

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

LINDAMARA DE LIMA CASTRO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE UM CONSÓRCIO
BACTERIANO EM DIFERENTES TIPOS DE ÓLEO DIESEL**

MANAUS

2026

LINDAMARA DE LIMA CASTRO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE UM CONSÓRCIO
BACTERIANO EM DIFERENTES TIPOS DE ÓLEO DIESEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Isabelle Bezerra Cordeiro

MANAUS

2026

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

- O48a Oliveira, Lindamara de Lima Castro
 Avaliação do potencial biorremediador de um consórcio
 bacteriano em diferentes tipos de óleo diesel / Lindamara de Lima
 Castro Oliveira. - 2026.
 89 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Isabelle Bezerra Cordeiro.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas,
 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2026.
1. Biorremediação. 2. Consórcio microbiano. 3. Óleo diesel. 4.
 Biossurfactantes. I. Cordeiro, Isabelle Bezerra. II. Universidade
 Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em
 Biotecnologia. III. Título
-

LINDAMARA DE LIMA CASTRO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE UM CONSÓRCIO
BACTERIANO EM DIFERENTES TIPOS DE ÓLEO DIESEL**

Dissertação de Mestrado submetido ao Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador(a): Prof(a). Dra. Isabelle Bezerra Cordeiro

Aprovado em 25 de fevereiro de 2026

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Isabelle Bezerra Cordeiro, Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof^a Dra. Elen Bethleen de Souza Carvalho, Membro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva, Membro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

MANAUS

2026

Dedico aos meus filhos, João Pedro
Castro e Linda Luane Castro, pois são
meus combustíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder saúde, força e perseverança.

Aos meus professores orientadores e coordenadores do laboratório em que atuei, Prof.^a Dr.^a Isabelle Bezerra Cordeiro e Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, por todo o ensinamento, incentivo e dedicação ao meu trabalho, fundamentais para minha formação acadêmica e científica.

Ao meu esposo, Yasser Oliveira, por ser o provedor da nossa família, minha âncora nos momentos difíceis e meu maior incentivador.

Aos meus pais, Valcilen Lima e Jucimar Araújo, pelas orações constantes e pelo apoio incondicional em busca do meu sucesso.

Às minhas irmãs, Eliomara Abreu e Milene Castro, por todas as palavras de conforto e carinho ao longo dessa trajetória.

À minha sogra, Silvia Melo, por cuidar dos meus filhos com tanto zelo enquanto eu me dedicava aos estudos e à pesquisa.

À equipe do Laboratório de Proteômica: Luciano Alfaia, André Vinícius, Genilton Oliveira, Betina Oliveira, Emerson Oliveira, Maurício Souza, Diego Leno e Paulo Ricardo, por todo auxílio prestado nos experimentos e pela convivência enriquecedora.

Agradeço à FAPEAM, pelo financiamento da bolsa de estudos, que possibilitou minha dedicação integral e a conclusão desta pesquisa.

Aos Laboratórios de Proteômica do Instituto de Ciências Biológicas (LAPROT/UFAM), à Central de Apoio Multidisciplinar (CAM/UFAM), ao Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas (CMABIO/ESA/UEA), à Central de Análises Químicas da Universidade do Estado do Amazonas (LAB.C-32/EST/UEA) e ao Laboratório de Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Agradeço, em especial, aos pesquisadores vinculados à CAM/UFAM: Dra. Enedina Nogueira de Assunção, Dr. Júlio Nino de Souza Neto, Dr. Felipe Moura Araújo da Silva e Dr. Henrique Alves da Silva; à CMABIO/ESA/UEA: Msc. Jéssica Araújo Marques; à Central de Análises Químicas (EST/UEA): Dr. Lucas Souza Falcão; e à Embrapa: Dr. Gilvan Ferreira da Silva e Dr. Thiago Fernandes dos Santos, pela valiosa contribuição científica.

*No começo, pensei que estivesse lutando para
salvar seringueiras, depois pensei que estava
lutando para salvar a Floresta Amazônica. Agora,
percebo que estou lutando pela humanidade*
Chico Mendes

RESUMO

A contaminação por hidrocarbonetos na região amazônica representa um desafio ambiental significativo, especialmente em áreas submetidas a intensa atividade portuária. Apesar do reconhecido potencial microbiano da Amazônia, consórcios autóctones capazes de degradar hidrocarbonetos permanecem pouco explorados. Neste estudo, caracterizou-se um consórcio microbiano isolado das águas do rio Negro, na região de Manaus (AM), cultivado em meio *Bushnell Haas* suplementado com 1% de óleo diesel. A eficiência da biodegradação foi avaliada por espectrometria de massas, com quantificação dos alcanos. Após sete dias de incubação, o consórcio apresentou taxas superiores a $98 \pm 2,26\%$ em óleo diesel S10 e $89 \pm 2,23\%$ em óleo diesel marítimo (ODM). A análise metataxonômica baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA revelou elevada diversidade bacteriana, com a identificação de 16 gêneros, destacando-se *Achromobacter* spp., *Bordetella* spp., *Burkholderia* spp., *Castellaniella* spp. e *Pseudomonas* spp. A análise do marcador ITS identificou seis gêneros fúngicos, com predominância de sequências atribuídas a *Meyerozyma* spp. A partir do isolamento de morfotipos do consórcio, três linhagens bacterianas foram caracterizadas em nível de gênero por análise do gene parcial de 16S rRNA e microscopia eletrônica de varredura: a linhagem A5C4 foi atribuída ao gênero *Pseudomonas* sp., enquanto A5C2 e A5C9 foram identificadas como *Achromobacter* sp.. Além disso, o consórcio promoveu redução superior a $46 \pm 1,1\%$ na tensão superficial do meio, determinada por tensiometria, indicando a produção de biossurfactantes. Em conjunto, os resultados evidenciam a eficiência comprovada do consórcio microbiano amazônico na degradação de óleo diesel, constituindo uma contribuição científica importante para futuros estudos em biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos.

Palavras-chave: Biorremediação; Consórcio microbiano; Óleo diesel; Biossurfactantes.

ABSTRACT

Hydrocarbon contamination in the Amazon region represents a significant environmental challenge, particularly in areas subjected to intense port activity. Despite the recognized microbial potential of the Amazon, autochthonous consortia capable of degrading hydrocarbons remain largely unexplored. In this study, a microbial consortium isolated from the waters of the Negro River in the Manaus region (AM) was characterized, cultivated in Bushnell Haas medium supplemented with 1% diesel oil. Biodegradation efficiency was evaluated by mass spectrometry, with quantification of alkanes. After seven days of incubation, the consortium exhibited degradation rates exceeding $98 \pm 2.26\%$ for S10 diesel and $89 \pm 2.23\%$ for marine diesel (ODM). Metataxonomic analysis based on 16S rRNA gene sequencing revealed high bacterial diversity, with 16 genera identified, including *Achromobacter* spp., *Bordetella* spp., *Burkholderia* spp., *Castellaniella* spp., and *Pseudomonas* spp. ITS marker analysis identified six fungal genera, with predominance of sequences assigned to *Meyerozyma* spp. From the isolation of consortium morphotypes, three bacterial strains were characterized at the genus level through partial 16S rRNA gene analysis and scanning electron microscopy: strain A5C4 was assigned to *Pseudomonas* sp., while A5C2 and A5C9 were identified as *Achromobacter* sp. Additionally, the consortium promoted a reduction of more than $46 \pm 1.1\%$ in the medium's surface tension, as determined by tensiometry, indicating biosurfactant production. Overall, the results demonstrate the proven efficiency of the Amazonian microbial consortium in diesel oil degradation, representing an important scientific contribution for future studies on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments.

Keywords: Bioremediation; Microbial consortium; Diesel oil; Biosurfactants.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	OBJETIVOS.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.....	13
2.1.1	Classificação do óleo diesel.....	15
2.2	BIORREMEDIAÇÃO.....	17
2.2.1	Potencial dos consórcios.....	18
2.2.2	Biossurfactantes e bioemulsificantes.....	20
3	METODOLOGIA.....	23
3.1	LOCAL DE COLETA.....	23
3.2	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	25
3.2.1	Análise metataxonômica do consórcio.....	26
3.2.2	Análise das linhagens por amplificação do Gene 16S rRNA.....	27
3.3	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO CONSÓRCIO.....	28
3.3.1	Isolamento das linhagens e coloração de GRAM.....	29
3.3.2	Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	30
3.4	AVALIAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO.....	31
3.4.1	Teste de degradação 2,6 DCPIP (2,6 – Diclorofenol-indofenol).....	32
3.4.2	Análise da degradação de alcanos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS).....	33
3.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO CONSÓRCIO EM PRODUZIR TENSOATIVOS.....	34
3.5.1	Ensaio colapso de gota.....	35
3.5.2	Determinação da Tensão superficial por tensiômetro.....	36
3.5.3	Ensaio bioquímicos.....	37
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	ANÁLISE MOLECULAR.....	39
4.1.1	Análise metataxonômica do consórcio.....	39
4.1.2	Inferência filogenética baseada no gene 16S rRNA das bactérias identificadas na metataxonomia.....	45

4.1.3	Identificação molecular das linhagens bacterianas isoladas por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	46
4.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	47
4.2.1	Caracterização morfológica das linhagens bacterianas isoladas por coloração de Gram e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
4.3	ANÁLISE DE BIODEGRADAÇÃO	49
4.3.1	Ensaio DCPIP com o consórcio A5 em diferentes tipos de óleo diesel	49
4.3.2	Análise de biodegradação de <i>n</i> -alcanos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	53
4.4	AVALIAÇÃO DOS TENSOATIVOS	57
4.4.1	Ensaio colapso de gota	57
4.4.2	Análise por tensiômetro	59
4.4.3	Análise dos ensaios bioquímicos	60
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
6	CRONOGRAMA	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICE I. Dados obtidos pela metatoxonomia com marcador do gene 16S rRNA	75
	APÊNDICE II. Dados obtidos pela metatoxonomia com marcador do gene ITS	89

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço das atividades industriais e urbanas, a intensificação da geração de poluentes tem se consolidado como um dos principais desafios ambientais da atualidade, promovendo impactos alarmantes aos ecossistemas. Dentre as diversas classes de contaminantes, destacam-se os derivados de petróleo, como óleos hidráulicos, lubrificantes, combustíveis e resíduos oleosos provenientes de atividades industriais e domésticas, que apresentam persistência ambiental e toxicidade.

Na Região Amazônica, essa problemática é particularmente preocupante devido à forte dependência da malha hidroviária como principal via de transporte de pessoas e mercadorias. Essa dinâmica favorece a ocorrência de derramamentos e descartes inadequados de combustíveis em ambientes aquáticos. Em agosto de 2018, mais de 1.800 litros de óleo combustível foram derramados na orla do Rio Negro, em Manaus, afetando diretamente pescadores e o abastecimento de água de comunidades locais, conforme registros do Instituto de Proteção Ambiental do Amazonas (IPAAM, 2018). De forma semelhante, em 2023, um acidente envolvendo transporte terrestre resultou no vazamento de aproximadamente 15 mil litros de óleo diesel às margens do Rio Aripuanã (IPAAM, 2023). Esses episódios evidenciam a vulnerabilidade dos ecossistemas amazônicos frente à contaminação por hidrocarbonetos.

Em contraposição a esse cenário de degradação ambiental, microrganismos como bactérias e fungos têm se destacado como agentes naturais capazes de metabolizar hidrocarbonetos, utilizados como ferramentas nas estratégias de biorremediação (Usman, 2025). Entre os mecanismos que favorecem a adaptação microbiana a ambientes contaminados, sobressai a produção de metabólitos secundários, como os tensoativos, compostos anfifílicos com ampla aplicabilidade biotecnológica, capazes de aumentar a biodisponibilidade de contaminantes hidrofóbicos (D'Almeida; Albuquerque; Rocha, 2024).

Nesse contexto, o emprego de consórcios microbianos hidrocarbonoclásticos emerge como alternativa sustentável e promissora, uma vez que a interação metabólica entre diferentes espécies favorece rotas degradativas complementares, amplia a eficiência na transformação de compostos recalcitrantes e contribui para a redução da toxicidade ambiental.

Corroborando essa perspectiva, estudos anteriores conduzidos no Laboratório de Proteômica da Universidade Federal do Amazonas demonstraram a capacidade de degradação de hidrocarbonetos por bactérias isoladas de águas contaminadas por óleo na região amazônica (Santos, 2021). Assim, o consórcio microbiano isolado de águas do Rio Negro contaminadas por óleo diesel, investigado neste estudo, representa uma fonte estratégica de conhecimento científico para o desenvolvimento de tecnologias voltadas à preservação dos ecossistemas amazônicos e à sustentabilidade ambiental.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar a capacidade de biodegradação de um consórcio microbiano isolado das águas do Rio Negro.

Objetivos específicos:

1. Obter a identificação molecular do consórcio.
2. Realizar a caracterização morfológica das linhagens bacterianas constituintes do consórcio.
3. Avaliar o crescimento do consórcio em diferentes tipos de óleo diesel.
4. Avaliar a degradação de alcanos.
5. Caracterizar bioquimicamente os biossurfactantes/bioemulsificantes produzidos pelo consórcio microbiano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Os hidrocarbonetos são moléculas apolares, quimicamente estáveis e de baixa solubilidade em água, características que influenciam diretamente seu comportamento ambiental. O petróleo bruto é classificado como um hidrocarboneto de petróleo, sendo composto majoritariamente por hidrocarbonetos, além de compostos contendo heteroátomos e pequenas concentrações de componentes metálicos (Peixoto, 2014).

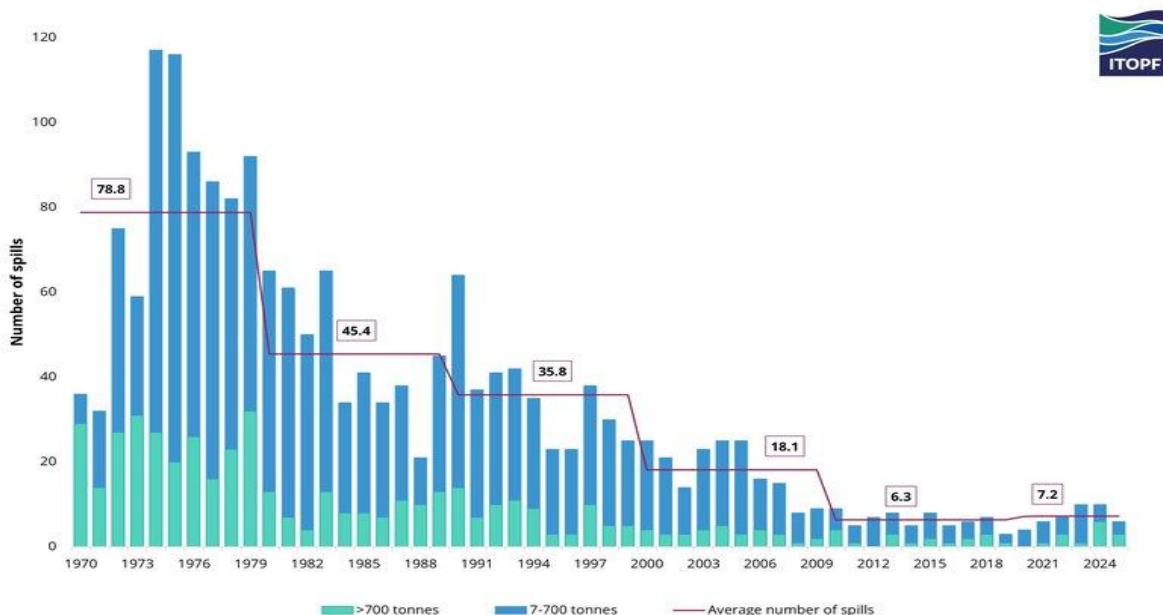
As frações do petróleo podem ser divididas em alifáticos, aromáticos, asfaltenos e resinas. A fração alifática inclui alcanos de cadeia reta, alcanos ramificados e cicloalcanos, enquanto a fração aromática é composta por hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, como benzeno, tolueno e xilenos, além de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), aromáticos naftênicos e compostos aromáticos sulfurados. Já asfaltenos e resinas são constituídos por moléculas mais polares, contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio em sua estrutura. A proporção dessas frações varia conforme a origem do petróleo, sua idade geológica e histórico de formação. De modo geral, apesar da complexidade estrutural, os constituintes do petróleo podem ser amplamente classificados em hidrocarbonetos e não-hidrocarbonetos (Peixoto, 2014; Castro, 2021; Adedeji *et al.*, 2022).

Devido à estabilidade química e à complexidade estrutural de muitos desses compostos, especialmente os HAPs, asfaltenos, óleos e graxas, diversos componentes do petróleo são considerados recalcitrantes, apresentando resistência à degradação biológica, térmica e química. A persistência desses contaminantes no ambiente representa um dos principais desafios associados a derramamentos acidentais de petróleo e seus derivados, podendo ocasionar contaminação do solo, da água e dos ecossistemas aquáticos, além de riscos à saúde humana e à biodiversidade (Araújo, 2021).

Os dados compilados pela *International Tanker Owners Pollution Federation* (ITOPF), conforme apresentado na Figura 1, demonstram uma redução expressiva no número de derramamentos de petróleo e derivados provenientes de navios petroleiros ao longo das últimas décadas. Os eventos são classificados de acordo com o volume

derramado, abrangendo derramamentos pequenos, médios (7–700 toneladas) e grandes (>700 toneladas). Na década de 1970, a média anual ultrapassava 70 ocorrências, com aproximadamente 78,8 derramamentos por ano, enquanto nas décadas seguintes observou-se queda progressiva para 45,4 (anos 1980) e 35,8 (anos 1990). A partir dos anos 2000, a média anual passou a ser inferior a 20 eventos, chegando a cerca de 6 a 7 ocorrências anuais na década de 2010.

Figura 1 - Derramamentos de petróleo e derivados no mundo (1970-2025). Número anual de derramamentos provenientes de navios petroleiros, classificados por volume em médios (7–700 toneladas) e grandes (>700 toneladas), evidenciando a tendência de redução na frequência desses eventos ao longo das décadas



Fonte: *International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF)*.

Na Figura 1, observa-se que, em 2025, embora o número de eventos de derramamento de óleo permaneça relativamente baixo, registros indicam um volume total aproximado de 4 mil toneladas de óleo derramado, evidenciando que, mesmo com a redução na frequência, episódios pontuais ainda podem representar impactos ambientais significativos.

Esses dados, compilados pela *International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF)*, referem-se principalmente a derramamentos provenientes de navios petroleiros e, em geral, consideram eventos acima de 7 toneladas, classificados como médios e grandes. Dessa forma, os derramamentos de menor

volume ou aqueles não associados ao transporte marítimo, como vazamentos em terminais, oleodutos, embarcações menores ou ocorrências regionais, podem não estar integralmente contemplados nesses registros. Assim, embora os dados indiquem uma tendência global de redução na frequência de grandes derramamentos, isso não exclui a ocorrência de eventos menores e mais localizados, que, somados, também podem representar impactos ambientais relevantes.

2.1.1 Classificação do óleo diesel

Entre os principais derivados do petróleo destaca-se o diesel, combustível obtido a partir do processo de refino, que envolve etapas de destilação, hidrogenação, síntese e craqueamento catalítico em refinarias. Esse combustível é constituído predominantemente por hidrocarbonetos com cadeias entre 8 e 16 átomos de carbono, além de pequenas proporções de compostos contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre. Embora presente em concentrações relativamente baixas, o enxofre é considerado indesejável devido aos seus impactos ambientais e operacionais. Durante a combustão, ocorre a emissão de dióxido de enxofre (SO_2) e trióxido de enxofre (SO_3); este último, ao reagir com água, forma ácido sulfúrico, responsável pela corrosão de componentes metálicos dos motores e pela intensificação da chuva ácida. Além disso, tais gases estão associados ao agravamento de doenças respiratórias e pulmonares (Jesus; Mangini, 2022).

No Brasil, a classificação do diesel comercializado baseia-se principalmente no teor de enxofre presente em sua composição. Esse critério está diretamente relacionado às políticas ambientais nacionais e às normas regulatórias voltadas à redução das emissões de poluentes atmosféricos. A implementação do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE), instituído pelo Ministério do Meio Ambiente e regulamentado pela Resolução nº 65, de 9 de novembro de 2012, da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), estabeleceu diretrizes para produção e uso desse combustível.

Atualmente, duas classificações são amplamente empregadas no país: o diesel S10 e o óleo diesel marítimo (ODM). Essas variações atendem a diferentes demandas dos setores rodoviário, ferroviário, marítimo, agrícola, industrial e de geração de energia elétrica (Araújo, 2021). A redução do teor de enxofre representa avanço

ambiental significativo, contudo, para as indústrias de motores sua remoção total não é tecnicamente vantajosa, pois o enxofre contribui para a lubricidade do combustível. A diminuição excessiva dessa propriedade pode provocar desgaste prematuro das bombas e dos sistemas de injeção, reduzindo a vida útil dos motores devido à menor capacidade de lubrificação (Jesus; Mangini, 2022).

Entre as categorias vigentes, destaca-se o diesel S10, classificado como combustível de ultrabaixo teor de enxofre (UBTE), contendo 10 mg/kg (ppm) desse elemento. Sua obtenção ocorre por meio do processo de hidrodessulfurização, no qual o enxofre é removido em reatores específicos durante o refino. Esse produto é derivado do diesel S50, classificado como óleo de baixo teor de enxofre (BTE), com 50 mg/kg de enxofre, amplamente utilizado em veículos leves fabricados antes de 2012, isto é, antes da implementação das fases mais restritivas do PROCONVE. A redução do teor de enxofre está associada à diminuição das emissões de dióxido de enxofre (SO₂) e material particulado, contribuindo para a melhoria da qualidade do ar e mitigação dos impactos ambientais (Farias; Silva, 2013).

Outra formulação anteriormente disponível no mercado era o diesel S1800, que apresentava 1.800 mg/kg (ppm) de enxofre. Esse combustível era destinado principalmente a aplicações não rodoviárias, como usinas termoeletricas, atividades de mineração e transporte ferroviário (Petrobras, 2024). Desde 2014, seu uso em caminhões rodoviários foi proibido pela ANP, em consonância com as políticas de controle de emissões atmosféricas. Posteriormente, a Resolução ANP nº 968/2024, em vigor a partir de 31 de julho de 2024, determinou a descontinuação definitiva da produção do diesel S1800 não rodoviário no Brasil (ANP, 2024). Apesar disso, durante parte da execução experimental deste trabalho, essa formulação ainda se encontrava disponível na região de estudo, razão pela qual foi utilizada em experimentos preliminares (Silva *et al.*, 2013).

No que se refere ao setor de navegação, o combustível empregado é o óleo diesel marítimo (ODM), classificado como S-5000, contendo 5.000 mg/kg (ppm) de enxofre (Petrobras, 2024). De acordo com Lima *et al.* (2024), a Região Norte do Brasil apresenta forte dependência do modal aquaviário, especialmente do transporte fluvial, em virtude da limitada infraestrutura rodoviária e da extensa rede hidrográfica que atravessa os estados amazônicos. Nesse contexto, o ODM é predominante nas embarcações responsáveis pelo transporte de pessoas e mercadorias. A elevada concentração de enxofre nessa formulação implica maior potencial poluidor,

particularmente em ambientes aquáticos sensíveis, como os ecossistemas amazônicos (Lima *et al.*, 2024).

Paralelamente, a relevância econômica do óleo diesel no cenário energético nacional e internacional é evidenciada pelos dados de produção divulgados pela Petrobras. Em 2023, houve crescimento de 3,5% na produção de diesel em comparação com 2022, com registro de produção média de 726 mil barris por dia (mbbl/d). Destaca-se ainda o recorde anual na produção de Diesel S10 em 2024, que apresentou incremento de 10,9% em relação ao ano anterior (Petrobras, 2024, p. 109).

Dessa forma, observa-se uma relação direta entre a importância estratégica do diesel para a matriz energética e a intensificação de sua produção e circulação, o que amplia o risco potencial de contaminação ambiental. Nesse contexto, reforça-se a necessidade de pesquisas voltadas à prevenção, ao monitoramento e à mitigação dos impactos associados aos derramamentos de hidrocarbonetos.

2.2 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma estratégia biotecnológica que utiliza organismos vivos para promover a recuperação de ambientes contaminados (Safdari *et al.*, 2018). Entre suas principais abordagens, destaca-se a bioestimulação, que consiste na modificação controlada do ambiente impactado por meio da adição de nutrientes, ajuste de pH, aeração e controle da umidade, com o objetivo de estimular a atividade da microbiota autóctone degradadora. Outra abordagem utilizada é a bioaugmentação, caracterizada pela introdução de microrganismos previamente selecionados, capazes de degradar compostos tóxicos (Aparicio *et al.*, 2022).

Em cenários de contaminação de solos e águas por hidrocarbonetos, os consórcios microbianos têm se destacado como alternativa eficiente (Safdari *et al.*, 2018).

2.2.1 Potencial dos consórcios

Consórcios de microrganismos são comunidades compostas por múltiplas espécies que interagem entre si de maneira sinérgica, estabelecendo relações cooperativas que resultam em maior eficiência metabólica (Nayak; Gautam; Ghosh, 2024). Essas associações podem ocorrer naturalmente no ambiente ou serem construídas artificialmente em laboratório, com a seleção estratégica de espécies com funções complementares. As culturas podem envolver linhagens puras ou mistas; entretanto, consórcios mistos são frequentemente considerados mais vantajosos devido à maior diversidade metabólica e capacidade adaptativa. Estudos demonstram que esses sistemas apresentam produtividade superior quando comparados a culturas isoladas, sobretudo em processos de biodegradação (Wang *et al.*, 2014; Islam, 2023).

