



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAM DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

THAIS DOS SANTOS LEAL

**BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR UM CONSÓRCIO
BACTERIANO ISOLADO DO RIO NEGRO (MANAUS, AM) IMOBILIZADO**

MANAUS - AM

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAM DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

THAIS DOS SANTOS LEAL

BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR UM CONSÓRCIO
BACTERIANO ISOLADO DO RIO NEGRO (MANAUS, AM) IMOBILIZADO

Defesa de Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia - PPGBiotec da
Universidade Federal do Amazonas –
UFAM, como requisito para obtenção do
título de mestra em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Dr. EDMAR VAZ DE ANDRADE

MANAUS - AM
2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L435b Leal, Thais dos Santos
Biodegradação de óleo diesel por um consórcio bacteriano
isolado do Rio Negro (Manaus, AM) imobilizado / Thais dos Santos
Leal . 2023
81 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Consórcio microbiano. 2. Degradação de diesel. 3.
Biorremediação. 4. Xenobiótico. 5. Poluição. I. Andrade, Edmar Vaz
de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais grupos de hidrocarbonetos contidos no petróleo. Adaptado de MCGENITY, 2014; ZÍLIO e PINTO, 2002; ASHOORI et al., 2017 e KINGSTON, 2002.	4
Figura 2: Bacia do Solimões, província do Juruá e a área produtora do Pólo do Rio Urucu. Fonte: MILANI & ARAÚJO, 2003.	7
Figura 3: Mapeamento dos principais acidentes relatados no mundo entre 1970 e 2019. Fonte: STEVANATO, 2020.	9
Figura 4: Número de derramamentos médios (7-700 toneladas) e grandes (> 700 toneladas) por década de 1970 a 2020. Fonte: ITOPI, 2020.	9
Figura 5: Número de acidentes ambientais no Brasil nos anos de 2017, 2018 e 2019. Fonte: IBAMA, 2019.	10
Figura 6: Decomposição microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia. Fonte: DIAZ, 2004; WETLER-TONINI, REZENDE, GRAVITOL, 2010.	19
Figura 7: Diferentes métodos de imobilização de microrganismos. Adaptado de PILKINGTON et al., 1998; IUPAC, 1995.	25
Figura 8: Área de coleta dos consórcios bacterianos. Porto do Ceasa, Rio Negro, Manaus-AM. Consórcios A1, A2, A3 e A4 coletados em 31 de agosto de 2018 (após derramamento de óleo na região). Consórcio A5 coletado em 15 de novembro de 2015. Fonte: SANTOS, 2021.	31
Figura 9: Fluxograma das etapas que serão realizadas nesta pesquisa. GC-MS: Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.	34
Figura 10: Avaliação de formação de biofilme por coloração com cristal de violeta.	39
Figura 11: A) Casca de cupuaçu granulometria 1mm in natura, B) Casca de cupuaçu granulometria 1mm in natura com o consórcio A3 imobilizado, C) Casca de cupuaçu granulometria 1mm com tratamento NaOH, D) Casca de cupuaçu granulometria 1mm com tratamento NaOH com o consórcio A3 imobilizado, E) Casca de cupuaçu granulometria 2,5mm in natura, F) Casca de cupuaçu granulometria 2,5mm in natura com o consórcio A3 imobilizado, G) Casca de cupuaçu granulometria 2,5mm com tratamento NaOH e H) Casca de cupuaçu	

granulometria 2,5mm com tratamento NaOH com o consórcio A3 imobilizado.	47
Figura 12: A) Casca de cupuaçu, com dimensões de aproximadamente 1 cm ² , B) Casca de cupuaçu, com dimensões de aproximadamente 1 cm ² com o consórcio A3 imobilizado, C) Espuma de poliuretano, com dimensões de aproximadamente 1 cm ³ , D) Espuma de poliuretano, com dimensões de aproximadamente 1 cm ³ com o consórcio A3 imobilizado E) Bucha vegetal, com dimensões de aproximadamente 1 cm ³ , F) Bucha vegetal, com dimensões de aproximadamente 1 cm ³ com o consórcio A3 imobilizado.	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Formação de biofilme das cepas e do consórcio A3 em meio BH e LB.	39
Gráfico 2: Formação de biofilme das cepas e do consórcio A3 pelo período de 24h, 72h e 168h.	42
Gráfico 3: Taxa de biodegradação pelo consórcio livre e imobilizado em casca de cupuaçu com granulometria 1mm com tratamento NaOH, fragmentos de casca de cupuaçu, poliuretano e bucha vegetal.	51

LISTA DE EQUAÇÕES

(Equação 1)	35
(Equação 2)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição elementar do petróleo.	4
Tabela 2: Condições de qualidade da água doce classe 2, segundo o CONAMA 357/2005.	12
Tabela 3: Limites de compostos BTEX, PAHs e metais em água doce classe 2, segundo o CONAMA 357/2005.	13
Tabela 4: Revisão da literatura sobre as principais espécies de bactérias encontradas em estudos de biodegradação de petróleo e derivados.	20
Tabela 5: Preparo dos suportes.	36
Tabela 6: Formação média de biofilme em meio BH e LB.	40
Tabela 7: Formação média de biofilme pelo período de 24h, 72h e 168h.	43
Tabela 8: Eficiência de imobilização nos diferentes suportes. As células imobilizadas foram desprendidas em banho ultrassônico e a contagem de CFU realizada em meio LB-ágar.	44
Tabela 9: Taxa de biodegradação do óleo diesel.	52

SUMÁRIO

Resumo	ix
Abstract	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Petróleo	3
2.1.1. Óleo diesel.....	5
2.1.2 Importância econômica do Petróleo no Mundo e no Brasil	6
2.1.3 Ambientes contaminados por derramamentos de derivados de petróleo	8
2.1.4 Legislação para monitoramento de índices de poluição por derivados de petróleo no Brasil e no Amazonas	11
2.2. Métodos de remediação de derivados de petróleo	16
2.2.1. Biorremediação.....	18
2.2.2. Consórcio bacteriano de microrganismos	22
2.2.3. Biossurfactantes	23
2.3. Métodos de imobilização de microrganismos	24
2.3.1. Adsorção	26
2.3.2 Suportes para imobilização.....	26
2.3.3. Espuma de Poliuretano.....	28
2.3.4. Materiais lignocelulósicas	28
3. JUSTIFICATIVA	31
4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivos gerais	33
4.2 Objetivos específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Avaliação da formação de biofilme	34
5.2 Coleta e Preparação dos suportes	35
5.3 Imobilização dos consórcios	36
5.4 Quantificação de microrganismos imobilizados.....	37
5.5 Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
5.6 Quantificação da degradação de diesel pelo consórcio livre e imobilizado	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1 Quantificação da formação de biofilme por meio de cultura	39

6.2 Quantificação da formação de biofilme por período de cultura.....	42
6.3 Quantificação de microrganismos imobilizados em diferentes suportes .	44
6.4 Avaliação do Suporte por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..	47
6.5 Quantificação da degradação de diesel pelo consórcio livre e imobilizado	51
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS	56

Resumo

O petróleo é um produto de grande importância social e econômica, relacionada ao elevado consumo de seus derivados. Seus derivados são constituídos por um complexo de hidrocarbonetos, compostos poluentes que são causadores de severos impactos sobre o meio ambiente aquático e terrestre. Ao longo dos anos inúmeras técnicas foram desenvolvidas a fim de mitigar os efeitos negativos ocasionados aos ecossistemas afetados. Com o avanço da biotecnologia, a técnica de biorremediação tem se mostrado promissora, e inúmeros estudos tem avançado tanto nas pesquisas de consórcios capazes de degradar o maior número de substâncias nocivas, como também, na exploração de ferramentas que possam elevar a eficiência da ação dos microrganismos, como a imobilização. O emprego de suportes orgânicos para imobilização por adsorção natural é considerado de fácil execução, além de uma alternativa econômica e sustentável. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência de degradação na forma imobilizada do consórcio bacteriano A3 constituído por *Acinetobacter seifertii*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Pseudomonas* (nova espécie), coletada do Porto do Ceasa, Rio Negro, Manaus-AM. A avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos foi realizada fornecendo óleo diesel como única fonte de carbono após 7 dias de cultivo a 30 °C. A imobilização foi realizada em suporte sintético de espuma de poliuretano e em suporte lignocelulósicos de casca de cupuaçu e bucha vegetal. Foi evidenciado, a partir da imobilização em bucha vegetal, uma melhora na eficiência da capacidade degradadora pelo consórcio bacteriano A3 em 91,8 %, gerando uma importante ferramenta no combate aos danos ocasionados por derramamentos de petróleo e derivados na região amazônica.

Palavras-chave: consórcio microbiano; degradação de diesel; biorremediação; xenobiótico; poluição; meio ambiente.

Abstract

Oil is a product of great social and economic importance, related to the high consumption of its derivatives. Its derivatives are made up of a complex of hydrocarbons, polluting compounds that cause severe impacts on the aquatic and terrestrial environment. Over the years numerous techniques have been developed in order to mitigate the negative effects caused to the affected ecosystems. With the advancement of biotechnology, the bioremediation technique has shown promise, and numerous studies have advanced both in the research of consortia capable of degrading the largest number of harmful substances, as well as in the exploration of tools that can increase the efficiency of the action of microorganisms, such as immobilization. The use of organic supports for immobilization by natural adsorption is considered easy to perform, as well as an economical and sustainable alternative. The present work aims to evaluate the degradation efficiency in the immobilized form of the bacterial consortium A3 consisting of *Acinetobacter seifertii*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Pseudomonas* (new species), collected from Porto do Ceasa, Rio Negro, Manaus-AM. The evaluation of the degradation capacity of hydrocarbons was carried out providing diesel oil as the only source of carbon after 7 days of cultivation at 30 °C. Immobilization was performed in synthetic polyurethane foam support and in lignocellulosic support of cupuaçu bark and vegetable loofah. It was evidenced, from the immobilization in vegetable bushing, an improvement in the efficiency of the degrading capacity by the bacterial consortium A3 in 91.8%, generating an important tool in the fight against the damages caused by oil spills and derivatives in the Amazon region.

Keywords: microbial consortium; diesel degradation; bioremediation.

1. INTRODUÇÃO

A crescente exploração, produção e consumo dos derivados de petróleo está profundamente relacionada com o desenvolvimento do setor energético e, conseqüentemente, com a expansão da economia mundial (BARRETO, 2018). Ao longo dos anos o setor petrolífero se apresentou como um estimulante dispositivo de manipulação de intensas disputas econômicas e interesses políticos. Nesse panorama, é observada uma significativa dependência mundial em relação a esta *commodity*, gerando uma renda anual em torno de US\$ 3,3 trilhões levando-se em consideração a indústria de petróleo e gás natural (DELLA-FLORA *et al.*, 2020).

A crescente demanda de diversos setores pelo petróleo e seus produtos o tornou um dos principais precursores dos severos impactos globais incidentes sobre os recursos ambientais, como ecossistemas aquáticos e terrestres (Della-Flora *et al.*, 2020). As fontes de contaminação de derramamentos ocorrem justamente durante as etapas que compreendem a extração e ações rotineiras da cadeia produtiva, principalmente no armazenamento, transporte e distribuição (ALMEIDA-VAL, 2011; DURVAL, 2017).

Os incontáveis casos de derramamento de petróleo em todo o mundo resultaram, nos últimos anos, em milhares de toneladas de petróleo depositados em ambientes aquáticos. A dispersão dessa contaminação, influenciada pela dinâmica ambiental dos ventos e das marés, eleva a dimensão dos efeitos físicos, químicos e biológicos sobre o local do acidente e dos sistemas adjacentes (FARIA, 2019).

O petróleo é basicamente formado por uma combinação complexa de compostos, predominando moléculas de hidrocarbonetos hidrofóbicos, que quando derramados nas águas resultam na formação de uma camada superficial prejudicial a troca de gases e de luz, vitais para a comunidade de fitoplânctons e para a manutenção da cadeia alimentar. A parte mais hidrofílica pode se alastrar rapidamente, ocasionando a migração de substâncias altamente tóxicas para águas subterrâneas. Além disso, as frações mais leves podem precipitadamente evaporar e as mais pesadas podem aderir a materiais suspensos e a contaminação pode alcançar sedimentos mais profundos (DURVAL, 2017; GONZÁLEZ *et al.*, 2009).

A presença de uma área de exploração de petróleo no interior da floresta amazônica, Província Petrolífera de Urucu no município de Coari-Manaus, e os possíveis acidentes ambientais envolvendo derramamento de hidrocarbonetos coloca em risco a biodiversidade animal, vegetal e microbiológica da região (ALMEIDA-VAL, 2011; BORDALO, 2012; SAFDARI *et al.*, 2018). Além disso, é imprescindível ressaltar as alterações hidrológicas, biológicas e ecológicas resultando em impactos socioeconômicos relevantes e a saúde das comunidades que vivem naquele local (SEBASTIAN e HURTIG *et al.*, 2005).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Petróleo

O petróleo é definido pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) como um material fóssil encontrado sob a superfície terrestre que apresenta grande concentração de hidrocarbonetos, elevado valor energético, característica oleosa, propriedade inflamável, cheiro particular e coloração que pode variar de incolor até o preto (ANP, 2020; SILVA, 2018).

O uso do petróleo é datado desde os primórdios da civilização, obtido a partir de poços mais superficiais. A princípio foi empregado pelos egípcios como um dos componentes para embalsamar corpos e pelos pré-colombianos na pavimentação de estradas, entre outras aplicações como betume, iluminação, lubrificante, impermeabilizante, fins bélicos, etc. Uma longa estrada foi percorrida desde a descoberta dos campos com poços até a produção dos diversos derivados produzidos atualmente (THOMAS, 2001; COSTA, 2012; VILAR *et al.*, 2018).

Atualmente, a indústria petrolífera está dividida em três segmentos principais: *upstream*, *middlestream* e *downstream*. O *upstream*, também referido como segmento de exploração e produção (E&P), compreende a fase de prospecção do petróleo, incluindo as etapas de perfuração, recuperação de poços, desenvolvimento e produção de petróleo e gás natural. O *middlestream* é relacionado ao transporte de óleo e o seu refino. Por fim, o *downstream* envolve o transporte de produtos derivados do petróleo até o consumidor final (COSTA, 2012).

A exploração do petróleo, relacionada ao primeiro segmento, pode ser realizada por meio de dois sistemas distintos: *onshore* e *offshore*. O sistema *onshore* é definido como o tipo de exploração realizado em campos terrestres, que neste momento, se encontram em fase de declínio produtivo natural. O sistema *offshore* é aquele que a exploração ocorre no mar, onde grandes reservas foram descobertas, desde campos em águas rasas até águas ultraprofundas (VILAR *et al.*, 2018; BNDES, 2019).

Em estado natural, logo após sua extração, o petróleo é denominado óleo cru ou bruto e é constituído por uma vasta mistura de substâncias orgânicas, em sua maioria hidrocarbonetos. Além disso, apresenta arranjos de compostos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e constituintes metálicos como níquel e

vanádio (RODRIGUES, 2018; SILVA, 2018). Na Tabela 1 está disposta a composição elementar do petróleo.

Tabela 1: Composição elementar do petróleo.

Elemento	Porcentagem em massa (%)
Carbono	83 - 87
Hidrogênio	11 - 14
Enxofre	0,06 - 8
Nitrogênio	0,1 - 1,7
Oxigênio	0,1 - 2
Metais	≤ 0,3

Adaptado de SPEIGHT, 2002; RIAZI, 2005.

Figura 1: Principais grupos de hidrocarbonetos contidos no petróleo. Adaptado de MCGENITY, 2014; ZÍLIO e PINTO, 2002; ASHOORI *et al.*, 2017 e KINGSTON, 2002.



Diversos aspectos podem afetar a composição geral do petróleo, tais como formação, idade e profundidade, produzindo óleos com diferentes

propriedades físico-químicas. Os compostos do petróleo podem ser classificados como hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos (FARIA, 2019). Na Figura 1 estão destacados os principais grupos de hidrocarbonetos presentes no petróleo.

As principais frações obtidas a partir do óleo cru são: gás de petróleo, gás liquefeito de petróleo (GLP), nafta, gasolina, querosene, óleo diesel, óleo lubrificante, óleo combustível e resíduos tais como coque, asfalto, alcatrão, breu, ceras e outros (ANP, 2017).

2.1.1. Óleo diesel

O óleo diesel é um dos combustíveis derivados de petróleo mais comercializados no mercado brasileiro, sendo empregado em veículos de grande porte, em embarcações, na indústria, em termoeletricas, nas máquinas agrícolas, entre outros. As demandas estimadas para o óleo diesel entre os anos de 2012 e 2035 são superiores a 5 milhões de barris/dia (RAMADASS *et al.*, 2017). O diesel é constituído pela mistura de gasóleos, querosene e nafta, apresentando em sua composição hidrocarbonetos de 13 a 18 carbonos e frações de nitrogênio, enxofre e oxigênio em concentrações menores (ANP, 2018). O diesel é classificado de acordo com a Resolução ANP nº. 65/2011 (BRASIL, 2011), da seguinte forma:

- a) Óleo diesel tipo A: combustível produzido por processos de refino de petróleo, centrais de matérias-primas petroquímicas ou autorizado, sem adição de biodiesel;
 - b) Óleo diesel B: óleo diesel A adicionado de biodiesel no teor estabelecido pela legislação vigente.
- I - Óleo diesel A S10 e B S10: com teor de até 10 mg/kg de enxofre;
 - II - Óleo diesel A S50 e B S50: com teor de até 50 mg/kg de enxofre;
 - III - Óleo diesel A S500 e B S500: com teor de até 500 mg/kg de enxofre;
 - IV - Óleo diesel A S1800 e B S1800: com teor de até 1800 mg/kg de enxofre;

Estima-se que a quantidade de diesel derramada nos ecossistemas terrestres e aquáticos esteja entre 1,7 a 8,8 milhões de ton/ano (IMRON *et al.*, 2019; TITAH *et al.*, 2018). Os elevados índices desses acidentes são extremamente preocupantes, visto que, no diesel há a presença de compostos, tais como, enxofre, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e compostos

de hidrocarbonetos monoaromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), altamente nocivos à saúde e ao meio ambiente e de difícil mitigação (ANJOS, 2012).

2.1.2 Importância econômica do Petróleo no Mundo e no Brasil

Desde a antiguidade o petróleo já era bastante empregado de formas rudimentares, porém, foi apenas no século XIX que ele passou a ter interesse econômico. Com o passar dos anos, o petróleo tornou-se o principal ator de diversas crises econômicas e tensões entre vários países no planeta. Além disso, na indústria petrolífera, evidenciou-se grande avanço tecnológico, culminando na redução de custos no segmento *upstream* (THOMAS, 2001; SOUZA, 2006; SIMÕES, 2006). Atualmente, o petróleo ainda é a principal fonte energética, sendo imprescindível e inerente na produção de diversos setores industriais em todo o mundo, tais como, o automotivo, o aeronáutico, o químico, o de materiais sintéticos, o de adubos, entre outros (MARTINS, 2008).

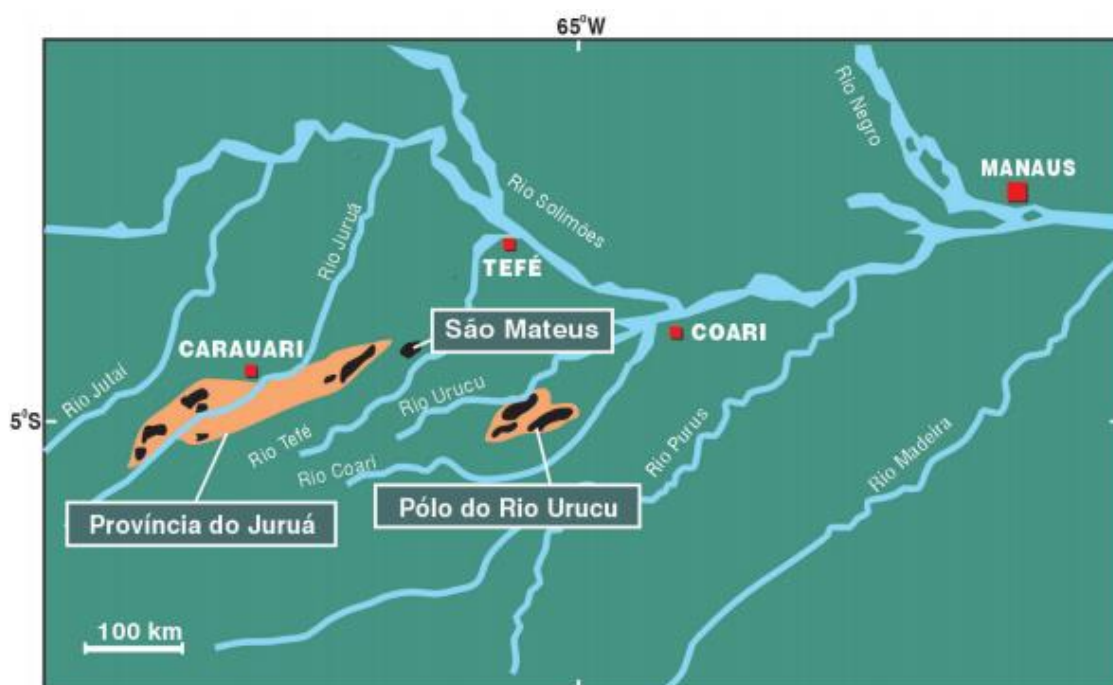
No Brasil, a busca por petróleo teve sua origem no ano de 1864 na época do Império. Porém, apenas em 1939 foi realizada a descoberta da primeira jazida de petróleo em Salvador (BA), incentivando o início da exploração de petróleo de campos comerciais no país (LUSTOSA, 2002; MOREIRA, 2018). Todos esses acontecimentos culminaram na criação da Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras) com a instauração da Lei nº 2.004/1953, a qual estabelecia o monopólio estatal de pesquisa, refino e transporte do petróleo.

A partir do ano de 2005, com o desenvolvimento da tecnologia de extração de óleo, foi possível encontrar no pré-sal volumes significativos de petróleo e gás natural, elevando a produção nacional a números exorbitantes de 2,7 milhões barris de óleo equivalente/dia em 2020, levando a autossuficiência de exploração do óleo no Brasil (SOUZA, 2006; ANP, 2020).

Na Amazônia, desde o ano de 1917, existem registros de atividades de sondagens de jazidas de petróleo. Nos anos 50 foram iniciadas as atividades exploratórias da Bacia do Solimões, sendo encontrada a primeira acumulação de gás do Rio Juruá, em 1978, e posteriormente, foi descoberta a província de gás e óleo do Rio Urucu. O óleo produzido nessa região é transportado por oleodutos até o terminal da cidade de Coari, sendo destinado em balsas até a refinaria Isaac Sabbá (REMAN), localizada em Manaus. De acordo com dados

da ANP (2021) a produção diária dessa província foi de 101.922 (boe/d). A Bacia do Solimões (Figura 2) está localizada sob a selva amazônica, compreendendo área sedimentar de mais de 600.000 km² (MILANI & ZALÁN, 1998).

