydrocarbon by mixed bacteria culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacterium* sp. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.** IOP Publishing, 2021. p. 052036.

TERAMOTO, M.; QUECK, S.Y.; OHNISHI, K. Specialized hydrocarbonoclastic bacteria prevailing in seawater around a port in the Strait of Malacca. **PLoS One,** v. 8, n. 6, p. e66594, 2013.

SZAJA, A. *et al.* The Effect of bioaugmentation with Archaea on the oxygen uptake rate in a sequencing batch reactor. **Water**. v. 10, n. 5, p. 575, 2018.

UNGLAUBE, F. *et al.* Phenazine radical cations as efficient homogeneous and heterogeneous catalysts for the cross-dehydrogenative aza-henry reaction. **Helvetica Chimica Acta**. v. 103, n. 12, p. e2000184, 2020.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 351.2 – **Determination of total Kjeldahl nitrogen by semi-automatic colorimetric**, 1993.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 365.3 – **Phosphorus, all forms (colorimetric, ascorbic acid, two reagents)**, 1978.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 8015 – **Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography/Flame Ionization Detector**, 1996.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 8270 – **Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 1996.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 9060 – **Total Organic Carbon**, 1996.

VASCONCELOS, U. **Tratamento microbiológico sequencial de solo proveniente de unidade de dessorção térmica**. 2011. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

VASCONCELOS, U.; FRANÇA, F.P.; OLIVEIRA, F.J.S. Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. **Quím Nova**. v. 34, p. 218-221, 2011.

VASCONCELOS, U.; OLIVEIRA, F.J.S.; FRANÇA, F.P. Raw glycerol as cosubstrate on the pahs biodegradation in soil. **Can J Pure Appl Sci**, v. 7, p. 2203-2209, 2013.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environ Int**. v. 26, n. 5-6, p. 409-411, 2001.

VIANA, A.A.G. *et al.* Correlation between pyocyanin production and hydrocarbonoclastic activity in nine strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Adv Eng Res Sci**, v. 5, n. 7, p. 212-223, 2018.

WANG, O.; COATES, J.D. Biotechnological applications of microbial (per) chlorate reduction. **Microorganisms**. v. 5, n. 4, p. 76, 2017.

WATANABE, K.; HAMAMURA, N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. **Current Opin Biotechnol**. v. 14, n. 3, p. 289-295, 2003.

WOŹNIAK-KARCZEWSKA, M. *et al.* Effect of bioaugmentation on long-term biodegradation of diesel/biodiesel blends in soil microcosms. **Sci Total Environ**. v. 671, p. 948-958, 2019.

WU, C-H. *et al.* Enhancement of power generation by toluene biodegradation in a microbial fuel cell in the presence of pyocyanin. **J Taiwan Inst Chem Eng**. v. 45, n. 5, p. 2319-2324, 2014.

WU, M. *et al.* Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. **Chemosphere**. v. 237, p. 124456, 2019.

YUAN, G-L. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of the central Tibetan Plateau, China: distribution, sources, transport and contribution in global cycling. **Environ Pollut**. v. 203, p. 137-144, 2015.

YAMAKI, A.; MURATSUBAKI, H. Phenazine methosulfate decreases HIF-1 $\alpha$  accumulation during the exposure of cells to hypoxia. **Biosci Biotechnol Biochem**. v. 76, n. 9, p. 1682-1687, 2012.

ZACHARIAS, D.C.; GAMA, C.M.; FORNARO, A. Mysterious oil spill on Brazilian coast: Analysis and estimates. **Marine Pollut Bull**. v. 165, p. 112125, 2021.

ZHANG, Q-Q. *et al.* Bioaugmentation as a useful strategy for performance enhancement in biological wastewater treatment undergoing different stresses: Application and mechanisms. **Crit Rev Environ Sci Technol**. v. 47, n. 19, p. 1877-1899, 2017.

ZHANG, Z.; LO, I.M.C. Biostimulation of petroleum-hydrocarbon-contaminated marine sediment with co-substrate: involved metabolic process and microbial community. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 99, p. 5683-5696, 2015.

ZHAO, F. *et al.* Bioaugmentation of oil reservoir indigenous *Pseudomonas aeruginosa* to enhance oil recovery through in-situ biosurfactant production without air injection. **Bioresour Technol.** v. 251, p. 295-302, 2018.

ZHU, X. *et al.* Bioaugmentation treatment of PV wafer manufacturing wastewater by microbial culture. **Water Sci Technol.** v. 72, n. 5, p. 754-761, 2015.

## APÊNDICE A – RESUMO PUBLICADO EM CONGRESSO

VIANA, A. A. G.; DIAS, D. S. B. ; VASCONCELOS, U. . Biotransformação de óleo cru vazado em uma praia do litoral de Pernambuco. In: XIII BRASPOR, 2023, Cascais. Encontro Rede BRASPOR: A linha de costa como espaço de interface e identidade: Contributos interdisciplinares das humanidades azuis. Lisboa: Rede Braspor, 2023. v. 1. p. 68-69.

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

Andrwey Augusto Galvão Viana, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil, [andrwey-viana@hotmail.com](mailto:andrwey-viana@hotmail.com); Diogo Simas Bernardes Dias, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia (COPPE), Rio de Janeiro, [diogosimasbd@gmail.com](mailto:diogosimasbd@gmail.com); Ulrich Vasconcelos, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil, [u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br](mailto:u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br).

**Palavras-Chave:** Biorremediação; Bioaumento alóctone; Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

#### RESUMO::

Por quase dez meses entre 2019 e 2020, muitas toneladas de óleo cru foram encontradas numa faixa ao longo de mais de 60% da linha costeira brasileira. Este vazamento é considerado o maior acidente da história do Brasil e um dos maiores desastres envolvendo óleo cru do mundo. Algumas ações foram tomadas visando a mitigação do desastre, porém as consequências durarão por décadas porque as moléculas mais recalcitrantes representam maior risco. Este trabalho teve por objetivo verificar a redução dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) de amostras da areia contaminada, utilizando bioaumento alóctone, em escala laboratorial, com *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04, linhagem hidrocarbonoclástica isolada por nosso grupo. Foram preparados microcosmos contendo areia fina pasteurizada, misturada com areia contaminada proveniente da praia de Tamandaré – Pernambuco (razão 1:5), adicionada do inóculo (razão inóculo: solo; 1:10; 1:100 e 1:1000). Após a mistura, cupons de dolamita (100 mm<sup>2</sup>) foram encravados na subsuperfície para quantificação do biofilme. O inóculo foi preparado a partir da incubação de *P. aeruginosa* TGC-04 (5 mL  $\approx$  10<sup>4</sup> UFC/mL) por 10 dias à 29±1°C em 100 g de areia de praia pasteurizada, misturada com bagaço de malte de cevada 0,5% (w/w). O ensaio de biorremediação durou 21 dias à 29±1°C. As perdas abióticas foram conhecidas em microcosmo