A superioridade funcional dos consórcios está relacionada à divisão de funções metabólicas entre os diferentes membros da comunidade. A interação entre linhagens pertencentes a uma mesma categoria taxonômica ou a distintos grupos funcionais permite a especialização em etapas específicas de vias metabólicas complexas. Dessa forma, um microrganismo pode iniciar a oxidação de uma molécula recalcitrante, enquanto outro utiliza os metabólitos intermediários gerados, promovendo a completa mineralização do composto. Essa complementaridade favorece maior eficiência, estabilidade ecológica e adaptação às variações ambientais (Araújo, 2021).

No caso específico da degradação de hidrocarbonetos por bactérias aeróbias, o processo envolve uma sequência de reações oxidativas. Inicialmente, um alcano é convertido em álcool por ação de enzimas monooxigenases. O álcool formado é posteriormente oxidado a aldeído e, em seguida, a ácido graxo. Este ácido graxo entra na via da beta-oxidação, resultando na formação de acetil-CoA, que é direcionado ao ciclo de Krebs para geração de energia celular (Rojo, 2009 apud Castro, 2021). Enzimas como hidroxilases e monooxigenases desempenham papel central nessas etapas iniciais de ativação da molécula. Quando presentes em consórcios bacterianos, essas enzimas atuam de maneira complementar e mais eficiente, potencializando a degradação dos hidrocarbonetos e acelerando o processo de biodegradação (Nayak; Gautam; Ghosh, 2024).

Diversos gêneros bacterianos têm sido amplamente descritos na literatura como degradadores de hidrocarbonetos, incluindo *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Alcanivorax*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Nocardia*, *Geobacillus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Vibrio* (Castro, 2021 apud Nzila *et al.*, 2018; Mujumdar; Joshi; Karve, 2019; Abdulrasheed *et al.*, 2020; entre outros). Esses microrganismos apresentam enzimas especializadas, como monooxigenases e dioxigenases, capazes de iniciar a oxidação de alcanos e compostos aromáticos, permitindo sua posterior mineralização.

Estudos experimentais demonstram que a atuação em consórcio frequentemente resulta em maior eficiência de degradação quando comparada às linhagens isoladas. Dhote, Kumar e Juwarkar (2016) observaram que um consórcio bacteriano isolado de solo contaminado com lodo de petróleo alcançou 78% de degradação de hidrocarbonetos após 20 dias. Quando avaliadas individualmente, as linhagens AAJ1, AAJ2, AAJ3 e AAJ4 apresentaram percentuais inferiores (57%, 56%, 55% e 54%, respectivamente). As amostras AAJ1 e AAJ2 foram classificadas como *Bacillus sp.*, enquanto AAJ3 e AAJ4 foram identificadas como *Pseudomonas sp.*, evidenciando o efeito sinérgico entre os gêneros.

Resultados semelhantes foram descritos por Roszak *et al.* (2021), que selecionaram 14 linhagens entre 44 isoladas de solo poluído, formando um consórcio com elevado potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Os gêneros identificados incluíram *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*. Em ensaios *in vitro*, foi observada redução de 93,5% no conteúdo total de HAPs após o primeiro dia de incubação e 99,22% após oito dias. Já em experimento *in situ*, a concentração total desses compostos foi reduzida em 33,3% após cinco meses e em mais de 72% após treze meses, demonstrando a aplicabilidade ambiental do consórcio (Roszak *et al.*, 2021).

De modo complementar, Liu *et al.* (2022) avaliaram um consórcio marinho isolado de área contaminada por derivados de petróleo, composto por *Bacillus altitudinis*, *Bacillus velezensis*, *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores identificaram efeito sinérgico especialmente entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus velezensis*, resultando em 86,2% de degradação de óleo diesel após 16 dias de incubação.

Além da interação entre bactérias, a literatura também destaca abordagens integradas envolvendo microrganismos e invertebrados do solo. Kumari *et al.* (2023) descreveram um consórcio composto por *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum anthropi* e *Microbacterium esteraromaticum*, aplicado em associação com minhocas da espécie *Eisenia fetida*. Após 30 dias, foram registradas taxas de degradação de 98% para naftaleno, 93% para fluoranteno, 74% para fenantreno, 76% para pireno, 66% para acenaftileno e 35% para benzo(a)pireno, evidenciando o potencial dessa abordagem para remediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em ecossistemas terrestres.

De maneira geral, os estudos indicam que a interação metabólica entre diferentes espécies amplia a eficiência degradativa, permitindo a atuação complementar em diferentes frações do petróleo. Essa cooperação microbiana favorece não apenas a transformação de compostos mais simples, mas também a degradação progressiva de moléculas aromáticas complexas de ambientes impactados por derivados de petróleo.

2.2.2 Biossurfactantes e bioemulsificantes

Apesar da elevada capacidade metabólica dos consórcios microbianos, a baixa solubilidade e a natureza hidrofóbica dos hidrocarbonetos representam limitações à sua biodisponibilidade em ambientes aquáticos. A reduzida interface entre microrganismos e substrato pode comprometer a taxa de degradação, mesmo quando há produção de enzimas altamente especializadas. Dessa forma, a síntese de metabólitos capazes de aumentar a dispersão e a disponibilidade desses contaminantes é um fator determinante para a eficiência da biorremediação, evidenciando o papel dos compostos tensoativos como facilitadores desse processo (Salek; Euston, 2019).

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos constituídos por uma porção hidrofóbica, geralmente formada por cadeias de hidrocarbonetos, e uma porção hidrofílica, que pode ser iônica, não iônica ou anfotérica. Essa estrutura lhes confere a capacidade de atuar nas interfaces entre fases de diferentes polaridades, reduzindo a tensão superficial e interfacial e favorecendo a formação de emulsões e microemulsões (Marinho *et al.*, 2022). Em geral, apresentam baixo peso molecular e

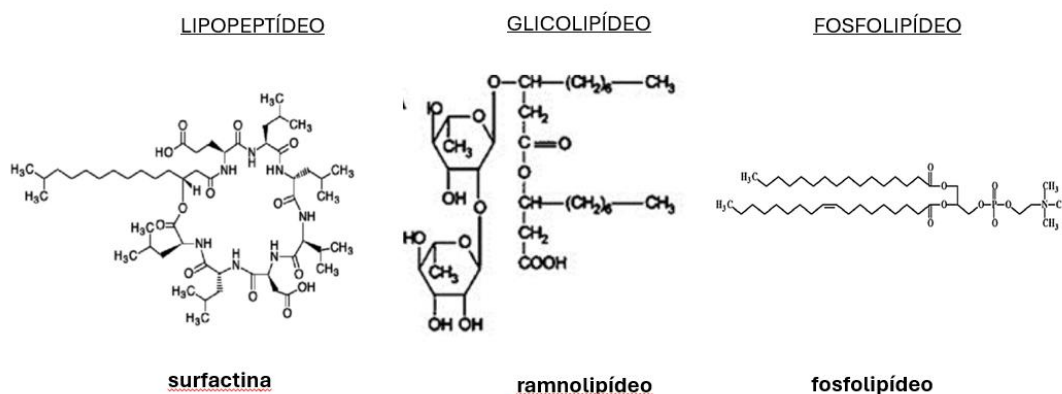
elevada atividade tensoativa, sendo produzidos por bactérias e fungos como parte de seus mecanismos de adaptação a ambientes contaminados (Wang *et al.*, 2021).

Além dos biossurfactantes de baixo peso molecular, existem os bioemulsificantes, que também são moléculas anfifílicas produzidas por microrganismos. Contudo, diferenciam-se funcionalmente por apresentarem maior peso molecular e estrutura polimérica complexa, como heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou proteínas (D'Almeida; Albuquerque; Rocha, 2024). Enquanto os biossurfactantes reduzem significativamente a tensão superficial, os bioemulsificantes atuam principalmente na estabilização de emulsões, formando uma barreira física ao redor das gotículas de óleo e mantendo-as dispersas por períodos prolongados. Por essa razão, apresentam baixa atividade tensoativa e não promovem intensa formação de espuma (Salek; Euston, 2019).

Um exemplo clássico de bioemulsificante é o Emulsan, um lipo-heteropolissacarídeo de elevado peso molecular (aproximadamente 1000 kDa), que apresenta alta eficiência na estabilização de emulsões, embora reduza de forma limitada a tensão superficial da água. Ainda assim, sua capacidade de manter hidrocarbonetos dispersos o torna relevante em processos de biorremediação (D'Almeida; Albuquerque; Rocha, 2024).

Dentre os biossurfactantes, destacam-se três principais grupos químicos: os glicolipídeos, os lipopeptídeos e os fosfolipídeos (Farias *et al.*, 2021; Nagtode *et al.*, 2023), conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Estruturas químicas representativas de biossurfactantes pertencentes aos principais grupos moleculares: ramnolipídeo (glicolipídeo), surfactina (lipopeptídeo) e fosfolipídeo. As estruturas ilustram a organização anfifílica dessas moléculas, caracterizadas pela presença de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, responsáveis por sua atividade tensoativa.



Fonte: Farias *et al.* (2021); Nagtode *et al.* (2023); Vicente; Gasparin (2024).

Os lipopeptídeos, como a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, são formados por cadeias peptídicas associadas a ácidos graxos, apresentando elevada eficiência na redução da tensão superficial. Os glicolipídeos, como os ramnolipídeos produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas spp.*, são constituídos por uma fração carboidrato ligada a cadeias lipídicas. Já os fosfolipídeos, compostos por glicerol ligado a ácidos graxos e grupo fosfato, também contribuem para a atividade tensoativa, especialmente em condições específicas de crescimento microbiano (Farias *et al.*, 2022).

Historicamente, bactérias do gênero *Pseudomonas spp.* foram as primeiras reconhecidas pela produção de ramnolipídeos, enquanto *Bacillus subtilis* ganhou destaque pela produção de surfactina, um dos lipopeptídeos mais estudados devido à sua elevada eficiência emulsificante (Phulpoto *et al.*, 2020; Santos, 2019).

Esses compostos apresentam relevância especial em ambientes contaminados por petróleo, pois aumentam a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, facilitando sua assimilação microbiana e, conseqüentemente, acelerando os processos de degradação. Além disso, os biossurfactantes apresentam vantagens ambientais significativas, como biodegradabilidade, baixa toxicidade e estabilidade sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade (Santos *et al.*, 2024).

Entretanto, apesar desses benefícios, sua aplicação em larga escala ainda enfrenta limitações relacionadas ao custo de produção, principalmente devido às etapas de fermentação, recuperação e purificação (Vučurović *et al.*, 2024). Enquanto o custo médio de um surfactante sintético é estimado em aproximadamente um dólar por quilograma, os biossurfactantes de origem microbiológica podem alcançar valores próximos a trinta dólares por quilograma (Nagtode *et al.*, 2023).

Ainda assim, o potencial desses compostos em estratégias de biorremediação tem impulsionado pesquisas voltadas à otimização de processos produtivos, ao uso de substratos alternativos de baixo custo e ao aproveitamento de resíduos agroindustriais como fontes de carbono, buscando tornar sua aplicação ambientalmente e economicamente mais viável.

Para chegarmos ao alcance dos objetivos da pesquisa foi planejado e estruturado uma metodologia baseada em experimentos validados de acordo com a análise pretendida, descritos no capítulo a seguir.

3 METODOLOGIA

Para contemplar os objetivos do presente trabalho, a metodologia foi dividida em quatro etapas independentes para análise do consórcio: análise molecular, análise morfológica, análise de degradação de hidrocarbonetos (HC) e análise dos tensoativos produzidos pelo consórcio. O esquema abaixo ilustra as diferentes abordagens realizadas.

Figura 3 – Etapas experimentais do estudo, indicando as diferentes abordagens analíticas realizadas. Para a análise molecular, realizou-se a amplificação do gene 16S rRNA, Sequenciamento Sanger e a Metataxonomia. Nas análises morfológicas, a coloração de GRAM e análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas. Para avaliar a degradação dos hidrocarbonetos do diesel, procedeu-se aos experimentos de detecção da coloração do meio com DCPIP e identificação/quantificação dos hidrocarbonetos consumidos por cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massas (GC-MS). E finalmente, a última etapa experimental do projeto contemplou a análise de tensoativos, por meio dos experimentos de colapso de gota, avaliação da tensão superficial (com uso do tensiômetro) e ensaios bioquímicos para identificar a natureza dos biossurfactantes.

Análise molecular	Análise morfológica	Análise de degradação de HC	Análise de Tensoativos
• Amplificação do gene 16S <u>rRNA</u> • Sequenciamento Sanger • <u>Metataxonomia</u>	• Coloração de GRAM • Microscopia eletrônica de varredura	• DCPIP • CG - MS	• Colapso de gota • Tensiômetro • Ensaios bioquímicos

Fonte: O autor (2025).

3.1 LOCAL DE COLETA

O consórcio microbiano desta pesquisa foi coletado pelo grupo do Laboratório de Proteômica da Universidade Federal do Amazonas, em 15 de novembro de 2015. O volume de 100mL de água da superfície do Rio Negro contaminada com óleo foram coletadas em frascos *Erlenmeyer* (250 mL), nas proximidades do porto do Ceasa, devido ao constante fluxo de embarcações de carga e descarga de combustíveis e derramamento destes, na Cidade de Manaus – AM, com as coordenadas: S 03°08'09.0 e W 59°56'18.0, como observado na Figura 4 da tese de Santos (2021).

O acesso ao patrimônio genético foi realizado de acordo com a solicitação SISGEN, cadastro de Acesso nº AC227C7.

Figura 4 – Localização geográfica do ponto de coleta dos consórcios microbianos na região portuária de Manaus (AM), área impactada por recente derramamento de óleo combustível. Em destaque, diferentes pontos de coleta com suas respectivas coordenadas geográficas, indicando a nomenclatura adotada para cada consórcio coletado (A1, A2, A3, A4 e A5). No presente trabalho, o consórcio A5 em destaque foi utilizado.



Fonte: Santos (2021).

A amostra, denominada A5, foi submetida à aclimação por 24 h a 30 °C, sob agitação constante de 150 rpm. Após esse período, 1 mL da água coletada foi inoculado em meio *Bushnell Haas* (BH) (MgSO_4 , CaCl_2 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NH_4NO_3 e FeCl_3), suplementado com 1% de diesel S10 como única fonte de carbono, e incubado a 30 °C, sob agitação de 150 rpm, por sete dias.

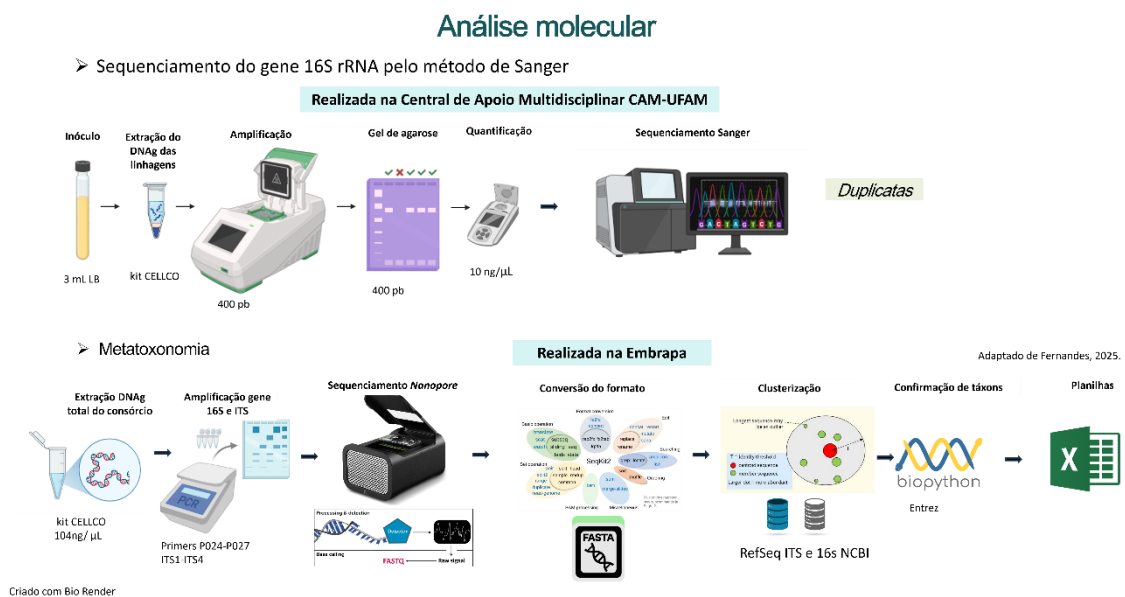
Em seguida, 1 mL da cultura obtida foi transferido para um novo frasco contendo 100 mL de meio BH acrescido de 1% de diesel e incubado nas mesmas condições por mais sete dias. Esse procedimento foi repetido por cinco ciclos consecutivos, possibilitando a avaliação da estabilidade do consórcio microbiano

selecionado. O consórcio A5 foi posteriormente preservado em meio BH ágar (0,75%) contendo 1% de diesel e mantido à temperatura ambiente (Santos, 2021).

3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para a identificação da composição microbiana do consórcio e o alcance dos objetivos propostos, foi adotada uma abordagem molecular estruturada em dois ensaios moleculares complementares: a análise metataxonômica e o sequenciamento do gene 16S rRNA pelo método de Sanger, descritos nas subseções 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. A Figura 5 apresenta um resumo esquemático das etapas metodológicas empregadas, contemplando desde a extração do DNA genômico até as análises de amplificação, sequenciamento e posterior identificação taxonômica dos microrganismos.

Figura 5 - Fluxograma da análise molecular empregada na caracterização do consórcio microbiano. Na Central de Apoio Multidisciplinar da UFAM (CAM-UFAM) foram realizadas as etapas de extração de DNA das linhagens isoladas, amplificação do gene 16S rRNA, eletroforese em gel de agarose, quantificação do DNA e sequenciamento pelo método de Sanger (em duplicata), destinado à identificação molecular dos isolados. Na Embrapa, foi conduzida a extração de DNA total do consórcio, seguida da amplificação dos marcadores 16S rRNA e ITS, sequenciamento por plataforma *Nanopore* (análise metataxonômica), processamento bioinformático, conversão de arquivos, clusterização das sequências, confirmação taxonômica e organização dos dados em planilhas.



Fonte: O autor (2026).

3.2.1 Análise metataxonômica do consórcio

A caracterização metataxonômica do consórcio microbiano foi realizada a partir da extração do DNA genômico total utilizando o *Bacteria DNA Preparation Kit* (CeLLco). A qualidade e a concentração do DNA extraído foram avaliadas em espectrofotômetro *NanoDrop*, apresentando concentração média de $104 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, adequada para as etapas subsequentes de amplificação.

Para a identificação bacteriana, foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA empregando os primers universais 27F (*Forward*) (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (*Reverse*) (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), gerando amplicons com tamanho aproximado de 1.500 pb. Para a caracterização da comunidade fúngica, foi amplificada a região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA ribossomal, utilizando os primers ITS1 (*Forward*) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (*Reverse*) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), produzindo fragmentos com aproximadamente 700 pb.

Os produtos de PCR foram avaliados quanto à integridade e ao tamanho esperado por eletroforese em gel de agarose. As amostras que apresentaram bandas únicas e com intensidade adequada foram selecionadas para sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), utilizando a plataforma da Oxford Nanopore Technologies, em corrida do tipo single-end. Os dados brutos gerados foram disponibilizados no formato FASTQ.

Os arquivos FASTQ foram submetidos à filtragem de qualidade, remoção de bases ambíguas e edição das sequências consenso, sendo posteriormente convertidos para o formato FASTA. Para reduzir redundâncias e identificar sequências representativas, os arquivos FASTA foram agrupados com base na similaridade nucleotídica utilizando o algoritmo *CD-HIT*, adotando-se um limiar de identidade previamente definido. As sequências representativas mais abundantes (centróides) foram selecionadas para as análises subsequentes.

As sequências FASTA representativas foram comparadas com bancos de dados de referência, incluindo RefSeq 16S rRNA e RefSeq ITS do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para identificação taxonômica de bactérias e fungos, respectivamente. As análises de similaridade foram realizadas com base nos

valores de identidade e cobertura dos alinhamentos, permitindo a atribuição taxonômica no nível mais confiável possível.

O processamento, a organização e a análise dos dados de sequenciamento foram conduzidas utilizando ferramentas implementadas em *Biopython*, integradas ao sistema *Entrez* do NCBI para recuperação automatizada das informações taxonômicas. Os dados obtidos foram compilados e organizados em planilhas eletrônicas, resultando na geração de perfis taxonômicos representativos do consórcio microbiano analisado.

Para montagem da árvore, a plataforma MEGA versão 12.0 foi usada para o alinhamento múltiplo das sequências do gene 16S rRNA, enquanto a reconstrução filogenética foi conduzida no software IQ-TREE versão 2.1. A visualização, edição e formatação da árvore foram efetuadas no iTOL versão 7.0. A seleção do modelo evolutivo indicou TIM2e+G4 como o melhor ajuste segundo os critérios de Akaike (AIC) e Akaike corrigido (AICc). Entretanto, de acordo com o Critério de Informação Bayesiano (BIC), o modelo TNe+G4 apresentou melhor desempenho, sendo este adotado como modelo evolutivo final para a reconstrução filogenética. A robustez dos agrupamentos foi avaliada por meio de análise de *bootstrap*, assegurando suporte estatístico adequado aos principais clados observados.

3.2.2 Análise das linhagens por amplificação do Gene 16S rRNA

O DNA genômico foi extraído das 3 linhagens bacterianas isoladas do consórcio, utilizando o Bacteria DNA Preparation Kit (CeLLco), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação parcial do gene 16S rRNA foi realizada por PCR, conforme descrito por Adedeji *et al.* (2022), utilizando os primers *Foward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e *Reverse* (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'), direcionados a uma região variável de aproximadamente 400 pb dentro do gene 16S rRNA.

As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 25 µL, contendo 16,8 µL de água deionizada estéril, 2,5 µL de tampão Taq contendo MgCl₂ (20 mM), 2,5 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de cada primer (25 µM), 1,0 µL de DNA molde e 0,2 µL de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador Bio Rad

T100 Thermal Cycler, com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min (1 ciclo), seguida de 20 ciclos de desnaturação a 95 °C por 40 s, anelamento a 58 °C por 40 s e extensão a 72 °C por 40 s, com extensão final a 72 °C por 5 min e manutenção a 4 °C.

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), corado com brometo de etídio, utilizando tampão TBE 1× e azul de bromofenol como corante de carregamento. Os fragmentos amplificados foram purificados com o Agarose Gel Extraction Kit (CeLLco), quantificados em fluorímetro Qubit® 2.0 (60 ng μL^{-1}) e enviados para sequenciamento Sanger 2X 200 pb, na Central de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil.

Os cromatogramas gerados pelo sequenciamento Sanger foram fornecidos no formato padrão ab1. Esses arquivos foram visualizados, editados e convertidos para o formato FASTA utilizando a plataforma *Chromas*.

As sequências obtidas em FASTA foram utilizadas para identificação taxonômica preliminar por meio de comparação com sequências depositadas no banco de dados *GenBank*, utilizando a ferramenta *BLASTn* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

3.3 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO CONSÓRCIO

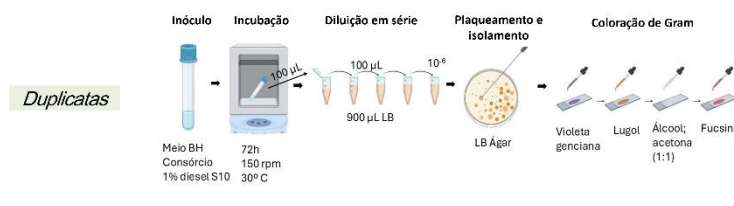
Esta seção descreve os procedimentos adotados para a caracterização morfológica das linhagens isoladas, com o objetivo de complementar as análises moleculares e fornecer evidências fenotípicas da identidade bacteriana. Foram empregadas técnicas clássicas e instrumentais, incluindo a coloração de Gram e a microscopia eletrônica de varredura (MEV), descritas nas subseções 3.3.1 e 3.3.2, respectivamente.

A Figura 6 apresenta o fluxograma das etapas metodológicas relacionadas à análise morfológica, contemplando desde o isolamento das linhagens até os procedimentos de coloração e observação microscópica.

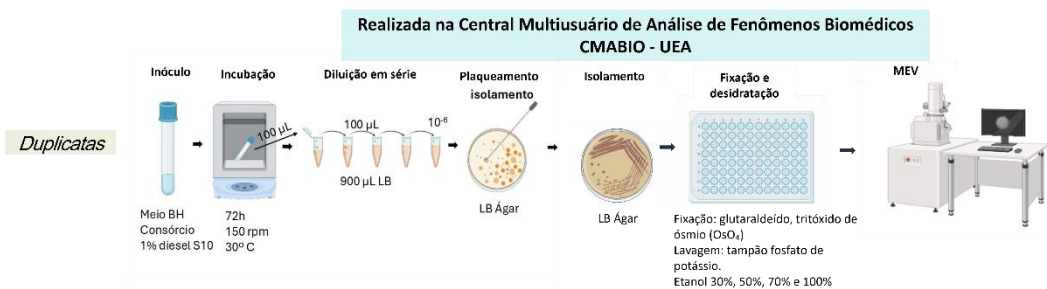
Figura 6 - Fluxograma da análise morfológica das linhagens isoladas. Esquema das etapas realizadas em duplicata para caracterização fenotípica bacteriana, incluindo preparo do inóculo, incubação, diluições seriadas, plaqueamento em meio LB ágar e isolamento de colônias. A etapa superior representa o procedimento de coloração de Gram (violeta de genciana, lugol, álcool-acetona e fucsina). A etapa inferior ilustra o preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV), incluindo fixação, desidratação e análise instrumental, realizada na Central Multiusuária de Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABIO – UEA).

Análise morfológica

➤ Coloração de Gram



➤ Microscopia eletrônica de varredura



Fonte: O autor (2026).