Figura 2: Bacia do Solimões, província do Juruá e a área produtora do Pólo do Rio Urucu. Fonte: MILANI & ARAÚJO, 2003.



Como mostrado, o petróleo ainda é uma fonte primordial de energia global, apesar das diversas pesquisas para desenvolvimento de tecnologias alternativas aos derivados fósseis. Isso está fortemente relacionado a uma constante manutenção promovida por atores do mercado petrolífero, priorizando a contínua busca por lucro em detrimento ao risco de se investir em energias sustentáveis (DELLA-FLORA *et al.*, 2020; LIRA & OLIVEIRA, 2020). Além de um valioso gerador de arrecadação, toda a organização (*upstream*, *middlestream* e *downstream*) da indústria petrolífera apresenta uma elevação na incidência de acidentes e contaminação ambientais, o que representa um importante fator de impacto negativo no âmbito econômico (BALKE & BROWN, 2018; COSTA, 2012; PAIM, 2011).

2.1.3 Ambientes contaminados por derramamentos de derivados de petróleo

A contaminação pode ser entendida como a introdução de qualquer substância indesejada no meio ambiente, de maneira planejada, acidental ou natural, de substâncias ou resíduos depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados que têm potencial de ocasionar danos à saúde humana, ao meio ambiente ou a outro bem (RODRIGUES, 2015). Toda a cadeia produtiva petrolífera, como exploração, refinamento, transporte e operações de armazenamento do petróleo e seus derivados, oferece elevado risco de contaminação, gerando impactos negativos e significativos em locais como a atmosfera, solos, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas (ANIEFIOK, 2013).

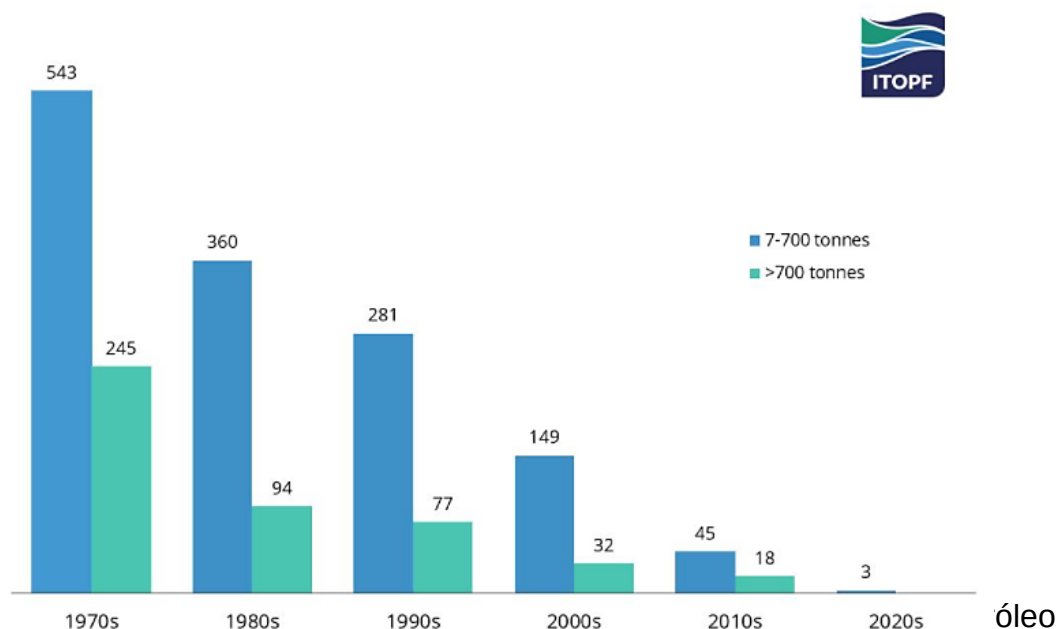
Os contaminantes orgânicos derivados do petróleo são persistentes e causam efeitos duradouros e crônicos ao ambiente afetado. Devido a isso, há implicações negativas expressivas sobre a dinâmica de diversos ecossistemas, acarretando a alteração da natureza e da função dos locais atingidos (SAMANTA *et al.*, 2002; FENT, 2004). Nos solos, os hidrocarbonetos podem afetar as atividades microbianas e interferir na absorção de nutrientes, e consequentemente, dificultar a respiração e fotossíntese das plantas (ZABBEY *et al.*, 2017). Nas águas superficiais, essa contaminação também irá ocasionar o comprometimento do processo de respiração dos peixes e de fotossíntese do fitoplâncton, e ainda pode levar a bioacumulação (BEAZLEY *et al.*, 2012). Além disso, a elevada toxicidade dos seus componentes químicos pode alcançar os seres humanos por meio da ingestão de água e peixes contaminados, resultando em severos efeitos sobre sua saúde (FENT, 2004).

A partir da década de 70 a ocorrência de graves acidentes industriais, principalmente de origem petroquímica (Figura 3), modificou a opinião pública e influenciaram a política ambiental da época com uma série de medidas internacionais de prevenção e controle como MARPOL 73/78 e OPRC 90, o que resultou em uma redução nos casos mundiais (Figura 4) (MAGRINI, 2001; KIRBY & LAW, 2010).

Figura 3: Mapeamento dos principais acidentes relatados no mundo entre 1970 e 2019. Fonte: STEVANATO, 2020.



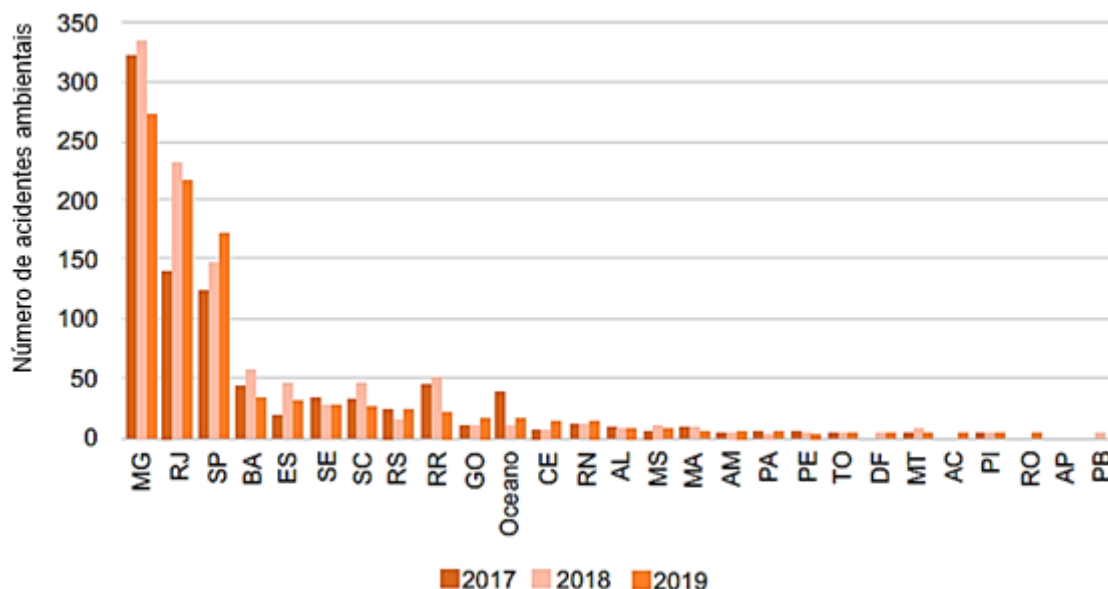
Figura 4: Número de derramamentos médios (7-700 toneladas) e grandes (> 700 toneladas) por década de 1970 a 2020. Fonte: ITOPF, 2020.



e seus derivados. Os primeiros registros estão relacionados ao transporte marítimo e, posteriormente, passaram a ser mais constantes nos oleodutos, terminais e refinarias (CETESB, 2018). Em 2019, ocorreu o maior desastre ambiental provocado pelo derrame de petróleo na história brasileira, foram 133 toneladas que se espalharam por uma área litorânea total superior a 4 mil quilômetros, atingindo 130 municípios em 11 estados do Nordeste e Sudeste do

país, segundo o último relatório publicado pelo Ibama no dia 20 de março de 2020.

Figura 5: Número de acidentes ambientais no Brasil nos anos de 2017, 2018 e 2019. Fonte: IBAMA, 2019.



Já a Amazônia, levando-se em consideração sua extensão territorial, é uma região pouco monitorada, onde muitos dos pequenos e médios acidentes resultantes do intenso fluxo de embarcações não são relatados aos órgãos competentes (CASTRO JR, 2007). Nas áreas amazônicas onde a exploração petrolífera é mais intensa como Peru e Equador, os derramamentos têm ocorrido com certa frequência (FEARNSIDE, 2019; FEARNSIDE, 2020).

Nos limites amazônicos brasileiros, em 1998, um acidente envolvendo um oleoduto da REMAN despejou no Rio Negro, aproximadamente 15 mil litros de óleo (MPE-AM, 1999). Dados mais atuais, registrados no Sistema Nacional de Emergências Ambientais (Siema), demonstrados na Figura 5, apresenta um comparativo do número de casos registrados no sistema, por unidade federativa e no oceano, nos anos 2017, 2018 e 2019 (IBAMA, 2019).

Os inúmeros acidentes relatados e os efeitos crônicos resultantes deles, demonstram como é de fundamental importância pensar em formas de tornar a indústria e seus processos mais limpos e sustentáveis. Especialmente em se tratando da exploração das bacias localizadas na Amazônia, uma das maiores florestas tropicais do mundo. Esta é responsável pela manutenção de diversos

serviços ecológicos e do equilíbrio climático de grande parte do território brasileiro (IPAM, 2010). A exploração dessas bacias apresenta questões conflitantes envolvendo quesitos legais, ambientais e sociais, afetando fortemente as populações indígenas e ribeirinhas. De forma que, durante a instalação e desenvolvimento de atividades petroquímicas, é imprescindível a presença de órgãos que possam controlar de forma rígida e extensiva todas as movimentações, monitorando medidas preventivas, condições operacionais, certificações e licenças, planos de ação para casos de acidentes com óleos e derivados a curto e longo prazo, e responsabilização dos atores envolvidos.

2.1.4 Legislação para monitoramento de índices de poluição por derivados de petróleo no Brasil e no Amazonas

Diante da indústria petrolífera e dos seus constantes acidentes, a proteção ambiental passou a ser foco dos governantes de todo mundo, principalmente quando tratamos dos severos impactos ambientais decorrentes desse setor. Segundo Moreira e Almeida (2019) e Costa (2012), a fim de atenuar o risco ambiental, monitorar e controlar essas ocorrências foram instituídas leis, regulamentos e penalidades mais rígidas.

A legislação ambiental que regulamenta a tolerância de poluentes provenientes de derramamento de petróleo é diferente em cada país. A Organização Mundial da Saúde classifica os compostos de hidrocarbonetos monoaromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), presentes na complexa mistura do petróleo, como compostos de alto risco à saúde humana. Os BTEX são caracterizados como compostos cancerígenos, mutagênicos e de toxicidade crônica, causando problemas neurotóxicos. Os PAHs apresentam potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico, além da possibilidade de bioacumulação e persistência no meio ambiente (ANJOS, 2012).

Nos Estados Unidos, a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), a Agência de Saúde e Segurança Ocupacional (*National Institute for Occupational Safety and Health - NIOSH*) e a Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency - EPA*) também incluem os BTEX em suas listas de compostos cancerígenos (EPA, 2003; IARC, 2006; NIOSH, 2006).

No Brasil, a Lei de nº 6.938/1981 sancionou a criação da base da legislação ambiental nacional, a Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA), que contém definições essenciais relacionadas ao meio ambiente e à poluição. Também foi instaurado o Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA) e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

Alguns dos principais instrumentos legais da esfera ambiental são estabelecidos pelo CONAMA e pelo IBAMA, de cunhos federais. O CONAMA tem papel de definir diretrizes e regulamentar questões de legislação ambiental, tais como padrão de qualidade da água doce de classe 2 (característica das águas do Rio Negro) (Tabela 2) e prevenção e controle de poluições provenientes dos compostos orgânicos e metais provenientes do óleo bruto de petróleo (Tabela 3). O IBAMA tem função de lavrar auto de infração ambiental e instaurar o processo administrativo de apuração da infração (COSTA, 2012).

Tabela 2: Condições de qualidade da água doce classe 2, segundo o CONAMA 357/2005.

I - Condições de qualidade de água:

- a) não verificação de efeito tóxico crônico a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, ou, na sua ausência, por instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método cientificamente reconhecido.
- b) materiais flutuantes, inclusive espumas não naturais: virtualmente ausentes;
- c) óleos e graxas: virtualmente ausentes;
- d) substâncias que comuniquem gosto ou odor: virtualmente ausentes;
- e) não será permitida a presença de corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais;
- f) resíduos sólidos objetáveis: virtualmente ausentes;
- g) coliformes termotolerantes: para uso de recreação de contato primário deverá

ser obedecida a Resolução CONAMA nº 274, de 2000. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80 % ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente;

h) densidade de cianobactérias: até 50000 cel/mL ou 5 mm³/L;

i) fósforo total:

a) até 0,030 mg/L, em ambientes lênticos; e,

b) até 0,050 mg/L, em ambientes intermediários, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lêntico.

j) Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) 5 dias a 20° C até 5 mg/L O₂;

l) Oxigênio dissolvido (OD), em qualquer amostra, não inferior a 5 mg/L O₂;

m) turbidez: até 100 UNT;

n) clorofila a: até 30 µg/L;

o) cor verdadeira: até 75 mg Pt/L; e

p) pH: 6,0 a 9,0.

Fonte: CONAMA 357 (2005).

Tabela 3: Limites de compostos BTEX, PAHs e metais em água doce classe 2, segundo o CONAMA 357/2005.

Compostos	Valores máximos
Hidrocarbonetos Totais (TPHs)	<100,00 µg/L
BTEX	
Benzeno	0,005 mg/L

Tolueno	2,0 µg/L
Etilbenzeno	90,0 µg/L
Xilenos	300 µg/L
PAHs	
Antraceno	-
Benzo(a)antraceno	0,05 µg/L
Benzo(b)fluoranteno	0,05 µg/L
Benzo(k)fluoranteno	0,05 µg/L
Benzo(g,h,i)pirileno	-
Benzo(a)pireno	0,05 µg/L
Criseno	0,05 µg/L
Dibenzo(a,h)antraceno	0,05 µg/L
Fenantreno	-
Fluoranteno	-
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,05 µg/L
Naftaleno	-
Metais	
Arsênio	0,01 mg/L
Cádmio	0,001 mg/L
Chumbo	0,01 mg/L
Cobre	0,009 mg/L
Cromo	0,05 mg/L
Ferro	0,3 mg/L
Manganês	0,1 mg/L

Mercúrio	0,0002 mg/L
Níquel	0,025 mg/L
Zinco	0,18 mg/L

Fonte: CONAMA 357 (2005).

A primeira referência à sanção por poluição marítima no Brasil é encontrada no Decreto nº 3.334/1899, no qual é definido a pena de multa para o lançamento de substâncias poluidoras em mares ou rios. O PNMA prevê no seu artigo 4 a obrigação do poluidor de indenizar ou reparar os danos causados ao meio ambiente e a terceiros, afetados por sua atividade independente de culpa. De acordo com a Constituição da República, Artigo 225, §3º, o poluidor ainda pode responder nas esferas civil, penal e administrativa. Na primeira pode resultar em indenizações e obrigações legais. Na ação penal, segundo Araújo (2011), é dificultada pois os principais autores dos crimes ambientais são empresas. Na esfera administrativa conta com inúmeras sanções, como, multa de R\$50 a R\$50 milhões.

A Lei nº 9.996/2000 determina que a reparação do dano ambiental e a indenização às atividades econômicas e ao patrimônio público e privado, que tenham sofrido prejuízo, é obrigatória em qualquer circunstância de descarga, ainda que autorizada, de óleo, substâncias nocivas ou perigosas ou misturas que os contenham, de água de lastro e de outros resíduos poluentes. E prevê multas de até R\$50 milhões e prisão nos casos de enquadramento na Lei nº 9.605/1998, Lei de Crimes Ambientais (LCA).

No âmbito do estado do Amazonas, a responsabilidade pelo planejamento, gestão e fiscalização das atividades no contexto ambiental são destinadas a dois órgãos principais, a Secretaria de Estado do Meio Ambiente (SEMA), criada pela Lei nº 3.590/2011, e o Instituto de Proteção Ambiental do Amazonas (IPAAM), criada pela Lei nº 2367/1995. A Lei nº 1532/1982 que dispõe sobre a Política Estadual da Prevenção e Controle da Poluição, Melhoria e Recuperação do Meio Ambiente e de Proteção aos Recursos Naturais e trata das sanções lavradas em infrações ambientais pelo órgão competente IPAAM, conforme descrito no Art. 20:

Art. 20. As infrações administrativas são punidas com as seguintes sanções, observado o disposto no art. 24 desta Lei:

I - advertência;

II - multa simples;

III - multa diária;

IV - apreensão de animais, produtos e subprodutos da fauna e flora, instrumentos, petrechos, equipamentos ou veículos de qualquer natureza utilizados para na prática da infração;

V - destruição ou inutilização do produto;

VI - suspensão de venda e fabricação do produto;

VII - embargo de obra ou atividade;

VIII - demolição de obra;

IX - suspensão parcial ou total de atividades;

X - restritiva de direitos;

XI - reparação do dano ambiental, independente do pagamento da multa.

A reparação das áreas contaminadas se dá pela rápida contenção, remoção e limpeza do óleo derramado. A escolha dentre as diversas técnicas de remediação deve levar em consideração o tipo de acidente e de contaminante e, principalmente, o tipo de ambiente atingido, como fatores físicos, geológicos, hidrogeológicos, bioquímicos e dimensionamento para desenvolvimento da descontaminação. Além disso, considerar aspectos socio-econômicos, tais como riscos à saúde humana, viabilidade econômica e legislações ambientais vigentes, e assim determinar o método mais eficiente para mitigar os impactos negativos do local afetado (PUJOL, 2007; COSTA, 2012).

2.2. Métodos de remediação de derivados de petróleo

Diferentes métodos de remediação vêm sendo estudados a fim de eliminar ou mitigar os efeitos causados por acidentes com hidrocarbonetos, promovendo a recuperação das áreas afetadas. Diferentes técnicas podem ser empregadas a fim de minimizar a contaminação a níveis aceitáveis para a segurança e saúde dos organismos (DELLA-FLORA *et al.*, 2020).

Dependendo das diversas circunstâncias envolvendo o episódio de contaminação, como o tipo de poluente, de ecossistema, de localidade, além de fatores econômicos, uma ou mais técnicas físicas, químicas ou biológicas podem ser eficientes (WHO, 1998; IRWIN, *et al.*, 1997; ATSDR, 1995). Segundo a European Information System Soil and Groundwater (EUGRIS, 2008) as técnicas de remediação podem ser classificadas em:

a) Tratamentos biológicos: processos nos quais os contaminantes são transformados em substâncias como dióxido de carbono, água e biomassa em função da ação de microorganismos. Em geral estes processos são de baixo custo e não há necessidade de tratamento residual, mas requer tempo e é difícil verificar se os contaminantes foram destruídos por completo.

b) Tratamentos físico-químicos: aqueles que usam as propriedades físicas, químicas ou elétricas do contaminante ou do meio contaminado para destruir (conversão química), separar ou conter a contaminação. Nos processos químicos, a estrutura e o comportamento químico das substâncias são alterados por meio de reações químicas a fim de produzir compostos menos tóxicos. Tais tratamentos apresentam boa relação custo-benefício e, se comparados aos processos biológicos, são rápidos.

c) Processos térmicos: aqueles que usam o calor para aumentar a volatilidade, queimar, decompor, destruir ou dissolver os contaminantes. Embora sejam uma alternativa rápida são, em geral, os mais caros.

O método de recuperação mecânica é uma das principais técnicas do tratamento físico, onde a separação das fases pode dar-se por barreiras, escumadeiras ou adsorventes. Já o método químico atua sobre as diferentes propriedades químicas dos componentes do poluente, empregando neutralizantes, dispersantes, emulsificantes, entre outros (DURVAL, 2017).

Com o avanço biotecnológico, as técnicas biológicas como de biorremediação, têm se mostrado promissoras quanto à utilização de microrganismos na biodegradação de tais compostos poluentes. Além disso, quando comparada às demais técnicas se mostra mais segura e mais eficiente (GERALDO & MARANHO, 2020).

2.2.1. Biorremediação

A biorremediação é uma técnica que emprega microrganismos no processo de degradação de contaminantes nocivos ao meio ambiente, produzindo substâncias menos tóxicas ou atóxicas (LIMA, 2011; DAS E CHANDRAN, 2011; MURADO *et al.*, 2011; CAO *et al.*, 2012). Pode ser classificada em três tipos: mineralização que resulta em substâncias inorgânicas, biotransformação que resulta em estruturas orgânicas menores, e co-metabolismo que resulta na geração de enzimas degradadoras de hidrocarbonetos (LAHEL *et al.*, 2016; DELLA-FLORA *et al.*, 2020).

São necessários três requisitos para ocorrer a degradação de contaminantes por microrganismos: a presença de um microrganismo capaz de metabolizar o poluente; um estímulo para a síntese de enzimas necessárias à biodegradação; e condições ambientais adequadas para a realização dos processos metabólicos envolvidos na biodegradação do contaminante (KERBER, 2020).

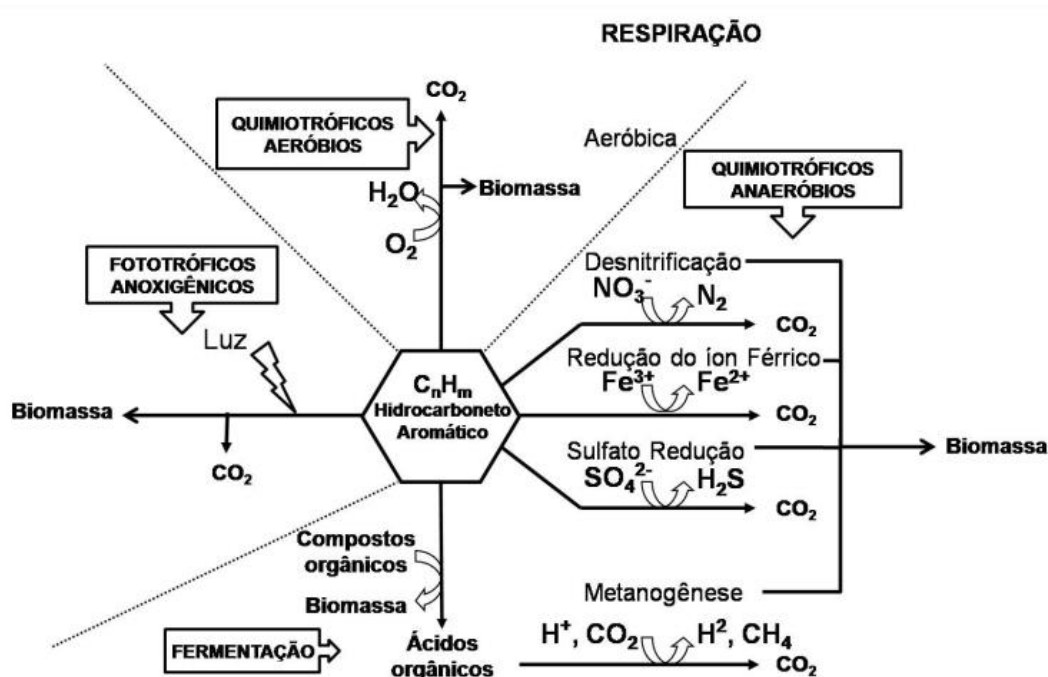
O processo de biorremediação pode ocorrer utilizando os microrganismos presentes no ambiente, chamado de atenuação natural, que além de oferecer tratamento adequado ao meio contaminado, também apresenta custo relativamente baixo. Ainda existem técnicas com a finalidade de elevar o rendimento do processo de descontaminação, a chamada bioestimulação, onde se acelera a reprodução e atividade metabólica dos microrganismos pelo fornecimento de nutrientes e oxigênio. Na bioaugmentação são introduzidos novos microrganismos ao meio para maximização da atividade de degradação (DEON *et al.*, 2012; DELLA-FLORA *et al.*, 2020). A capacidade de degradação atribuída a esses microrganismos se deve a elevada habilidade de adaptação às condições do meio, e a expressiva presença de diferentes hidrocarbonetos em diversos ecossistemas, fazendo com que uma gama de espécies passasse a utilizar os compostos contaminantes petrolíferos como substrato de crescimento (FARIA, 2019).