3.3.1 Isolamento das linhagens e coloração de GRAM

Para a avaliação das linhagens bacterianas presentes no consórcio, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) ágar. Em seguida, 100 µL do pré-inóculo do consórcio A5, previamente diluído a 10⁻⁶ em meio LB, foram espalhados uniformemente sobre a superfície do meio. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, os diferentes morfotipos bacterianos observados foram isolados e inoculados em 3 mL de caldo LB. As culturas foram incubadas a 30 °C, sob agitação de 150 rpm, por 48 h. Posteriormente, 5 µL de cada inóculo foram fixados por calor em lâminas de vidro (76 × 26 mm) para realização da coloração de Gram.

As lâminas foram coradas inicialmente com violeta genciana por aproximadamente 1 min e lavadas com água destilada. Em seguida, foram cobertas

com solução de lugol por 1 min, novamente lavadas, e então descoradas com acetona a 50% (v/v), seguida de lavagem com água destilada. Para a coloração final, aplicou-se fucsina por 30 s, seguida de lavagem e secagem à temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 100X, pertencente à Central de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

3.3.2 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os inóculos correspondentes aos morfotipos isolados foram plaqueados em meio LB ágar à 30 °C por 24 h. As colônias obtidas foram cortadas da placa e preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas (CMABIO/UEA).

Para a preparação das amostras, as linhagens bacterianas foram inicialmente fixadas em glutaraldeído por 72 h, lavadas com tampão fosfato de potássio e submetidas à pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO_4). Após nova lavagem com tampão, procedeu-se à desidratação em série crescente de etanol (30%, 50%, 70% e 100%), seguida de secagem em estufa a 36 °C por aproximadamente 4 h.

Posteriormente, as amostras foram metalizadas com fina camada de ouro para garantir condutividade elétrica, as micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM IT500 HR (MEV-FEG), operando com tensão de aceleração entre 5 e 15 kV e detector de elétrons secundários (SED) para análise topográfica da superfície celular. A distância de trabalho (WD) foi mantida entre 8 e 15 mm, visando equilibrar resolução e profundidade de campo. A corrente do feixe eletrônico (spot size/probe current) foi ajustada para valores baixos a moderados, a fim de otimizar a relação sinal/ruído e minimizar possíveis danos ou efeitos de carregamento na amostra biológica. As imagens foram registradas em ampliações variando de 2.000× a 50.000×, conforme a necessidade de visualização da morfologia.

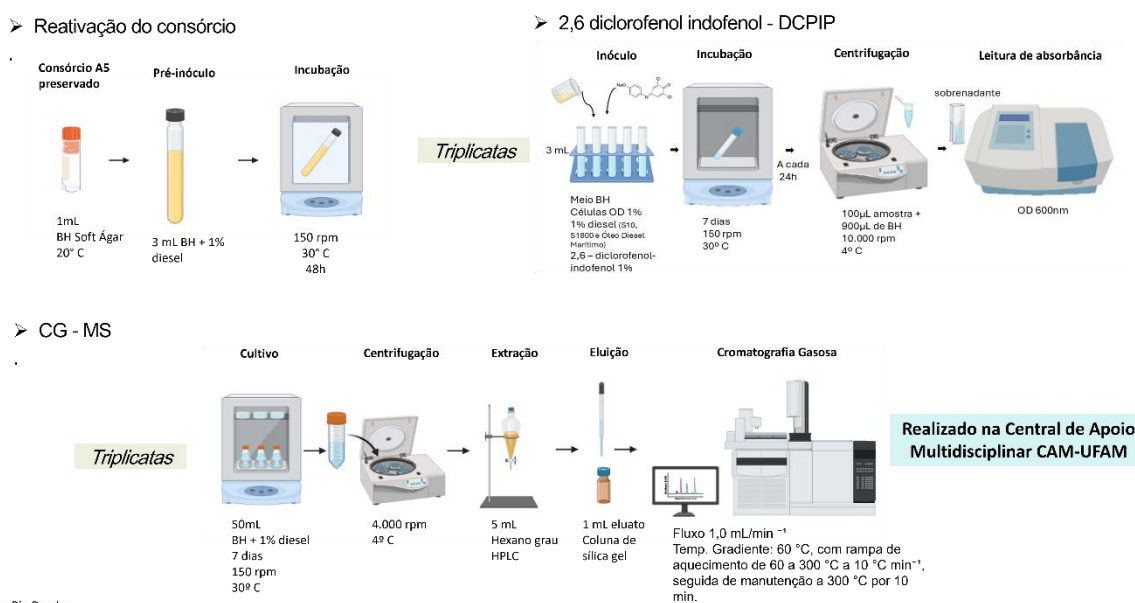
3.4 AVALIAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO

Esta seção contempla os procedimentos experimentais adotados para avaliar o potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos pelo consórcio microbiano e pelas linhagens isoladas, em consonância com os objetivos propostos neste estudo. São descritos os ensaios destinados à verificação da capacidade degradativa frente aos diferentes tipos de diesel, bem como os métodos empregados para o monitoramento e a análise dos resultados.

A Figura 7 apresenta um fluxograma resumindo as etapas do ensaio de degradação com 2,6-DCPIP e da análise de degradação de alcanos por CG-MS, detalhadas nas subseções 3.4.1 e 3.4.2, respectivamente, permitindo uma visualização integrada do delineamento experimental.

Figura 7 - Fluxograma dos ensaios de biodegradação de hidrocarbonetos. Esquema das etapas experimentais realizadas em triplicata para avaliação do potencial degradativo do consórcio microbiano e das linhagens isoladas. A parte superior ilustra o ensaio colorimétrico com 2,6-DCPIP, incluindo preparo do inóculo, incubação, centrifugação e leitura de absorbância a 600 nm. A parte inferior apresenta as etapas de cultivo, centrifugação, extração, eluição e análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS) para determinação da degradação de alcanos, sendo esta etapa realizada na Central de Apoio Multidisciplinar da UFAM (CAM-UFAM).

Análise de degradação de hidrocarbonetos



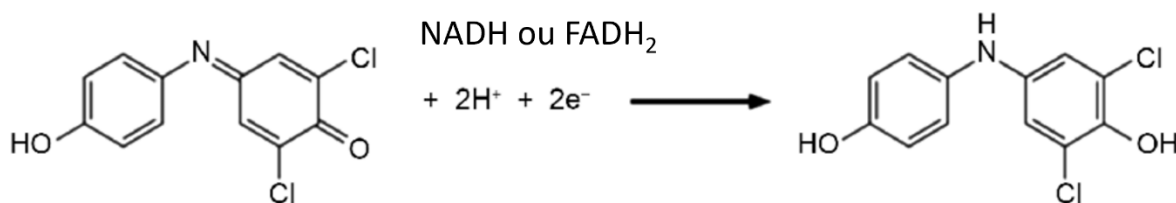
Fonte: O autor (2026).

Todo o material utilizado possui grau analítico, e os experimentos foram conduzidos com equipamentos e reagentes do Laboratório de Proteômica e da Central de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas – Campus Manaus. Os hidrocarbonetos (diesel S-10, diesel S1.800 e diesel marítimo) foram doados pela Província Petrolífera de Urucu, Coari – AM.

3.4.1 Teste de degradação 2,6 DCPIP (2,6 – Diclorofenol-indofenol)

O teste de degradação de hidrocarbonetos utilizando o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é uma metodologia amplamente empregada para avaliar a capacidade metabólica de microrganismos na oxidação de compostos orgânicos, especialmente hidrocarbonetos. Nesse ensaio, o DCPIP atua como aceptor artificial de elétrons, sendo reduzido pelos elétrons provenientes do metabolismo microbiano, transportados por cofatores como NADH e FADH₂. Conforme ilustrado na Figura 8, a estrutura molecular à esquerda corresponde à forma oxidada, de coloração azul intensa devido ao seu sistema conjugado, enquanto a estrutura à direita representa a forma reduzida, incolor, após o ganho de elétrons. Assim, durante o processo de biodegradação, a redução do DCPIP promove a perda gradual da coloração da solução, fenômeno que pode ser monitorado e quantificado por análises espectrofotométricas, permitindo inferir a atividade degradativa do consórcio microbiano (Castro, 2021).

Figura 8 - Representação esquemática da molécula de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) nos estados oxidado e reduzido. A imagem ilustra o DCPIP atuando como aceptor artificial de elétrons, recebendo elétrons dos cofatores NADH e FADH₂. A transferência eletrônica promove a redução do DCPIP e mudança na coloração da molécula.



Fonte: Adaptado de Castro (2021).

O consórcio bacteriano A5 foi testado quanto ao seu potencial para utilizar diferentes tipos de óleo diesel como fonte de carbono. O pré-inóculo foi cultivado em

3mL de BH com 1% do tipo de cada diesel, a 30° C, 150 rpm por 72h, então centrifugado a 4.000 rpm por 20 min, o *pellet* ressuspenso em 500 µL de BH, a OD_{600nm} foi avaliada e o volume de inóculo ajustado para OD = 0,01 para 3 mL BH\ diesel 1% + DCPIP 0,5mg/mL. O consórcio foi inoculado em 3 mL de BH estéril incorporado com 30 µL de cada substrato de hidrocarboneto (óleo diesel S10, S1800 e óleo diesel marítimo). Em seguida, foram adicionados 400 µL de 2,6-Diclorofenol Indofenol (DCPIP) a 1%, 30°C, 150 rpm por 7 dias (Mariano *et al.*, 2008).

As amostras foram preparadas em triplicata para cada um dos três tipos de óleo diesel contendo o consórcio microbiano, sendo cada condição acompanhada de seu respectivo controle negativo sem células. Adicionalmente, foram incluídos controles negativos contendo células, DCPIP e caldo BH, porém na ausência de óleo diesel, bem como um controle constituído apenas por DCPIP e caldo BH, sem a presença do consórcio microbiano e do óleo diesel. A absorbância do sobrenadante foi monitorada a 600 nm em intervalos de 24 horas, durante um período de sete dias. Para cada análise, foram coletadas alíquotas de 100 µL de cada amostra, diluídas em 900 µL de caldo BH e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Jenway 6051 (UK), conforme metodologia descrita por Ayangbenro *et al.* (2014).

3.4.2 Análise da degradação de alcanos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS)

As amostras do consórcio A5, em triplicata, foram cultivadas por 7 dias em 50 mL de meio *Bushnell–Haas* (BH) suplementado com 1% (v/v) de óleo diesel S10, a 30 °C, sob agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, os cultivos foram centrifugados a 4000 rpm, e os sobrenadantes foram submetidos à extração com 5 mL de hexano grau HPLC em funil de separação. A fase orgânica obtida foi aplicada em uma coluna de extração em fase sólida (SPE), preparada em pipeta Pasteur contendo sílica previamente ativada com hexano grau analítico. Em seguida, 1 mL do eluato foi coletado em frascos do tipo *vial* para análise.

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC–MS) foi realizada em um sistema TRACE GC ULTRA/ISQ (Thermo Scientific), equipado com coluna capilar TR-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Thermo Scientific).

Hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. Alíquotas de 1 µL das amostras foram injetadas em modo splitless. O programa de temperatura do forno consistiu em temperatura inicial de 60 °C, com rampa de aquecimento de 60 a 300 °C a 10 °C min⁻¹, seguida de manutenção a 300 °C por 10 min. As temperaturas do injetor, da linha de transferência e da fonte de íons foram ajustadas para 250, 250 e 220 °C, respectivamente.

A análise da biodegradação de alcanos foi realizada utilizando a plataforma Xcalibur™ (Thermo Scientific), e a identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis na biblioteca NIST. Os alcanos totais foram considerados como a soma das áreas dos picos de todos os carbonos identificados. O rendimento e a taxa de biodegradação foram calculados utilizando as fórmulas de Hosseini (2025 *apud* Sun *et al.*, 2019), com adaptações.

$$\text{Taxa de degradação de alcanos} = \frac{Ci - Af}{Ci} \times 100\%$$

Ci e *Af* correspondem a concentração de *n*-alcanos do óleo diesel em controle abiótico e o residual após cultivo bacteriano, respectivamente.

3.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO CONSÓRCIO EM PRODUZIR TENSOATIVOS

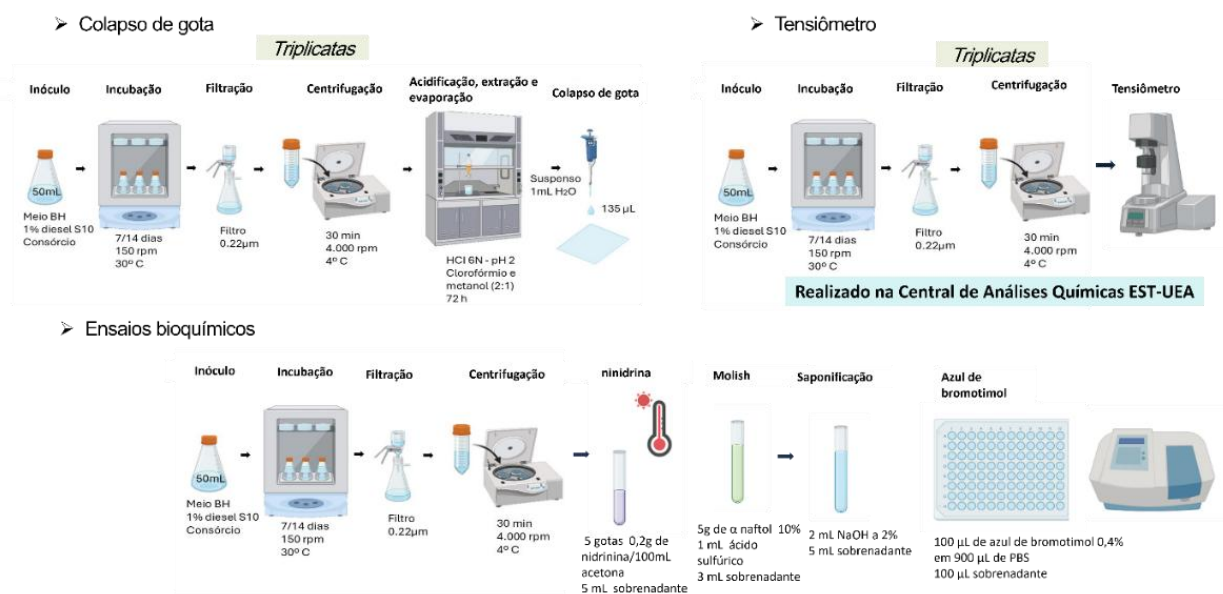
Com o intuito de investigar a produção de compostos com atividade tensoativa pelo consórcio previstos nos objetivos específicos, foram realizados ensaios voltados à detecção, quantificação e caracterização preliminar de biossurfactantes e/ou bioemulsificantes.

A abordagem experimental compreendeu testes qualitativos e quantitativos, incluindo o ensaio de colapso de gota, a determinação da tensão superficial por tensiometria e ensaios bioquímicos para classificação dos compostos produzidos, descritos nas subseções 3.5.1, 3.5.2 e 3.5.3. A Figura 9 apresenta um esquema geral das etapas envolvidas na produção, extração e avaliação dos tensoativos ao longo desta seção.

Figura 9 - Fluxograma da análise de produção de tensoativos pelo consórcio microbiano.

Esquema das etapas realizadas em triplicata para avaliar a produção de biossurfactantes e/ou bioemulsificantes. O protocolo incluiu preparo do inóculo em meio BH com diesel S10, incubação, filtração, centrifugação, extração por acidificação e ensaio de colapso de gota. A tensão superficial foi determinada por tensiometria na Central de Análises Químicas (EST-UEA), além de ensaios bioquímicos (ninhidrina, *Molish*, saponificação e azul de bromotimol) para caracterização preliminar dos compostos.

Análise de produção de tensoativos



Fonte: O autor (2026).

3.5.1 Ensaio colapso de gota

Para extração e purificação dos biossurfactantes e/ou bioemulsificantes, foi utilizado o método de Varjani & Upasani (2016). O consórcio microbiano foi cultivado por 7 e 14 dias (representado, respectivamente, o final da fase logarítmica e o final da fase estacionária) em meio mínimo adicionado 1% (v/v) de óleo diesel S10. Após o período de incubação, 100 mL do caldo de cultivo foram coletados, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 4000 rpm por 30 min a 4 °C, filtrado em membrana de 0,22 µm e submetido à acidificação utilizando solução de ácido clorídrico (HCl) 6N. O pH foi medido até que atingir o valor de pH 2. Em seguida, foi acrescentado ao sobrenadante um volume igual de solução de clorofórmio-metanol (2:1).

A fase orgânica contendo os biossurfactantes foi coletada com auxílio de um funil de separação, sendo o passo de extração com a fase aquosa repetido mais duas

vezes. Ao final, as fases orgânicas foram reunidas e secas utilizando um rotaevaporador a 40°C e sobre rotação constante. A detecção qualitativa da produção de biossurfactantes obtidas dos cultivos foi baseada em estudo publicado por Jain *et al.* (1991), usando como indicador o ensaio de colapso de gota de sobrenadante. O experimento consistiu em pipetar cuidadosamente 35 µL do sobrenadante da cultura em uma superfície hidrofóbica, assim como os controles negativos (água destilada) e os positivos (SDS 0,1% e SDS 10%), foram registradas imagens e a área de espalhamento das gotas foram analisadas no software *IMAGEJ*, quanto maior o espalhamento da gota maior a concentração e confirmação da presença de tensoativos.

3.5.2 Determinação da Tensão superficial por tensiômetro

O consórcio microbiano foi cultivado por 7 e 14 dias em meio *Bushnell-Haas* (BH) suplementado com 1% (v/v) de óleo diesel S10. Após o período de incubação, 50 mL do caldo de cultivo foram coletados, e o sobrenadante foi separado por centrifugação a 4000 rpm por 30 min a 4 °C e, posteriormente, filtrado em membrana polietersulfona (PES) de 0,22 µm.

A tensão superficial dos sobrenadantes de cultura foi determinada utilizando um tensiômetro com anel de platina (método de Du Noüy), modelo Krüss K20, da Central de Análises Químicas, Laboratório C-32, da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Antes das medições, o anel de platina foi cuidadosamente limpo com acetona para remoção de resíduos orgânicos. O equipamento foi calibrado utilizando água destilada, empregada como controle negativo, conforme as recomendações do fabricante.

As amostras foram transferidas para recipientes apropriados, garantindo ausência de bolhas de ar e estabilidade térmica à temperatura ambiente. O anel de platina foi inicialmente imerso na amostra e, posteriormente, elevado lentamente até a ruptura do filme líquido, sendo registrada automaticamente a força máxima necessária para o rompimento. Os valores de tensão superficial foram expressos em mN m^{-1} .

3.5.3 Ensaio bioquímicos

Os testes bioquímicos foram realizados de acordo com a metodologia de Patawary, Kalita e Deka (2015). Estes ensaios permitiram uma análise prévia dos compostos químicos dos tensoativos do consórcio, já que sua caracterização não foi possível durante a realização deste projeto de mestrado. O teste de ninidrina verificou a presença de proteínas, o teste de *Molisch* para carboidratos, já o teste de saponificação e azul de bromotimol para presença de lipídeos.

No teste de ninidrina, foi preparado a solução de 0,2g de ninidrina para 100mL de acetona, adicionados 5 gotas da solução a 5 mL do sobrenadante isento de células, mantidos em banho-maria durante 5 minutos. A formação de cor indica a presença de aminoácidos e seus poliméricos.

Para o teste de *Molisch*, foram recolhidos 3 ml do sobrenadante isento de células, misturado com 5g de α naftol a 10%, 100 mL de álcool etílico, então adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado na borda do tubo, a formação de um anel na interface indica resultado positivo (Patawary *et al.*, 2016).

No ensaio de azul de bromotimol, 100 μ L de azul de bromotimol 0,4% foi diluído em 900 μ L da solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) (0,2 M Na_2HPO_4 , 0,2 M NaH_2PO_4 e NaCl 1 M) com pH 7,2, o mesmo volume da solução de BTB e a amostra de biossurfactantes foram misturadas em placas de 96 poços, posteriormente verificados a absorbância OD595nm, a mudança da cor azul para amarelo ou verde-água indica a presença de lipídeos (Ong; Wu, 2018). No teste de saponificação foi adicionado 2 mL de NaOH a 2%, em 5 mL do sobrenadante livre de células, vortexados, a visualização de espuma indica resultado positivo (Patawary; Kalita; Deka, 2015).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas desta pesquisa foi utilizado o *software* BioEstat (versão 5.3), tendo sido feito o teste de análise de variância (ANOVA) para verificar diferenças significativas entre os tratamentos dos experimentos. Comparações por

pares foram feitas usando o método de *Tukey* com 95 % de confiança, e o teste para significância entre as médias foi inferido em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

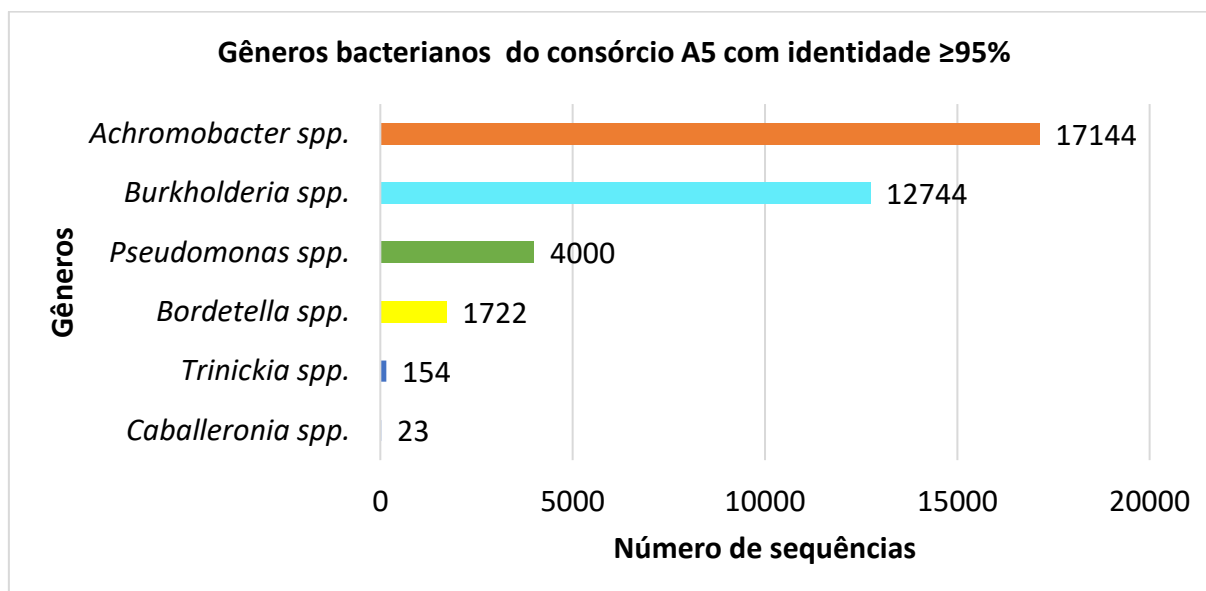
4.1 ANÁLISE MOLECULAR

4.1.1 Análise metataxonômica do consórcio

Contemplando o objetivo específico 1, que consiste em identificar quais microrganismos integravam o consórcio A5 foi feita uma análise metataxonômica do consórcio utilizando os *barcodes* 16S rRNA e ITS. A identificação molecular do consórcio microbiano, por meio da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, revelou a presença de 16 gêneros bacterianos distintos, todos pertencentes ao filo Pseudomonadota, principalmente na classe Betaproteobacteria, exceto *Pseudomonas spp.*, que é Gammaproteobacteria.

Dentre esses, seis apresentaram sequências com percentual de identidade superior ou igual a 95% quando comparadas às sequências depositadas em bancos de dados, permitindo a sugestão de possíveis espécies. Os gêneros com maior resolução taxonômica foram *Pseudomonas spp.*, *Achromobacter spp.*, *Burkholderia spp.*, *Bordetella spp.*, *Trinickia spp.* e *Caballeronia spp.* (FIGURA 10).

Figura 10 - Gêneros bacterianos do consórcio identificados por análise metataxonômica, considerando sequências com identidade superior ou igual a 95%. Na figura abaixo, foram identificadas 17.144 sequências com identidade superior a 95% para o gênero bacteriano *Achromobacter spp.*; em seguida, identificaram-se 12.744 sequências para o gênero *Burkholderia spp.*, 4000 sequências para o gênero *Pseudomonas spp.*, 1722 para o gênero *Bordetella spp.*, 154 sequências para o gênero *Trinickia spp.* E 23 sequências para o gênero *Caballeronia spp.*



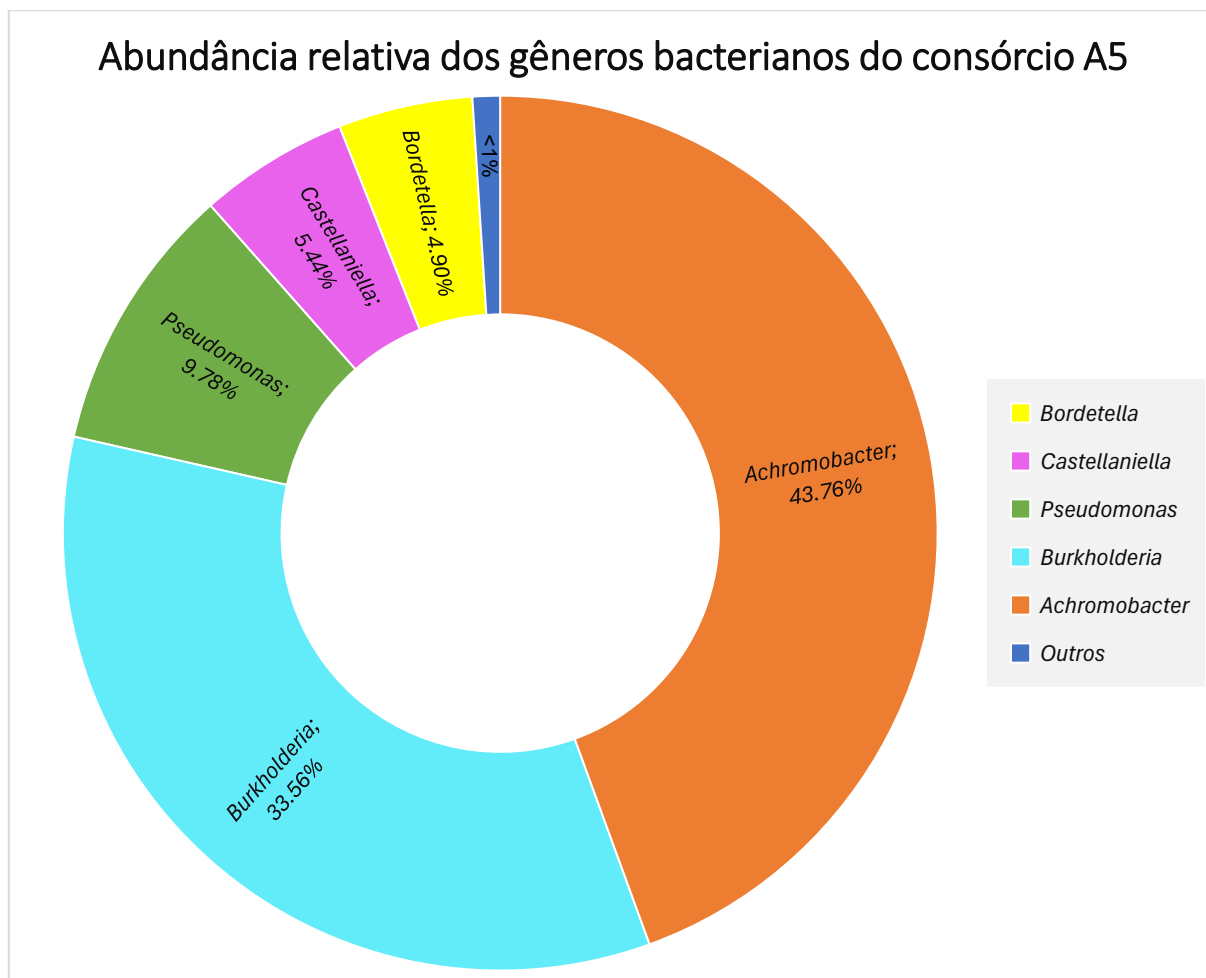
Fonte: O autor (2026).