Inúmeros fatores físicos, químicos e biológicos podem afetar o processo de biodegradação, tais como, o pH, biomassa microbiana, concentração de sais, temperatura, agitação, falta ou excesso de substrato, nutrientes (N, P, S, K, Ca, Mg, etc.), oxigênio, complexidade do contaminante, atividade enzimática,

diversidade dos microrganismos, entre outros (MARTINS, 2004; SEO *et al.*, 2009, HU *et al.*, 2010; GILBERT E BROWN, 2018; KIM *et al.*, 2018).

A decomposição dos compostos aromáticos presentes no petróleo, tais como BTEX e PAHs, por microrganismos pode ocorrer de forma aeróbica ou anaeróbica, conforme demonstrado na Figura 6 (DAGLEY, 1975; BUGG & WINFIELD, 1998; BOOPATHY, 2000; WIDDEL & RABUS, 2001; DÍAZ, 2004; JACQUES *et al.*, 2007).

Figura 6: Decomposição microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia. Fonte: DIAZ, 2004; WETLER-TONINI, REZENDE, GRAVITOL, 2010.



Segundo Faria (2019), alguns microrganismos produzem biossurfactantes que facilitam a degradação dos compostos BTEX. Entretanto, a maioria desses microrganismos encontram certa dificuldade em degradar moléculas com anéis aromáticos condensados como os PAHs. Diante disso, o processo de biorremediação pode ocorrer pela atuação de uma única espécie ou de diversas espécies de microrganismos. Diversos estudos apontaram que a utilização de consórcios com ampla diversidade metabólica propicia uma maior e mais variada produção de enzimas que degradam de forma mais rápida hidrocarbonetos de grande complexidade e tendem a melhorar a eficiência do processo de

biodegradação (SILVA *et al.*, 2014). Na literatura são apresentadas diversas espécies bacterianas que possuem a capacidade de degradar diferentes tipos de contaminantes (Tabela 4).

Tabela 4: Revisão da literatura sobre as principais espécies de bactérias encontradas em estudos de biodegradação de petróleo e derivados.

Bactéria	Contaminante	Fonte
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> EB104	C9-C18	Kleber <i>et al.</i> , 1983
<i>Acinetobacter sp.</i> M-1	C13-C44	Sakai <i>et al.</i> , 1994
<i>Alcaligenes odorans</i> P20	-C33	Lal & Khanna, 1996
<i>Antrobacter nicotianae</i> KCC B35	C10-C40	Radwan <i>et al.</i> , 1996
<i>Azoarcus sp.</i> EB1	Etilbenzeno	Ball <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus sp.</i>	Petróleo	Udgire <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus spp.</i>	Óleo diesel	Lima <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus thermoleovorans</i> B23 e H41	C9-C30	Kato <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus thuringiensis / cereus</i> A2	C6-C28	Chaerun <i>et al.</i> , 2004
Cepa Hxd3	C12-C20	Aeckersberg <i>et al.</i> , 1991
Cepa Pnd3	C14-C17	Aeckersberg <i>et al.</i> , 1998
Cepa OcN1	C8-C12	Ehrenreich <i>et al.</i> , 2000
Cepa TD3	C8-C12	Rueter <i>et al.</i> , 1994
Clone B1-B3	-C16	Zengler <i>et al.</i> , 1999
<i>Dechloromas sp.</i> JJ	Benzeno e Tolueno	Coates <i>et al.</i> , 2001

<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	Tolueno	Rabus <i>et al.</i> , 2001
<i>Dietzia psychrhalcaliphila</i>	C13-C24	Yumoto <i>et al.</i> , 2002
<i>Marinobacter</i> sp. BC36	-C18	Bonin <i>et al.</i> , 2004
<i>Marinobacter</i> sp. BC42	C6-C15	Bonin <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycobacterium</i> sp. PYR-1	Antraceno	Khan <i>et al.</i> , 2001
<i>Mycobacterium</i> sp. CH1	C12-C28	Churchill <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	C12-C24	Smits <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Óleo diesel e Biodiesel	Mariano <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas</i> sp. U2	Naftaleno	Fuenmayor <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas</i> sp. NAP-3	Naftaleno	Rockne <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>vesicularis</i>	Fluorano	Weissenfels <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>saccharophilia</i>	Pireno	Kazunga e Aitken, 2000
<i>Pseudomonas putida</i>	BTX	Lee <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas putida</i>	Benzeno, Tolueno e Fenol	Abuhamed <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852	BTX	Otenio <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhodococcus</i> sp. IBN	C6-C28	Vincenza <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhodococcus</i> sp. 124	Tolueno	Treadway <i>et al.</i> , 1999
<i>Xylella fastidiosa</i> RR15	C14-C34	Yuste <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus subtilis</i> ,		
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e <i>Rhodococcus</i> sp.	C12 e C14	Faria, 2019

<i>Burkholderia vietnamiensis</i> ,		
<i>Pseudomonas</i>		
<i>aeruginosa</i> ,	BTX e Etanol	Morales, 2008
<i>Pseudomonas spp.</i>		
<i>Hydrogenophaga spp.</i> , <i>Pseudomonas</i>	Benzeno	Aburto & Peimbert,
<i>fluorescens</i> , <i>Rhodoferax spp.</i>	Tolueno	2011
<i>Pseudomonas sp.</i> C18,		Denome <i>et al.</i> , 1993;
<i>Pseudomonas sp.</i> PP2 e	Fenantreno	Samanta <i>et al.</i> , 1999;
<i>Pseudomonas sp.</i> DLC-P11		Prabhu e Phale, 2003

Fonte: Adaptado de VAN HAMME *et al.*, 2003; WENTZEL *et al.*, 2007; CRUZ, 2009; KERBER, 2020.

Segundo a instrução normativa nº 5, de 17 de maio de 2010, estabelece os procedimentos e as exigências a serem adotados para obtenção do registro para a realização de pesquisa e experimentação com produtos remediadores, expedido pelo IBAMA, no parágrafo único do seu art. 23 descreve:

Parágrafo único - Não será concedido registro a remediador que contenha *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismos dos gêneros *Shigella* e *Salmonella* e a quaisquer outros produtos cuja composição ou forma de aplicação ofereçam riscos de efeitos danosos.

2.2.2. Consórcio bacteriano de microrganismos

Atualmente, existe uma extensa necessidade de pesquisas para um melhor entendimento do maior número possível de espécies bacterianas e das suas propriedades metabólicas para a biodegradação de petróleo e de seus derivados que levem a descontaminação de ambientes por estes compostos.

O isolamento e seleção de microrganismos é a principal etapa durante o estudo de programas de biorremediação, auxiliando em uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo. Lima *et al.* (2020), realizaram um levantamento das bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em águas contaminadas por vazamentos de gasolina no sul da Amazônia, sendo

encontradas 23 cepas de bactérias. Duas cepas apresentaram capacidade de degradar um maior número de diferentes compostos, *Bacillus sp. L26* e *Bacillus sp. L30*.

O gênero *Bacillus* é um conjunto bacteriano bastante importante dentro do grupo de microrganismo degradadores devido sua capacidade de produzir biossurfactantes, atuando na tensão superficial e colaborando para o acesso e disponibilidade de fontes de carbono. Em contraste com o estudo de Lima *et al.*, 2020, o estudo obtido por Bisognin *et al.* (2018), evidenciou a capacidade degradadora de óleo diesel comercial de alguns fungos e de bactérias do tipo *Bacillus spp.* e *Streptomyces sp.* a partir de biopilhas empregadas na biorremediação.

Pinhati *et al.* (2014), avaliou três cepas bacterianas, *A. genomospecies 3*, *B. pumilus* e *B. flexus*, apresentando uma boa taxa de degradação de hidrocarbonetos aromáticos, o que comprova a eficiência operacional do consórcio microbiano no tratamento de efluentes contendo esses compostos.

O estudo realizado por Ugaz-Hoyos *et al.* (2020), apresentou o desempenho de surfactantes produzidos pelas *Pseudomonas spp.* à concentração de 1,0-1,5 gL⁻¹, com rendimento de 35 % (*Pseudomonas sp. 2HI*), 31 % (*Pseudomonas sp. 8JU*) e 19 % (*Pseudomonas sp. 4CF*).

Aprofundando mais o entendimento das interações ocorridas durante o processo de biodegradação, Bitencourt *et al.* (2014) observaram que atividade emulsificante das espécies de bactérias *Caulerpa racemosa* (B_{cr}), *Laurencia obtusa* (B_{Lo}) e *Dictyota menstrualis* (B_{Dm}) aumentaram a degradação dos hidrocarbonetos no ambiente em estudo, se apresentando como uma interessante ferramenta no controle de derramamento de óleo.

2.2.3. Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, que possuem uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica, e tem origem por meio de síntese química ou biológica, os chamados biossurfactantes. Como mencionado anteriormente, alguns microrganismos têm a capacidade de produzir esses compostos que melhoram o contato enzimas/substrato, proporcionando um aumento da interface entre microrganismo/contaminante e uma degradação mais efetiva (CASSIDY e HUDAK, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2013; KERBER, 2020).

Em comparação aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam diversas vantagens, como maior atividade superficial, baixa toxicidade, biodegradabilidade, utilização de diferentes substratos para metabolização, custo financeiro, entre outros (MULLIGAN *et al.*, 2014).

As principais classes de biossurfactantes são os dos grupos químicos glicolipídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, soforolipídios, rhamnolipídios lipoproteínas, lipopeptídeos e lipopolissacarídeos (SANTOS *et al.*, 2016). Segundo Bento *et al.* (2008), os biossurfactantes também podem ser divididos em dois grupos: os de baixa massa molecular, que atuam sobre a redução da tensão superficial em soluções aquosas, e os de alta massa molecular, que agem na formação de emulsões, chamados bioemulsificantes.

A tensão superficial consiste na força de atração eletroquímica existente entre as moléculas de um líquido, de forma que, há um efeito de membrana elástica no contato entre duas diferentes fases químicas. Assim, os biossurfactantes intervêm na região de interface de fases com diferentes polaridades, reduzindo a tensão superficial. Já o grupo de formação de emulsão permite que ocorra a dispersão coloidal de pequenas partículas de um líquido em outro líquido (MARIANO, 2006; BENTO *et al.*, 2008; DALTIM, 2011).

2.3. Métodos de imobilização de microrganismos

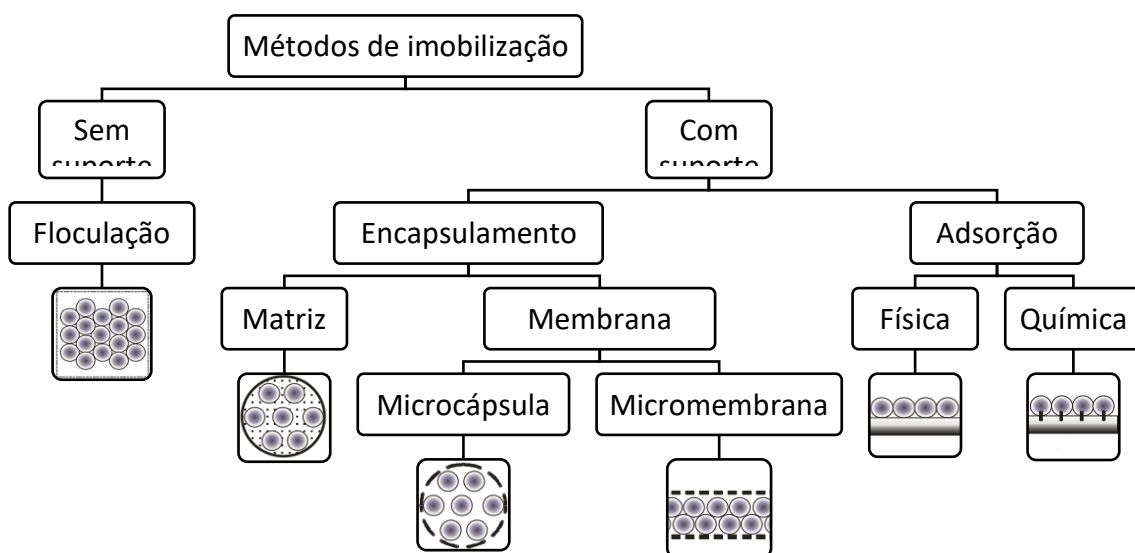
As técnicas de imobilização são aplicadas a fim de limitar fisicamente a mobilidade das células, preservando suas propriedades catalíticas. A maior concentração de células em uma região definida do espaço possibilita melhora na síntese de metabólitos e aumento da eficiência do processo, além de facilitar a recuperação dos produtos para reutilização, quando os suportes empregados são inertes e de alta resistência (COVIZZI *et al.*, 2007). Com isso, diferentes métodos de imobilização de microrganismos estão sendo estudados para avaliação da sua eficiência em inúmeras aplicabilidades, tais como na produção de pigmentos, proteínas, enzimas, alimentos, biodegradação, fermentação, entre outros (COVIZZI *et al.*, 2007).

De acordo com Covizzi *et al.* (2007), as técnicas de imobilização podem ser classificadas em naturais, que ocorrem espontaneamente por interações eletrostáticas formando biofilmes ou aderindo em suportes; e artificiais, que acontecem pelo encapsulamento ou pela formação de ligações covalentes por

reagentes ligantes. Os biofilmes são comunidades de células agregadas em uma matriz de polímeros extracelulares, chamados de exopolissacarídeos (EPS), que aderem a superfícies abióticas ou bióticas (HA; O'TOOLE, 2015). A matriz polimérica atua protegendo a comunidade microbiana de agentes externos, além de influenciar parâmetros importantes, tais como taxa de crescimento e capacidade de degradação em comparação com as bactérias livres (COSTERTON, 1999).

Segundo Haider e Husain (2009), pode-se classificar a imobilização por métodos físicos por meio da retenção da molécula na matriz de diferentes materiais, tais como, polímeros, microcápsulas e membranas; e imobilização química, que se dá pela interação da molécula com a matriz por ligações e outros tipos de interações. Na Figura 7 estão detalhados os métodos de imobilização.

Figura 7: Diferentes métodos de imobilização de microrganismos. Adaptado de PILKINGTON *et al.*, 1998; IUPAC, 1995.



A imobilização de microrganismos possibilita a reutilização das células, redução de custos e aumento da eficiência dos processos. Além disso, permite a obtenção de células mais resistentes a alterações no meio, tais como, temperatura, pH, solventes orgânicos, presença de metais pesados e a altas concentrações de poluentes. Outra característica dessa técnica é a formação de uma barreira de proteção em torno dos microrganismos, resultando na

preservação da atividade enzimática e redução dos riscos de mutação genética (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; BRANDY & JORDAN, 2009; MENDES *et al.*, 2011; GUZIK *et al.*, 2014).

2.3.1. Adsorção

Os primórdios dos estudos relacionados a imobilização de microrganismos se deram a partir da observação da capacidade de alguns microrganismos se prenderem espontaneamente a diferentes superfícies, tais como caules de árvores e formação de cáries dentais (JUNTER & JOUENNE, 2004). O método de adsorção é bastante popular e amplamente empregado nos processos de biorremediação devido a sua simplicidade, rapidez, baixo custo, sustentabilidade, fácil manipulação e grande diversidade de suportes (HOU *et al.*, 2014).

A adsorção física ocorre por meio da fixação do microrganismo ao suporte por meio de ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e dipolo-dipolo (DWEVEDI, 2016). Desta forma, a adsorção física, quando comparada a adsorção química por ligação covalente, apresenta forças de ligação fracas, o que favorece a capacidade de reutilização do suporte após inativação dos microrganismos em uso. Entretanto, também pode ser entendido como uma desvantagem quando ocorrer a dessorção durante o processo de biorremediação. Com isso, a fim de reduzir a dessorção da enzima, foram propostas técnicas de modificação química do suporte, redução de poros ou a reticulação das enzimas nos poros (BRENA & BATISTA-VIEIRA, 2006; HE *et al.*, 2006; REIS, WITULA, HOLMBERG, 2008; JESIONOWSK *et al.*, 2014; ES *et al.*, 2015; DWEVEDI, 2016; LIU, CHEN, SHI, 2018).

2.3.2 Suportes para imobilização

A técnica de imobilização por adsorção se dá pela interação enzima/suporte. A escolha de um suporte adequado é determinante para o sucesso da imobilização microbiana. Para isso, é necessário que o suporte atenda a alguns requisitos básicos, tais como, adequada funcionalidade, porosidade e área superficial elevada, insolubilidade, resistência térmica e mecânica, e inércia (KRAJEWSKA, 2004; GUPTA *et al.*, 2013; ZUCCA & SANJUST, 2014; SIRISHA *et al.*, 2016).

Ao longo dos últimos anos o considerável avanço tecnológico e nas pesquisas no setor de materiais levou ao desenvolvimento de inúmeras alternativas com possibilidade de aplicação para suportes, podendo ser de origem inorgânica ou orgânica. Os suportes inorgânicos podem ser obtidos a partir de materiais como alumina, sílica, zeólitos, e sílicas mesoporosas. Já os suportes orgânicos podem ser classificados em naturais, como quitina, quitosana, alginato, celulose e materiais lignocelulósicos, ou sintéticos, como polímeros (MENDES *et al.*, 2011; MILÉTIC *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2015). Os suportes ainda podem ser do tipo porosos, onde a imobilização ocorre no interior dos poros com grande área superficial e elevada proteção ao microrganismo; ou não porosos, onde a mobilidade será limitada na superfície do suporte com baixa área superficial (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Dentre os diferentes materiais empregados na imobilização microbiana os suportes orgânicos naturais do tipo lignocelulósicos vem sendo foco de diversos estudos, principalmente por apresentarem propriedade como fácil manipulação da sua estrutura para se atingir as condições necessárias, além de serem biodegradáveis, de baixo custo, sustentáveis, atóxicos e contarem com grande quantidade de grupos hidroxila reativos (MARINOV *et al.*, 2009; MILÉTIC *et al.*, 2012). Além disso, os materiais lignocelulósicos estão amplamente disponíveis, principalmente aqueles que são subprodutos agroindustriais, de forma que seu emprego como suportes possibilitaria a redução na produção de resíduos e agregaria valor a esse material, facilitando sua aplicação industrial (D'SOUZA & GODBOLE, 2002; BEZERRA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

Diante dos avanços nos estudos, diversos tratamentos vêm sendo avaliados a fim de aumentar a funcionalidade dos materiais lignocelulósicos, podendo ser classificados em tratamento físicos, químicos, físico-químicos, biológicos, elétricos ou tratamentos combinados (LI *et al.*, 2010; BEHERA *et al.*, 2014; KHOO *et al.*, 2016; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). Os principais tratamentos físicos utilizados são trituração, moagem e extrusão. O tratamento químico atua na quebra da lignina e parte da hemicelulose, aumentando a área superficial e a porosidade do material, podendo ser empregado tratamento alcalino, ácido, organosolv, ozonólise, líquido iônico, agentes oxidantes, solventes orgânicos (TAHERZADEH & KARIMI, 2007; AGBOR *et al.*, 2011; DYK

& PLETSCHE, 2012; MOOD *et al.*, 2013; BEHERA *et al.*, 2014; KHOO *et al.*, 2016). O tratamento alcalino é um dos mais empregados, sendo realizado por meio de bases como hidróxido de sódio e de amônio, apresentando como principal vantagem a eficiente remoção da lignina e solubilização da hemicelulose (MAURYA *et al.*, 2015; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016).

2.3.3. Espuma de Poliuretano

Na literatura, diversos materiais sintéticos são aplicados no processo de imobilização, dentre eles, se destacam os polímeros formados por espumas de poliuretano, apresentando propriedades hidrofóbicas, alta porosidade, afinidade química, resistência física, singulares para eficiente imobilização e biorremediação de compostos poluentes (MILÉTIC *et al.*, 2012; Ali Partovinia, Ali Abolhasani Soorki e Mojtaba Koosha, 2021).

O poliuretano é um polímero muito popular na indústria, sendo utilizado na fabricação de espumas, adesivos, tintas, entre outros. As diferentes composições da síntese do poliuretano lhe conferem alta versatilidade para emprego com diferentes finalidades, como é o caso da imobilização (Vilar, 1998; Merlini, 2011; Partovinia, Ali Abolhasani Soorki e Mojtaba Koosha, 2021).

Majul *et al.* (2020), utilizaram a espuma de poliuretano em conjunto com substratos lignocelulósicas para imobilização de microrganismos na degradação de efluentes contaminados, resultando em um sistema com alta eficiência em ciclos sucessivos de degradação. Partovinia, Ali Abolhasani Soorki e Mojtaba Koosha (2021) obtiveram melhores resultados de biodegradação de *Bacillus licheniformis* na imobilização em espuma de poliuretano combinada a polímeros naturais, formando um aprimorado suporte híbrido, que possibilitou eficiente degradação em fase de solo argiloso.

2.3.4. Materiais lignocelulósicas

Os materiais lignocelulósicos são de origem vegetal, sendo constituídos por polímeros de carboidratos de celulose e hemicelulose, e por um polímero aromático de lignina. A celulose é um dos principais componentes responsáveis por conferir resistência a esse tipo de material (SANTOS, 2013; SUN; OTHMAN, 2019). A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) e a casca de cupuaçu, se destacam, no

Brasil e na região amazônica, respectivamente, como materiais lignocelulósicos abundantes e acessíveis.

A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) é uma trepadeira herbácea da família das Cucurbitáceas de clima tropical, amplamente aplicada no mercado como matéria-prima pelo setor de beleza e cuidados corporais. A bucha vegetal tem sido extensivamente estudada, devido apresentar um conjunto de propriedades ímpares, tais como, baixo custo, atoxicidade, biodegradabilidade; condições favoráveis à adsorção, como baixa densidade, alta porosidade, elevado volume específico de poros, grande área superficial, estabilidade a variação de pH e temperatura; além de estrutura e textura de fibras hidrofílicas, resistentes e elásticas (Liu et. al., 1998; Vichiato et al., 2008).

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), da família Sterculiaceae, é uma planta frutífera típica da Amazônia, com grandes extensões de plantios nos estados do Pará e do Amazonas (SANTOS, LIMA e LIMA, 1992; COSTA et al., 2003). O cupuaçu, dentre as frutas regionais da Amazônia, é uma das mais apreciadas e consumidos localmente, seja *in natura*, ou ainda na forma de cremes, bombons, sucos, bolos, geleias, entre outros (ME, 2007; SOCHA; PINHEIRO, 2016). Seus frutos também são vendidos por todo o território nacional, além de serem exportados para outros países (DAL RI, 2006).

O cupuaçu é constituído em 45 % de casca, 35 % de polpa e 20 % de sementes, aproximadamente. Sua casca é um resíduo de biomassa agrícola e alguns produtores a utilizam para fabricação de adubo orgânico ou ainda pode ser obtido para a fabricação de artesanatos. Contudo, geralmente, são acumulados próximo a área de processamento dos frutos, contribuindo para a proliferação de pragas e doenças que atingem as populações do cupuaçuzeiro (CARVALHO et al., 1981; COUTINHO, 1969; SANTOS et al., 2004).

Nesta perspectiva, verifica-se na literatura diversas pesquisas enfatizando o uso potencial de resíduos agroindustriais no desenvolvimento de novos suportes para imobilização. Segundo Choudhury (2018) a celulose e seus derivados são considerados materiais bastante satisfatórios para esse fim, sendo baratos, não tóxicos, renováveis e biodegradáveis. Neta (2017) e Nikolic (2010) relataram que a imobilização em materiais orgânicos, como caule de girassol e algodão, resultou em melhorias nos parâmetros de estabilidade e na atividade enzimática. Wang, T. et al. (2020), empregaram a bucha vegetal

como suporte, resultando no favorecimento do crescimento de *Pseudomonas sp.* e *M. alpina* e a degradação de hidrocarbonetos. Samhan, et al. (2017), mostraram que diferentes materiais de origem orgânica são excelentes alternativas como suportes, como rafia de folha de palmeira, esponja, bucha vegetal e qqualh de milho moído. Sakdapetsin, Kaokhum e Pinyakong (2021), observou que a imobilização de *Exiguobacterium sp.* foi mais bem sucedida em suporte orgânico de bio-cordão, em comparação com suportes inorgânicos.

3. JUSTIFICATIVA

A presença de uma área de exploração de petróleo no interior da floresta amazônica, Província Petrolífera de Urucu no município de Coari-Amazonas, e os possíveis acidentes ambientais envolvendo derramamento de hidrocarbonetos colocam em risco a biodiversidade animal, vegetal e microbiológica da região (ALMEIDA-VAL, 2011).

Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa Proteoma e Bioprospecção no Amazonas/UFAM, bactérias da espécie *A. junii* (ARAÚJO, 2014; SOUZA NETO, 2015; SOUZA NETO, 2019; CARDENES, 2017) e *B. pumilus* (SANTOS, 2014; ARAÚJO, 2014) foram isolados de águas do Rio Negro (Manaus-AM) com histórico de contaminação derivados de petróleo e diesel, sendo demonstrada sua capacidade de degradação de compostos do diesel e petróleo. SOARES (2020) estudou as características de promoção de biorremediação do óleo diesel a partir de cepas isoladas de *B. arboris*, *B. cereus*, *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.* e *Moraxella sp.*

Figura 8: Área de coleta dos consórcios bacterianos. Porto do Ceasa, Rio Negro, Manaus-AM. Consórcios A1, A2, A3 e A4 coletados em 31 de agosto de 2018 (após derramamento de óleo na região). Consórcio A5 coletado em 15 de novembro de 2015. Fonte: SANTOS, 2021.



Em estudos mais recentes, SANTOS (2021) avaliou a complexidade do desempenho de degradação de diesel por 5 consórcios bacterianos isolados de águas do Rio Negro (Manaus-AM), destacando-se o consórcio A3, que pela análise do proteoma identificou às espécies *Acinetobacter seifertii*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Pseudomonas* (nova espécie), apresentando resultados promissores como alto grau de afinidade com os hidrocarbonetos estudados, melhor desempenho de emulsificação entre 20 e 40 %, alcançando taxa de degradação superior a 70 % e redução da toxicidade do contaminante.

A proposição da aplicação da técnica de imobilização de microrganismo do consórcio A3 em suportes orgânicos, possibilitará a geração de um produto amazônico, agregando valor a insumos, facilitando sua implementação industrial e com potencial de obter um importante instrumento no combate a danos ambientais causados por derramamentos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar a capacidade degradadora de hidrocarbonetos de um consórcio bacteriano imobilizado.

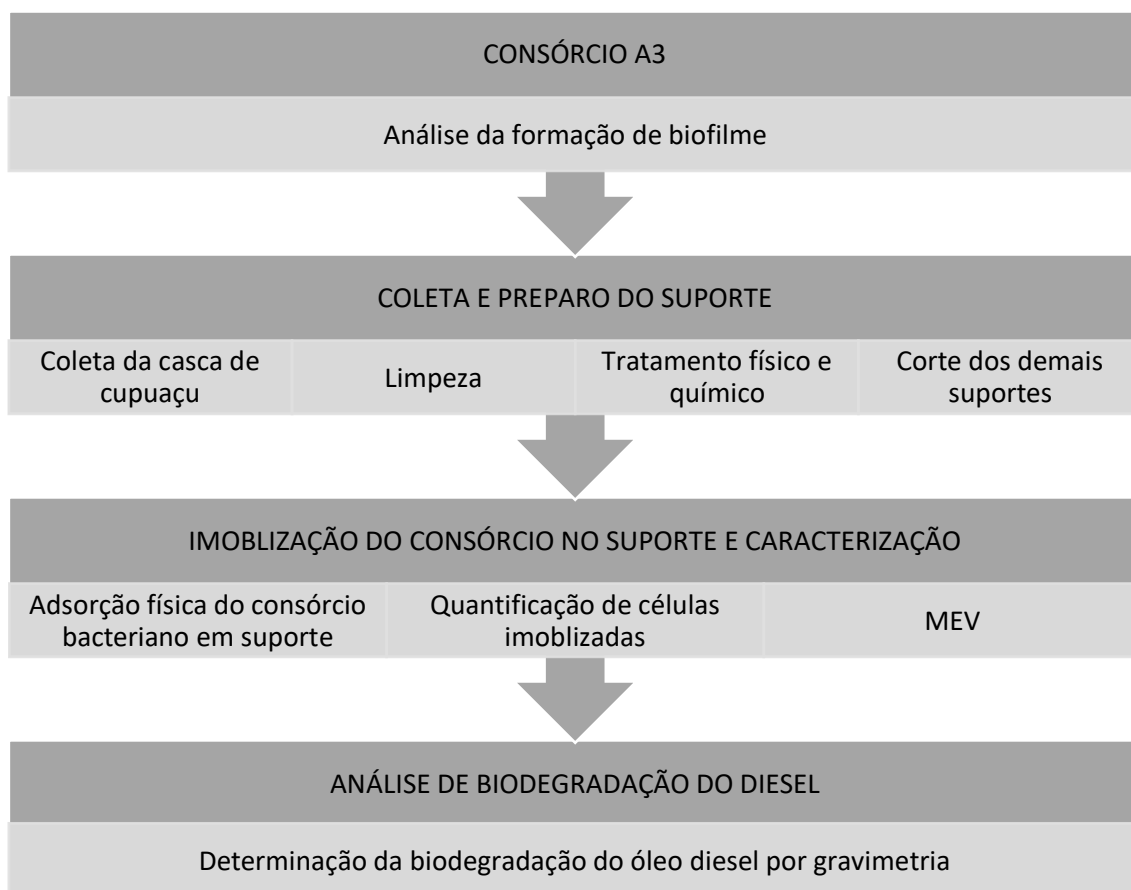
4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar as condições para o suporte, tais como, dimensional e pré-tratamento para limpeza da superfície e remoção parcial da lignina.
- b) Imobilizar o consórcio bacteriano A3 em diferentes suportes.
- c) Avaliar e comparar o potencial de degradação de diesel pelo consórcio bacteriano nos suportes e dos micro-organismos livres.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O resumo da metodologia empregada no trabalho está descrito na Figura 9.

Figura 9: Fluxograma das etapas que serão realizadas nesta pesquisa. GC-MS: Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.



5.1 Avaliação da formação de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada conforme metodologia descrita por Stepanovic, *et al.* 2007. Os pré-inóculos foram preparados em dois meios diferentes, LB (Luria Bertani, HIMEDIA) e BH (Bushnell Haas, HIMEDIA) suplementado com 0,5g/L de extrato de levedura, incubados a 30° C, 150 rpm, por 24 h. As células foram colhidas por centrifugação a 4.000 rpm, 20 min. e 4° C. Após isso, as células foram lavadas e ressuspensas em solução de NaCl 0,85 % (p/v). A densidade celular foi ajustada para 0,1 a 600 nm (10^8 UFC/mL). Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana foram transferidos para os poços de

placas de poliestireno de 96 poços, incubados a 30° C por um período de 24, 72 e 168 h.

Posteriormente, o conteúdo da placa foi descartado, lavado com água Mili-Q e os poços foram corados com 100 µL de solução de cristal de violeta a 0,1 (p/v) por 15 min. Os poços foram lavados quatro vezes com água destilada e, em seguida, a placa foi virada para secagem em temperatura ambiente, por 24 h.

Para avaliar a formação de biofilme, 125 µL de ácido acético a 30 % (v/v) foi adicionado aos poços por um período de 15 min. O material solubilizado foi transferido para uma placa de fundo chato, sendo avaliada a absorbância a 540 nm. Utilizou-se ácido acético, isento de células, como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata.

A formação de biofilme foi determinada a partir dos resultados das densidades ópticas, de acordo com a equação 1 (Naves, 2009).

$$FB = BA - PC \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde, FB corresponde a formação de biofilme, BA é a densidade óptica a 600 nm dos poços com bactérias aderidas e PC é a densidade óptica dos poços de controles negativos.

O meio que apresentou maior capacidade de formação de filme foi escolhido para os experimentos subsequentes.

A análise estatística de todo o estudo foi realizada com ANOVA e Teste Tukey no software Minitab® 19.2020.1.

5.2 Coleta e Preparação dos suportes

Os resíduos de casca de cupuaçu foram fornecidos por um agricultor familiar do município de Manacapuru/Manaus. Inicialmente, o material foi lavado em água corrente, para remoção das impurezas presentes na superfície e quebrado em pedaços menores. Após a secagem parcial em temperatura ambiente, o material foi colocado dentro de uma estufa a 60 °C para eliminação da umidade. As cascas de cupuaçu foram submetidas a tratamento físico por meio de moagem até granulometria de 1 mm e 2,50 mm.

Para o tratamento químico da casca de cupuaçu em pó foi utilizado uma solução de NaOH, em concentração de 0,75 mol/L, por um intervalo de 1 h, conforme descrito por Neta (2017). Após esse procedimento, o pH do meio foi ajustado para 7,0, sendo filtrado, lavado sucessivas vezes com água destilada e seco a em estufa à 40° C por 48 h.

A casca de cupuaçu, também chamada de pericarpo, foi submetida a um processo de raspagem para remoção da estrutura menos rígida que faz parte da casca, chamada mesocarpo. Após esse procedimento, somente a parte mais rígida chamada epicarpo, foi cortada nas dimensões 1cm x 1cm para uso posterior.

Outros suportes foram utilizados no estudo: espuma de poliuretano (TekBond Saint-Globain, BR) e bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), ambos cortados nas dimensões de 1 cm³.

5.3 Imobilização dos consórcios

Os pré-inóculos foram preparados no meio escolhido, incubados a 30° C, 150 rpm, por 24 h. As células foram colhidas por centrifugação a 4.000 rpm, 20 min. e 4° C. Após isso, as células foram lavadas e ressuspensas em solução de NaCl 0,85 % (p/v). A densidade celular foi ajustada para 0,1 a 600 nm (10⁸ UFC/mL).

A imobilização bacteriana foi adaptada de Sakdapetsin, Kaokhum e Pinyakong, 2021. Um grama de cada suporte ou 3 fragmentos de cada suporte, foi acrescentado em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 90 mL de meio e 10 % (v/v) de inóculo. O sistema foi incubado a 30° C, 150 rpm, por 24 h.

Tabela 5: Preparo dos suportes.

Suporte	Tratamento físico	Tratamento químico	Dimensão
Casca de cupuaçu	Moído	-	Granulometria 2,5mm
	Moído	NaOH	Granulometria 2,5mm

	Moído	-	Granulometria 1mm
	Moído	NaOH	Granulometria 1mm
	Corte	-	1 cm ²
Espuma de Poliuretano	Corte	-	1 cm ³
Bucha vegetal	Corte	-	1 cm ³

5.4 Quantificação de microrganismos imobilizados

Após a imobilização, a suspensão do sistema imobilizado foi descartada, e os suportes foram lavados quatro vezes com solução NaCl 0,85 % (p/v), para remoção das células livres. O suporte imobilizado foi ressuspensão em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio, ureia e sulfato de magnésio. O desprendimento das células do suporte foi realizado em um banho de sonicação com dois ciclos de 1 min. As células foram colhidas por centrifugação a 4.000 rpm, 15 min a 4°C, ressuspensas em solução NaCl 0,85% (p/v) e o inóculo foi diluído em série sete vezes. Para a contagem de células viáveis foi empregado o método de espalhamento em placa, uma alíquota de 0,04 mL das suspensões bacterianas 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foi utilizada. Os suportes com a maior capacidade de fixação foram escolhidos para os experimentos subsequentes.

5.5 Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliar a influência do tratamento químico nos suportes em pó e avaliar a imobilização nos diferentes suportes, foram realizadas análises morfológicas da superfície de cada material por MEV no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABio) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

5.6 Quantificação da degradação de diesel pelo consórcio livre e imobilizado

Pré-inóculos do consórcio foram preparados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio BH suplementado com 0,5g/L de extrato de levedura e cultivados por 24 h, a 30° C e 150 rpm. A cultura bacteriana foi utilizada no preparo do

sistema do consórcio livre e do imobilizado nos suportes escolhidos. Para isso, foi utilizado 100 mL de meio BH/diesel (1 %) e foi incubada a agitação constante de 150 rpm, durante 7 dias a 30° C. Todos os cultivos foram desenvolvidos em triplicata.

A metodologia descrita por Ayed *et al.* (2015) foi empregada na análise gravimétrica para determinar o nível de biodegradação do óleo diesel. Após a etapa de biodegradação, o sobrenadante foi submetido a centrifugação 4°C, 30 min a 4000 rpm, depois foi transferido para um funil de separação de 500 mL, onde foi adicionado 50 mL n-hexano (Hexano PA, NUCLEAR), seguido de 30 s de agitação e 5 min de repouso para extração do óleo diesel residual. Com a separação das fases orgânica e aquosa, a fração orgânica foi deixada para evaporar em capela de exaustão em temperatura ambiente por um período de 72 h. Controles abióticos foram realizados nas mesmas condições e o óleo diesel residual recuperado foi usado para estimar as perdas por evaporação e manipulação.

A porcentagem de óleo diesel biodegradado foi calculada pela Equação 2.

$$Biodegradação = \frac{(PCA - PC)}{PD} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

PCA: peso do diesel recuperado no controle abiótico;

PC: peso do diesel recuperado das culturas bacterianas;

PD: peso original do diesel introduzido.

Todos os ensaios, incluindo os controles abióticos dos suportes e do consórcio livre, foram realizados em triplicata com três réplicas biológicas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Quantificação da formação de biofilme por meio de cultura

O biofilme é expresso pela formação de um aglomerado de microrganismos e pela excreção de uma matriz polimérica de aparência gelatinosa, com elevada capacidade de aderência sobre diferentes superfícies (Chaves, 2004; HA; O'TOOLE, 2015). A capacidade de formação de biofilme pelo consórcio A3 e pelas três cepas constituintes do consórcio foi verificada em cada coluna da placa. Os resultados obtidos em meio BH (linhas de 1 a 6) e LB (linhas de 4 a 8) estão apresentados na Figura 10 e Gráfico 1.

Figura 10: Avaliação de formação de biofilme por coloração com cristal de violeta.

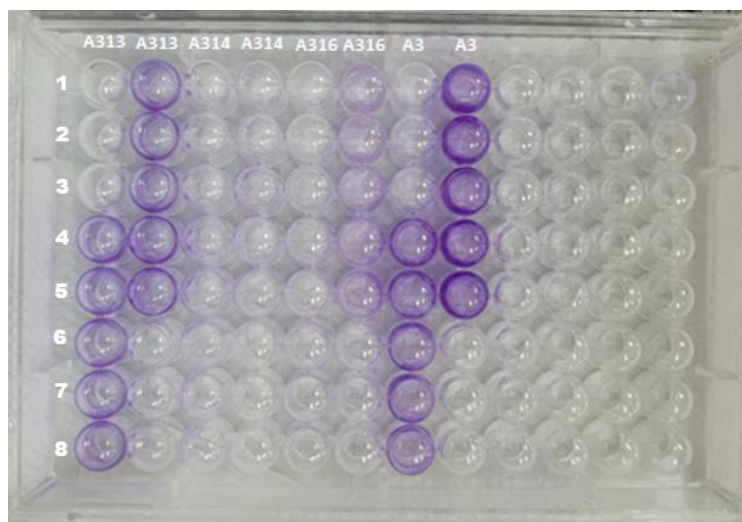


Gráfico 1: Formação de biofilme das cepas e do consórcio A3 em meio BH e LB.

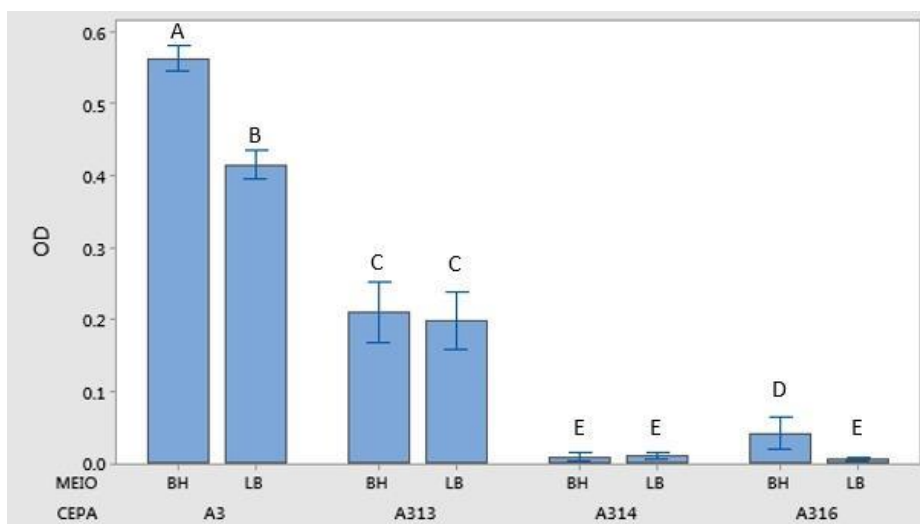


Tabela 6: Formação média de biofilme em meio BH e LB.

Meio	Consórcio/Cepa	Formação de biofilme (FB)
BH	A3	0,562±0,03
	A313 (<i>Acinetobacter seifertii</i>)	0,210±0,08
	A314 (<i>Achromobacter xylosoxidans</i>)	0,009±0,01
	A316 (<i>Pseudomonas sp.</i>)	0,042±0,04
LB	A3	0,415±0,04
	A313 (<i>Acinetobacter seifertii</i>)	0,197±0,07
	A314 (<i>Achromobacter xylosoxidans</i>)	0,010±0,01
	A316 (<i>Pseudomonas sp.</i>)	0,006±0,00

No Gráfico 1, observa-se que todas as cepas constituintes do consórcio A3 apresentaram formação de biofilme nos dois meios utilizados. A cepa A313 foi a que apresentou, quando cultivada em cultura pura a maior fixação do corante cristal violeta e, conseqüentemente, maior formação de biofilme, sem diferença significativa entre os dois meios (meio BH, 0,210±0,08; meio LB, 0,197±0,07).

O consórcio apresentou melhor resultado na formação do biofilme em relação às cepas isoladas. A formação de biofilme do consórcio A3 no meio BH (0,562±0,03) foi significativamente diferente ($p < 0,005$) do produzido no meio LB (0,415±0,04). Os controles negativos permaneceram incolores.

A formação de biofilme pode ser afetada por diversos fatores, tais como, pH, temperatura, concentração de nutrientes do meio, características do microrganismo, tipo e superfície do material do suporte, entre outros. O desenvolvimento dos biofilmes está intimamente ligado à variedade de espécies que o compõem e a disponibilidade dos nutrientes necessários para o crescimento dessas espécies (Buckman, 1997). Dessa forma, pode-se observar o quanto a variedade de cepas beneficiou a produção de biofilme para o consórcio A3.

O meio BH (Bushnell Haas) é um meio de cultivo que apresenta todos os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano, exceto fontes de carbono, sendo ideal para seleção de microorganismos degradadores de hidrocarbonetos (Himedia, 2011). Baêso (2022) mostrou em seu estudo como diferentes composições do meio, utilizando caldo nutriente (CN), BH e BH suplementado com Glicose e Lactato, podem afetar o crescimento microbiano. Guerra (2018), demonstrou que o enriquecimento de meios distintos pode afetar o arranjo da comunidade microbiana.

O gênero *Acinetobacter*, *Achromobacter* e *Pseudomonas* constituintes do consórcio já foram relatadas como formadoras de biofilme. Castro (2021), apontou que diferentes isolados de *Acinetobacter baumannii* apresentaram-se como fortes produtores de biofilme.

Na literatura, o gênero *Achromobacter* se mostra como formador de biofilmes resistentes, especialmente a espécie *A. xylosoxidans* (CHANG *et al.*, 2015).

Pseudomonas são amplamente relatadas como formadoras de biofilme, além da espécie *P. aeruginosa*, outras também apresentam essa propriedade, tais como, diferentes cepas *P. sp.* AKS2, EJ01, U2, NAP-3, vesicularis, saccharophilia, *P. putina* (CHANG *et al.*, 2015; FUENMAYOR *et al.*, 1998; ROCKNE *et al.*, 2000; WEISSENFELS *et al.*, 1990; KAZUNGA e AITKEN, 2000; ABUHAMED *et al.*, 2004; TRIBEDI e SIL, 2013; CHIEN, LIN e WU, 2013). Chien, Lin e Wu (2013) relataram que o gênero *P. sp.* cepa EJ01 apresenta resistência à metais pesados, e quando associadas a biofilmes observaram melhoras nas propriedades de resistência a contaminantes tóxicos e a condições ambientais adversas.