Contudo, destaca-se que o gráfico apresentado acima (Figura 10) contempla exclusivamente os gêneros cujas sequências obtiveram identidade $\geq 95\%$ em comparação com bancos de dados, critério que permite maior segurança na inferência taxonômica em nível de espécie. Dessa forma, essa representação prioriza a robustez da identificação molecular, restringindo-se ao subconjunto de microrganismos com maior resolução taxonômica. Na Figura 11 é apresentado o gráfico de abundância relativa total do consórcio, o qual inclui todos os gêneros detectados, independentemente do percentual de identidade, oferecendo uma visão mais ampla da estrutura da comunidade microbiana. Essa distinção metodológica é fundamental para a análise baseada em maior confiabilidade taxonômica e a representação quantitativa global relativa da composição do consórcio.

Em termos de abundância relativa, destacaram-se *Achromobacter spp.* (43,76%), *Burkholderia spp.* (33,56%), *Pseudomonas spp.* (9,78%), *Castellaniella spp.* (5,44%) e *Bordetella spp.* (4,90%) (Figura 11). Os demais 11 gêneros bacterianos representaram individualmente menos de 1% da composição total do consórcio, sendo eles: *Advenella spp.*; *Caballeronia spp.*; *Paraburkholderia spp.*; *Rehaibacterium*

spp; *Mycoavidus spp*; *Zwartia spp*; *Ectopseudomonas spp*; *Caenibaculum spp*; *Trinickia spp*; *Robbsia spp*; e *Metapseudomonas spp* (FIGURA 11).

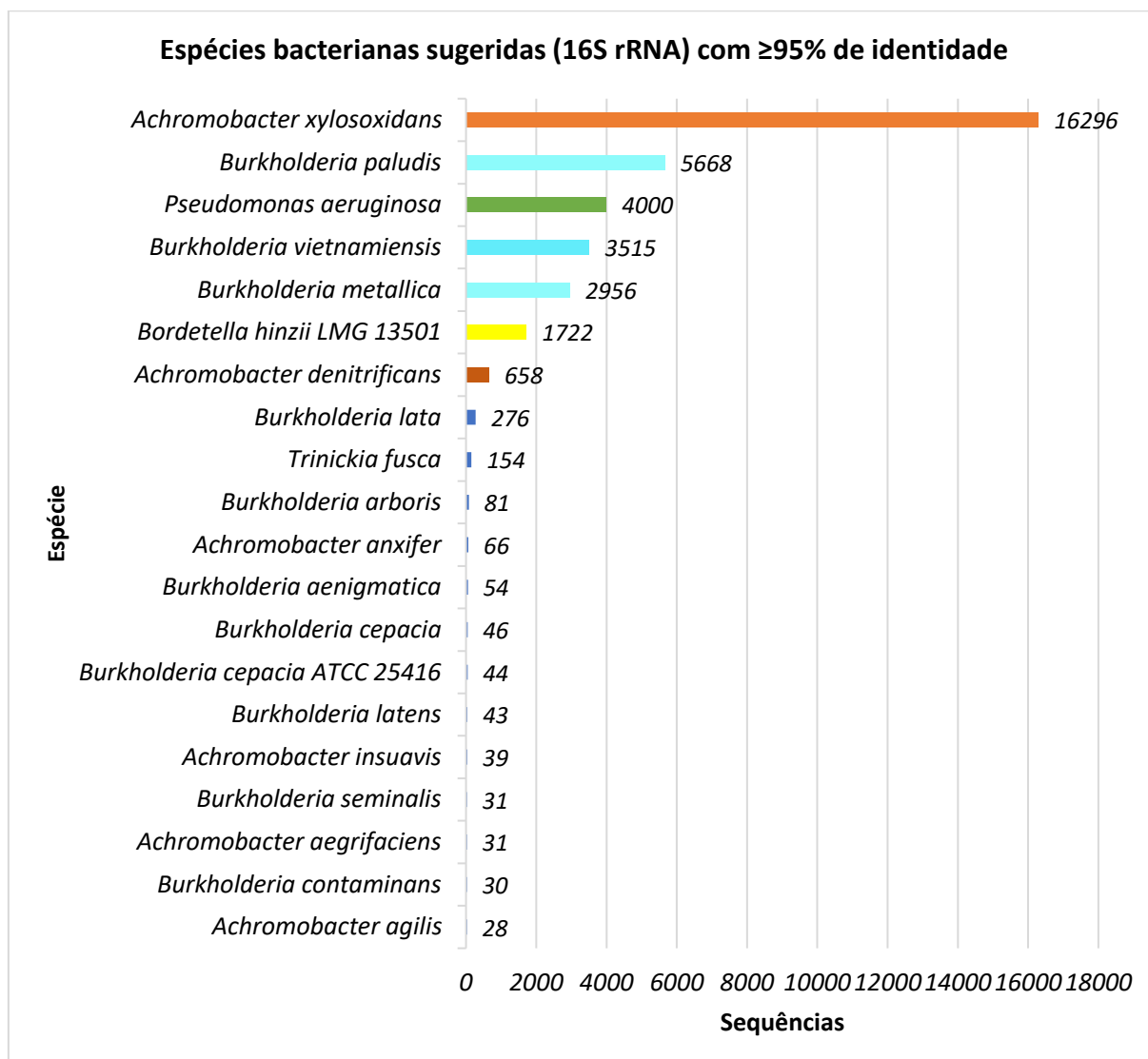
Figura 11 - Abundância relativa dos gêneros bacterianos do consórcio A5 identificados por metataxonomia a partir do marcador 16S rRNA. Destacam-se *Achromobacter spp.* (43,76%), *Burkholderia spp.* (33,56%), *Pseudomonas spp.* (9,78%), *Castellaniella spp.* (5,44%) e *Bordetella spp.* (4,90%). Os demais gêneros, com abundância individual inferior a 1%, foram agrupados na categoria “Outros”.



Fonte: O autor (2026).

Espécies sugeridas dos gêneros bacterianos estão elencadas na Figura 12, ilustrando a maior abundância relativa de *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia paludis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia metallica*, *Bordetella hinzii* LMG 13501 e *Achromobacter denitrificans*, com os maiores números de sequências.

Figura 12 - Espécies bacterianas sugeridas no consórcio A5, identificadas por análise metataxonômica com o marcador 16S rRNA, considerando sequências com identidade superior a 95%. Destacaram-se *Achromobacter xylosoxidans* (16.296 sequências), *Burkholderia paludis* (5.668 sequências), *Pseudomonas aeruginosa* (4.000 sequências), *Burkholderia vietnamiensis* (3.515 sequências), *Burkholderia metallica* (2.956 sequências), *Bordetella hinzii* LMG13501 (1.722) e *Achromobacter denitrificans* (658). As demais espécies sugeridas apresentaram frequência inferior a 300 sequências cada, representando fração minoritária do total analisado.



Fonte: O autor (2026).

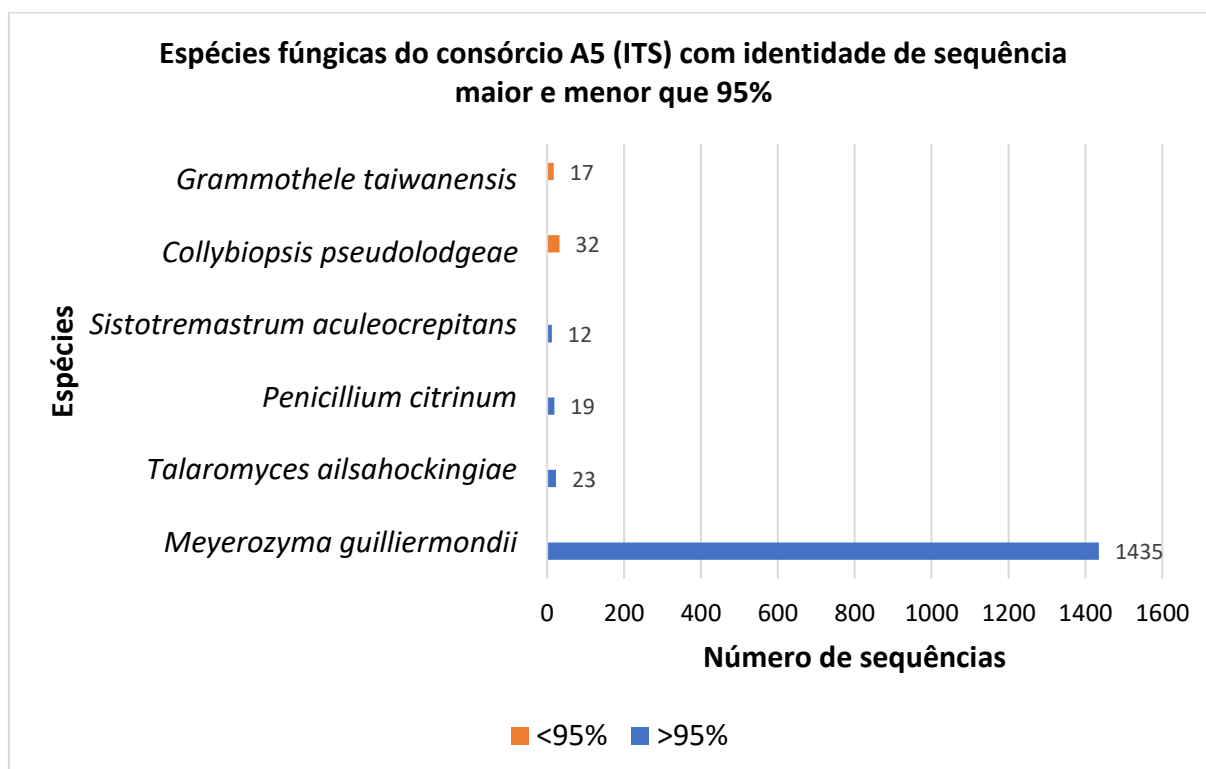
Complementarmente, a análise metataxonômica baseada no marcador ITS revelou a presença de seis gêneros fúngicos: *Meyerozyma spp.*, *Talaromyces spp.*, *Penicillium spp.*, *Sistotremastrum spp.*, *Collybiopsis spp.* e *Grammothele spp.*, com predominância expressiva relativa de *Meyerozyma spp.* (93,30%), enquanto os demais apresentaram abundância relativa inferior a 2%. Entre os gêneros fúngicos identificados, *Collybiopsis spp.* e *Grammothele spp.* apresentaram identidade inferior a 95% quando comparados às bases de dados de referência, o que pode indicar a

presença de potenciais táxons ainda não descritos ou insuficientemente representados em bancos públicos (FIGURA 13).

Considerando que a região ITS é reconhecida como o principal *barcode* para identificação de fungos, valores inferiores a 97–99% limitam a atribuição segura em nível de espécie, reforçando a necessidade de análises complementares para confirmação taxonômica.

As espécies sugeridas para os gêneros que apresentaram identidade superior a 95% em ordem decrescente do número de sequências, foram: *Meyerozyma guilliermondii*, *Talaromyces ailsahockingiae*, *Penicillium citrinum* e *Sistotremastrum alcoholipotransferens*, conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 13 - Espécies fúngicas identificadas no consórcio A5 por análise metataxonômica utilizando o marcador ITS, considerando sequências com identidade acima e abaixo de 95%. Entre as sequências com identidade $\geq 95\%$, destacaram-se *Meyerozyma guilliermondii* (1.435 sequências), *Talaromyces ailsahockingiae* (23 sequências), *Penicillium citrinum* (19 sequências) e *Sistotremastrum aculeocreptans* (12 sequências). Para as sequências com identidade $< 95\%$, foram sugeridas *Collybiopsis pseudolodgeae* (32 sequências) e *Grammothele taiwanensis* (17 sequências), indicando menor resolução taxonômica quando comparadas às demais.



Fonte: O autor (2026)

De forma integrada, os resultados indicam um consórcio microbiano caracterizado por dominância bacteriana de gêneros frequentemente associados a

ambientes contaminados e um domínio fúngico concentrado em um único táxon predominante. Essa estrutura sugere possível complementaridade funcional entre bactérias e fungos na dinâmica ecológica da amostra analisada.

Entre os gêneros identificados, diversos estudos na literatura descrevem suas elevadas capacidades metabólicas associadas à biorremediação de derivados de petróleo (Pandolfo *et al.*, 2024). Li *et al.* (2020), por exemplo, relataram que uma cepa de *Achromobacter* (AC15), isolada de solo de manguezal, apresentou expressiva produção de biossurfactantes, o que possibilitou a utilização de altas concentrações de pireno como única fonte de carbono e energia. Os autores observaram que a cepa foi capaz de degradar aproximadamente 40% do pireno, presente em concentração inicial de 300 mg/L, além de promover a redução da tensão superficial do meio de cultura após 14 dias de incubação, associada à produção de compostos tensoativos.

De forma semelhante, o gênero *Pseudomonas* é amplamente reconhecido em estudos de biorremediação. Medić (2020) demonstrou que uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou alta eficiência na degradação de *n*-alcanos (C16 e C19) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como fluoranteno, fenantreno e pireno. A eficiência de degradação dos hidrocarbonetos individuais, em concentrações iniciais de 20 mg/L, variou entre 41% e 98%, dependendo do composto, ao longo de um período de sete dias. Isso demonstra que estes gêneros identificados estão relacionados com ótimos resultados de degradação de hidrocarbonetos, assim como os obtidos nesta dissertação.

Estudos genômicos recentes demonstram o potencial biodegradador de espécies do gênero *Achromobacter* em ambientes contaminados. Grzadzielewska e Gałązka (2023) evidenciaram que algumas espécies apresentam vias metabólicas completas para a degradação de xenobióticos e compostos aromáticos, incluindo genes envolvidos nas rotas de degradação de aminobenzoato, benzoato e estireno, indicando relevante potencial funcional para a biorremediação de poluentes orgânicos. Ainda em termos moleculares, Hong *et al.* (2017), ao analisarem o genoma de *Achromobacter sp.* HZ01, identificaram genes associados à degradação de *n*-alcanos por meio da via de oxidação terminal e à metabolização de compostos aromáticos via rota da catecola, além de sequências relacionadas à biossíntese de biossurfactantes e mecanismos adaptativos ambientais.

Em conjunto, esses achados sustentam que membros do gênero apresentam capacidades catabólicas compatíveis com a degradação de petróleo e seus derivados,

corroborando a elevada abundância de *Achromobacter spp.* no consórcio A5 e seu provável papel funcional na decomposição de componentes do diesel e de outros substratos complexos.

4.1.2 Inferência filogenética baseada no gene 16S rRNA das bactérias identificadas na metataxonomia

Para a construção da árvore filogenética (Figura 12), foram selecionadas sete sequências representativas. Embora a análise metataxonômica tenha identificado 16 gêneros bacterianos, apenas aqueles que apresentaram identidade >95% no gene 16S rRNA foram incluídos na reconstrução filogenética, com o objetivo de assegurar maior confiabilidade taxonômica e evitar posicionamentos instáveis associados a sequências com baixa similaridade. Essa estratégia possibilitou melhor resolução dos clados e suporte estatístico mais consistente. As sete sequências selecionadas, obtidas por meio do sequenciamento *Nanopore*, correspondem às espécies com identidade superior a 95% e maior abundância relativa na análise taxonômica, distribuídas entre os seis gêneros previamente identificados dentro desse critério de similaridade.

Também foram incluídas as sequências do gene 16S rRNA das espécies-tipo de cada gênero: *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071^T; *Caballeronia calidae* LMG 2932; *Trinickia fusca* VKM B-2; *Burkholderia metallica* R-16017^T; *Bordetella hinzii* LMG 135; *Achromobacter xylosoxidans* DSM 10346. Para o enraizamento da árvore, utilizaram-se *Bacillus subtilis* DSM10 (Bacillota) e *Streptomyces coelicolor* NBRC 12854 (Actinobacteriota) como grupos externos. Os valores de bootstrap, calculados a partir de 1.000 repetições, superiores a 70% estão indicados nos nós.

A topologia observada mostrou-se coerente com a classificação taxonômica descrita para os grupos analisados, incluindo representantes dos gêneros *Pseudomonas spp.*, *Achromobacter spp.*, *Bordetella spp.*, *Burkholderia spp.*, *Caballeronia spp.* e *Trinickia spp.*. Os agrupamentos formados evidenciaram organização consistente e relações filogenéticas compatíveis com as análises taxonômicas previamente realizadas. De modo geral, a árvore apresentou boa resolução em nível de gênero e suporte estatístico adequado, indicando confiabilidade na inferência das relações evolutivas entre os isolados estudados (Figura 14).

Figura 14 - Árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA das sequências bacterianas com identidade $\geq 95\%$, representando os principais gêneros abundantes identificados na análise metataxonômica. Foram incluídos representantes dos gêneros *Pseudomonas spp.*, *Achromobacter spp.*, *Bordetella spp.*, *Burkholderia spp.*, *Caballeronia spp.* e *Trinickia spp.* Os agrupamentos formados evidenciaram organização consistente e relações filogenéticas compatíveis. Os valores de *bootstrap* foram superiores a 80% nos clados correspondentes às classes Beta- e Gammaproteobacteria, e superiores a 90% nos agrupamentos internos dentro da Betaproteobacteria, indicando elevada confiabilidade estatística dos ramos formados.



Fonte: O autor (2026).

4.1.3 Identificação molecular das linhagens bacterianas isoladas por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

As linhagens isoladas foram identificadas em nível de gênero com base na similaridade das sequências do gene 16S rRNA, considerando valores superiores a 90% de identidade no banco de dados NCBI. As colônias denominadas A5C4 foi atribuída ao gênero *Pseudomonas sp.*, enquanto as colônias A5C2 e A5C9 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Achromobacter spp.* (TABELA 1).

Tabela 1- Identificação taxonômica das linhagens isoladas por sequenciamento do gene 16S rRNA. A linhagem A5C4 foi identificada como pertencente ao gênero *Pseudomonas sp.*, enquanto as linhagens A5C2 e A5C9 foram classificadas como pertencentes ao gênero *Achromobacter sp.*

Linhagem	Gênero
A5C4	<i>Pseudomonas sp.</i>
A5C2; A5C9	<i>Achromobacter spp.</i>

Fonte: O autor (2026).

A predominância de representantes do filo Proteobacteria entre as linhagens isoladas é consistente com relatos da literatura que descrevem esse grupo como o principal componente bacteriano envolvido na degradação de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos e contaminados. Os membros das classes Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria constituem os principais degradadores de compostos derivados do petróleo, possuem elevada versatilidade metabólica e capacidade de colonizar ambientes impactados por derramamentos de óleo (Usman, 2022; Cruz *et al.*, 2026).

4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

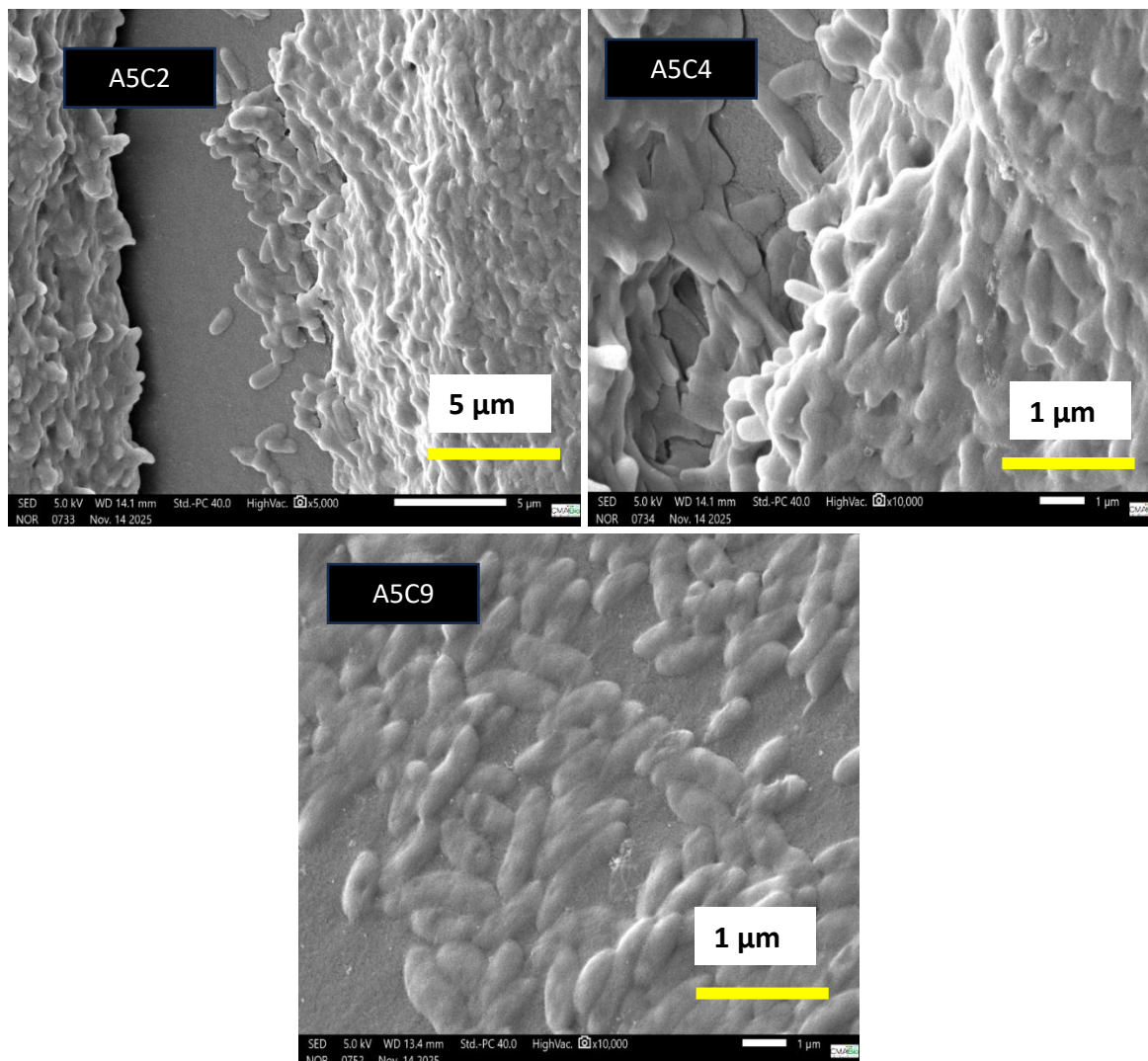
4.2.1 Caracterização morfológica das linhagens bacterianas isoladas por coloração de Gram e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para alcance do objetivo específico 2, os morfotipos bacterianos foram classificados com base nas características morfológicas observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e na coloração de Gram. A partir do consórcio microbiano, foram isolados e cultivados três morfotipos distintos.

As linhagens A5C2, A5C4 e A5C9 apresentaram morfologia típica bacilar, evidenciada nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, conforme ilustrado na Figura 15, e coloração Gram-negativa.

Figura 15 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das linhagens bacterianas isoladas A5C2, A5C4 e A5C9, evidenciando morfologia bacilar.

As imagens foram registradas utilizando escalas de 5 μm (para A5C2) e 1 μm (para A5C4 e A5C9), com o aumento de 5000x (para A5C2) e 10,000x (para A5C4 e A5C9), permitindo a visualização detalhada do formato celular e das dimensões aproximadas das células.



Fonte: O autor (2025).

Os gêneros *Achromobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. são descritos na literatura como bactérias de morfologia bacilar e característica Gram-negativa, conforme evidenciado por coloração diferencial (Cruz et al., 2026). Tal descrição encontra-se em consonância com os resultados observados nas linhagens isoladas neste estudo, cujas análises morfológicas e testes de coloração de Gram confirmaram a presença de bacilos Gram-negativos, corroborando a identificação molecular previamente obtida.

De modo geral, as características morfológicas visualizadas por microscopia eletrônica de varredura, associadas ao perfil Gram-negativo evidenciado pela

coloração de Gram, mostraram-se consistentes com os resultados provenientes do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA pelo método de Sanger. A concordância entre os dados fenotípicos e moleculares reforça a robustez da identificação taxonômica das linhagens isoladas, indicando que a caracterização morfológica sustentou as inferências obtidas por meio da análise genética.