Os resultados mostrados revelam que para o consórcio A3 (Gráfico 1 e Tabela 6, os meios de cultura afetaram significativamente a formação de biofilme. Segundo Wu, M. *et al.* (2013), diferentes meios podem resultar em composições microbianas distintas, assim, o meio LB se apresenta como um excelente meio que permite o crescimento e o meio BH suplementado com 0,5g/L de extrato de levedura apresentou maior crescimento da comunidade bacteriana. Ao longo do período de incubação, foi possível observar o

crescimento bacteriano na formação de uma película transparente de tom levemente amarelado, que ficou aderida fortemente sobre a superfície da placa.

6.2 Quantificação da formação de biofilme por período de cultura

O processo de desenvolvimento do biofilme consiste em três etapas principais. A primeira é a adesão inicial onde ocorre o primeiro contato entre os microrganismos e a superfície guiada por forças físicas. Após isso, dá-se a segunda etapa, chamada ancoragem, onde ocorre a ligação entre os complexos bacterianos e a adesão se torna irreversível, essa é uma fase que apresenta um rápido crescimento populacional. Depois de atingir uma taxa de crescimento máximo, o biofilme entra em uma fase estacionária de crescimento, e inicia a última etapa do processo, chamada fase de dispersão (Souza, 2017). No Gráfico 2 e Tabela 7 são mostrados os resultados obtidos para a formação de biofilme do consórcio A3 e das três cepas constituintes do consórcio em diferentes períodos de 24, 72 e 168 horas.

Gráfico 2: Formação de biofilme das cepas e do consórcio A3 pelo período de 24h, 72h e 168h.

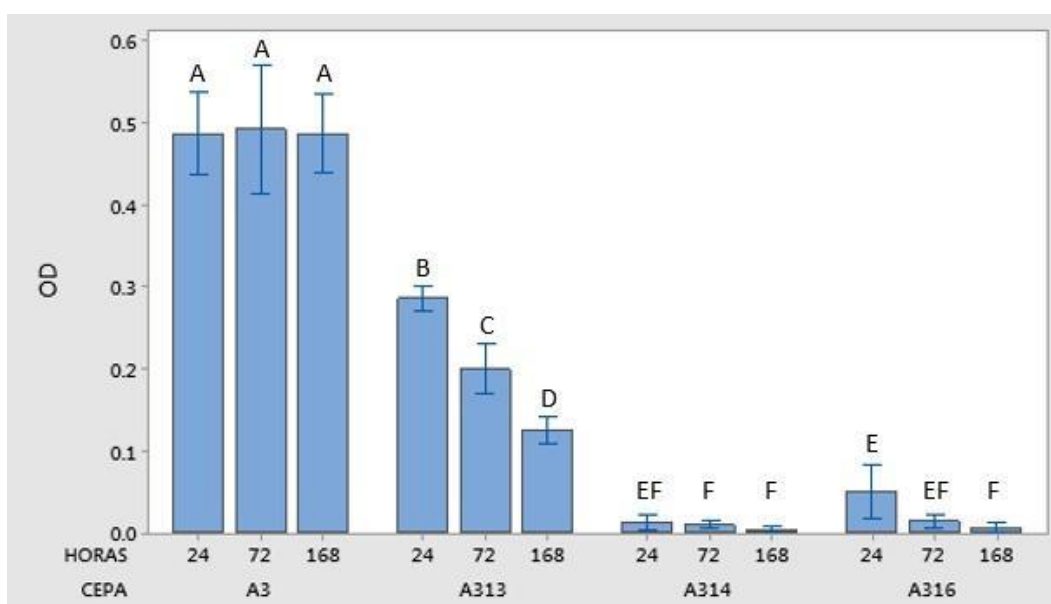


Tabela 7: Formação média de biofilme pelo período de 24h, 72h e 168h.

Consórcio/Cepa	Período (h)	Formação de biofilme (FB)
A3	24	0,487±0,07
	72	0,492±0,11
	168	0,486±0,07
A313 (<i>Acinetobacter seifertii</i>)	24	0,286±0,02
	72	0,200±0,04
	168	0,126±0,02
A314 (<i>Achromobacter xylosoxidans</i>)	24	0,014±0,01
	72	0,011±0,01
	168	0,005±0,01
A316 (<i>Pseudomonas sp.</i>)	24	0,051±0,05
	72	0,014±0,01
	168	0,007±0,01

No Gráfico 2, podemos observar que dentre as cepas, a A313 foi ainda a que resultou em maior formação de biofilme no período inicial de 24h (0,286±0,02), apresentando diferença significativa menor ($p<0,005$) nos períodos posteriores de 72h (0,200±0,04) e 168h (0,126±0,02). Contudo, apresentou elevada dispersão do biofilme, superior a 30 %, após o período de 24h, que pode estar relacionada ao desprendimento de células, fatores nutricionais, cisalhamento por efeitos físicos e/ou a desidratação do biofilme (Ivleva; Kubryk; Niessner, 2017; Souza, 2017). As cepas A314 e A315, além de apresentarem capacidade inferior para a formação do biofilme, este é reduzido a partir de 24 h.

O consórcio A3 apresentou formação de biofilme significativamente maior ($p<0,005$) ao produzido pelas cepas isoladas, ao longo dos três períodos avaliados. O período de incubação para o consórcio não se mostrou como um

fator significativamente impactante no processo de ancoragem ou na dispersão do biofilme. Estes resultados indicam que, quando cultivadas em consórcio, ocorre contribuição entre as cepas constituintes tanto para a formação quanto para a manutenção do biofilme formado.

Nos estudos realizados em diferentes amostras de *A. baumannii* foram observadas que todas apresentaram formação de biofilme, em diferentes quantidades. Com o passar das horas foi notado que algumas amostras demonstraram desprendimento ou aumento gradativo de biofilme (Antunes et. al, 2009).

Os resultados obtidos nos ensaios aqui mostrados, indicam que o tempo não afetou significativamente a formação de biofilme do consórcio A3, tornando viável a realização da imobilização em um prazo reduzido de 24 h.

6.3 Quantificação de microrganismos imobilizados em diferentes suportes

No estudo de imobilização, frequentemente são avaliadas a quantidade de células viáveis para avaliação da eficiência dos suportes empregados no procedimento. Dentre os diversos métodos aplicados para esta avaliação, a técnica de contagem por espalhamento em placas (Pelczar et. al., 1996; Tortora et al., 2000) é amplamente utilizada, além dessa, podemos citar ainda a contagem por microgota (Sakdapetsin, Kaokhum e Pinyakong, 2021) ou em câmara de Neubauer (Santos, 2008; Kishkel et. al., 2015). Os resultados para a quantificação de células viáveis do consórcio A3 imobilizadas foram obtidos no intervalo de 24 h (Tabela 8).

Tabela 8: Eficiência de imobilização nos diferentes suportes. As células imobilizadas foram desprendidas em banho ultrassônico e a contagem de CFU realizada em meio LB-ágar.

Suporte	Descrição	UFC (Média ± dp)
	Granulometria 2,5mm in natura	1,84±0,56 x10 ⁸ c
	Granulometria 2,5mm com tratamento NaOH	2,71±0,84 x10 ⁸ c

Casca de cupuaçu	Granulometria 1mm in natura	1,07±0,41 x10 ⁹ bc
	Granulometria 1mm com tratamento NaOH	1,55±0,71 x10 ⁹ bc
Espuma de Poliuretano	1 cm ²	2,22±0,79x10 ⁹ b
	1 cm ³	1,48±0,68x10 ⁹ bc
Bucha vegetal	1 cm ³	5,19±0,98x10 ⁹ a

Na Tabela 8, os resultados obtidos mostram que todos os suportes apresentaram uma grande quantidade de células aderidas. A casca de cupuaçu foi utilizada em forma de grânulo e em fragmentos de 1 cm². Para os grânulos nas duas granulometrias de 2,5 mm e 1 mm, tanto in natura quanto com tratamento químico, foram obtidos resultados de contagem de células sem diferença significativa. O procedimento foi fortemente impactado pelos grânulos que apresentaram baixa resistência física ao processo de agitação, a partição do suporte em si pode ter fragilizado a correta ancoragem dos microrganismos ao material, ocasionando dessorção. Posteriormente, para evitar a desfragmentação da casca de cupuaçu das partes que tinham 1cm² foi realizado a raspagem da parte mais frágil, chamada mesocarpo, resultando em amostras mais resistentes, melhorando significativamente os resultados de adesão de células a sua superfície (2,22±0,79x10⁹b). Os controles negativos não apresentaram crescimento de colônias nas placas.

Salim *et. al.* (2015) compararam a adsorção em casca de banana em pó, in natura e tratada com hidróxido de sódio (0,1 M), onde foi evidenciado maior eficiência no material que foi submetido ao tratamento químico. Segundo Souza (2017), três elementos principais podem afetar a adesão das comunidades microbianas: superfície, microrganismo e condições ambientais. Na superfície, porosidade, topografia rugosa, resistência termomecânica e condições compatíveis a do microrganismo com capacidade de formação de biofilme para formação de ligações físico-químicas fortes, são fatores cruciais para a eficiência

do suporte escolhido (Souza, 2017; Silva, 2016; KRAJEWSKA, 2004; GUPTA *et al.*, 2013; ZUCCA & SANJUST, 2014; SIRISHA *et al.*, 2016).

O suporte de espuma de poliuretano resultou em uma contagem de células sem diferença significativa ($p < 0,005$) com os dados obtidos nos grânulos de casca de cupuaçu. Na literatura são encontradas diferentes conclusões no uso de espumas de poliuretano para imobilização microbiana, mostrando que o gênero da espécie imobilizada é primordial no sucesso do processo. Maiqian *et al.* (2016), encontrou melhores resultados ao realizar a imobilização de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em espuma de poliuretano, do que em espigas de milho e lascas de madeira. Já Sakdapetsin, Kaokhum e Pinyakong (2021), observou que a imobilização de *Exiguobacterium sp.* foi mais bem sucedida em bio-cordão, quando comparado à espuma de poliuretano.

A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) foi a que apresentou melhor imobilização bacteriano do consórcio A3, exibindo uma viabilidade média de células imobilizadas ($5,19 \pm 0,98 \times 10^9$) significativamente diferente dos demais suportes. Wang, T., Su, E., Wang, X., Ele, A. (2020), selecionaram a bucha vegetal para transportar microrganismos na degradação de poluentes em solo, devido ao seu baixo custo, atoxicidade, biodegradabilidade e suas condições superficiais favoráveis, como grande área superficial, baixa densidade e elevado volume de poros (Liu *et al.*, 1998); no estudo a imobilização favoreceu o crescimento de *Pseudomonas sp.* e *M. alpina* e a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH). Samhan, *et al.* (2017), mostraram que rafia de folha de palmeira, esponja, bucha vegetal e qqualh de milho moído são excelentes alternativas como biocarreadores de *P. aeruginosa*, *C. sakazakii*, *K. oxytoca* e *B. bronquispetica* utilizando petróleo bruto como fonte de carbono. Kishkel *et al.* (2015), apresentou o sucesso do procedimento de imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em bucha vegetal tratada com hidróxido de sódio (2%). Estes dados corroboram os resultados deste trabalho, no qual foi demonstrado melhor imobilização do consórcio A3 em bucha vegetal. Os controles negativos não apresentaram crescimento de colônias nas placas.

Diante deste cenário, diversos outros materiais naturais, tais como os resíduos agroindustriais, podem se tornar alternativas no processo de imobilização de microrganismos. Hasanzadeh *et al.* (2020), utilizaram cascas de noz para imobilizar microrganismos para tratamento de águas com elevada

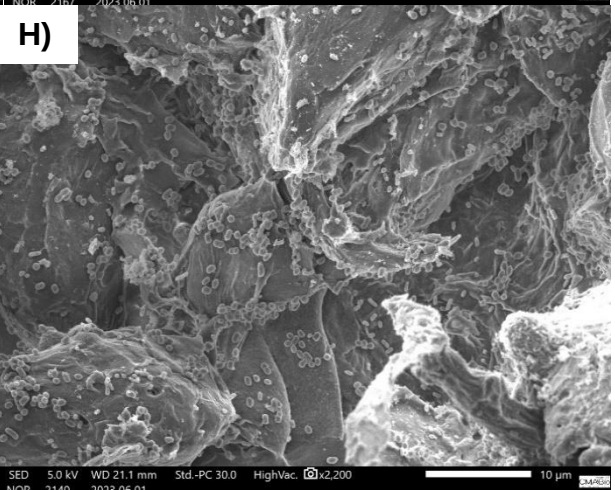
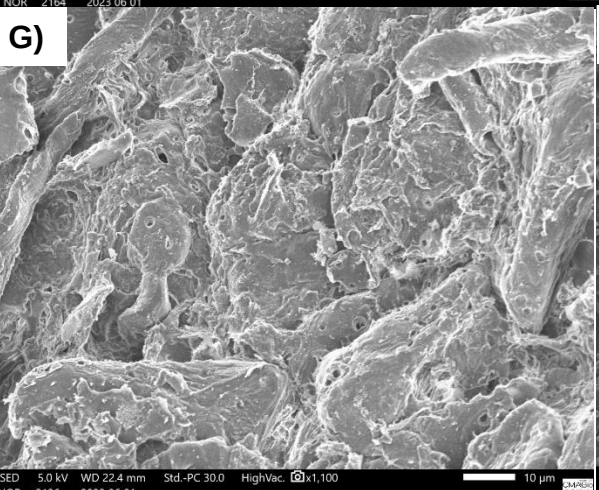
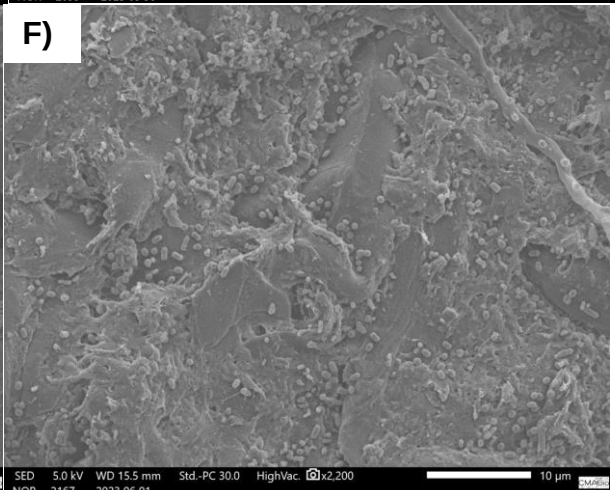
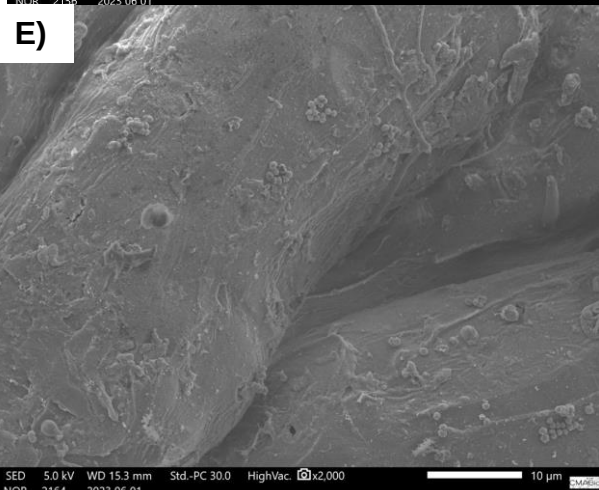
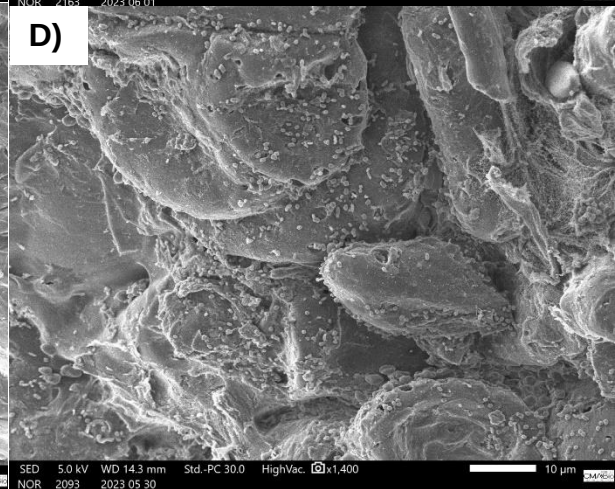
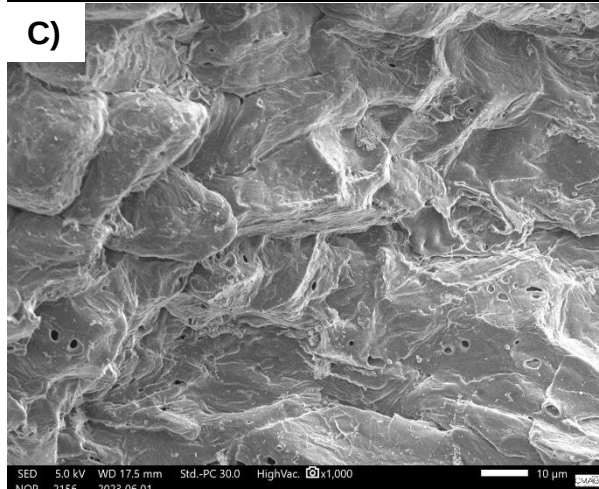
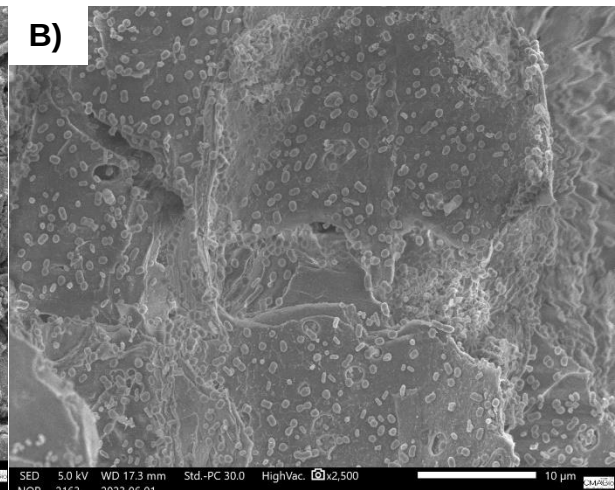
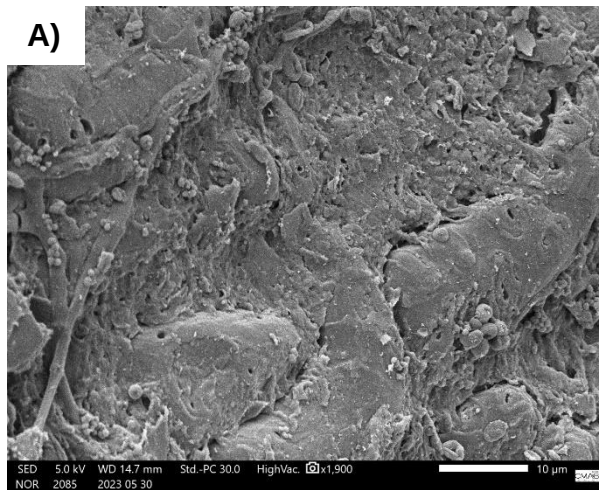
concentração salina derivada de campos petrolíferos, demonstrando uma promissora e gradual degradação dos hidrocarbonetos mais complexos. De Toledo *et al.* (2019) aplicaram a imobilização em cavacos de madeira e outros materiais oriundos de reaproveitamento de resíduos, observando que técnicas híbridas de física/sorção e biológica/imobilização são promissoras na remoção de contaminantes devido a características bioSORVENTES, promovendo até mesmo a redução do tempo do processo em alguns casos específicos.

Os resultados mostram que a bucha vegetal foi o suporte que apresentou melhor aderência das bactérias do consórcio A3, dessa forma, maior viabilidade de células imobilizadas, com um número de UFCs superior a todos os suportes utilizados.

6.4 Avaliação do Suporte por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

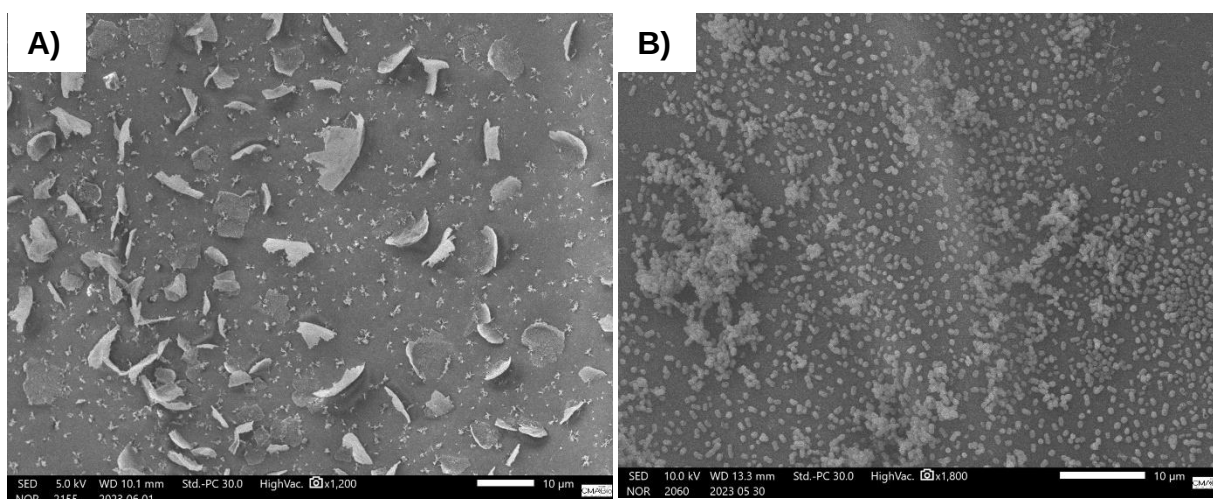
Os ensaios de microscopia são fundamentais para a avaliação da morfologia da superfície dos suportes que serão beneficiados na etapa de imobilização dos microrganismos. O MEV auxilia também na observação da quantidade e das características das células imobilizadas. A estrutura dos suportes, antes e após a imobilização do consórcio bacteriano, foi avaliada e os resultados são apresentados na Figuras 11 e 12.

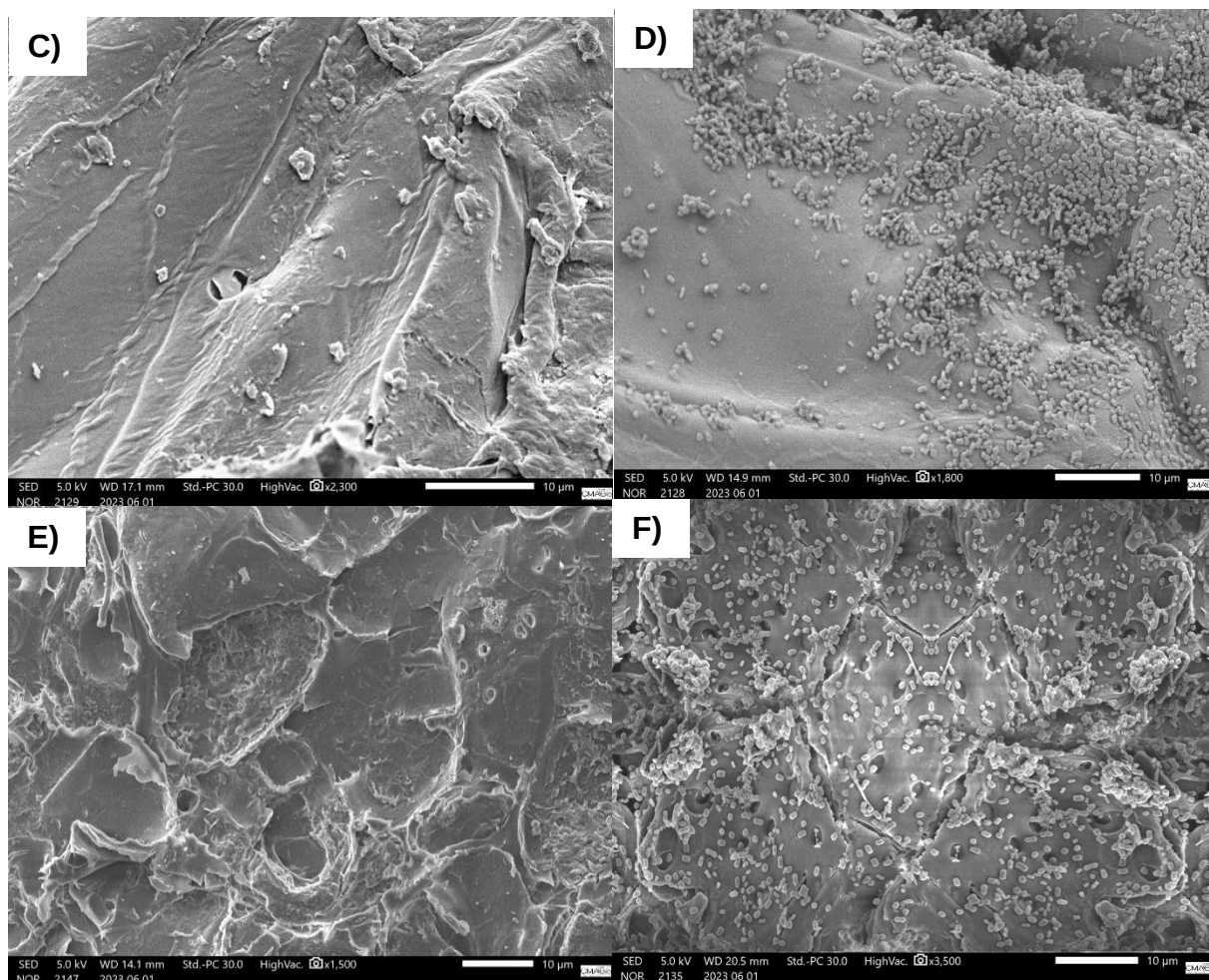
Figura 11: A) Casca de cupuaçu granulometria 1mm in natura, B) Casca de cupuaçu granulometria 1mm in natura com o consórcio A3 imobilizado, C) Casca de cupuaçu granulometria 1mm com tratamento NaOH, D) Casca de cupuaçu granulometria 1mm com tratamento NaOH com o consórcio A3 imobilizado, E) Casca de cupuaçu granulometria 2,5mm in natura, F) Casca de cupuaçu granulometria 2,5mm in natura com o consórcio A3 imobilizado, G) Casca de cupuaçu granulometria 2,5mm com tratamento NaOH e H) Casca de cupuaçu granulometria 2,5mm com tratamento NaOH com o consórcio A3 imobilizado.



De acordo com os resultados obtidos por MEV (Figura 11) dos grânulos de casca de cupuaçu, em todos os tratamentos avaliados houve a imobilização do consórcio A3 no suporte lignocelulósicas. Na Figura 11A e 11C, e na 11E e 11G, é possível observar que o tratamento químico com hidróxido de sódio foi eficaz na remoção da camada mais externa dos grânulos de 1 e 2,5 mm, mostrando uma superfície mais uniforme antes do tratamento e uma superfície mais irregular após o processo, consequentemente, aumentando a superfície de contato. Esse resultado corrobora os dados obtidos na contagem de células viáveis do tópico anterior, onde foi observado uma maior densidade de bactérias ancoradas no suporte da Figura 11D de granulometria 1 mm e tratamento com NaOH, embora sem diferença significativa, devido à baixa resistência encontrada no suporte. Esse resultado é validado também por Salim et. al. (2015) e Souza (2017), que observaram que a topografia das superfícies dos suportes foi fundamental na ancoragem da comunidade microbiana.

Figura 12: A) Casca de cupuaçu, com dimensões de aproximadamente 1 cm², B) Casca de cupuaçu, com dimensões de aproximadamente 1 cm² com o consórcio A3 imobilizado, C) Espuma de poliuretano, com dimensões de aproximadamente 1 cm³, D) Espuma de poliuretano, com dimensões de aproximadamente 1 cm³ com o consórcio A3 imobilizado E) Bucha vegetal, com dimensões de aproximadamente 1 cm³, F) Bucha vegetal, com dimensões de aproximadamente 1 cm³ com o consórcio A3 imobilizado.





Na Figura 12A é mostrada a casca de cupuaçu com uma superfície mais plana e alguns lâminas resultantes do processo de raspagem para remoção do mesocarpo. Na Figura 12B é possível observar que a extensão mais lisa da camada possibilitou uma excelente fixação do consórcio sobre a superfície, criando regiões bem estruturadas/complexas de biofilme. Nas Figuras 12C e 12D é possível observar que a camada de espuma de poliuretano se mostrou levemente irregular, sendo também capaz de imobilizar uma grande quantidade de células. A bucha vegetal, evidenciada nas Figuras 12E e 12F, mostrou uma superfície extremamente rugosa, com elevada porosidade, beneficiando a deposição das células na depressão dos sítios. Segundo Souza (2017) superfícies de topografia mais rugosa são vantajosas para colonização com favorável formação de biofilme nos poros, gerando uma proteção à comunidade bacteriana contra a tensão de cisalhamento devido aos efeitos físicos. A ultraestrutura da bucha vegetal (Figuras 12E e 12F) corrobora os resultados

obtidos para eficiência de imobilização (Tabela 8), onde foi observada uma densidade de células imobilizadas em bucha vegetal significativamente superior aos demais suportes avaliados.

A partir dos resultados obtidos de contagem células viáveis e imagens de MEV da superfície dos suportes, foram selecionados 4 suportes para serem análise de biodegradação: casca de cupuaçu com granulometria 1mm com tratamento NaOH, fragmentos de casca de cupuaçu, poliuretano e bucha vegetal.

6.5 Quantificação da degradação de diesel pelo consórcio livre e imobilizado

A análise gravimétrica é amplamente aplicada para determinação quantitativa residual de petróleo bruto em ensaios de degradação de hidrocarbonetos (Latha e Kalaivani, 2012; Shahaby, Alharthi e El Tarras, 2015). No Gráfico 3 são mostrados os resultados obtidos da biodegradação do óleo diesel pelo consórcio A3 imobilizado nos diferentes suportes, por gravimetria.

Gráfico 3: Taxa de biodegradação pelo consórcio livre e imobilizado em casca de cupuaçu com granulometria 1mm com tratamento NaOH, fragmentos de casca de cupuaçu, poliuretano e bucha vegetal.

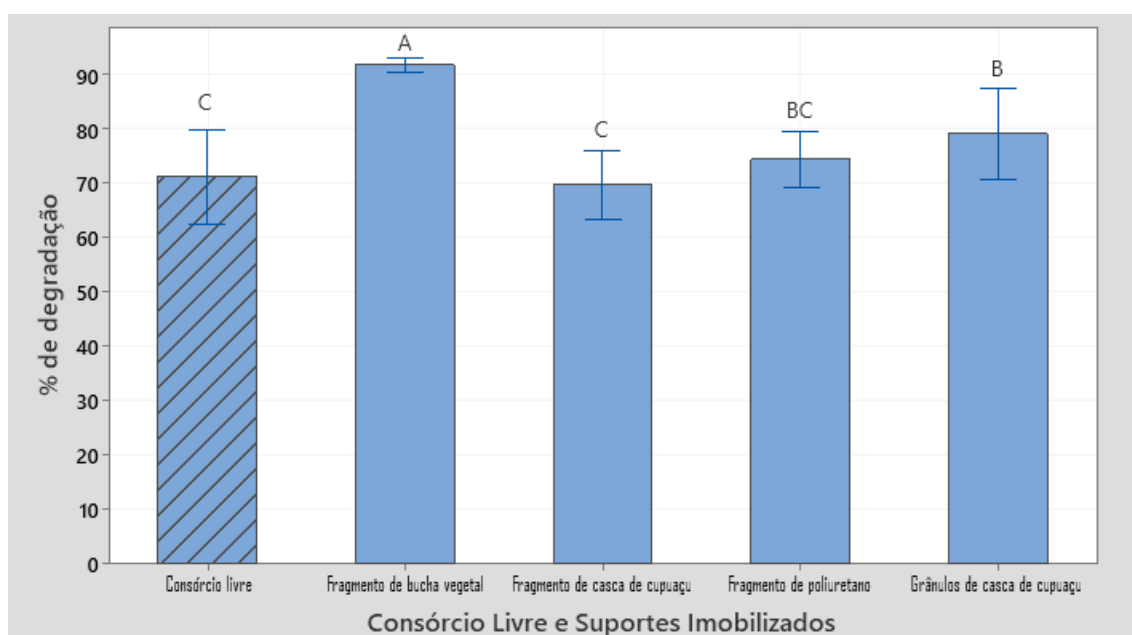


Tabela 9: Taxa de biodegradação do óleo diesel.

Suporte	Descrição	Biodegradação (%) ± dp	Controle negativo (perdas) (%)
Casca de cupuaçu	Granulometria 1mm com tratamento NaOH	79,1±3,38b	14,2±3,91
Casca de cupuaçu	1 cm ²	69,8±2,14c	10,7±1,78
Espuma de Poliuretano	1 cm ³	74,3±2,02bc	11,8±0,69
Bucha vegetal	1 cm ³	91,8±1,86a	8,1±0,92
Consórcio Livre	Bactérias não imobilizadas	71,2±3,47c	8,1±1,01

No Gráfico 3 e Tabela 9, podemos observar que todos os suportes apresentaram elevada taxa de biodegradação após o período de 7 dias. O suporte de casca de cupuaçu em fragmentos de 1 cm² (69,8±2,14) e o consórcio livre (71,2±3,47) foram os que apresentaram menor taxa de degradação do óleo diesel, não apresentando diferença significativa ($p < 0,005$) entre eles.

O grânulo de 1 mm da casca de cupuaçu tratado com NaOH (79,1±3,38) e a espuma de poliuretano (74,3±2,02) apresentaram biodegradação média superior a 74 %, sem diferença significativa ($p < 0,005$), ambos os suportes. Contudo, quando comparado a degradação mediada pelo consórcio livre, o imobilizado em casca de cupuaçu granulado (1 mm/NaOH) houve um aumento significativo na taxa de degradação do óleo diesel.

O consórcio imobilizado em bucha vegetal apresentou taxa de biodegradação significativamente superior ($p < 0,005$) ao obtido pelos demais suportes e ao consórcio A3 livre. Sah *et al.* (2023) demonstraram que a imobilização atuou como agente favorável ao processo de biodegradação, aumentando a capacidade da comunidade bacteriana de fragmentar compostos do diesel na concentração de 1%. Os autores obtiveram uma melhor taxa de

biodegradação por células imobilizadas em grânulos de alginato (80,39 %) em comparação às células livres (68,21 %). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com dados descritos na literatura.

As perdas dos controles abióticos de alguns dos suportes apresentaram resultados superiores a 10 %. O aumento da perda pode estar relacionado ao processo de bioissorção de parte óleo diesel pelo suporte lignocelulósico e/ou perdas por evaporação e manipulação durante o experimento (Stepanovic, *et al.* 2007; Toledo *et al.*, 2019).

Vários parâmetros podem afetar a taxa de degradação derivados de combustíveis fósseis, tais como temperatura, pH, concentração de diesel e tempo de cultivo (Jerin, 2021).

Shahaby, Alharthi e El Tarras (2015) descreveram o estudo da biorremediação de 4 cepas bacterianas isoladas de uma região contaminada por petróleo bruto na região de Taif na Arabia Saudita. Além de realizar a identificação das cepas, também foi realizado o monitoramento da degradação do óleo pela técnica de gravimetria pelo período de 5 dias alcançando taxas superiores a 93 %. Nwakanma e Obih (2015) ao analisarem a degradação por 11 cepas isoladas de Enubu na Nigeria, observaram que após 14 dias de incubação, obtiveram uma degradação de petróleo bruto de até 60%.

A gravimetria também é bastante aplicada para quantificar biodegradação em solos contaminados. Varjani e Upasani (2019) avaliaram o desempenho da *P. aeruginosa* em diferentes condições de bioestimulação e bioaugmentação obtendo resultados por gravimetria de até 96 % de degradação das frações de hidrocarbonetos. Anjum (2022) estudou a degradação de diesel utilizando duas cepas em solo contaminado, encontrando após 25 dias de incubação taxas de 67,57 para a *Pseudomonas sp.* e 52,95% para a *Micrococcus sp.*, entretanto, a combinação das duas espécies atingiu uma capacidade de aproximadamente 90% de redução do óleo.

Os resultados mostrados apontam que dentre todos os suportes avaliados, a bucha vegetal é o mais promissor para aplicação de imobilização do consórcio A3 para emprego em processos de biorremediação. Sendo observado uma taxa de degradação de 91,8 % do óleo diesel em um período de 7 dias. Este percentual de degradação, além de comparável aos melhores índices descritos na literatura, foi obtido após apenas 7 dias de cultivo, portanto, representando

uma vantagem sobre vários microrganismos degradadores reportados em banco de dados disponíveis. Ressalta-se ainda, que a bucha vegetal é um produto biodegradável e de fácil cultivo, e que a sua utilização como suporte para microrganismos em processos de biorremediação irá potencializar a sua cadeia produtiva.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados descritos neste trabalho, concluiu-se que o método de imobilização em bucha vegetal por adsorção do consórcio bacteriano A3 possibilitou um aprimoramento na degradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, sendo obtido um produto promissor para área de biorremediação.

O processo de formação de biofilme foi fundamental para a fixação do consórcio aos suportes escolhidos. A relação meio e tempo de incubação para as cepas isoladas e para o consórcio, foi primordial na definição dos parâmetros de trabalho para a etapa de imobilização.

A partir do MEV foi possível observar que todos os suportes apresentaram boa fixação das bactérias, entretanto, suportes com maior rugosidade e poros apresentaram maior concentração de células impregnadas nos vales.

Quando se avalia a contribuição da rugosidade dos suportes observada nas imagens de alta resolução da superfície das amostras obtidas por MEV, podemos dizer que ela foi um fator chave nas análises de contagem de células impregnadas e no processo de biodegradação. Na contagem celular foi observado que todos os suportes apresentaram uma contagem de fixação de células aproximadas, com exceção da bucha vegetal que apresentou maior contagem, levando em consideração seu elevado volume de poros.

A relação rugosidade e o método de degradação por 7 dias também influenciou fortemente os resultados de gravimetria, visto que, a agitação por um longo período favoreceu o desprendimento/dessorção das bactérias posicionadas mais externamente nos suportes com características superficiais menos rugosas.

Dando continuidade para validação do produto imobilizado como uma ferramenta sólida nos processos de biorremediação, outras atividades futuras podem ser aplicadas para avaliar a influência da bioaugmentação e biestimulação no crescimento do consórcio A3, além da análise cromatográfico do diesel degradado.

8. REFERÊNCIAS

- ABNT, NBR. 7148 - DETERMINAÇÃO DA MASSA ESPECÍFICA, DENSIDADE RELATIVA E API MÉTODO DO DENSÍMETRO. PRODUTOS DE PETRÓLEO-DETERMINAÇÃO DA COR: MÉTODO DO DENSÍMETRO. ABNT, 2001.
- ABUHAMED, T. ET AL. KINETICS MODEL FOR GROWTH OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* F1 DURING BENZENE, TOLUENE AND PHENOL BIODEGRADATION. PROCESS BIOCHEMISTRY, V. 39, P. 983 – 988, 2004.
- ABURTO, A.; PEIMBERT, M. DEGRADATION OF A BENZENE-TOLUENE MIXTURE BY HYDROCARBONADAPTED BACTERIAL COMMUNITIES. ANNALS OF MICROBIOLOGY, V. 61, P. 553 – 562, 2011.
- AECKERSBERG F, BAK F, WIDDEL F (1991) ANAEROBIC OXIDATION OF SATURATED HYDROCARBONS TO CO₂ BY A NEW TYPE OF SULFATE-REDUCING BACTERIUM. ARCH MICROBIOL 156: 5–14.
- AECKERSBERG F, RAINEY FA, WIDDEL, F (1998) GROWTH, NATURAL RELATIONSHIPS, CELLULAR FATTY ACIDS AND METABOLIC ADAPTATION OF SULFATE-REDUCING BACTERIA THAT UTILIZE LONG-CHAIN ALKANES UNDER ANOXIC CONDITIONS. ARCH MICROBIOL 170: 361–369.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. BIOMASS PRETREATMENT: FUNDAMENTALS TOWARD APPLICATION. BIOTECHNOLOGY ADVANCES. V.29, P.675–685, 2011.
- ALI PARTOVINIA, ALI ABOLHASANI SOORKI, MOJTABA KOOSHA. SYNERGISTIC ADSORPTION AND BIODEGRADATION OF HEAVY CRUDE OIL BY A NOVEL HYBRID MATRIX CONTAINING IMMOBILIZED BACILLUS LICHENIFORMIS: AQUEOUS PHASE AND SOIL BIOREMEDIATION, ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, VOLUME 222, 2021, 112505, ISSN 0147-6513, [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.ECOENV.2021.112505](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112505).
- ALMEIDA-VAL, V. M. F; OLIVEIRA, A. R; SILVA, M. N. P; NOZAWAI, M. S. F; ARAÚJO, R. M; VAL, A. L; NOZAWA, S. R. ANOXIA-AND HIPOXIA-INDUCED EXPRESSION OF LDH-A IN THE AMAZON OSCAR, ASTRONOTUS CRASSIPINIS, GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, V.34, N.2, 2011.
- ANIEFIOK, N. D. E; IBOK U. J; MARGARET U; SUNDAY W. P. PETROLEUM EXPLORATION AND PRODUCTION: PAST AND PRESENT ENVIRONMENTAL ISSUES IN THE NIGERIA'S, SCIENCE AND EDUCATION PUBLISHING, 2013
- ANJOS, R. B. DOS. AVALIAÇÃO DE HPA E BTEX NO SOLO E ÁGUA SUBTERRÂNEA, EM POSTOS DE REVENDA DE COMBUSTÍVEIS: ESTUDO DE CASO NA CIDADE DE NATAL-RN. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, 2012.
- ANJUM, S. (2022). BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DE MOTOR DIESEL POR MICRORGANISMOS E COMPARAÇÃO DE SEU POTENCIAL DE BIOREMEDIÇÃO: O MÉTODO GRAVIMÉTRICO. INTERNATIONAL

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. O PETRÓLEO (2017). DISPONÍVEL EM: <HTTP://WWW.ANP.GOV.BR/WWWANP/PETROLEO-EDERIVADOS2/PETROLEO>. ACESSO EM: 20 JUN. 2021.

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO E PROCESSAMENTO DE GÁS NATURAL (2020). DISPONÍVEL EM: HTTPS://WWW.GOV.BR/ANP/PT-BR/ASSUNTOS/PRODUCAO-DE-DERIVADOS-DE-PETROLEO-E-PROCESSAMENTO-DE-GAS-NATURAL/PRODUCAO-DE-DERIVADOS-DE-PETROLEO-E-PROCESSAMENTO-DE-GAS-NATURAL/PETROLEO-E-DERIVADOS. ACESSO EM: 24 JUN. 2021.

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, (2018). O REFINO NO BRASIL CENÁRIO ATUAL, OPORTUNIDADES E AÇÕES PARA A CRIAÇÃO DE UM MERCADO ABERTO, DINÂMICO E COMPETITIVO. DISPONÍVEL EM: MICROSOFT POWERPOINT - ANP_PPT_DECIOODDONE_REFINO_19_04 FINAL.PPTX.

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, (2021). BOLETIM DA PRODUÇÃO DE PETRÓLEO E GÁS NATURAL (2021). MARÇO 2021/ NÚMERO 127]. DISPONÍVEL EM: HTTPS://WWW.GOV.BR/ANP/PT-BR/CENTRAIS-DE-CONTEUDO/PUBLICACOES/BOLETINS-ANP/BMP/2021/2021-03-BOLETIM-PDF.PDF. ACESSO EM: 20 JUN. 2021.

ANTUNES, ALINE; DE PAULO, LUIS FERNANDO; CAETANO, MILENE DALILLA; SCHULTZ, THIAGO NAGEIA; UBER, ANA PAULA. PRODUÇÃO DE BIOFILME E PADRÃO DE ADESÃO A CÉLULAS E SUPERFÍCIES ABIÓTICAS DE AMOSTRAS DE ACINETOBACTER BAUMANNII BIOFILM PRODUCTION AND STANDARD ADHERENCE TO THE CELLS AND ABIOTIC SURFACES SAMPLES OF ACINETOBACTER BAUMANNII. REVISTA UNINGÁ, MARINGÁ – PR, N.21, P.XX-XX, JUL./SET. 2009.

ARAÚJO, ROMANA. VALORAÇÃO ECONÔMICA DO DANO AMBIENTAL EM INQUÉRITO CIVIL PÚBLICO. BRASÍLIA: ESCOLA SUPERIOR DO MINISTÉRIO PÚBLICO DA UNIÃO, 2011. 200 P.

ARAÚJO, SOLANGE PIRES DE. PRODUÇÃO DE INÓCULO MICROBIANO, OBTIDO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS NA AMAZÔNIA, COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO. 2014. 157 F. TESE (DOCTORADO EM BIOTECNOLOGIA) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, MANAUS, 2014.

ASHOORI, S; SHARIFI, M; MASOUMI, M; SALEHI, M. M. THE RELATIONSHIP BETWEEN S.A.R.A. FRACTIONS AND CRUDE OIL STABILITY, EGYPTIAN JOURNAL OF PETROLEUM, VOLUME 26, ISSUE 1, MARCH 2017.

- ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR FUEL OILS, SCIENCES INTERNATIONAL, ATLANTA, GEORGIA.1995
- AYED, H.B.; JEMIL, N.; MAALEJ, H.; BAYOUNDH, A.; HMIDET, N.; NASRI, M. ENHANCEMENT OF SOLUBILIZATION AND BIODEGRADATION OF DIESEL OIL BY BIOSURFACTANT FROM BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS AN6. INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, V. 99, P. 8-14. 2015.
- BAÊSSO, RENATO CERQUEIRA GUARÇONI. BIODEGRADAÇÃO DE INIBIDORES DE INCRUSTAÇÕES POR MICRORGANISMOS. DISSERTAÇÃO (DOUTORADO) – UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – INSTITUTO DE QUIMICA, 2022.
- BALKE, N. S. E BROWN, S. P. OIL SUPPLY SHOCKS AND THE US ECONOMY: AN ESTIMATED DSGE MODEL. ENERGY POLICY, V. 116, P. 357-372, 2018.
- BALL, H. A.; JOHNSON, H. A.; REINHARD, M.; SPORMANN, A. M. (1996). INITIAL REACTIONS IN ANAEROBIC ETHYLBENZENE OXIDATION BY A DANITRIFYING BACTERIUM, STRAIN EB1. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. V. 178, P. 5755-5761.
- BARRETO, R. A. FOSSIL FUELS, ALTERNATIVE ENERGY AND ECONOMIC GROWTH. ECONOMIC MODELLING, V. 75, P. 196-220, 2018.
- BASTOS, G; LUPARELLI, A., (2015). BACIA DE CAMPOS. DISPONÍVEL EM: ANP. ACESSO EM 22 JUN. 2021.
- BEAZLEY, M. J.; MARTINEZ, M.; RAJAN, S.; POWELL, J.; PICENO, A.; TOM, L. M.; ANDERSEN, G. L.; HAZEN, T. C.; NOSTRAND, J. D.; JIZHONG ZHOU, B.; PATRICIA A.; SOBECKY, P. A. MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS OF A COASTAL SALT MARSH AFFECTED BY THE DEEPWATER HORIZON OIL SPILL. PLOS ONE, V. 7, 2012.
- BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. IMPORTANCE OF CHEMICAL PRETREATMENT FOR BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS. RENEWABLE AND SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS. V.36, P.91–106, 2014.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. BIOSURFACTANTES, CAPÍTULO 7, P. 151 – 184. IN: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. MICROBIOLOGIA AMBIENTAL. 2ª EDIÇÃO REVISTA E AMPLIADA. JAGUARIÚNA: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 647P., 2008.
- BEZERRA, T. M. S.; BASSAN, J. C.; SANTOS, V. T. O; FERRAZ, A.; MONTI, R. COVALENT IMMOBILIZATION OF LACCASE IN GREEN COCONUT FIBER AND USE IN CLARIFICATION OF APPLE JUICE. PROCESS BIOCHEMISTRY, V.50, P. 417–423, 2015.
- BHAT, SARITA G E NAMBISAN, PADMA. MICROBIAL BIOPRODUCTS (PP.70-96). CHAPTER: 4. PUBLISHER: DIRECTORATE OF PUBLIC RELATION AND

PUBLICATION COCHIN UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KOCHI-682022, KERALA, INDIA. 2014.

BISOGNIN, RAMIRO PEREIRA *ET AL.* ANÁLISE DO POTENCIAL MICROBIANO DE UMA BIOPILHA NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO. *ENG. SANIT. AMBIENT.*, RIO DE JANEIRO, V. 23, N. 3, P. 517-526, JUNE 2018. AVAILABLE FROM <[HTTP://WWW.SCIELO.BR/SCIELO.PHP?SCRIPT=SCI_ARTTEXT&PID=S1413-41522018000300517&LNG=EN&NRM=ISO](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522018000300517&lng=en&nrm=iso)>. ACESSO EM: 12 JUL. 2021.

BITENCOURT, JOSÉ A.P. *ET AL.* PROTISTS AND BACTERIA INTERACTIONS IN THE PRESENCE OF OIL. *AN. ACAD. BRAS. CIÊNC.*, RIO DE JANEIRO, V. 86, N. 2, P. 745-754, JUNE 2014. AVAILABLE FROM <[HTTP://WWW.SCIELO.BR/SCIELO.PHP?SCRIPT=SCI_ARTTEXT&PID=S0001-37652014000200745&LNG=EN&NRM=ISO](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652014000200745&lng=en&nrm=iso)>. ACESSO EM: 12 JUL. 2021.

BNDES. BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. PRODUÇÃO DE PETRÓLEO TERRESTRE NO BRASIL (2019). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WEB.BNDES.GOV.BR/BIB/JSPUI/BITSTREAM/1408/16962/3/PRART214594_PRODUCAO%20DE%20PRETROLEO%20TERRESTRE%20NO%20BRASIL_P_BD.PDF](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/16962/3/PRART214594_PRODUCAO%20DE%20PRETROLEO%20TERRESTRE%20NO%20BRASIL_P_BD.PDF). ACESSO EM: 17 JUN. 2021.

BONIN P, CRAVO-LAUREAU C, MICHETAY V, HIRSCHLER-RÉA A (2004) THE ANAEROBIC HYDROCARBON-DEGRADING BACTERIA: AN OVERVIEW. *OPHELIA* 58: 243–254.

BOOPATHY, R. 2000. FACTORS LIMITING BIOREMEDIATION TECHNOLOGIES. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 74: 63-67.

BORDALO, C. D. M. A VALORAÇÃO ECONÔMICA COMO FERRAMENTA PARA COMPENSAÇÃO DE DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO ENERGÉTICO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2012.

BRADY D, JORDAN J. ADVANCES IN ENZYME IMMOBILISATION. *BIOTECHNOL LETT.* 2009;31(11):1639-50.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. RESOLUÇÃO NO 357 DE 17 DE MARÇO DE 2005. DIÁRIO OFICIAL DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, BRASÍLIA.

BRASIL. DECRETO Nº 3.334, DE 05 DE JULHO DE 1899. DIÁRIO OFICIAL [DA] REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, BRASÍLIA, DF, 05 JUL. 1899. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW2.CAMARA.LEG.BR/LEGIN/FED/DECRET/1824-1899/DECRETO-3334-5-JULHO-1899-511477-PUBLICACAOORIGINAL-1-PE.HTML#:~:TEXT=APPROVA%20O%20REGULAMENTO%20PARA%20AS,LHE%20FOI%20CONCEDIDA%20PELO%20ART.&TEXT=560%2C%20DE%20](https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1824-1899/decreto-3334-5-julho-1899-511477-publicacaooriginal-1-pe.html#:~:text=APPROVA%20O%20REGULAMENTO%20PARA%20AS,LHE%20FOI%20CONCEDIDA%20PELO%20ART.&text=560%2C%20DE%20)

31%20DE%20DEZEMBRO,PARA%20AS%20CAPITANIAS%20DOS%20PORT
OS. ACESSO EM: 15 MAR. 2021.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 17 DE MAIO DE 2010. ESTABELECE OS PROCEDIMENTOS E AS EXIGÊNCIAS A SEREM ADOTADOS PARA EFEITO DE REGISTRO, RENOVAÇÃO DE REGISTRO E ANUÊNCIA PRÉVIA PARA A REALIZAÇÃO DE PESQUISA E EXPERIMENTAÇÃO COM PRODUTOS REMEDIADORES. DIÁRIO OFICIAL [DA] REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, BRASÍLIA, DF, 17 MAI. 2010. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.GOV.BR/IBAMA/PT-BR/CENTRAIS-DE-CONTEUDO/IN05-REMEDIAADORES-2010-PDF](https://www.gov.br/ibama/pt-br/centrais-de-conteudo/in05-remediadores-2010-pdf). ACESSO EM: 15 JAN. 2022.

BRASIL. LEI Nº 1532/1982: DISPÕEM SOBRE A POLÍTICA ESTADUAL DA PREVENÇÃO E CONTROLE DA POLUIÇÃO. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, 1981. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.IPAAM.AM.GOV.BR/WP-CONTENT/UPLOADS/2021/01/LOE-1.532-82-POLITICA-ESTADUAL-DO-MEIO-AMBIENTE.PDF](http://www.ipaam.am.gov.br/wp-content/uploads/2021/01/LOE-1.532-82-POLITICA-ESTADUAL-DO-MEIO-AMBIENTE.PDF). ACESSO EM 02 AGO. 2021.

BRASIL. LEI Nº 2367/1995: ALTERA DISPOSITIVOS DA LEI Nº 2.330, DE 29 DE MAIO DE 1995, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, 1995. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://SAPL.AL.AM.LEG.BR/MEDIA/SAPL/PUBLIC/NORMAJURIDICA/1995/6822/6822_TEXTO_INTEGRAL.PDF](https://sapl.al.am.leg.br/media/sapl/public/normajuridica/1995/6822/6822_TEXTO_INTEGRAL.PDF). ACESSO EM 02 AGO. 2021.

BRASIL. LEI Nº 6.938/1981: DISPÕE SOBRE A POLÍTICA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, SEUS FINS E MECANISMOS DE FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, 1981. DISPONÍVEL EM: [HTTP://PLANALTO.GOV.BR/CCIVIL_03/LEIS/L6938.HTM](http://planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6938.htm). ACESSO EM 02 AGO. 2021.

BRASIL. LEI Nº 12.351/2010: DISPÕE SOBRE A EXPLORAÇÃO E A PRODUÇÃO DE PETRÓLEO, DE GÁS NATURAL E DE OUTROS HIDROCARBONETOS FLUIDOS, SOB O REGIME DE PARTILHA DE PRODUÇÃO, EM ÁREAS DO PRÉ-SAL E EM ÁREAS ESTRATÉGICAS; CRIA O FUNDO SOCIAL - FS E DISPÕE SOBRE SUA ESTRUTURA E FONTES DE RECURSOS; ALTERA DISPOSITIVOS DA LEI Nº 9.478, DE 6 DE AGOSTO DE 1997. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, 1995. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.PLANALTO.GOV.BR/CCIVIL_03/_ATO2007-2010/2010/LEI/L12351.HTM](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/L12351.htm). ACESSO EM 02 AGO. 2021.

BRASIL. LEI Nº 2.004/1953: DISPÕE SOBRE A POLÍTICA NACIONAL DO PETRÓLEO E DEFINE AS ATRIBUIÇÕES DO CONSELHO NACIONAL DO PETRÓLEO, INSTITUI A SOCIEDADE ANÔNIMA, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, 1995. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.PLANALTO.GOV.BR/CCIVIL_03/LEIS/L2004.HTM](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L2004.htm). ACESSO EM 02 AGO. 2021.

BRASIL. LEI Nº 3.590/2011: DISPÕE SOBRE A CRIAÇÃO DA SECRETARIA DE E S
T A D O D E M I N E R A Ç Ã O , GEODIVERSIDADE E RECURSOS HÍDRICOS

– SEMGRH, DEFININDO SUAS FINALIDADES, COMPETÊNCIAS E ESTRUTURA ORGANIZACIONAL, FIXANDO O SEU QUADRO DE CARGOS COMISSIONADOS E ESTABELECENDO OUTRAS PROVIDÊNCIAS. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, 1995. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://SAPL.AL.AM.LEG.BR/MEDIA/SAPL/PUBLIC/NORMAJURIDICA/2011/8045/8045_TEXTO_INTEGRAL.PDF](https://sapl.al.am.leg.br/media/sapl/public/normajuridica/2011/8045/8045_TEXTO_INTEGRAL.PDF). ACESSO EM 02 AGO. 2021.

BRASIL. LEI Nº 9.605/1998: DISPÕE SOBRE AS SANÇÕES PENAIS E ADMINISTRATIVAS DERIVADAS DE CONDUTAS E ATIVIDADES LESIVAS AO MEIO AMBIENTE, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, 1995. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.PLANALTO.GOV.BR/CCIVIL_03/LEIS/L9605.HTM](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm). ACESSO EM 02 AGO. 2021.

BRASIL. LEI Nº 9.996/2000: DISPÕE SOBRE A PREVENÇÃO, O CONTROLE E A FISCALIZAÇÃO DA POLUIÇÃO CAUSADA POR LANÇAMENTO DE ÓLEO E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NOCIVAS OU PERIGOSAS EM ÁGUAS SOB JURISDIÇÃO NACIONAL E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, 1995. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.PLANALTO.GOV.BR/CCIVIL_03/LEIS/L9966.HTM#:~:TEXT=LEI%20NO%209.966%2C%20DE%2028%20DE%20ABRIL%20DE%202000.&TEXT=DISP%C3%B5E%20SOBRE%20A%20PREVEN%C3%A7%C3%A3O%2C%20O,NACIONAL%20E%20D%C3%A1%20OUTRAS%20PROVID%C3%A2NCIAS. ACESSO EM 02 AGO. 2021.](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9966.htm#:~:text=Lei%20n%C3%B5%209.966%2C%20de%2028%20de%20abril%20de%202000.&text=disp%C3%B5e%20sobre%20a%20preven%C3%A7%C3%A3o%2C%20o,nacional%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%A2ncias. Acesso em 02 ago. 2021.)

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. IMMOBILIZATION OF ENZYMES: A LITERATURE SURVEY. IN IMMOBILIZATION OF ENZYMES AND CELLS/ EDITED BY JOSE M. GUINAN. — 2ND ED.P. ; CM — (METHODS IN BIOTECHNOLOGY; 22). TOTOWA, NEW JERSEY: EDITORA HUMANA PRESS INC. 2006.

BUCKMAN (1997). PÁGINA DA BACKMAN DA INTERNET. DISPONIVEL EM:
<WEBMASTER@BUCKMAN.COM>. ACESSO EM: MARÇO DE 2023.

BUGG, T.D.H.; WINFIELD, C.J. ENZYMATIC CLEAVAGE OF AROMATIC RINGS: MECHANISTIC ASPECTS OF THE CATECHOL DIOXYGENASES AND LATER ENZYMES OF BACTERIAL OXIDATIVE CLEAVAGE PATHWAYS. NATURAL PRODUCT REPORTS. P. 513-530. 1998.

CAO, Y.; XU, Z.; LING, N.; YUAN, Y.; YANG, X.; CHEN, L.; SHEN, B.; SHEN, Q. R. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LIPOPEPTIDES PRODUCED BY *B. SUBSTILLIS* SQR 9 FOR SUPPRESSING FUSARIUM WILT OF CUCUMBER. SCIENTIA HORTICULTURAE. V.135. P.32-9. 2012.

CARAHER, E.; REYNOLDS, G.; MURPHY, P.; MCCLEAN, S.; CALLAGHAN, M.
COMPARISON OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *BURKHOLDERIA*
CEPACIA COMPLEX ORGANISMS WHEN GROWN PLANKTONICALLY OR
AS BIOFILM IN VITRO. EUR. J. CLIN. MICROBIOL. INFECT. DIS., V. 26, P.
213–216. 2006.

- CARDENES G. O. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ACINETOBACTER JUNII SB132 NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO DIESEL. MANAUS, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2017.
- CARVALHO, J.R. DE C.; ROCHA FILHO, G.N. DA; SERRUYA, H. ANÁLISE DOS ÓLEOS DOS TRÊS FRUTOS COMESTÍVEIS DA REGIÃO AMAZÔNICA - CUPUAÇU THEOBROMA GRANDIFLORUM SPRENG SHUM, STERCULIACEAE), MARI (PARAQUEIBA PARAENSIS. ICACINACEAE) E UXI (ENDOPLEURA UXI, HUMIRICACEAE). IN: ENCONTRO DE PROFISSIONAIS DA QUÍMICA DA AMAZÔNIA. ANAIS. 1, 1980. BELÉM; 2, 1981. SÃO LUIZ. ANAIS. BELÉM, CFQ, 1981. P.187-196.
- CARVALHO, LUIZ CARLOS CABRAL. LOGÍSTICA DE ABASTECIMENTO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO NA REGIÃO DE INFLUÊNCIA DA REFINARIA INSTALADA EM MANAUS: ESTUDO DE VIABILIDADE. FLORIANÓPOLIS, 2002. 163 F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, FLORIANÓPOLIS, 2002.
- CASSIDY, D. P; HUDAK, A. J. MICROORGANISM SELECTION AND BIOSURFACTANT PRODUCTION IN A CONTINUOUSLY AND PERIODICALLY OPERATED BIOSLURRY, JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS, V. 84, P. 253-264. 2001
- CASTRO JUNIOR, O. A.; DA SILVA, R. R. [2013]. BREVES NOTAS SOBRE A LIMITAÇÃO DA RESPONSABILIDADE CIVIL NO TRANSPORTE MARÍTIMO DE CARGAS PERIGOSAS E SUBSTÂNCIAS NOCIVAS À LUZ DA CONVENÇÃO HNS 2010. DISPONÍVEL EM: . ACESSO EM: 20 JUL. 2021.
- 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. TESE (DOUTORADO) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE. 2021.
- CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. BREVE HISTÓRIA DO PETRÓLEO NO BRASIL E EM SÃO PAULO E PRINCIPAIS ACIDENTES, 2012. DISPONÍVEL EM: ACESSO EM: 05 JUL. 2021.
- CHAERUN S. K., TAZAKI K., ASADA R., KOGURE K. (2004). BIOREMEDIATION OF COASTAL AREAS 5 YEARS AFTER THE NAKHODKA OIL SPILL IN THE SEA OF JAPAN: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROCARBON-DEGRADING BACTERIA. ENVIRON. INT. 30 911–922. 10.1016/J.ENVINT.2004.02.007
- CHANG, JACLYN ML * ; MCCANNA, DAVID J. † ; SUBBARAMAN, LAKSHMAN N. † ; JONES, LYNDON W. ‡ . Eficácia de Antimicrobianos contra Biofilmes de Achromobacter e Pseudomonas. Optometria e Ciência da Visão 92(4):p 506-513, abril de 2015. | DOI: 10.1097/OPX.0000000000000549

- CHAVES, L. DA C. D. ESTUDO DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM SUPERFÍCIES EM CONTACTO COM ÁGUA POTÁVEL. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UNIVERSIDADE DO MINHO, DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA, 2004.
- CHIEN, Chih-Ching; LIN, Bo-Chou; WU, Chun-Hsien. Formação de biofilme e resistência a metais pesados por *Pseudomonas* sp. *Revista de Engenharia Bioquímica*, v. 78, p. 132-137, 2013.
- CHIMIN, R. Q. F. ESTUDO DA EVOLUÇÃO DE CLORETOS NO PROCESSO DE DESTILAÇÃO DE PETRÓLEO. DISSERTAÇÃO, 2013.
- CHOUDHURY, A. K. R. INTRODUCTION TO ENZYMES. 1ST ED. ÍNDIA, ELSEVIER LTD, 2018. 16 P. V.1.
- CHURCHILL SA, HARPER JP, CHURCHILL PF. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A MYCOBACTERIUM SPECIES CAPABLE OF DEGRADING THREE- AND FOUR-RING AROMATIC AND ALIPHATIC HYDROCARBONS. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 1999; 65:549-552.COATES ET AL., 2001
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. SURFACE-ACTIVE AGENTS FROM TWO *BACILLUS* SPECIES. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, V. 53, N. 2, P. 224-229, 1987.
- COSTA D. M. B. DA. A VALORAÇÃO ECONÔMICA COMO FERRAMENTA PARA COMPENSAÇÃO DE DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO. 2012.
- COSTA, A. C. A.; FRANÇA, F. P. THE USE OF SEaweEDS AS IMMOBILIZATION SUPPORTS FOR MICROORGANISMS USED IN CONTINUOUS CADMIUM BIOSORPTION. *BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES*, KEW, V. 10, N. 10, P. 761-766, 1996.
- COSTA, M. C. ET AL. CONSERVAÇÃO DE POLAPA DE CUPUAÇU [*THEOBROMA GRANDIFLORUM* (WILLD EX SPRENG.) SCHUM] POR MÉTODOS COMBINADOS. *REVISTA BRASILEIRA DE FRUTICULTURA*, V. 25, P. 213 - 215, 2003.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E.P. BACTERIAL BIOFILMS: A COMMON CAUSE OF PERSISTENT INFECTIONS. *SCIENCE*, V. 284, P. 1318-1322, 1999.
- COUTINHO, R. B. S. INDUSTRIALIZAÇÃO DAS SEMENTES DE CUPUAÇU (*THEOBROMA BICOLOR* HUMBOLDT). *REVISTA DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA DA AMAZÔNIA*, V. 11, N. 4, P. 283-286, 1969.
- COVIZZI, L. G. ET AL. IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. *SEMINA: CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS*, V. 28, P. 143–160, 2007.
- CRUZ, G.G. 2009. DEGRADAÇÃO DE GASOLINA, ÓLEO DIESEL E QUEROSENE POR *RHODOTORULA AURANTIACA* UFPEDA 845. MONOGRAFIA DA

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, RECIFE, BRASIL.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. IMMOBILIZATION OF INVERTASE ON RICE HUSK USING OLYETHYLENIMINE. J. OF BIOCH. AND BIOPHYSICAL METHODS, V.52, P.59-62, 2002.

DAGLEY, S.A (1975). BIOCHEMICAL APPROACH TO SOME PROBLEMS OF ENVIRONMENTAL POLLUTION. ESSAYS IN BIOCHEMISTRY, 11: 81-138.

DAL RI, E. S. AVALIAÇÃO DO PROCESSO PRODUTIVO E DA QUALIDADE DE POLPAS DE FRUTAS COMERCIALIZADAS EM BOA VISTA/RR. 2006. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM RECURSOS NATURAIS) – UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA, BOA VISTA, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. APLICAÇÕES SINTÉTICAS DE LIPASES IMOBILIZADAS EM POLÍMEROS. QUIMICA NOVA, V. 27, N. 4, P. 623–630, 2004.

DALTIN, D. TENSOATIVOS: QUÍMICA, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES. SÃO PAULO: BLUCHER, 2011.

DAS, N., & CHANDRAN, P. MICROBIAL DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBON CONTAMINANTS: AN OVERVIEW. BIOTECHNOLOGY RESEARCH INTERNATIONAL, 2011.

DE TOLEDO, RA, HIN CHAO, U., SHEN, T. *ET AL.* DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS HÍBRIDOS PARA REMOÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS, PLASTIFICANTES E COMPOSTOS FARMACEUTICAMENTE ATIVOS UTILIZANDO LODO DE ESGOTO, RESÍDUOS DE PNEUS E CAVACOS DE MADEIRA COMO SORVENTES E MATRIZES DE IMOBILIZAÇÃO MICROBIANA. ENVIRON SCI POLLUT RES 26 , 11591–11604 (2019). [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S11356-018-2877-2](https://doi.org/10.1007/s11356-018-2877-2).

DELLA-FLORA I. K., DUPONT G. K., CLERICI N. J., SERAFINI C. G., HOFFMANN J. I., WELTER N., PORTA P. G. D. BRAZ. J. OF DEVELOP., CURITIBA, V. 6, N. 9, P. 72256-72269, SEP. 2020.

DENOME, S. A., STANLEY, D. C., OLSON, E. S., YOUNG, K. D. METABOLISM OF DIBENZOTHIOPHENE AND NAPHTHALENE IN PSEUDOMONAS STRAINS: COMPLETE DNA SEQUENCE OF AN UPPER NAPHTHALENE CATABOLIC PATHWAY. JOURNAL BACTERIOLOGICAL, 175:6890-690, 1993.

DEON, M. C., ROSSI, A. DE DAL'MAGRO, C., REINEHR, C. R., COLLA, L. M. BIORREMEDIÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM RESÍDUOS OLEOSOS ATRAVÉS DE BIOAUMENTAÇÃO E ATENUAÇÃO NATURAL. SEMINA: CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS, 33(1):73-82, 2012.

DÍAZ, E. BACTERIAL DEGRADATION OF AROMATIC POLLUTANTS: A PARADIGM OF METABOLIC VERSATILITY. INTERNATIONAL MICROBIOLOGY. N. 7, P. 173-180. 2004.