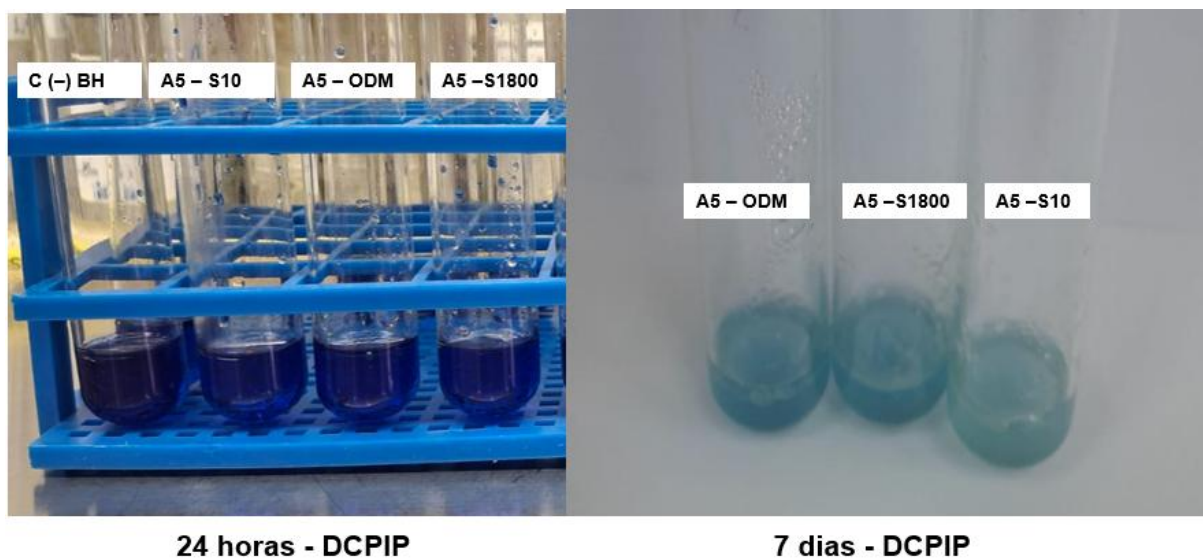
4.3 ANÁLISE DE BIODEGRADAÇÃO

Após as análises de sequenciamento e caracterização morfológica, procedeu-se à avaliação dos resultados de biodegradação, com o intuito de atender aos objetivos específicos número 3 e 4 desta pesquisa.

4.3.1 Ensaio DCPIP com o consórcio A5 em diferentes tipos de óleo diesel

O resultado da biodegradação em diferentes tipos de óleo diesel pelo consórcio utilizando o DCPIP é observada na Figura 16 e 17, após 7 dias de experimento. Todas as amostras com diferentes fontes de carbono apresentaram descoloração. Não houve diferença na coloração das amostras do consórcio em diesel distintos, como ilustra a Figura 16.

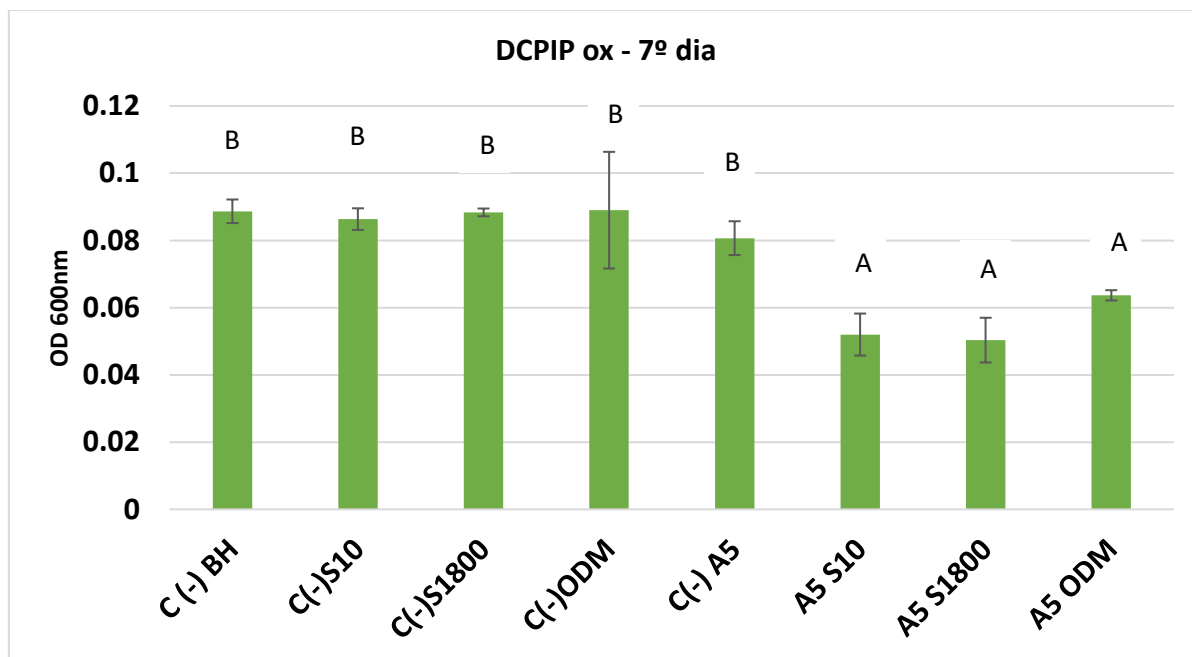
Figura 16 - Ensaio de biodegradação com DCPIP. O ensaio colorimétrico evidencia a redução do 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), observada pela perda da coloração azul e tendência à incolor, em decorrência do processo de biodegradação do óleo diesel pelo consórcio microbiano. A5–ODM, A5–S1800 e A5–S10 correspondem ao consórcio bacteriano A5 incubado com DCPIP e os respectivos tipos de óleo diesel. C(–) BH refere-se ao meio de cultura BH contendo DCPIP, sem inoculação, utilizado como controle negativo.



Fonte: O autor (2025).

Na Figura 17, apresenta-se em gráfico os valores de redução do DCPIP durante os 7 dias de análise, comparado aos cultivos controles. Observa-se diferenças na descoloração do consórcio bacteriano com diferentes fontes de carbono e os controles negativos nos 7 dias do experimento. O consórcio crescido em diesel S10 e S1800 demonstrou um declínio contínuo, ficando com medidas de OD abaixo dos consórcios em ODM após os dias de cultivo.

Figura 17 -Análise da redução do DCPIP por biodegradação de diferentes tipos de óleo diesel pelo consórcio bacteriano no 7º dia. C (-) BH – controle negativo DCPIP + BH; C(-) S10 – controle negativo DCPIP + BH + diesel S10; C(-) S1800 – Controle negativo DCPIP + BH + diesel S1800; C (-) ODM – Controle negativo DCPIP + BH + óleo diesel marítimo; C(-) A5 - Controle negativo DCPIP + BH + consórcio bacteriano; A5 S10, A5 S1800 e A5ODM – Consórcio bacteriano (A5) cultivado em DCPIP + BH + respectivo óleo diesel (S10, S1800 e ODM). Todas amostras foram realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, análise de variância e teste Tukey com significância de 0,01.



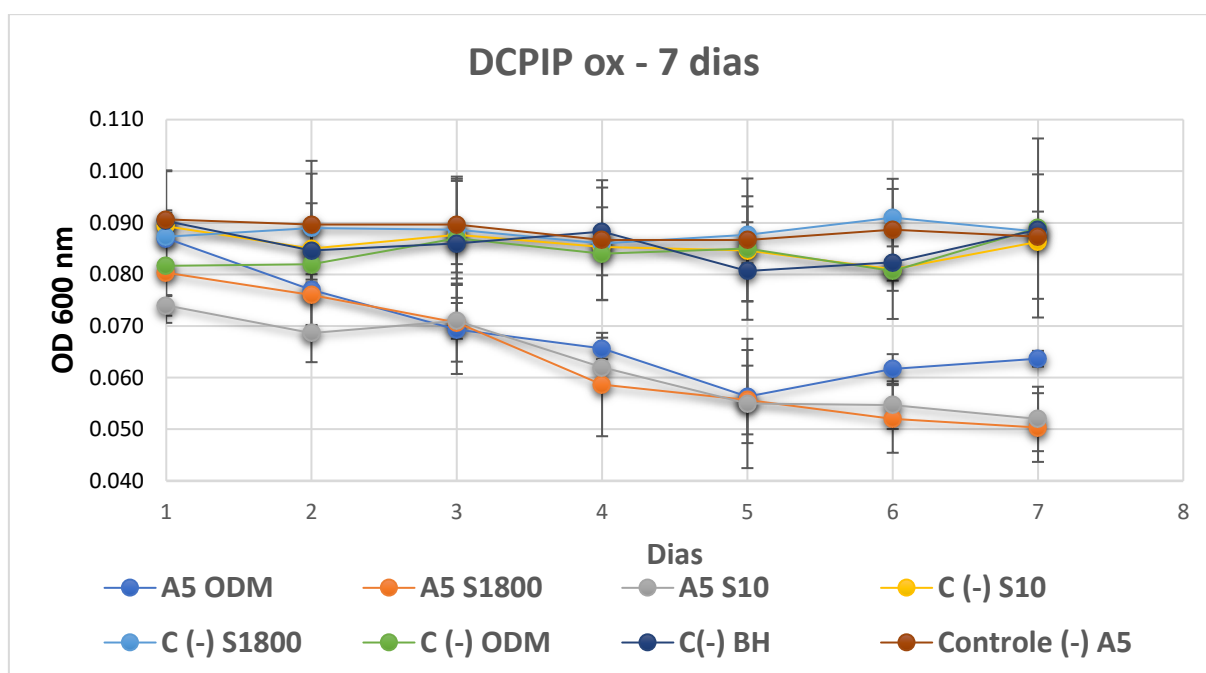
Fonte: O autor (2025).

A análise estatística demonstra que não houve diferença estatística significativa entre as amostras crescidas em diferentes tipos de diesel, conforme a Figura 17. O controle negativo do 7º dia com óleo diesel marítimo (ODM) demonstrou um desvio padrão maior, por apresentar maior viscosidade do combustível relacionada à elevada quantidade de enxofre e hidrocarbonetos de cadeias longas, que tende a formar micelas que interferem na leitura espectrofotométrica do DCPIP, fato já discutido em estudos na composição química dos derivados de petróleo (Usman, 2024).

Na Figura 18, é ilustrada a redução do DCPIP durante a biodegradação do óleo diesel pelo consórcio ao longo de 7 dias de experimento. As leituras foram realizadas a cada 24 h utilizando espectrofotômetro, permitindo acompanhar quantitativamente a mudança na absorbância do corante. Observa-se uma acentuada redução do DCPIP nas amostras com o consórcio em diferentes tipos de diesel, indicando resultados positivos de atividade biodegradativa. Em contraste, os controles negativos apresentaram apenas uma descoloração gradual, associada à presença de íons H^+ provenientes do meio de cultura sem células ou do próprio derivado de petróleo,

distribuídos pelo indicador redox. Além disso, a liberação da estrutura química do DCPIP ao longo do tempo também pode contribuir para essa variação (Isola *et al.*, 2013).

Figura 18 - Redução do DCPIP por biodegradação de diferentes tipos de óleo diesel pelo consórcio bacteriano ao longo de 7 dias. A absorbância foi medida a cada 24 h por espectrofotômetro em 600nm, evidenciando que as linhas correspondentes ao consórcio (A5 S10, A5 S1800 e A5 ODM) apresentam redução acentuada do DCPIP em comparação aos controles negativos, indicando atividade positiva de biodegradação. Legenda dos controles: C (-) BH – DCPIP + BH; C (-) S10 – DCPIP + BH + diesel S10; C (-) S1800 – DCPIP + BH + diesel S1800; C (-) ODM – DCPIP + BH + óleo diesel marítimo; C (-) A5 – DCPIP + BH + consórcio bacteriano.



Fonte: O autor (2025).

Em conjunto, os resultados indicam que o consórcio A5 possui capacidade intrínseca de promover a redução do DCPIP em presença de diferentes tipos de óleo diesel, confirmando versatilidade metabólica e adaptação funcional para atuar na biodegradação de hidrocarbonetos, compatível com o desempenho de comunidades microbianas estudadas em biorremediação de ambientes contaminados por derivados de petróleo.

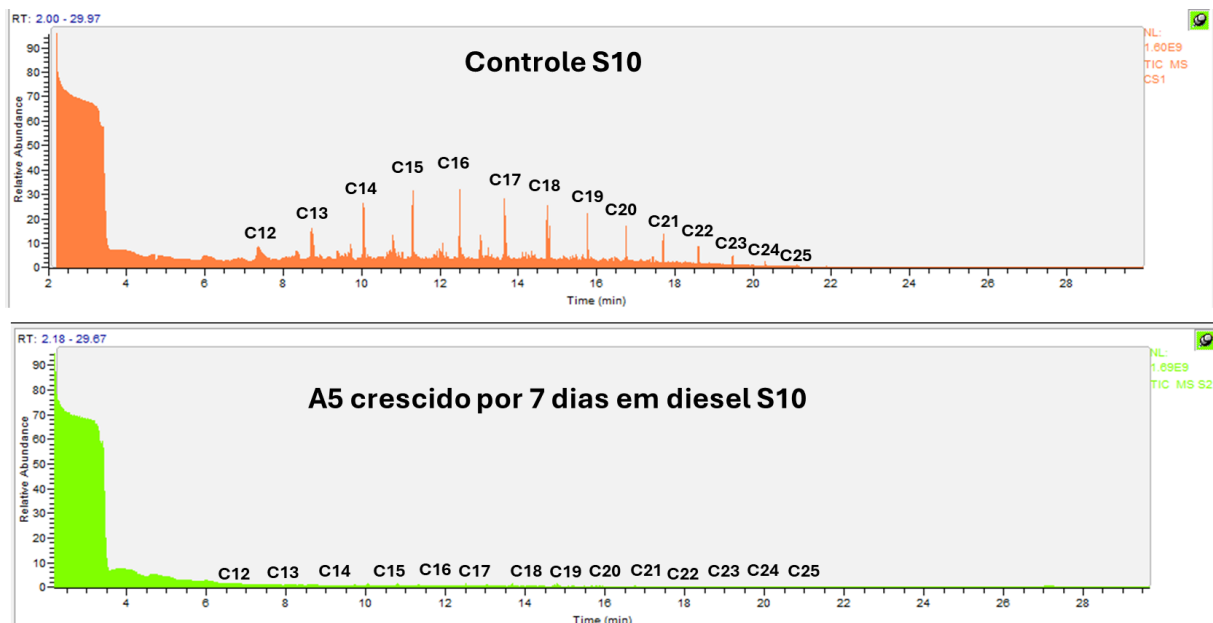
Os resultados observados em nosso ensaio de redução do DCPIP são consistentes com as tendências encontradas na literatura para a detecção da atividade biodegradativa de consórcios ou isolados microbianos sobre hidrocarbonetos. Em particular, o estudo de Mohammed *et al.* (2023) empregou o método do DCPIP, além de análise espectrofotométrica e GC-MS, para avaliar a

capacidade de microrganismos indígenas de solos contaminados em degradar petróleo bruto e frações de hidrocarbonetos, demonstrando que certos isolados bacterianos e fúngicos foram capazes de reduzir a coloração do DCPIP de azul para incolor, indicando reação redox associada ao metabolismo de hidrocarbonetos (incluindo alifáticos e aromáticos) durante a biodegradação.

4.3.2 Análise de biodegradação de *n*-alcanos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

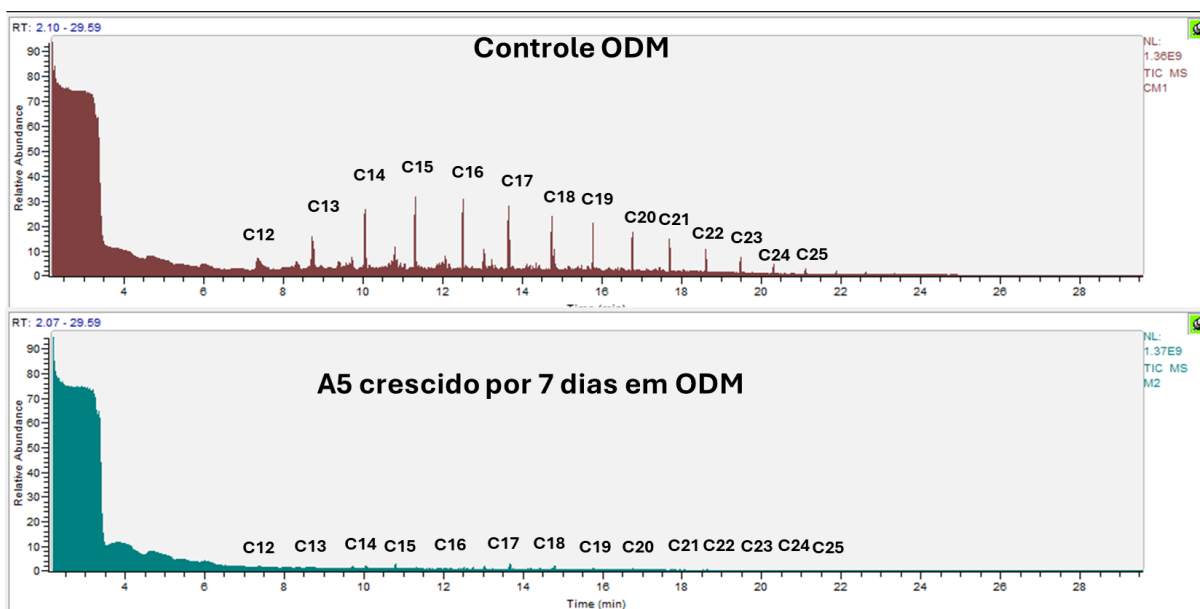
Para uma análise quantitativa mais sensível da biodegradação, foi realizada a cromatografia gasosa (GC–MS), considerando apenas os óleos diesel S10 e ODM, uma vez que o S1800 não está mais disponível no mercado. A análise permitiu a identificação de picos correspondentes aos alcanos lineares com número de carbonos variando de C12 a C25 em ambos os tipos de diesel. As imagens cromatográficas evidenciaram uma redução expressiva na intensidade desses picos após o tratamento com o consórcio microbiano, indicando degradação eficiente dos hidrocarbonetos alifáticos presentes no óleo diesel (FIGURAS 19 e 20).

Figura 19 - Cromatogramas da degradação de *n*-alcanos pelo consórcio em óleo diesel S10. Estão identificados picos correspondentes a alcanos lineares de C12 a C25. A imagem superior representa o controle negativo isento de células, enquanto a imagem inferior mostra o consórcio A5 cultivado em 7 dias, evidenciando a redução na intensidade dos picos.



Fonte: O autor (2025).

Figura 20 - Cromatogramas da degradação de *n*-alcanos pelo consórcio em óleo diesel marítimo. Estão identificados picos correspondentes a alcanos lineares de C12 a C25. A imagem superior representa o controle negativo isento de células, enquanto a imagem inferior mostra o consórcio A5 cultivado em 7 dias, evidenciando a redução significativa na intensidade dos picos.

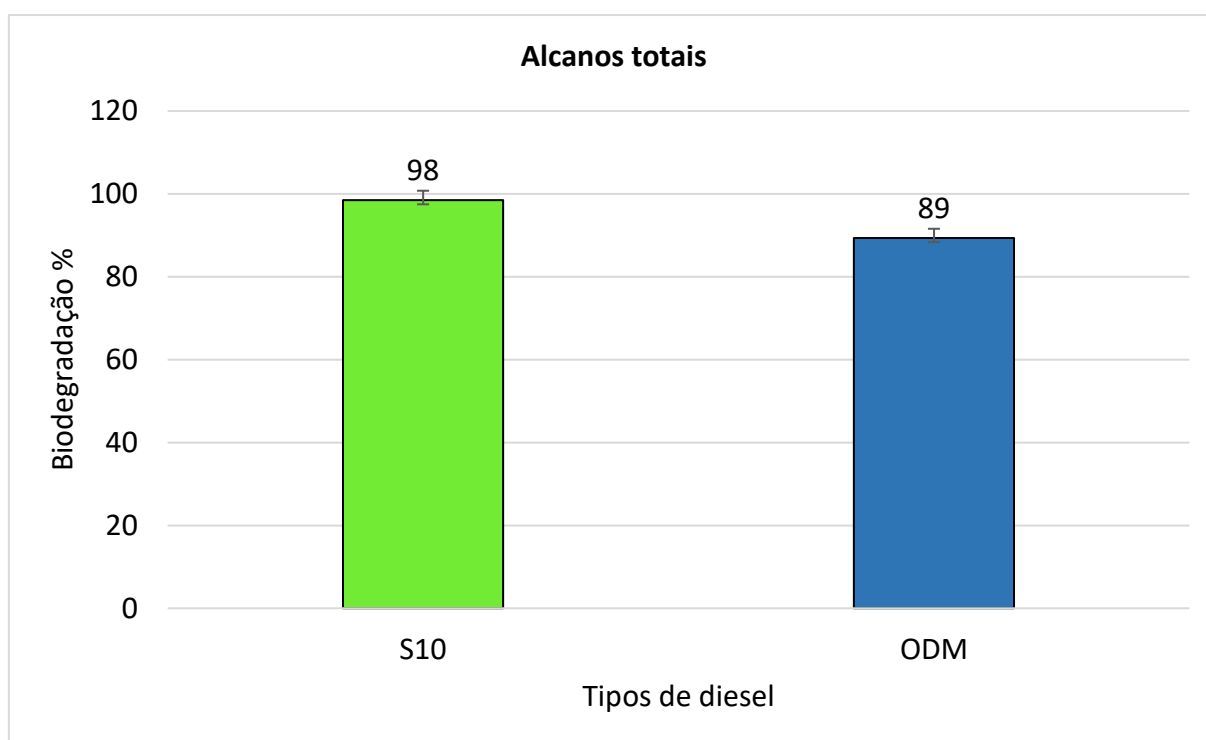


Fonte: O autor (2025).

No óleo diesel S10, observou-se elevada eficiência na biodegradação dos alcanos totais (somatório de todos os alcanos identificados nesta análise), com

remoção de $98 \pm 2,26\%$ (Figura 15). A Figura 21 apresenta a degradação de cada pico de carbono individual (*n*-alcano), com os valores representando a redução relativa de cada composto após incubação com o consórcio bacteriano. Com exceção do *n*-alcano C14, em óleo diesel S10, todos os demais compostos apresentaram taxas de biodegradação superiores a 99%, atingindo, em alguns casos, 100% de remoção. Esses resultados evidenciam a elevada capacidade metabólica do consórcio microbiano em degradar hidrocarbonetos alifáticos de cadeia curta e média (FIGURA 21).

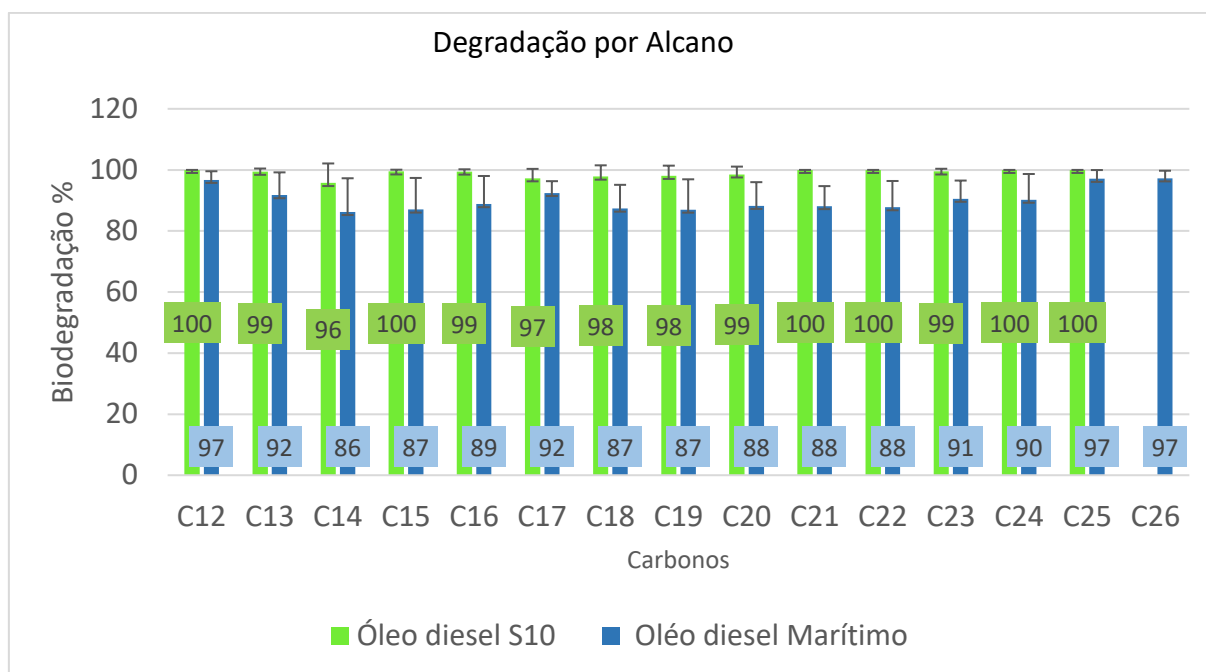
Figura 21 - Gráficos da biodegradação dos alcanos totais pelo consórcio em diferentes tipos de óleo diesel. Os alcanos totais correspondem à soma de todos os alcanos identificados na análise por GC-MS. Observa-se que o consórcio degradou 98 % dos alcanos presentes no diesel S10 e 89 % no óleo diesel marítimo (ODM), evidenciando alta eficiência na degradação de hidrocarbonetos alifáticos.



Fonte: O autor (2025).

Para o óleo diesel marítimo (ODM), a biodegradação total dos alcanos atingiu $89 \pm 2,23\%$, valor inferior ao observado para o diesel S10, porém ainda indicativo de atividade biodegradadora. Os alcanos com cadeias entre C14 e C22 apresentaram taxas de degradação variando entre aproximadamente 86% e 88% em ODM, com destaque para o alcano C17, que alcançou $92 \pm 3,8\%$ de biodegradação (FIGURA 22).

Figura 22 – Degradação de *n*-alcanos individuais (C12-C26) no óleo diesel pelo consórcio. As barras representam os diferentes carbonos nos óleos diesel S10 e ODM. No diesel S10, todos os alcanos foram degradados acima de 99–100 %, com exceção de C14 e C17, que apresentaram degradação de 96 % e 97 %, respectivamente. No ODM, os alcanos C14–C16 apresentaram degradação de 86 %, 87 % e 89 %, enquanto C18–C22 foram degradados em 87 %, 87 %, 88 %, 88 % e 88 %, respectivamente. Os demais alcanos mostraram degradação de C12 e C13 – 97 %, C17 – 92 %, e C23–C26 – 91 %, 90 %, 97 % e 97 %. Esses resultados evidenciam a elevada eficiência do consórcio na metabolização da maioria dos hidrocarbonetos alifáticos presentes em diferentes tipos de óleo diesel.



Fonte: O autor (2025).

De forma semelhante, Zaman *et al.* (2025) em seus resultados de cromatografia gasosa observaram predominância de *n*-alcanos entre C14 e C36 no petróleo bruto, com maiores intensidades para C18 e C24. Após a biodegradação por uma espécie bacteriana, verificou-se elevada eficiência de consumo com degradação total de *n*-alcanos em 90%, houve redução completa de C24 (100%) e diminuição expressiva de C18 (97%), enquanto alcanos de cadeia mais longa, como C34 e C36, apresentaram menor remoção. Na literatura, a análise de linhagens isoladas nomeadas *SHA* e *SWOC*, de Shokranian *et al.* (2025) apresentaram taxas de degradação de hidrocarbonetos em 84,2% e 85,8%, respectivamente. A eficiência degradativa foi categorizada em *n*-alcanos de C13–C30.

Neste estudo, embora o ensaio com DCPIP não tenha evidenciado diferenças significativas entre as taxas de descoloração para os diferentes tipos de diesel, a análise por CG-MS revelou uma diferença quantitativa relevante na remoção de

alcanos, com $98 \pm 2,26\%$ para o diesel S10 e $89 \pm 2,23\%$ para o óleo diesel marítimo. Essa divergência se explica pelo caráter indireto e global do DCPIP, que avalia a atividade redox microbiana, enquanto a CG-MS permite a quantificação direta e individual dos hidrocarbonetos degradados, sendo mais sensível para detectar variações no perfil de biodegradação. A maior eficiência observada no diesel S10 pode ser atribuída à maior biodisponibilidade de seus *n*-alcanos para a diversidade microbiana do consórcio, além de corresponderem às frações mais facilmente degradáveis, o que favorece a interação microrganismo–substrato.

4.4 AVALIAÇÃO DOS TENSOATIVOS

Para atender ao objetivo específico nº 5, após a análise de biodegradação, foram realizadas avaliações qualitativas e quantitativas da redução da tensão superficial, bem como a classificação bioquímica preliminar dos tensoativos produzidos pelo consórcio microbiano.

4.4.1 Ensaio colapso de gota

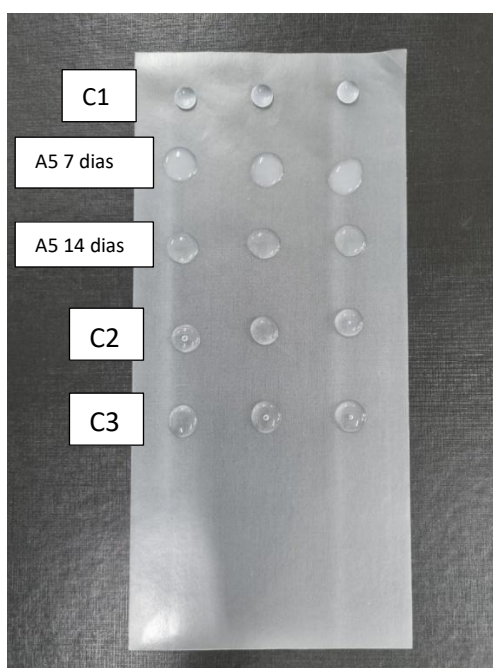
A partir da purificação parcial dos metabólitos produzidos pelo consórcio em 7 e 14 dias, foi realizado o teste de colapso de gota para avaliar a diminuição da tensão superficial, indicando a presença de biossurfactantes ou bioemulsificantes.

Na Figura 23, observa-se o maior espalhamento da gota nas amostras com 7 dias de incubação, seguido pelas amostras de 14 dias, sendo ambos superiores aos controles (C1, C2 e C3), que consistiam em água destilada, SDS 1 % e SDS 10 %, evidenciando a produção de tensoativos pelo consórcio.

A maior extensão de espalhamento observada nas amostras de 7 dias indica que o consórcio bacteriano já produziu quantidades significativas de tensoativos neste período, sugerindo um pico inicial de biossurfactante ativo. Embora as amostras de 14 dias também apresentem espalhamento superior aos controles, a ligeira redução em relação às amostras de 7 dias pode refletir processos como a degradação parcial dos metabólitos produzidos, a saturação do meio e fim da fase estacionária do consórcio. Esses resultados confirmam que o consórcio é capaz de sintetizar

metabólitos com capacidade de reduzir a tensão superficial, reforçando sua aplicabilidade em processos de biorremediação e emulsificação de hidrocarbonetos.

Figura 23 - Teste de colapso de gota para avaliação de tensoativos produzidos pelo consórcio bacteriano. C1 – controle negativo (H_2O); A5 7 dias – sobrenadante parcialmente purificado do consórcio bacteriano após 7 dias de incubação; A5 14 dias – sobrenadante parcialmente purificado do consórcio após 14 dias de incubação; C2 – controle positivo (SDS 1 %); C3 – controle positivo (SDS 10 %). Observa-se que o maior espalhamento da gota ocorreu nas amostras de 7 dias, seguido das amostras de 14 dias, ambos superiores aos controles negativos e positivos. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

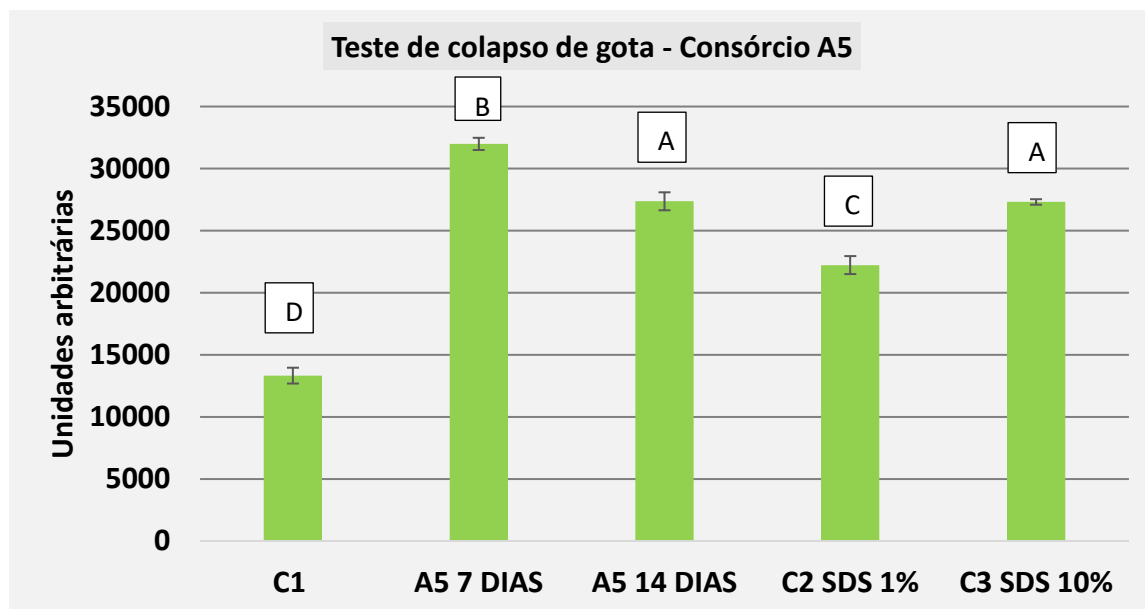


Fonte: O autor (2025).

A imagem do teste de colapso de gota foi processada pelo software *ImageJ* para obtenção dos valores das circunferências usados na análise de variância e teste *Tukey* com $p < 0,01$, estão representados na Figura 24.

As análises indicaram que a amostra A5 cultivada por 14 dias não difere estatisticamente do controle positivo SDS 10%, indicando presença de metabólitos equivalente ao detergente 10%. Já a amostra A5 cultivada por 7 dias apresenta diferença estatística significativa com os controles positivos SDS 1% e SDS 10%, sugerindo maior presença de metabólitos que agem sobre a tensão superficial chegando a superar a concentração dos respectivos controles.

Figura 24 – Análise estatística do teste de colapso de gota do sobrenadante do consórcio. C1 – controle negativo (H₂O); A5 7 dias – sobrenadante do consórcio após 7 dias de incubação; A5 14 dias – sobrenadante do consórcio após 14 dias de incubação; C2 – controle positivo (SDS 1 %); C3 – controle positivo (SDS 10 %). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, determinadas por análise de variância seguida do teste de *Tukey*, com nível de significância de 0,01. Observa-se que o sobrenadante A5 7 dias se diferenciou significativamente de todos os controles e do tratamento A5 14 dias, enquanto o A5 14 dias apresentou efeito equivalente ao controle positivo SDS 10 %.



Fonte: O autor (2025).

4.4.2 Análise por tensiômetro

Para mensurar a redução da tensão superficial e complementar as análises de espalhamento de gota citada no tópico anterior, foram realizadas as medidas da tensão superficial em mN/m (TABELA 2), conforme metodologia descrita no tópico 3.5.3. Os valores obtidos com o tensiômetro de anel de platina evidenciam uma média de 35,3 mN/m aos 7 dias e 37,6 mN/m aos 14 dias.

Após os sete dias de incubação, observou-se que o consórcio microbiano promoveu uma redução da tensão superficial de 45,8%, com desvio padrão de $\pm 1,1$ em relação ao controle negativo (BH + óleo diesel sem células). Já aos 14 dias de incubação, a redução da tensão superficial foi de 42,3%, com desvio padrão de $\pm 2,2$, registrando uma leve diminuição.

Em estudo conduzido por Rodrigues *et al.* (2006), foi realizada a caracterização físico-química de tensoativos glicolipídicos produzidos por *Lactococcus lactis* 53, sendo determinada uma concentração micelar crítica de 14 g/L para a fração isolada,

associada a um valor de tensão superficial de 36 mJ/m², próximo aos valores do consórcio A5, enquanto outros trabalhos com consórcios bacterianos degradadores de hidrocarbonetos indicam reduções típicas entre 35–50 mN/m dependendo do tempo de incubação e do substrato (Mohammed *et al.*, 2023). Esses dados reforçam que o consórcio A5 apresenta capacidade competitiva na produção de biossurfactantes.

Tabela 2 - Tensão superficial (mN/m) do consórcio A5 cultivado por 7 e 14 dias. A tensão superficial foi medida em tensiômetro de anel de platina. Aos 7 dias de incubação, o sobrenadante apresentou média de 35,3 mN/m, enquanto aos 14 dias a média foi de 37,6 mN/m. Como controles negativos, utilizaram-se o meio mínimo BH com óleo diesel filtrado e água destilada, esta última para calibração do equipamento e como padrão de referência já estabelecido na literatura..

Réplica	Tensão superficial (mN/m)			
	Controle (-) Água destilada	Controle (-) BH + 1% de óleo diesel S10	A5 cultivado em 7 dias	A5 cultivado em 14 dias
1	69.8	62.7	35.3	37.8
2	69.8	69	36.4	39.6
3	69.8	63.7	34.2	35.3
Média	69.0 ± 0,0	65.1 ± 3,4	35.3 ± 1,1	37.6 ± 2,2

Fonte: O autor (2025).

4.4.3 Análise dos ensaios bioquímicos

Para avaliar a natureza dos tensoativos de forma qualitativa, procedeu-se à realização de alguns ensaios bioquímicos, conforme os resultados da Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados qualitativos das reações de *Molisch*, *Ninhidrina*, Saponificação e azul de bromotimol para o consórcio microbiano A5. Os sinais representam intensidade da reação: NR (ensaio não realizado), – (negativo), + (positivo), ++ (positivo intenso).

Tratamentos	Molish	Ninhidrina	Saponificação	Azul de bromotimol
Controle negativo (H ₂ O)	NR	NR	NR	-
A5 7 dias	-	-	+	+
A5 14 dias	-	-	+	++
C2 – SDS 1%	NR	NR	+	+
C4 – Triton 1%	NR	NR	NR	++
C5 – Amido >1g/L	+	NR	NR	NR
C6 lipopeptídeo	–	-	+	NR

Fonte: O autor (2025).

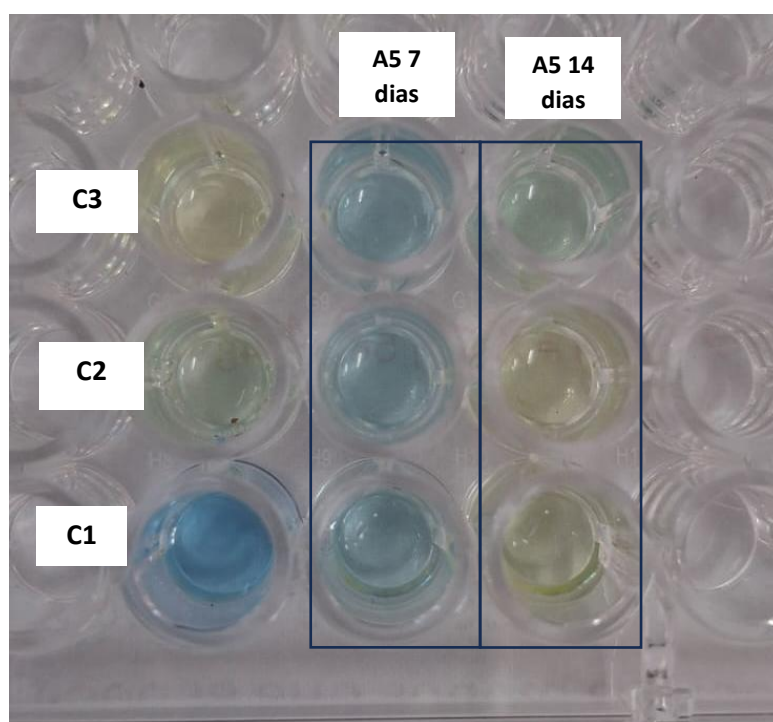
No teste de *Molisch*, o ácido sulfúrico foi adicionado lentamente na borda do tubo de ensaio, promovendo a desidratação dos carboidratos e a formação de um intermediário que reage com α -naftol, gerando um composto de coloração violeta. O ensaio foi negativo, pois não houve formação do anel violeta, sugerindo que os biossurfactantes produzidos pelo consórcio possivelmente não pertencem à classe dos glicolipídios. Como controle positivo, utilizou-se uma solução de amido (≥ 1 g/L), que apresentou o anel violeta.

No ensaio de *Ninhidrina*, não foi observada coloração violeta, indicando ausência de aminoácidos livres. A reação ocorre quando a ninhidrina reage com grupos amino, formando hidrindantina e, subsequentemente, o complexo de Ruhemann, responsável pela coloração azul-violeta. A ausência de reação sugere que os biossurfactantes não são lipopeptídeos. O controle positivo para *Ninhidrina* foi realizado com o sobrenadante de uma linhagem bacteriana produtora de lipopeptídeos, que apresentou resultado positivo.

O teste de saponificação revelou a presença de lipídeos, evidenciada pela formação de espuma nos tubos, embora em pequena proporção. Já no ensaio de azul de bromotimol, o sobrenadante também apresentou resultado positivo para lipídeos,

comparável aos controles positivos (SDS 1% e Triton 1%). A análise em placas de 96 poços mostrou que a coloração da amostra do consórcio cultivado por 14 dias se aproximou da obtida pelo controle positivo (SDS 1%), enquanto a amostra de 7 dias apresentou leve descoloração em relação ao controle negativo, conforme a Figura 25.

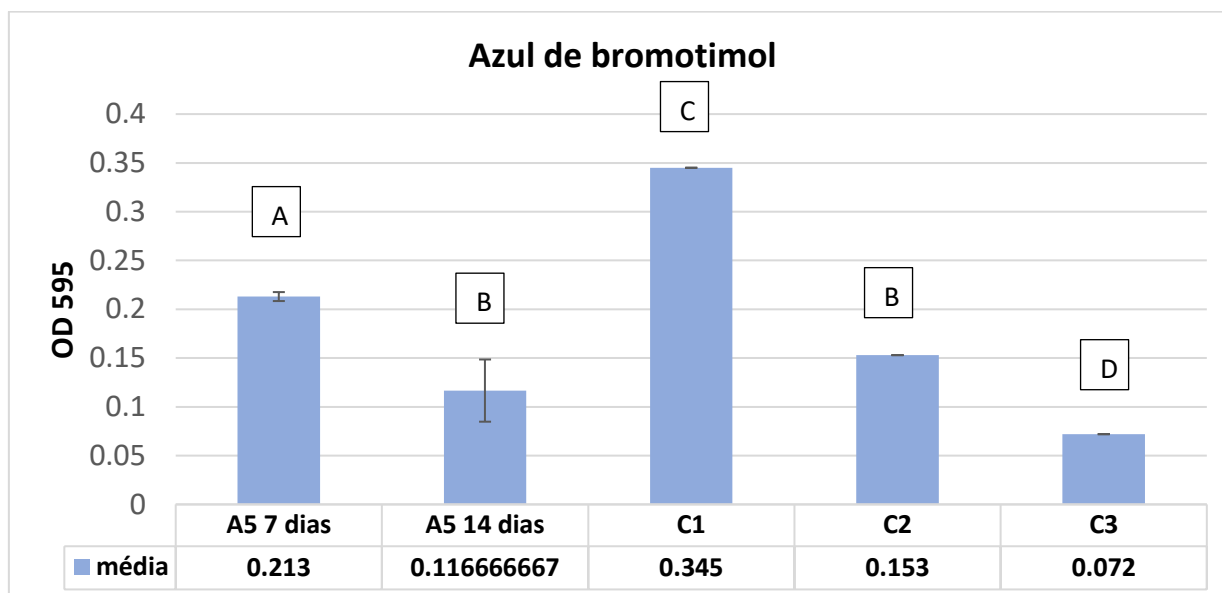
Figura 25 - Teste Azul de bromotimol para detecção de lipídeos. C1 – controle negativo (H₂O); C2 – controle positivo (SDS 1%); C3 – controle positivo (Triton 1%); A5 7 dias – Sobrenadante do consórcio cultivado em 7 dias; A5 14 dias – Sobrenadante do consórcio cultivado em 14 dias. O sobrenadante do consórcio aos 7 dias apresentou tonalidade azul mais clara que os controles negativos, indicando presença de lipídeos. Aos 14 dias, observou-se mudança para tonalidade verde-água a amarela, sugerindo maior concentração de lipídeos livres ao longo do tempo de incubação



Fonte: O auutor (2025).

Ao analisar estatisticamente os dados espectrofotométricos (OD 595 nm), a análise de variância e teste *tukey* indica o sobrenadante do consórcio bacteriano crescido em 14 dias com metabólitos equivalentes ao SDS 1%, já o consórcio crescido em 7 dias possui diferenças estatísticas com os dois controles positivos, porém também se diferencia do controle negativo, indicando presença de lipídeos livres, mas em concentrações menores que os controles utilizados, como observado na Figura 26.

Figura 26 - Análise estatística do azul de bromotimol para detecção de lipídeos livres. C1 – controle negativo (H₂O); C2 – controle positivo (SDS 1%); C3 – controle positivo (Triton 1%); A5 7 dias – Sobrenadante parcialmente purificado do consórcio bacteriano crescido em 7 dias; A5 14 dias – Sobrenadante do consórcio bacteriano parcialmente purificado crescido em 14 dias. %). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, análise de variância e teste *Tukey* com significância de 0,01.



Fonte: O autor (2025).

Os resultados indicam que os biossurfactantes produzidos pelo consórcio A5 podem não ser glicolipídios ou lipopetídeos típicos, mas possuem compostos dos tensoativos detectáveis nos ensaios de espuma e azul de bromotimol. Vale ressaltar que os protocolos utilizados não definem claramente a concentração mínima detectável dos compostos, o que pode explicar resultados negativos em testes como *Molisch* e *Ninhidrina*.

Estudos prévios demonstram que a concentração e a composição dos biossurfactantes variam conforme a fonte de carbono e a cepa microbiana. Hošková *et al.* (2013) observaram maiores concentrações de ramnolipídios em citrato de sódio em comparação a glicerol e óleo de girassol. Pirog *et al.* (2013) produziram 6,1–7,7 g/L de biossurfactantes com *Acinetobacter calcoaceticus* utilizando óleo de girassol residual, enquanto Zaman *et al.* (2025) relataram 0,846 g/100 mL com *Rhodococcus indonesiensis* no mesmo substrato.

A concentração dos biossurfactantes é crucial para a análise de rendimento e para obter resultados positivos nos ensaios bioquímicos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos a partir das análises morfológicas, do sequenciamento Sanger do gene 16S rRNA e da caracterização metataxonômica evidenciam a diversidade metabólica do consórcio microbiano A5. A morfologia bacteriana observada junto a molecular, confirmou a predominância de gêneros classicamente associados à degradação de hidrocarbonetos, como *Pseudomonas spp.* e *Achromobacter spp.*, reconhecidos por sua atuação em ambientes contaminados.

Os ensaios de biodegradação reforçam essa adaptação ambiental. O teste com DCPIP demonstrou atividade redutora consistente do consórcio em diferentes tipos de óleo diesel, indicando metabolismo ativo sobre os hidrocarbonetos, embora sem distinção significativa entre as fontes de carbono. A análise por CG-MS permitiu uma avaliação mais específica e quantitativa da degradação dos *n*-alcanos, evidenciando taxas de remoção significativas, com destaque para o diesel S10 ($\geq 98\%$), enquanto o diesel marítimo apresentou taxas menores, possivelmente em função de sua maior quantidade de enxofre e teor de compostos aromáticos.

Além disso, o consórcio apresentou produção de biossurfactantes e/ou bioemulsificantes, evidenciado pelo teste de colapso de gota e confirmado pelo tensiômetro. Os ensaios bioquímicos indicaram de forma qualitativa compostos dos surfactantes. A ausência de coloração em testes específicos, como *Ninhidrina*, sugere que os metabólitos produzidos não pertencem à classe de lipopeptídeos ou que a concentração presente não foi suficiente para detecção. Ainda assim, a diversidade metabólica observada, associada à presença de lipídios nos ensaios de azul de bromotimol e saponificação, indica a produção de outros tipos de tensoativos.

A estratégia deste trabalho foi direcionada prioritariamente para bactérias, devido ao seu crescimento rápido em condições laboratoriais de onde este estudo foi realizado. Em virtude do prazo de execução, o isolamento de fungos não foi realizado, mas sua caracterização deve ser considerada em estudos futuros.

Em síntese, todos os resultados adquiridos demonstraram a eficiência biotecnológico do consórcio A5 para futuras aplicações em biorremediação de hidrocarbonetos.

6 CRONOGRAMA

Tabela 4 - Planejamento e Cronograma de atividades

MESES	ATIVIDADES	Situação
Março a maio de 2024	Revisão bibliográfica	Realizado
Junho a agosto de 2024	Reativação do consórcio	Realizado
Setembro a novembro de 2024	Avaliação da degradação do óleo diesel em diferentes tipos de óleo	Realizado
Dezembro de 2024 a fevereiro de 2025	Avaliação de tensoativos Purificação parcial de tensoativos	Realizado
Março a abril de 2025	Avaliação da degradação de n-alcenos em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	Realizado
maio a Junho de 2025	Avaliação morfológica das linhagens constituintes do consórcio. Extração do DNA genômico das linhagens isoladas	Realizado
Julho a Setembro de 2025	Avaliar a taxonomia do consórcio PCRs para identificação molecular das linhagens + sequenciamento	Realizado
Outubro a Dezembro de 2025	Avaliação dos gêneros do consórcio Construção da árvore filogenética	Realizado
Janeiro a fevereiro de 2026	Escrita da Dissertação Escrita do Artigo Científico	Realizado

Fonte: O autor (2024).

REFERÊNCIAS

ADEDEJI, Jeremiah A.; TETTEH, E.K; AMANKWA, M Opoku; SACKKEY, Dennis Asante; FRIMPONG, Samuel Ofori; ARMAH, Edward Kwaku; RATHILAL, Sudesh; MOHAMMADI, Amir H.; CHETTY, Maggie. Microbial bioremediation and biodegradation of petroleum products—A mini review. **Applied Sciences**, [S. l.], v. 12, n. 23, p. 12212, 2022. Available at: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/23/12212>. Access at: 05 jan. 2025.

AYED, Hanen Ben *et al.* Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 99, p. 8-14, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.009>. Access at: 05 jan. 2025.

AYANGBENRO, A. S.; OKEDEJI, A.O.; SHOFOLA, T.C; BALOGUN, S.A. Screening of hydrocarbonoclastic bacteria using redox indicator 2, 6-dichlorophenol indophenol. **Global nest journal**, [S. l.], vol 17, n. 3, pp 565-573, 2015. Available at: https://journal.gnest.org/sites/default/files/Submissions/gnest_01514/gnest_01514_published.pdf. Access at: 08 jan. 2025.

ANP. **Dados Estatísticos** – Atualizado 2024. Ministério de Minas e Energia. Conteúdo da Internet. Disponível em: https://www.gov.br/anp/pt-br/canais_atendimento/imprensa/noticias-comunicados/anp-cria-grupo-de-trabalho-para-descontinuidade-do-diesel-s500-e-do-s1800-de-uso-nao-rodoviario. Acesso em: 7 jan. 2025.

ARAÚJO, Wydemberg José de. **Obtenção de consórcios microbianos produtores de biossurfactantes e biodegradadores de hidrocarboneto recalcitrantes**. 2021. 87f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/32910>. Acesso em: 07 jan. 2025.

APARICIO, Juan Daniel *et al.* The current approach to soil remediation: a review of physicochemical and biological technologies, and the potential of their strategic combination. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 107141, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.jece.2022.107141. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343722000148>. Access at: 08 jan. 2025.

BANYA, Andriy *et al.*. Use of biosurfactants, microorganism-destructors, and plants for eco-friendly bioremediation technologies on oil-contaminated soils **BioTechnologia**. V.106(4), pg.411-420, 2025. Available at: <https://doi.org/10.5114/bta/209980>. Access at: 08 jan. 2025.

BULCÃO, Thayse Lopes Melgaço; CARDOSO, Célia Karina Maia; MOREIRA, Ícaro Thiago Andrade; LOBATO, Ana Katherine de Carvalho Lima. Mapeamento de tecnologias utilizando biossurfactantes para remediação de solos contaminados. In: **Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo**. [S. l.], 2021. ISSN: 2446-

8339. Disponível em:

https://prh36.ufba.br/sites/prh36.ufba.br/files/trabalho_ev147_md1_sa9_id414_28042021144535.pdf. Acesso em: 19 nov. 2024.

CASTRO, Jenielly de Noronha Ferreira de. **Potencial biotecnológico de bactérias isoladas a partir de consórcios provenientes de água de produção em reservatórios de petróleo no Brasil**. 2021. 132f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/46709>. Acesso em: 15 dez. 2024.

CRUZ, Bernardo Coelho. *et al.* Variações operacionais na coloração de Gram: implicações para o ensino e a rotina laboratorial. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. Ano. 11, Ed. 01, Vol. 01, pp. 95-116. Janeiro de 2026. ISSN: 2448-0959. DOI: 10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/coloracao-de-gram. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/coloracao-de-gram>. Acesso em: 20 jan. 2026.

D'ALMEIDA, Alan Portal; ALBUQUERQUE, Tiago Lima de; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Recent advances in Emulsan production, purification, and application: Exploring bioemulsifiers unique potentials. **International Journal of Biological Macromolecules**. V.278(1), 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133672>. Access at: 05 jan. 2026.

DHOTE, M., KUMAR, A.; JUWARKAR, A. Petroleum Contaminated Oil Sludge Degradation by Defined Consortium: Influence of Biosurfactant Production.. **Proc. Natl. Acad. Sci., Índia, Sect B Biol. Sci.** 88, 517–523, aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0778-z>. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40011-016-0778-z>. Access at: 31 march 2025.

DURVAL, Italo José Batista. **Produção de biossurfactante por Bacillus Cereus UCP 1615 com potencial para aplicações biotecnológicas industriais**. 2021. 150 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia(Renorbio)) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2021. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/8772>. Acesso em: 10 out. 2024.

FACCIOLI, Yslla Emanuely da Silva *et al.* Biosurfactants: Chemical Properties, Ecofriendly Environmental Applications, and Uses in the Industrial Energy Sector. **Energies**, v. 17, n. 20, p. 5042, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/en17205042>. Available at: <https://www.mdpi.com/1996-1073/17/20/5042>, Access at: 31 march 2025.

FARIAS, Charles Bronzo B. *et al.* Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**. [S. l.] v. 51, p. 28-39, may 2021. DOI: 10.1016/j.ejbt.2021.02.002. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345821000063>. Access at: 11 out. 2024

GALIEVA, *et al.* Biosurfactants produced by the novel strain *Bacillus subtilis* H1 as an efficient tool to biocontrol fungal diseases of tomato and wheat. **E3S Web of Conferences** 392, 01012, 2023. DOI:

<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202339201012>. Available at: https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/abs/2023/29/e3sconf_rse-ii-2023_01012/e3sconf_rse-ii-2023_01012.html. Access at: 31 march 2025.

GRZĄDZIEL A. Marzec, GAŁĄZKA A. Sequencing of the Whole Genome of a Bacterium of the Genus *Achromobacter* Reveals Its Potential for Xenobiotics Biodegradation. **Agriculture**. 2023; 13(8):1519. Available at: <https://doi.org/10.3390/agriculture13081519>. Access at: 01 jan. 2026.

HONG Y-H. *et al.* Genome Sequencing Reveals the Potential of *Achromobacter* sp. HZ01 for Bioremediation. **Front. Microbiol.** 8:1507, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01507>. Access at: 01 jan. 2026.

Hosseini, S., Sharifi, R. & Habibi, A. Biorremediação eficiente de solo contaminado por petróleo bruto por um consórcio de degradadores de hidrocarbonetos produtores de biossurfactantes in situ. **Sci Rep.** v. 15, 2025. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-05035-8>. Access at: 25 jan. 2025.

HOŠKOVÁ, Miriam *et al.* Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. **Bioresource technology**, v. 130, p. 510-516, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.085>. Access at: 31 march 2025.

IPAAM. **Instituto de Proteção Ambiental do Amazonas**. Notícias. 2018. Disponível em: <http://ipaam.am.gov.br/ipaam-aplica-multa-de-r-25-milhoes-em-empresa-por-vazamento-de-oleo-no-mauazinho/>. Acesso em: 05 jan. 2025.

IPAAM. **Instituto de Proteção Ambiental do Amazonas**. Notícias. 2023. Disponível em: <https://www.ipaam.am.gov.br/ipaam-atende-ocorrencia-de-tombamento-de-carreta-que-transportava-combustivel-na-transamazonica/>. Acesso em: 05 jan. 2025.

ISLAM, M. Amirul; KARIM, Ahasanul; ETHIRAJ, Baranitharan; RAIHAN, Topu; KHAN, Md. Maksudur Rahman; KADIER, Abudukeremu Kadier; NADHARI, Saleh Al; AL-MASRI, Abeer A.; AMEEM, Fuad. Interspecies microbial interactions in bioelectrochemical system and biodegradation: A state of the art review. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 891, p. 164623, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.164623. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164623>. Access at: 05 jan. 2025.

ISOLA, Daniela *et al.* Isolation and screening of black fungi as degraders of volatile aromatic hydrocarbons. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5, p. 369-379, 2013. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11046-013-9635-2>. Access at: 05 jan. 2025.

JAIN, D.K; COLLINS-THOMPSON, D.L.; LEE,, H.; TREVORS, J.T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological**

Methods, [S. l.], v.13(4), p. 271-279, aug.1991. DOI: 10.1016/0167-7012(91)90064-W. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016770129190064W>. Access at: 15 dez. 2024.

JESUS, Flavio Luiz França de; MANGINI, Luiza Fernanda Kaefer Mangini. Hidrodessulfurização aplicada à indústria naval e desafios enfrentados por gestores de frotas marítimas. **Caderno Progressus**, [S. l.], 2(3), 50–66, 2022. Disponível em: <https://www.cadernosuninter.com/index.php/progressus/article/view/2127>. Acesso em: 07 jan. 2025.

KUMARI, S.; GAUTAM, K.; SETH, M. *et al.* Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil by bacterial consortium in soil amended with *Eisenia fetida* and rhamnolipid. **Environ Sci Pollut Res** 30, 82517–82531, july, 2023. ISSN 1614-7499. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28082-y>. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-023-28082-y>. Access at: 31 march 2025.

LI, Jing *et al.* Characterization of a new biosurfactant produced by an effective pyrene-degrading *Achromobacter* species strain AC15. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 152, p. 104959, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104959>. Access at: 19 jan 2026.

LIMA, E. de Q.; GUERREIRO, H. de M.; SANTOS, E. P.; PEREIRA, A. de L.; OLIVEIRA, E. P. de; LASMAR, D. J. Riscos socioeconômicos gerados pela adição de corante violeta ao óleo diesel marítimo na região norte do Brasil. **Observatório de la economía latinoamericana**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. e8140, 2024. DOI: 10.55905/oelv22n12-079. Disponível em: <https://ojs.observatoriolatinoamericano.com/ojs/index.php/olel/article/view/8140>. Acesso em: 7 jan. 2025.

MARIANO, Adriano Pinto; BONOTTO, Daniel Marcos; ANGELIS, Dejanira de Franceschi de; PIROLO, Maria Paula Santos; CONTIERO, Jonas. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 39, p. 133-142, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100028>. Access at: 08 jan. 2025.

MARINHO, Patrícia Suzanne da Silva; SILVA, Renata Raianny da; LUNA, Juliana Moura de. Microbial biosurfactants and environmental applications: a narrative review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. e103111234123, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i12.34123. Available at: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/34123>. Access at: 10 out. 2024.

MEDIĆ, Ana *et al.* Efficient biodegradation of petroleum n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by polyextremophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain with multidegradative capacity. **RSC advances**, v. 10, n. 24, p. 14060-14070, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1039/C9RA10371F>. Access at: 10 out. 2025.

MOHAMMED, S.A. *et al.* Degradation of crude oil and the pure hydrocarbon fractions by indigenous soil microorganisms. **Biologia**, 78, 3637–3651, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01513-4>. Access at: 10 out. 2025.

NAGTODE, Vaishnavi S. *et al.* Green surfactants (biosurfactants): a petroleum-free substitute for Sustainability— Comparison, applications, market, and future prospects. **ACS omega**, v. 8, n. 13, p. 11674-11699, abr. 2023. DOI: 10.1021/acsomega.3c00591. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10077441/>. Access at: 12 out. 2024.

NAYAK, Jagdeep Kumar; GAUTAM, Rahul; GHOSH, Uttam Kumar. Bioremediation potential of bacterial consortium on different wastewaters for electricity and biomass feedstock generation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 11295-11308, 2024. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/S13399-022-02992-2>. Access at: 05 jan. 2025.

ONG, Shufen Angeline; WU, Jin Chuan. A simple method for rapid screening of biosurfactant-producing strains using bromothymol blue alone. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 16 (2018), p. 121–125, 2018. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818118302536>. Access at: 10 jan. 2025.

PANDOLFO, E. *et al.* Análises metagenômicas de um consórcio para a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. **AMB Expr.** v.14, 105, 2024. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13568-024-01764-7>. Access at: 06 jan. 2026.

PATOWARY, Kaustuvmani; KALITA, Mohan Chandra; DEKA, Suresh. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) employing biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* KS3. **Indian Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 14, pp. 208-215, april 2015. Available at: [https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/31810/1/IJBT%2014\(2\)%20208-215.pdf](https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/31810/1/IJBT%2014(2)%20208-215.pdf). Access at: 06 jan. 2025.

PATOWARY, Rupshikha; PATOWARY, Kaustuvmani; KALITA, Mohan Chandra; DEKA, Suresh. Utilization of Paneer Whey Waste for Cost-Effective Production of Rhamnolipid Biosurfactant. **Appl Biochem Biotechnol**, [S. l.], n. 180, pp. 383–399, may 2016. DOI: 10.1007/s12010-016-2105-9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27142272/>. Access at: 06 jan. 2025.

PEIXOTO, Camila Gisele Damasceno. **Aplicação da destilação simulada por cromatografia gasosa e da termogravimetria para a avaliação da influência da redução do teor de enxofre sobre as propriedades físico-químicas do óleo diesel**. 2014. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Petróleo) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/19621>. Acesso em: 02 out. 2024.

PETROBRAS. **Notícias**. 2024. Conteúdo da Internet. Disponível em: <https://petrobras.com.br/quem-somos/oleo-diesel>. Acesso em: 01 out. 2024.

PETROBRAS. **Relatório Anual e Form 20-F**. 2023. Conteúdo da Internet. Disponível em: <https://petrobras.com.br/documents/d/f3a44542-113e-11ee-be56-0242ac120002/form-20f-2023-2>. Acesso em: 02 out. 2024.

PIROG, T.; SOFILKANYCH, A.; KONON, A.; SHEVCHUK, T.; IVANOV, S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food and Bioproducts Processing*, v.91, n.2, p.149–157, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.001>. Access at: 08 jan. 2025.

PHULPOTO, I. A.; YU, Z.; HU, B.; WANG, Y.; NDAYISENGA, F.; LI, J.; LIANG, H.; QAZI, M. A. Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and it's potential for oil contaminated soil remediation. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–12, 2020. Available at: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-020-01402-4>. Access at: 19 nov. 2024.

RODRIGUES, Lígia R. *et al.* Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 49, 1, pag. 79-86, 2006. ISSN 0927-7765. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.03.003>. Access at: 11 out. 2025.

SAFDARI, Mohammad-Saeed; KARIMINIA Hamid-Reza; RAHMATI, Mahmood Rahmati; FAZLOLLAHI, Farhad; POLASKO, Alexandra; MAHENDRA, Shaily Mahendra; WILDING, W. Vincent; FLETCHER, Thomas H. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 342, p. 270-278, jan. 2018. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.08.044. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389417306362?via%3Di> hub. Access at: 05 jan. 2025.

SALEK, Karina; EUSTON, Stephen R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation, **Process Biochemistry**, v. 85, pg 143-155, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.027>. Access at: 05 jan. 2026.

SANTOS, Cerqueira dos; TORQUATO, S.Araújo; SANTOS, C., de Alexandria *et al.* Production and characterization of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* isolated in the Amazon region, and potential antiviral, antitumor, and antimicrobial activity. **Scientific Reports** 14 , 4629, 12 de march, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54828-w>. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-54828-w>. Access at: 20 fev. 2025.

SANTOS, Emília Mendes da Silva. **Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo**. 106 f. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco. Recife, 2019.

Disponível em: <http://tede2.unicap.br:8080/handle/tede/1250>. Acesso em: 10 out. 2024.

SANTOS, Jefferson Ferreira dos. **Sinergismo entre cepas de um consórcio bacteriano degradador de diesel isolado do Rio Negro**. 2021. 197 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2021. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/8599>. Acesso em: 15 ag. 2024.

SHOKRANIAN, S. *et al.* Isolation, characterization, and bioremediation potential of oil-degrading bacteria from contaminated soils in Shiraz and Bandar Abbas, Iran. **Sci Rep**, v. 15, 42101, 2025. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-26242-3>. Access at: 11 out. 2025.

SILVA, Thiago Emanuel Pereira da; CARVALHO, David Oliveira de; SILVA, Michellhe Juliana Pereira da; SANTOS, Nathalie Elizabeth Silva dos; COSTA, Pedro Paulo dos Reis. Enxofre: um poluente em potencial na composição do óleo diesel brasileiro. **IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**, Salvador/BA – 25 a 28/11/2013, 2013. Disponível em: <https://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2013/XI-081.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2024.

USMAN, Shehu *et al.* Anthracene degradation by *Achromobacter xylosoxidans* strain BUK_BTEG6 isolated from petrochemical contaminated soil. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 8, p. 100418, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2023.100418>. Access at: 20 dec. 2025.

VARJANI, Sunita J.; UPASANI, Vivek N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresource Technology*, v. 2021, p. 510-516, dec.2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.080>. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852416313475?via%3Di> hub. Access at: 27 março 2025.

VERMA, Chandrabhan et al. Green surfactants for corrosion control: Design, performance and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 311, p. 102822, jan. 2023. DOI: 10.1016/j.cis.2022.102822. Available at: <https://khazna.ku.ac.ae/en/publications/green-surfactants-for-corrosion-control-design-performance-and-ap>. Access at: 09 out. 2024.

VICENTE, Bianca Jesus; GASPARIN, Fabiana Guillen Moreira. Biossurfactantes: Moléculas Versáteis Para Fins Biotecnológicos. **Atena Editora**, São Paulo, out. 2024. ISBN 978-65-258. DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.6852421105>. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/post/biossurfactantes-moleculas-versateis-para-fins-biotecnologicos>. Acesso em: 26 março 2025.

VUČUROVIĆ, Damjan et al. Biotechnological utilization of agro-industrial residues and by-products—sustainable production of biosurfactants. **Foods**, v. 13, n. 5, p.

711, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13050711>. Available at: <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/5/711>. Access at: 31 march 2025.

WANG, Tengfei et al. Application of surfactants in papermaking industry and future development trend of green surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 105, n. 5, p. 1-16, sept. 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11602-6. Available at: https://www.researchgate.net/publication/354829877_Application_of_surfactants_in_papermaking_industry_and_future_development_trend_of_green_surfactants. Access at: 11 out. 2024.

WANG, Victor Bochuan; CHUA, Canção-Lin; CAI, Zhao; SIVAKUMAR, Krishnakumar; ZHANG, Qichun; KJELLEBERG, Staffan; CAO, Bin; LOO, Diga Chye Joachim; YANG, Liang. A stable synergistic microbial consortium for simultaneous azo dye removal and bioelectricity generation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v.155, pp. 71 – 76, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.078. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852413019184>. Access at: 05 jan. 2025.

YUSNE, N. I. L.; RAZAK, Wan Abdul. Ability of *Pseudomonas* sp. and *Aspergillus* sp. on the Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons Contaminated Water. **A Review. Bioresources and Environment**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 76–89, 2023. DOI: 10.24191/bioenv.v1i3.46. Available at: <https://bioenvuitm.com/index.php/en/article/view/46>. Access at: 11 out. 2024.

ZAMAN, S.A.U. et al. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading bacteria from oil polluted soil near Nacharam, Hyderabad, India. **Sci Rep**, v.15, 17219, 2025. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-01081-4>. Access at: 11 out. 2025.

ZAMAN, S.A.U. et al. Whole genome of petroleum hydrocarbon degrading *Rhodococcus indonesiensis* isolated from Nacharam, Hyderabad, India. **Sci Rep**, 16, 165, 2026. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-28934-2>. Access at: 04 jan. 2026.

APÊNDICES

APÊNDICE I. Dados obtidos pela metatoxonomia com marcador do gene 16S rRNA

Qseqid	sseqid	pident	length	superkingdom	phylum	class	species	Cluster_ID	Num_Sequências
03b858f5-bd74-461f-97ac-2bc524ac45b8_Cluster518	NR_042634.1	97,476	1347	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia arboris</i>	518	12
04320221-6f1e-456a-88e2-6c2ef0f23234_Cluster740	NR_114471.1	96,659	1317	Bacteria	Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	740	15
06e354f3-0c30-4ab1-bb1a-2dbc260e0aaa_Cluster61	NR_117615.1	92,852	1455	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter animicus</i>	61	53
0843b1ae-4157-4082-be72-c81bd1ded7bf_Cluster586	NR_117615.1	93,755	1345	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter animicus</i>	586	26
09846ec8-ab08-45e5-8087-0ec01051357d_Cluster230	NR_113733.1	97,316	1416	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	230	12
0b2f9aef-8919-4270-bdfe-21c791dbace2_Cluster681	NR_113733.1	95,95	1320	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	681	26
0c930c74-a194-46ca-b3e6-37dab4a29195_Cluster200	NR_027537.1	93,918	1447	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	200	23
0d2a84bd-d40c-4b3f-9b5e-b3591c7400c4_Cluster168	NR_113733.1	95,543	1436	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	168	287
0e669e23-33e0-42ab-8cd3-8c63a33d1c17_Cluster1107	NR_118872.1	96,725	1191	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	1107	17
127c18a6-3584-4cc0-81be-71234c2092a0_Cluster561	NR_113733.1	96,562	1338	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	561	19
128b742f-ab7a-419a-9626-b8658683c6a5_Cluster152	NR_113733.1	98,831	1369	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	152	24
13633ae6-d943-4d5b-ac03-fced56bddfa2_Cluster2946	NR_118057.1	95,018	823	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	2946	23
174522ba-716f-4914-ad13-a538b39dd63b_Cluster24	NR_118403.1	98,625	873	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	24	44

18c32077-0799-45b5-a7cc-1e0a81df2cf0_Cluster4055	NR_1176 78.1	97,1 81	674	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4055	12
19d817f7-bea4-4047-a755-29409d6fca0c_Cluster73	NR_0426 36.1	95,4 51	147 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	73	21
1a3e3171-0d3a-4fcf-8704-e6f5849c8657_Cluster42	NR_1137 33.1	97,0 55	142 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	42	119
1b73e39b-120c-4a9c-825b-11d79a2f8824_Cluster63	NR_1137 33.1	99,1 1	146 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	63	1456
1d4f3ea4-2ccc-40b9-8cc1-aff0d3cd94b1_Cluster327	NR_1144 71.1	98,4 98	139 8	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	327	23
1dff548a-41cb-4060-ba1d-b64ccc941a00_Cluster252	NR_0417 69.1	89,9 3	143 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella avium</i>	252	71
1ee4fc68-9d75-48f0-88f7-54b0a30ffb05_Cluster4375	NR_0449 25.1	96,2 73	644	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	4375	11
1f270ac4-eb9a-47d2-b68a-97ca3b32a0a1_Cluster132	NR_1144 71.1	94,2 7	146 6	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	132	12
22b915c9-fca8-4eab-ae9d-a2343e8bcf95_Cluster634	NR_1189 85.1	90,7 53	134 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Robbsia andropogonis</i>	634	14
231d4168-6263-4ef4-af9b-8553fc222d3a_Cluster259	NR_1144 71.1	96,0 17	143 1	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	259	15
23d22694-ae7c-4d55-90cf-9f04cd0707af_Cluster110	NR_1137 33.1	98,6 64	142 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	110	15
24739ce9-b51a-4bdf-afb1-7e2415a84c90_Cluster212	NR_1144 91.1	91,0 7	146 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cepacia ATCC 25416</i>	212	13
24891c6f-986f-4a12-a8ab-bd56a3ed8308_Cluster804	NR_0426 32.1	95,6 39	130 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia latens</i>	804	14
24f54a58-0546-4134-b8fb-2e24a300b030_Cluster47	NR_1144 71.1	98,9 87	148 1	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47	1075
25e4b126-cc05-4044-8b43-84de0ec9c9eb_Cluster93	NR_1164 82.1	90,6 62	143 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Castellaniella ginsengisoli</i>	93	12
25e502e5-4ec7-4060-8ab8-d12f440ece58_Cluster796	NR_1144 71.1	97,3 12	126 5	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	796	15

26952179-95a3-4452-8158-202d174ca7d0_Cluster210	NR_1735 36.1	92,9 17	142 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Caenibaculum baiyandianus</i>	210	17
294e3e4c-88d9-41a8-87e4-069a20cbdea2_Cluster131	NR_0293 58.1	93,8 48	146 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia multivorans</i>	131	137
29a33e53-c603-4c53-9e30-8403c28059cb_Cluster659	NR_0417 20.1	93,4 57	134 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	659	11
2bae43e7-111e-46fd-b0a0-198083c6a98d_Cluster29	NR_0426 36.1	99,1 61	143 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	29	2826
2baff978-192f-4be0-9909-9feca64259ac_Cluster153	NR_1137 33.1	94,1 62	145 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	153	14
2c17650b-2814-4815-b5d4-44b332e0184f_Cluster17	NR_1184 03.1	98,6 21	943	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	17	2325
2d31bf47-bfc2-4f9a-98a7-308c101fc4a4_Cluster166	NR_1136 45.1	97,1 69	144 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cepacia</i>	166	31
2dee995e-6658-497b-aa3a-d838f79422ad_Cluster419	NR_1357 25.1	89,8 34	138 7	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Ectopseudomonas guguanensis</i>	419	21
2f4abb14-07c2-4ab8-91f0-a4b85cb1bebe_Cluster38	NR_0250 13.1	92,7 44	100 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	38	25
32f384aa-af8f-4e7d-8e4c-a3fd7d5fbb26_Cluster286	NR_1135 99.1	96,6 83	141 7	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	286	26
3322f319-a2e4-4543-83ec-a8272ccd8e9d_Cluster45	NR_1788 50.1	99,1 22	148 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	45	5328
33dd2045-1afe-4add-8666-3ea1f6a2f435_Cluster105	NR_1788 50.1	95,9 75	146 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	105	17
345c80db-4aad-4b37-aced-bebc0b16fd92_Cluster137	NR_1527 05.1	93,7 76	146 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Paraburkholderia pallidirosea</i>	137	17
376bfe24-f930-4e0f-b0c6-28dff4fcb0a4_Cluster68	NR_0417 20.1	95,4 05	148 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	68	37
37eef0e6-2100-4652-a11c-cf51be621334_Cluster403	NR_1742 30.1	95,2 8	137 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia aenigmatica</i>	403	54
38ca2beb-1b45-4bbb-853c-22cf130f07c2_Cluster154	NR_1176 15.1	94,3 6	145 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter animicus</i>	154	34

39162d83-ad01-49e4-968b-d2aaa80d3645_Cluster1232	NR_1176 15.1	92,5 89	117 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter animicus</i>	1232	11
3a1d5a75-0f4d-4999-9960-3785115cfb26_Cluster34	NR_1184 03.1	97,3 33	75	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	34	15
3a4a2b22-d8e9-4096-973e-8e1c335dc6d6_Cluster262	NR_0275 37.1	91,9 94	139 9	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	262	19
3aaf2e3e-6a6b-4b70-adac-ef71ff473009_Cluster198	NR_1136 45.1	93,0 26	143 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cepacia</i>	198	58
3cdb2539-8daa-47a3-9436-e33cd4deb915_Cluster195	NR_1715 25.1	95,4 95	144 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Trinickia fusca</i>	195	154
4082d02a-3f07-4925-9771-fa3e3a70ed2d_Cluster164	NR_1137 33.1	95,5 48	146 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	164	19
41c24eec-eb3c-4362-95d1-50ef27729dd8_Cluster599	NR_0417 20.1	95,5 36	134 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	599	34
4228fce8-1e83-4ed3-a4f4-5748b17677cd_Cluster124	NR_1049 60.1	90,4 44	146 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Robbsia andropogonis</i>	124	169
4259a349-2aa9-49ea-8eb0-822b7044f678_Cluster55	NR_0420 21.1	94,4 48	147 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter denitrificans</i>	55	1043
4650ca6d-cfc4-427d-9192-ad10f62d087f_Cluster202	NR_1144 71.1	92,7 34	144 5	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	202	52
466e11b0-4806-4aee-afa2-8b41ff26e45c_Cluster179	NR_1788 50.1	96,1 07	146 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	179	31
49ce5480-93a7-4fa5-b6db-5459db5575b0_Cluster11	NR_1137 33.1	97,5 73	119 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	11	4407
4a4766c6-493c-4269-9908-e74a609f8a23_Cluster224	NR_1144 71.1	94,5 4	144 7	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	224	64
4ade851b-75f3-4d25-a53d-ba9cfca667de_Cluster174	NR_1185 87.2	88,3 9	144 7	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Rehaibacterium terrae</i>	174	38
4c401e90-d985-424c-95e9-b2b50822d68c_Cluster57	NR_1144 71.1	98,5 12	147 8	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57	1326
4dfec387-1928-406e-9119-5c9836f6e41a_Cluster107	NR_1137 33.1	98,0 08	145 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	107	14

4f5f4455-5f19-4562-8244-3b610660ee21_Cluster150	NR_0426 32.1	97,4 54	145 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia latens</i>	150	13
4fa5f9a0-a576-46bb-9b13-64b968e13710_Cluster3089	NR_0426 36.1	99,5 84	721	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	3089	14
500c1245-672d-4284-98cf-3c2a516e36f3_Cluster108	NR_1144 71.1	96,7 24	146 5	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	108	92
52995dcd-63cb-4ec9-b42c-dc1236b2d100_Cluster1024	NR_1144 71.1	93,3 87	124 0	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1024	17
531bf441-da14-4f54-ac73-ae565319aeab_Cluster216	NR_0426 32.1	95,9 89	144 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia latens</i>	216	16
534e523e-5230-4d02-ad67-77080a66dfea_Cluster52	NR_1735 36.1	92,4 57	144 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Caenibaculum baiyandianus</i>	52	46
5450ed91-e6c2-4202-b65f-aa1c061a57b2_Cluster142	NR_0426 36.1	95,3 8	147 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	142	12
54a24fb7-82a6-49f9-8cc3-e6e7485c479d_Cluster92	NR_1144 71.1	92,9 68	147 9	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92	33
54dfe093-5749-4c95-aeb4-175457db2360_Cluster326	NR_0442 09.1	93,9 23	133 3	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas panipatensis</i>	326	47
5713199a-4e6d-4fee-a3b9-8a33334fd15c_Cluster41	NR_1164 82.1	89,8 76	145 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Castellaniella ginsengisoli</i>	41	2406
57ec2c47-1eb7-4e1b-b891-83bc7f6a5276_Cluster177	NR_1144 71.1	94,3 57	145 3	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	177	21
5c427b68-e368-4e72-9004-55d22356ae30_Cluster90	NR_0275 37.1	95,0 2	146 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	90	235
5ce3c654-5a03-4a44-a198-a6ca91210bbc_Cluster70	NR_0420 21.1	96,7 05	148 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter denitrificans</i>	70	20
5e470052-3b1a-448b-ae92-1981c4b788a3_Cluster180	NR_1137 32.1	95,1 03	145 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter denitrificans</i>	180	29
5fc99709-efe8-4a9e-ae04-6f82b9bce0c8_Cluster94	NR_0437 16.1	90,3 5	143 0	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas syringae</i>	94	35
61979381-cf25-4080-8105-4e685a3bf672_Cluster417	NR_0275 37.1	94,4 32	138 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	417	45

626adb83-53f6-4cf5-a189-bc83509bd9cf_Cluster2767	NR_0426 36.1	99,2 29	778	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	2767	11
6305fee0-b271-4618-b578-ff22c004466e_Cluster103	NR_0420 21.1	97,0 57	146 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter denitrificans</i>	103	588
635a2f6c-b351-40b6-8901-c3b3127b2887_Cluster172	NR_1177 08.1	96,1 22	144 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter anxifer</i>	172	66
63a13f37-7b97-41a8-9ef2-1a947fbd7287_Cluster143	NR_1137 33.1	94,5 18	144 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	143	48
659cb12f-3dda-46c8-aa44-928c4f1b9168_Cluster488	NR_0275 37.1	92,6 55	137 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	488	22
66478dfc-08b5-448a-99a5-3000c301d102_Cluster303	NR_1520 13.1	93,8 58	138 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter agilis</i>	303	34
664869d9-c301-415f-8a7f-135722df4e95_Cluster89	NR_0417 20.1	94,3 53	145 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	89	51
681425f0-0816-4538-b06f-ffcad073c790_Cluster140	NR_1136 28.1	90,4 18	146 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	140	26
69db7210-4371-48db-92ef-4adb8a2ba95a_Cluster127	NR_1788 50.1	96,2 84	145 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	127	63
6a696f99-66df-4de6-a153-73b5b5457482_Cluster123	NR_1137 33.1	97,5 64	143 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	123	30
6aab1517-9fbf-41df-90ee-43b8b4631b32_Cluster79	NR_1028 90.1	97,0 03	146 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia lata</i>	79	101
6b46839d-350e-48fa-944e-849d224555ff_Cluster104	NR_1177 08.1	90,6 44	147 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter anxifer</i>	104	18
6c6242c2-88b0-4bc4-8a37-92169d982b25_Cluster134	NR_1137 33.1	96,6 04	144 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	134	68
6cae8a07-2313-4604-b378-ef131bdd5096_Cluster314	NR_0449 25.1	97,7 26	140 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	314	19
6cb97747-bedc-4125-abe2-52dbc867ee57_Cluster1511	NR_1137 33.1	98,4 48	103 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1511	11
6d326c89-f308-464e-834e-bcc7088f6f14_Cluster33	NR_0275 37.1	97,7 52	102 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	33	834

6d9cdaa3-8610-4697-b082-a39f3d3deee5_Cluster49	NR_1028 90.1	91,2 06	150 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia lata</i>	49	14
6e552163-bdfc-4cf9-885f-6b7fa25546e2_Cluster191	NR_1049 78.1	96,4 73	144 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia contaminans</i>	191	12
6eba620e-aebd-4c15-8060-0366cd47f9c5_Cluster157	NR_1136 45.1	96,5 56	145 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cepacia</i>	157	15
7091d219-34e7-4a42-8226-5872164babdd_Cluster269	NR_1788 50.1	98,6 87	137 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	269	13
714901a7-4d14-4df4-9a53-242279e61dd6_Cluster43	NR_1788 50.1	97,9 17	148 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	43	187
7607310f-bf46-4e78-b4bb-8c67c05542c7_Cluster83	NR_1144 71.1	93,5 24	146 7	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83	41
7628bc95-b163-4eed-98f0-299cc2e8016c_Cluster133	NR_1164 82.1	89,8 88	143 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Castellaniella ginsengisoli</i>	133	18
7842bb81-2f29-40d6-b02f-c28e10b8e9b7_Cluster368	NR_1492 40.1	88,5 8	140 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Mycoavidus cysteinexigens</i>	368	15
790b8f28-e238-4835-9e40-45a6b2dd3e24_Cluster213	NR_1137 33.1	97,7 48	142 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	213	107
7beb1e8c-57f2-4d61-a174-cb3c0ab3a9b9_Cluster86	NR_0426 36.1	92,5 35	148 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	86	57
7c5d64b5-e4b3-4349-adfd-1604138040aa_Cluster416	NR_1137 33.1	95,0 47	137 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	416	11
7c849465-a9b0-4cbe-b4a6-d0779bfb8163_Cluster144	NR_1788 50.1	96,2 94	145 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	144	18
7ed97e7f-59d7-4f97-91cf-b0aeba405994_Cluster380	NR_0417 69.1	91,3 04	138 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella avium</i>	380	11
7f01f357-ee39-4c82-92d2-3aa0a29783a5_Cluster607	NR_1715 25.1	94,4 36	134 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Trinickia fusca</i>	607	26
803f171a-186f-4ec6-9a82-7a7f2e1a5d14_Cluster8	NR_1137 33.1	98,5 43	130 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	8	1972
80a1e065-a400-492e-b356-975911427ec5_Cluster88	NR_1735 36.1	93,4 84	145 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Caenibaculum baiyandianus</i>	88	30

80de072f-710c-4142-99d3-b46258738a4d_Cluster170	NR_1797 71.1	87,3 8	145 8	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Metapseudomonas lalkuanensis</i>	170	16
80e5277e-dabb-4bea-85b7-2ddded99d970_Cluster220	NR_1144 91.1	94,8 2	144 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cepacia ATCC 25416</i>	220	29
81d5bd54-9236-4778-ba12-8dda88b734b1_Cluster161	NR_1790 84.1	90,4 07	144 9	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas mangiferae</i>	161	28
836fec89-fcdd-4359-a999-8bd4c43c8f7c_Cluster225	NR_1137 33.1	93,9 25	143 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	225	23
8433dea9-acc1-4eea-a2a8-6f86dceea93f_Cluster4317	NR_1368 33.1	92,8 46	657	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Paraburkholderia metalliresistens</i>	4317	14
87b29936-7562-44d8-a43b-8d5505a43c97_Cluster80	NR_0417 20.1	97,0 67	146 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	80	464
8a4f8614-c6ad-49fd-9ed3-7fa5f684c9c7_Cluster64	NR_1137 33.1	98,6 99	146 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	64	283
8b10783b-8a00-4243-a814-4166c44b1464_Cluster559	NR_1357 25.1	92,0 18	135 3	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Ectopseudomonas guguanensis</i>	559	34
8c5df7cb-acdb-4946-809a-50b2b098617b_Cluster2997	NR_1135 99.1	95,7 06	815	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2997	14
8cfa1de1-975b-4926-939c-3ec67791fb4f_Cluster77	NR_1357 25.1	88,3 11	148 0	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Ectopseudomonas guguanensis</i>	77	39
8e10bc19-2e30-4c68-9f85-834662bb5bd9_Cluster493	NR_1137 33.1	99,9 23	130 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	493	17
9117b916-15ad-445a-acfd-c4a3b2cf0a30_Cluster533	NR_0426 34.1	97,0 39	135 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia arboris</i>	533	11
9136f9ab-439a-4af3-b7a6-ab0cbb1a1d5d_Cluster271	NR_0426 36.1	95,8 48	142 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	271	38
92f79985-0396-4c2c-99b4-51c77da6e6ed_Cluster67	NR_0417 20.1	96,4 65	147 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	67	461
93ad76a0-6c28-477b-acf3-e9178dec9c39_Cluster62	NR_1797 71.1	93,2 93	147 6	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Metapseudomonas lalkuanensis</i>	62	199
951f4865-fc49-412c-a1fb-8b97b2f1619b_Cluster246	NR_1137 33.1	97,5 44	142 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	246	97

95d33399-636a-4ca3-b99d-dc2afde165d8_Cluster432	NR_1492 40.1	90,6 11	137 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Mycoavidus cysteinexigens</i>	432	20
95ffe71a-b3bf-43a3-b7eb-d2d890adebe7_Cluster938	NR_1144 91.1	98,9 76	117 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cepacia ATCC 25416</i>	938	21
97c23bcb-bcd8-4d0e-aa9a-deee31f067f5_Cluster422	NR_1137 33.1	95,1 48	138 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	422	11
97e67218-2b24-4962-958a-8ee81a07a1f8_Cluster121	NR_1144 71.1	96,2 12	145 2	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	121	33
9845bfc3-8c76-47aa-b16e-bce9d73d5aa9_Cluster785	NR_1136 45.1	93,8 37	129 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cepacia</i>	785	13
9900c180-173b-47a4-8db6-6ca3e3b3c775_Cluster913	NR_1735 36.1	94,6 94	122 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Caenibaculum baiyandianus</i>	913	12
9bc196f0-dd2e-4dde-8eea-c75519a96a4f_Cluster36	NR_1188 72.1	98,2 72	926	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	36	47
9c21f503-7725-4f3f-b544-42c1ba415127_Cluster772	NR_1028 90.1	95,3 03	132 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia lata</i>	772	14
9d32985c-e1b0-4de6-b991-985966a2155c_Cluster39	NR_0742 91.1	94,9 01	141 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella petrii</i>	39	48
a0526fd4-5388-4121-8571-d2f6829bc4cf_Cluster122	NR_1137 33.1	92,2 29	146 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	122	21
a0606b3f-d3a3-48e7-acb4-ab6457593dd4_Cluster48	NR_1788 50.1	94,9 56	148 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	48	23
a153292a-240f-4da4-bf73-91161b6b43ec_Cluster743	NR_1656 95.1	94,6 25	132 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia alba</i>	743	23
a2ac0f65-7f87-499b-a804-571ac537d45e_Cluster146	NR_1176 78.1	92,1 64	139 1	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	146	24
a4dcf28e-570b-4772-bb8c-61bf03467a15_Cluster355	NR_0449 25.1	99,0 67	139 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	355	33
a7c35ea0-2900-4c3b-9839-8e19fcd4f871_Cluster400	NR_1144 71.1	96,6 21	139 1	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	400	17
a9a83eed-7a2d-4072-97ff-569fcc43ca33_Cluster50	NR_1028 90.1	95,8 89	148 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia lata</i>	50	102

aa9bf281-716a-4a56-8d3c-f1f2630838ee_Cluster238	NR_1144 71.1	97,0 22	144 4	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	238	12
acaed006-e405-4a87-8063-55ea0145bd7c_Cluster300	NR_1357 25.1	91,4	140 7	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Ectopseudomonas guguanensis</i>	300	18
b07da9ed-2c2c-4bd6-839d-da1a6e249a70_Cluster376	NR_1137 33.1	95,5 14	138 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	376	19
b09c740e-4742-4274-be31-c3305105a712_Cluster74	NR_1144 71.1	93,3 24	146 8	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74	23
b0fe0769-ff47-453c-8b46-b259676b8d70_Cluster31	NR_0293 58.1	94,3 45	145 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia multivorans</i>	31	1752
b11983fe-a71b-41fe-94d5-3a3ef7774ff0_Cluster242	NR_1788 50.1	94,4 37	143 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	242	48
b15902c9-8d9b-44c4-8c35-7abb46172ba9_Cluster189	NR_1137 33.1	99,4 87	136 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	189	72
b341a000-224b-46bd-b606-cb5f5b0bbe05_Cluster87	NR_1656 87.1	92,1 34	146 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Zwartia panacis</i>	87	107
b459f39d-898a-43f5-87b0-caf13a0225f6_Cluster111	NR_0426 36.1	98,5 64	146 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	111	34
b64d694c-6eef-4b5e-b62f-3e90ec241aa8_Cluster340	NR_1137 33.1	96,8 41	139 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	340	14
b6a5c3eb-ea68-4685-8840-1a9750591477_Cluster98	NR_0426 34.1	97,5 74	742	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia arboris</i>	98	21
b6dddc6-7215-45d4-893d-06fea34e8ee0_Cluster118	NR_1137 33.1	97,5 21	145 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	118	69
b6fd8454-98e9-49cd-92b0-16b3197ae17a_Cluster58	NR_1137 33.1	93,7 97	146 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	58	384
b79b1382-86de-41e0-956a-b121ef5c08e3_Cluster393	NR_1164 82.1	89,5 91	139 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Castellaniella ginsengisoli</i>	393	32
b7e9b9ba-4a92-480f-a046-afe5dda2661c_Cluster101	NR_0275 37.1	96,2 25	145 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	101	146
bb6c97f2-d5c2-482f-9a00-d06b207ea13b_Cluster109	NR_1028 90.1	95,6 22	146 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia lata</i>	109	30

bb9ffa3f-d021-4de2-b8f8-29ffec78b343_Cluster1231	NR_1788 50.1	95,8 3	117 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia paludis</i>	1231	11
bc6f682f-a92d-47c7-a81d-387bbaa22cc2_Cluster102	NR_0417 69.1	93,1 69	146 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella avium</i>	102	78
bd3f5008-0847-4d18-a3c0-b9a9c400589e_Cluster19	NR_1184 03.1	96,9 54	952	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	19	269
becfae10-36ab-4662-a6ad-2bb8535084d8_Cluster59	NR_1049 78.1	96,4 16	142 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia contaminans</i>	59	18
c18e8681-ffba-49b2-87c2-1dfa7938152a_Cluster227	NR_1137 33.1	97,5 56	143 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	227	14
c1e77193-0394-4d68-89aa-2480db95069e_Cluster479	NR_1049 78.1	94,9 74	135 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia contaminans</i>	479	12
c214f4eb-6755-49be-87db-1b8b8b687261_Cluster319	NR_0426 35.1	95,2 58	141 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia seminalis</i>	319	31
c2cc642a-439d-41e0-9a12-024fea1c6f84_Cluster91	NR_1144 71.1	95,4 92	146 4	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91	21
c4c56733-620f-4b30-90c5-a49d93d4b1bb_Cluster374	NR_0265 33.1	92,5 82	140 2	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	374	16
c4d37552-7b6b-4b38-ad7c-a35e04be280c_Cluster183	NR_0417 20.1	91,5 45	144 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	183	45
c5000a1d-6736-487d-8c14-71205e31491d_Cluster348	NR_1520 13.1	95,2 48	138 9	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter agilis</i>	348	28
c8caf3d7-8fd1-442c-90d4-d33b86bca1c4_Cluster1164	NR_1137 33.1	99,6 73	612	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1164	16
cadfb16c-d6a4-4dd1-b76d-9204f464d579_Cluster125	NR_1028 90.1	94,9 01	147 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia lata</i>	125	12
cb42710f-bd6f-4c11-b5f1-7e0835af03f3_Cluster357	NR_0426 34.1	95,6 9	139 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia arboris</i>	357	16
cc2079ac-1ded-4e9b-a35d-c956ae93e328_Cluster337	NR_1492 40.1	90,0 86	140 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Mycoavidus cysteinexigens</i>	337	12
cc78f955-9846-4640-b127-5ba6c9def5ce_Cluster35	NR_0417 20.1	95,3 72	142 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	35	2171

ce06aa4e-9ec4-4c9b-adcd-e38ebe48190a_Cluster30	NR_1144 71.1	99,1 64	107 7	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	963
d3174f47-94f8-4dc9-a071-103e0f9846f6_Cluster550	NR_1486 23.1	91,0 32	132 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Advenella alkanexedens</i>	550	18
d465e9f5-b6b2-4eef-994e-fed3ade7ce9d_Cluster305	NR_1144 71.1	95,8 39	141 8	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	305	18
d60dc74c-249b-44c3-9df8-5afbbae14e8_Cluster40	NR_0417 20.1	95,6 12	141 3	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	40	284
d6a9aea9-5bb5-484e-a800-0811285494f9_Cluster44	NR_1177 06.1	94,0 57	146 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter insuavis</i>	44	391
d88b3835-b4e9-49d7-9c25-64f375ea6f90_Cluster51	NR_1137 33.1	94,8 86	144 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	51	545
da46fc38-b808-4249-be43-20d12ae80bbe_Cluster312	NR_1137 33.1	96,2 73	142 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	312	20
da4d1b4d-cfbf-48aa-bcc9-68274db18703_Cluster260	NR_0426 36.1	91,1 89	143 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia metallica</i>	260	42
db722e21-27a2-4b0d-8a7a-a807bfdee0bf_Cluster1306	NR_0426 34.1	97,9 65	113 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia arboris</i>	1306	21
db923f4a-84c8-4569-a9de-1a4daa577ecd_Cluster301	NR_1144 91.1	94,0 14	142 0	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia cepacia ATCC 25416</i>	301	14
e1495164-480d-4854-b9f6-a525733fb5e8_Cluster66	NR_1817 70.1	94,5 27	148 0	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Metapseudomonas boanensis</i>	66	88
e2a00e29-2cab-4444-9060-4bc96d88a21c_Cluster4016	NR_1456 02.1	95,4 34	679	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Caballeronia calidae</i>	4016	23
e405090e-8641-4aa9-a87c-3a125c4dfda4_Cluster71	NR_1177 06.1	96,4 72	147 4	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter insuavis</i>	71	39
e5ba4b6a-d010-4282-9c5c-ac42340d0e2e_Cluster135	NR_1177 07.1	95,2 67	145 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter aegrifaciens</i>	135	31
e5ea8444-e05a-41c2-8367-27da05e89e31_Cluster22	NR_0449 25.1	99,6 63	594	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	22	3074
e62170bd-adbe-4d4d-8740-fe23993661ab_Cluster46	NR_0417 69.1	92,9 27	142 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella avium</i>	46	75

e6f04b36-15a5-45db-8693-ccdebe99f350_Cluster408	NR_1137 33.1	97,8 31	133 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	408	20
e7264cd4-c954-48fb-a5cd-de07fa7a82e7_Cluster2325	NR_1137 33.1	99,0 31	826	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2325	19
e8d8a468-9609-4386-b78b-ac4bce352a27_Cluster120	NR_0742 91.1	92,7 3	145 8	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Bordetella petrii</i>	120	80
ea93578e-7e79-41da-b6f5-2a3903fd2718_Cluster72	NR_1144 71.1	97,6 11	146 5	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72	145
eb5c7739-7fb0-47bc-ac8d-155adc215d36_Cluster25	NR_1184 03.1	99,6 65	896	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	25	253
ec19e36f-a440-429b-8698-aa4d7f066fe7_Cluster32	NR_1184 03.1	98,1 34	911	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	32	12
ee70642e-f4f1-45de-b453-d2f3fe008f45_Cluster56	NR_0426 32.1	93,4 55	148 2	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia latens</i>	56	89
eecfd1f1-328b-4ca4-8fe2-3eae32ed16a0_Cluster119	NR_1177 06.1	94,0 29	145 7	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter insuavis</i>	119	19
efbaa077-95ca-4949-8377-723b452a6b4f_Cluster65	NR_1176 44.1	94,2 22	147 1	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter pulmonis</i>	65	30
f0c96bb9-df99-4c9c-933f-5da925ec295c_Cluster204	NR_1144 71.1	94,4 6	144 4	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	204	20
f2735422-0806-4722-9fe6-ce75f5ae9a67_Cluster1398	NR_1028 90.1	99,6 42	111 6	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Burkholderia lata</i>	1398	29
f3e0cbec-1b55-4d3b-a1ca-33dcf0da180c_Cluster23	NR_1184 03.1	99,2 1	886	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	23	388
f52b6ba6-ad47-4f4a-8e1a-492a3cb6bb53_Cluster251	NR_1735 36.1	90,0 35	142 5	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Caenibaculum baiyandianus</i>	251	16
f591cb5c-296c-4b27-8b53-cb1b83fbc82f_Cluster54	NR_1137 33.1	97,9 44	145 9	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	54	505
f9811d4b-8688-4ca8-b263-2996fd0be02b_Cluster675	NR_1144 71.1	96,3 1	132 8	Bacteria	Pseudomon adota	Gammaproteob acteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	675	11
fabf4a03-e61d-4d7a-8902-b231968c65a2_Cluster3495	NR_1137 32.1	96,7 21	732	Bacteria	Pseudomon adota	Betaproteobact eria	<i>Achromobacter denitrificans</i>	3495	21

faef6ae3-b449-4837-ad60-d14068002f10_Cluster37	NR_027537.1	98,129	855	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Bordetella hinzii</i> LMG 13501	37	507
fb5d4f56-6175-4b61-a9cf-cf139f9dfae1_Cluster445	NR_113733.1	99,325	1334	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	445	73
fc31e8d0-ce29-4888-a85a-5669acf27abf_Cluster60	NR_114471.1	96,219	1481	Bacteria	Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60	167
fd33861e-d13e-4292-a080-66494b163dfc_Cluster392	NR_113733.1	97,742	1373	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	392	13
ffdd0916-fad2-42d0-b80d-303d54e1a6c6_Cluster232	NR_113733.1	95,958	1435	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	232	20

APÊNDICE II. Dados obtidos pela metatoxonomia com marcador do gene ITS

Query_ID	Cluster	Subject_Accession	Identity	Bit_score	kingdom	phylum	class	genus	species	Num_Sequencias
1c7d1c92-d03b-4b73-a94c-da9c70ad344a	55	MH545918.1	99.486	1062	Fungi	Ascomycota	Pichiomyces	<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	868
5669e34f-81d2-4279-8e42-563eb8cd97a5	51	MH545918.1	98.587	998	Fungi	Ascomycota	Pichiomyces	<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	270
c6535f09-1b11-4342-b7af-fc456b0cb95c	52	MH545918.1	97.611	994	Fungi	Ascomycota	Pichiomyces	<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	222
6385f4ba-55f4-465f-b566-d132087aacab	53	MH545918.1	99.15	1059	Fungi	Ascomycota	Pichiomyces	<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	50
2614f09a-7a66-40ff-8fad-ecb7eee1ad88	33	NR_119462.1	81.048	544	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	<i>Collybiopsis</i>	<i>Collybiopsis pseudolodgeae</i>	32
9a82268b-b44f-4879-a1bf-4caae292c6c1	76	PP416843.1	95.512	885	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Talaromyces</i>	<i>Talaromyces ailsahockingiae</i>	23
621b7e28-bd00-4121-ad7c-52257ebd05a6	119	MT558921.1	98.462	913	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	19
7daa60be-776b-4b6f-86c2-3cc22bacb0ba	46	NR_185618.1	93.043	830	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	<i>Grammothele</i>	<i>Grammothele taiwanensis</i>	17
0274f6aa-a559-4ff9-841c-ff9db29a3b9c	88	MH545918.1	96.564	907	Fungi	Ascomycota	Pichiomyces	<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	13
960b71e0-9d1c-435c-8958-40dec37e32d	124	MH545918.1	98.263	900	Fungi	Ascomycota	Pichiomyces	<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	12
80eacc1d-6db4-4850-bb0b-d7b9f047dd8b	133	NR_161046.1	98.891	800	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	<i>Sistotrema</i>	<i>Sistotremastrum aculeocreptans</i>	12