- DURVAL I. J. B. ESTUDO DE UM BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR ESPÉCIES DE BACILLUS ISOLADAS DE ÁGUA DO MAR E SEU POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO DE DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO. RECIFE, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2017.
- DWEVEDI, A. (2016). ENZYME IMMOBILIZATION: ADVANCES IN INDUSTRY, AGRICULTURE, MEDICINE, AND THE ENVIRONMENT USA: SPRINGER. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1007/978-3-319-41418-8](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-41418-8).
- DYK, J. S. V.; PLETSCHE, B. I. A REVIEW OF LIGNOCELLULOSE BIOCONVERSION USING ENZYMATIC HYDROLYSIS AND SYNERGISTIC COOPERATION BETWEEN ENZYMES – FACTORS AFFECTING ENZYMES, CONVERSION AND SYNERGY. BIOTECHNOLOGY ADVANCES. V.30, P.1458–1480, 2012.
- EHRENREICH, P.; BEHREND, A.; HARDER, J.; WIDDEL, F. (2000). EHRENREICH P, BEHREND A, HARDER J, WIDDEL F.. ANAEROBIC OXIDATION OF ALKANES BY NEWLY ISOLATED DENITRIFYING BACTERIA. ARCH MICROBIOL 173: 58-64. ARCHIVES OF MICROBIOLOGY. 173. 58-64. 10.1007/S002030050008.
- EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM: BENZENE. CASRN 71-43-2, 2003. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.EPA.GOV/IRIS/SUBST/0276.HTM](http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm). ACESSO EM 22 JUN. 2021.
- ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. PRINCIPLES, TECHNIQUES, AND APPLICATIONS OF BIOCATALYST IMMOBILIZATION FOR INDUSTRIAL APPLICATION. APPLIED MICROBIOLOGY BIOTECHNOLOGY. V.99, P.2065–2082, 2015.
- EUGRIS – EUROPEAN INFORMATION SYSTEM SOIL AND GROUNDWATER. CONSULTA GERAL A HOMEPAGE. 2008. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.EUGRIS.INFO](http://www.eugris.info) ACESSO EM 22 JUN. 2021.
- FARIA, D. J. BIORREMEDIAÇÃO EM DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO COM ÊNFASE NA TÉCNICA DE ENCAPSULAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS CONSORCIADOS. PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2019.
- FEARNSIDE, P.M. 2019. O DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO NO NORDESTE: UM ALERTA PARA O PRÉ-SAL E PARA AMAZÔNIA. AMAZÔNIA REAL, 28 DE OUTUBRO DE 2019.
- FEARNSIDE, P.M. 2020. OIL AND GAS PROJECT THREATENS BRAZIL'S LAST GREAT BLOCK OF AMAZON FOREST. MONGABAY, 09 DE MARÇO DE 2020.
- FELTRE, R. QUÍMICA ORGÂNICA. 2004
- FENT, K. 2004. ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS AT CONTAMINATED SITES. TOXICOLOGY, 205: 223-240.

- FIORATI, J. J. A DISCIPLINA JURÍDICA DOS ESPAÇOS MARÍTIMOS NA CONVENÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE DIREITO DO MAR DE 1982 E NA JURISPRUDÊNCIA INTERNACIONAL. RENOVAR, RIO DE JANEIRO, P. 223, 1999.
- FUENMAYOR, S. L.; WILD, M.; BOYES, A. L. & WILLIAMS, P. A. (1998). A GENE CLUSTER ENCODING STEPS IN CONVERSION OF NAPHTHALENE TO GENTISATE IN PSEUDOMONAS SP. STRAIN U2. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 180: 2522-2530.
- GERALDO M. R. & MARANHO L. T. IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO OBTIDAS DA RIZOSFERA DE PANICUM AQUATICUM POIR., POACEAE. BRAZ. J. OF DEVELOP., CURITIBA, V. 6, N. 7, P.45816-45830 JUL. 2020.
- GILBERT, P. E BROWN, M. R. MICROORGANISMS IN LIQUID MEDIA: EFFECTS OF GROWTH RATE AND NUTRIENT LIMITATION. MICROBIOLOGICAL QUALITY ASSURANCE: A GUIDE TOWARDS RELEVANCE AND REPRODUCIBILITY OF INOCULA, 2018.
- GONZALEZ, J.; FIGUEIRAS, F. G.; ARANGUREN-GASSIS, M.; CRESPO, B. G.; FERNANDEZ, E.; MORAN, X. A. G.; NIETO-CID, M. EFFECT OF A SIMULATED OIL SPILL ON NATURAL ASSEMBLAGES OF MARINE PHYTOPLANKTON ENCLOSED IN MICROCOSMS. ESTUARINE, COASTAL AND SHELF SCIENCE, N. 83, P. 265-276, 2009.
- GUERRA, ALAINE DE BRITO. METAGENÔMICA DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE RESÍDUO DE PERFURAÇÃO. TESE (DOUTORADO) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE. 2018.
- GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C. N. TUNE TO IMMOBILIZE LIPASES ON POLYMER MEMBRANES: TECHNIQUES, FACTORS AND PROSPECTS – REVIEW. BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY. V.2, P.171–190, 2013.
- GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYŃSKA, D. IMMOBILIZATION AS A STRATEGY FOR IMPROVING ENZYME PROPERTIES-APPLICATION TO OXIDOREDUCTASES. MOLECULES, V.19, P. 8995–9018, 2014.
- HA, D-G.; O'TOOLE, G. A. C-DI-GMP AND ITS EFFECTS ON BIOFILM FORMATION AND DISPERSION: A PSEUDOMONAS AERUGINOSA REVIEW. MICROBIOLOGY SPECTRUM, V. 3, N. 2, 2015. DISPONÍVEL EM:< [HTTP://WWW.ASMSCIENCE.ORG/CONTENT/JOURNAL/MICROBIOLSPEC/10.1128/MICROBIOLSPEC.MB-0003-2014](http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/MICROBIOLSPEC.MB-0003-2014)> DOI: 10.1128/MICROBIOLSPEC.MB-0003-2014.
- HAIDER, T.; HUSAIN, Q. HYDROLYSIS OF MILK/WHEY LACTOSE BY B GALACTOSIDASE: A COMPARATIVE STUDY OF STIRRED BATCH PROCESS AND PACKED BED REACTOR PREPARED WITH CALCIUM

- ALGINATE ENTRAPPED ENZYME. CHEMICAL ENGINEERING AND PROCESSING: PROCESS INTENSIFICATION, V. 48, N. 1, P. 576–580, 2009.
- HASANZADEH, REYHANEH *ET AL.* APPLICATION OF ISOLATED HALOPHILIC MICROORGANISMS SUSPENDED AND IMMOBILIZED ON WALNUT SHELL AS BIOCARRIER FOR TREATMENT OF OILFIELD PRODUCED WATER. JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS, [S. L.], V. 400, P. 123197, 2020. [HTTPS://DOI.ORG/ 10.1016/J.JHAZMAT.2020.123197](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123197).
- HE J, SONG Z, MA H, YANG L, GUO C. FORMATION OF A MESOPOROUS BIOREACTOR BASED ON SBA-15 AND PORCINE PANCREATIC LIPASE BY CHEMICAL MODIFICATION FOLLOWING THE UPTAKE OF ENZYMES. J MATER CHEM. 2006;16(44):4307-15.
- HIMEDIA (2022). BUSHNELL HAAS BROTH. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.HIMEDIALABS.COM/EU/M350-BUSHNELL-HAAS-BROTH.HTML](https://www.himedialabs.com/eu/m350-bushnell-haas-broth.html)>. ACESSO EM: ABRIL DE 2023.
- HOU, J.; DONG, G.; YE, Y.; CHEN, V. LACCASE IMMOBILIZATION ON TITANIUM NANOPARTICLES AND TITANIUM-FUNCTIONALIZED MEMBRANES. J. MEMB. SCIENCE, V. 452, P. 229-40, 2014.
- HU, L. M.; MEEGODA, J. N.; LO, I. M.; LIU, Y.; GAO, S. Y.; WU, Z. Q. GASOLINE CONTAMINATED SITES: POLLUTANT TRANSPORT AND REMEDIATION. IN: ADVANCES IN ENVIRONMENTAL GEOTECHNICS. SPRINGER, BERLIN, HEIDELBERG, P. 221-235, 2010.
- IARC: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. CARCINOGENICITY EVALUATION OF BTEX, 71:829, 2006. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.IARC.FR/](http://www.iarc.fr/). ACESSO EM: 14 JUL. 2021.
- IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. RELATÓRIO ACIDENTES AMBIENTAIS (2019). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.IBAMA.GOV.BR/EMERGENCIAS-AMBIENTAIS/PUBLICACOES/MANUAL-DE-BOAS-PRATICAS/FILE/8373-2019-IBAMA-RELATORIO-ACIDENTES-AMBIENTAIS-PDF](https://www.ibama.gov.br/emergencias-ambientais/publicacoes/manual-de-boas-praticas/file/8373-2019-ibama-relatorio-acidentes-ambientais-pdf). ACESSADO EM: 28 JUN. 2021.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY – IEA. OFFSHORE PRODUCTION NEARLY 30% OF GLOBAL CRUDE OIL OUTPUT IN 2015. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.EIA.GOV/TODAYINENERGY/DETAIL.PHP?ID=28492](https://www.eia.gov/todayinenergy/detail.php?id=28492). ACESSADO EM: 15 JUN. 2021.
- IPAM – INSTITUTO DE PESQUISA AMBIENTAL DA AMAZÔNIA; CARTILHAS, 2010. A IMPORTÂNCIA DAS FLORESTAS EM PÉ; CARTILHAS.
- IRWIN, R. J. ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS ENCYCLOPEDIA, NATIONAL PARKSERVICE, 1997.
- ITPOF (2019). "THE INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED - OIL TANKER SPILL STATISTICS: 2019."

- IUPAC. CLASSIFICATION AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF IMMOBILIZED ENZYMES. PURE AND APPLIED CHEMISTRY, V. 67, P. 597–600, 1995.
- IVLEVA, N. P.; KUBRYK, P.; NIESSNER, R. RAMAN MICROSPECTROSCOPY, SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING MICROSPECTROSCOPY, AND STABLE-ISOTOPE RAMAN MICROSPECTROSCOPY FOR BIOFILM CHARACTERIZATION. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, V. 409, N. 18, P. 4353–4375, 2017.
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. BIORREMEDIÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. CIÊNCIA RURAL, N. 37:(4), P. 1192-1201. 2007.
- JERIN, I., RAHI, M.S., SULTAN, T. *ET AL.* DIESEL DEGRADATION EFFICIENCY OF ENTEROBACTER SP., ACINETOBACTER SP., AND CEDECEA SP. ISOLATED FROM PETROLEUM WASTE DUMPING SITE: A BIOREMEDIATION VIEW POINT. ARCH MICROBIOL 203, 5075–5084 (2021). [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S00203-021-02469-2](https://doi.org/10.1007/S00203-021-02469-2)
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. ENZYME IMMOBILIZATION BY ADSORPTION: A REVIEW. ADSORPTION. V.20, P.801–821, 2014.
- JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. IMMOBILIZED VIABLE MICROBIAL CELLS: FROM THE PROCESS TO THE PROTEOME IN LEADER OR THE CART BEFORE THE HORSE. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, NEW YORK, V. 22, N. 8, P. 633-658, 2004.
- KATO T, HARUKI M, IMANAKA T, MORIKAWA M, KANAYA S. (2001) ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LONG-CHAIN-ALKANE DEGRADING BACILLUS THERMOLEOVORANS FROM DEEP SUBTERRANEAN PETROLEUM RESERVOIRS. J BIOSCI BIOENG 91:64–70
- KAZUNGA, C.; AITKEN, M. D. PRODUCTS FROM THE INCOMPLETE METABOLISM OF PYRENE BY POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON-DEGRADING BACTERIA. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 66:1917-1922, 2000.
- KERBER, S. S. PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL NA BIORREMEDIÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS COM BTX (BENZENO, TOLUENO E XILENO). DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2020.
- KHAN, A. A.; WANG, R. F.; CAO, W.W.; DOERGE, D. R.; WENNERSTROM, D. & CERNIGLIA, C. E. (2001). MOLECULAR CLONING, NUCLEOTIDE SEQUENCE, AND EXPRESSION OF GENES ENCODING A POLYCYCLIC AROMATIC RING DIOXYGENASE FROM MYCOBACTERIUM SP. STRAIN PYR-1. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 67: 3577- 3585.
- KHOO, H. H.; EE, W. L.; ISONI, V. BIO-CHEMICALS FROM LIGNOCELLULOSE FEEDSTOCK: SUSTAINABILITY, LCA AND THE GREEN CONUNDRUM. GREEN CHEMISTRY. V.18, P.1912–1922, 2016.

- KIM, H. W.; LEE, K.; KIM, S. H.; RHEE, M. S. PREDICTIVE MODELING OF BACTERIAL GROWTH IN READY-TO-USE SALTED NAPA CABBAGE (BRASSICA PEKINENSIS) AT DIFFERENT STORAGE TEMPERATURES. FOOD MICROBIOLOGY, V. 70, P. 129-136, 2018.
- KINGSTON, P.F. LONG-TERM ENVIRONMENTAL IMPACT OF OIL SPILLS. SPILL SCIENCE & TECHNOLOGY BULLETIN, V. 7, N. 1-2, P. 53-61, 2002.
- KIRBY, M. F., LAW, R. J. ACCIDENTAL SPILLS AT SEA – RISK, IMPACT, MITIGATION AND THE NEED FOR CO-ORDINATED POST-INCIDENT MONITORING. MARINE POLLUTION BULLETIN, 60:797–803, 2010.
- KISHKEL, BRENDA; COSTA, ANA ISABEL CONEJO; BENEDICTO, GIOVANA BREPOHL; SANTOS, NICOLLE RAMOS DOS; SILVA, BEATRIZ PAES; SILVA, BRUNA POLACCHINE DA; NETO, ANDRÉ ÁLVARES MONGE. AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE ESPONJA VEGETAL (LUFFA CYLINDRICA) COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO PARA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE. V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, 2015.
- KISHKEL. B., COSTA, A. I. C., BENEDICTO, G. B, DOS SANTOS, N.R., SILVA, B. P., DA SILVA, B. P., NETO, A. A. M. AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE ESPONJA VEGETAL (LUFFA CYLINDRICA) COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO PARA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA. V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, 2015.
- KLEBER, H.-P., CLAUS, R., AND ASPERGER, O. (1983) ENZYMOLOGY DER N-ALKANOXIDATION BEI ACINETOBACTER. ACTA BIOTECHNOL 3: 251±260.
- KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. IMMOBILIZATION TECHNOLOGIES AND SUPPORT MATERIALS SUITABLE IN ALCOHOL BEVERAGES PRODUCTION: A REVIEW. FOOD MICROBIOLOGY, V. 21, P. 97-377, 2004. KRAJEWSKA, 2004;
- LAHEL, A.; FANTA, A. B.; SERGIENKO, N.; SHAKYA, M.; LÓPEZ, M. E.; BEHERA, S. K.; RENE, E. R.; PARK, H. S. EFFECT OF PROCESS PARAMETERS ON THE BIOREMEDIATION OF DIESEL CONTAMINATED SOIL BY MIXED MICROBIAL CONSORTIA. INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION 113, 375-385, 2016.
- LAL, B. AND KHANNA, S. (1996). DEGRADATION OF CRUDE OIL BY ACINETOBACTER CALCOACETICUS AND ALCALIGENES ODORANS, JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 81 (4), PP. 355-362.
- LATHA R. , R KALAIVANI , 2012. BACTERIAL DEGRADATION OF CRUDE OIL BY GRAVIMETRIC NALYSIS. ADV. APPL. SCI. RES., 3(5):2789-2795.
- LEE, J.Y.; JUNG, K.H.; CHOI, S.H. AND KIM H.S. 1995. COMBINATION OF THE TOD AND THE TOI PATHWAYS IN REDESIGNING A METABOLIC ROUTE O F PSEUDOMONAS PUTIDA FOR THE MINERALIZATION OF A BENZENE,

TOLUENE, AND P-XILENE MIXTURE. APPLIED AND ENVIRONMENT MICROBIOLOGY. 61(6): 2211-2217.

- LI, C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H. V.; AUERA, M.; VOGEL, K. P.; SIMMONS, B. A; SINGH, S. COMPARISON OF DILUTE ACID AND IONIC LIQUID PRETREATMENT OF SWITCH GRASS: BIOMASS RECALCITRANCE, DELIGNIFICATION AND ENZYMATIC SACCHARIFICATION. BIORESOURCE TECHNOLOGY. V.101, P.4900–4906, 2010.
- LIMA *ET AL.* ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROCARBON-DEGRADING BACTERIA FROM GAS STATION LEAKING-CONTAMINATED GROUNDWATER IN THE SOUTHERN AMAZON, BRAZIL. BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY, P. 1 – 8, 2018. DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1590/1519-6984.208611](http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.208611)
- LIMA, D. F. UTILIZAÇÃO DOS FUNGOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SUBSTRATOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO, ESTADO DA ARTE. CADERNOS DE GEOCIÊNCIAS, V.8, N.2., 2011.
- LIMA, MARIANA DA SILVA DE. ANÁLISE PROTEÔMICA, POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE BURKHOLDERIA SMF090 SOB TRATAMENTO COM GASOLINA COMERCIAL. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, CURSO DE MEDICINA, PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, SOBRAL, 2013.
- LIMA, S. D. *ET AL.* ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROCARBON-DEGRADING BACTERIA FROM GAS STATION LEAKING-CONTAMINATED GROUNDWATER IN THE SOUTHERN AMAZON, BRAZIL. BRAZ. J. BIOL., SÃO CARLOS, V. 80, N. 2, P. 354-361, JUNE 2020. AVAILABLE FROM <[HTTP://WWW.SCIELO.BR/SCIELO.PHP?SCRIPT=SCI_ARTTEXT&PID=S1519-69842020000200354&LNG=EN&NRM=ISO](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842020000200354&lng=en&nrm=iso)>. ACESSO EM: 02 JUL. 2021.
- LIRA F. & OLIVEIRA F. DOS S. CADERNOS DE RELAÇÕES INTERNACIONAIS E DEFESA ISSN 2674-8894. V.2, Nº.2, 2020/1, P.107-116.
- LIU, D.; CHEN, J.; SHI, Y. TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY ADVANCES ON METHODS AND EASY SEPARATED SUPPORT MATERIALS FOR ENZYMES IMMOBILIZATION. TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, V. 102, P. 332–342, 2018.
- LIU, YK ; SEKI, M. ; TANAKA, H. ; FURUSAKI, S. CARACTERÍSTICAS DA ESPONJA BUCHA (LUFFA CYLINDRICA) COMO TRANSPORTADORA PARA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS VEGETAIS . J. FERMENTO. BIOENG. 1998 , 85 , 416 – 421 , DOI: 10.1016/S0922-338X(98)80086-X.
- LUSTOSA, M. C. J. MEIO AMBIENTE, INOVAÇÃO E COMPETITIVIDADE NA INDÚSTRIA BRASILEIRA: A CADEIA PRODUTIVA DO PETRÓLEO. 245 F. 2002. TESE (DOUTORADO EM ECONOMIA) -INSTITUTO DE ECONOMIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, 2002.

- MAGRINI, A. POLÍTICA E GESTÃO AMBIENTAL: CONCEITOS E INSTRUMENTOS. REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIA, V. 8, N. 2, 2001.
- MAIQIAN NIE, HONGYUN NIE, MEILI HE, YINGYING LIN, LEI WANG, PENGKANG JIN, SENYUAN ZHANG, IMMOBILIZATION OF BIOFILMS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA NY3 AND THEIR APPLICATION IN THE REMOVAL OF HYDROCARBONS FROM HIGHLY CONCENTRATED OIL-CONTAINING WASTEWATER ON THE LABORATORY SCALE, JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT, VOLUME 173, 2016, PAGES 34-40, ISSN 0301-4797, [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JENVMAN.2016.02.045](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.045).
- MAJUL, L., WIRTH, S., LEVIN, L., 2020. HIGH DYE REMOVAL CAPACITY OF PENIOPHORA LAXITEXTA IMMOBILIZED IN A COMBINED SUPPORT BASED ON POLYURETHANE FOAM AND LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES. ENVIRON. TECHNOL. 1–12.
- MARIANO, A. P. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS E DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADAS COM ÓLEO DIESEL. TESE (DOCTORADO EM GEOCIÊNCIAS E MEIO AMBIENTE) - INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS EXATAS, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. RIO CLARO, SÃO PAULO, 125P., 2006.
- MARIANO, A.P.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS, D.F.; PIRÔLLO, M.P.S.; CONTIERO, J. BIODEGRADABILITY OF COMMERCIAL AND WEATHERED DIESEL OILS. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, V. 39, P. 133-142, 2008.
- MARINOV, I.; GABROVSKA, K.; VELICHKOVA, J.; GODJEVARGOVA, T. IMMOBILIZATION OF ACETYLCHOL IN ESTERASE ON NANOSTRUCTURE POLYACRYLONITRILE MEMBRANES. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES. V.44, P.338–345, 2009.
- MARTINS, B.A.D. 2004. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE BIODEGRADAÇÃO DO ETANOL EM CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS NECESSÁRIAS DOS NUTRIENTES NITROGÊNIO E FÓSFORO. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. FLORIANÓPOLIS, SC, BRASIL. 86P.
- MARTINS, D. IPIRANGA: A TRAJETÓRIA DE UMA REFINARIA EM RIO GRANDE (RS) RUMO À CONSOLIDAÇÃO DE UM GRUPO EMPRESARIAL (1930-1967). 2008. 140 F. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO) - FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS HUMANAS. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, 2008.
- MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. AN OVERVIEW OF KEY PRETREATMENT PROCESSES FOR BIOLOGICAL CONVERSION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS TO BIOETHANOL. 3 BIOTECH, 5:597, 2015. DOI 10.1007/S13205-015-0279-4.
- MCGENITY, T.J. 2014. HYDROCARBON BIODEGRADATION IN INTERTIDAL WETLAND SEDIMENTS. CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY.

- ME. MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA. CUPUAÇU. BRAZÍLIA, 2007.
- MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C. D., CASTRO, H. F. D., GIORDANO, R. L. C. APLICAÇÃO DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL. QUÍMICA NOVA. 2011;34(5):831-40.
- MERLINI, C. ANÁLISE EXPERIMENTAL DE COMPÓSITOS DE POLIURETANO DERIVADO DE ÓLEO DE MAMONA E FIBRAS DE BANANEIRA. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – FLORIANÓPOLIS, SC, 2011.
- MILANI, E.J. & ZALÁN, P.V. BRAZILIAN GEOLOGY PART 1: THE GEOLOGY OF PALEOZOIC CRATONIC BASINS AND MESOZOIC INTERIOR RIFTS OF BRAZIL. AAPG INTERNATIONAL CONFERENCE AND EXHIBITION, AMERICAN ASSOCIATION OF PETROLEUM GEOLOGISTS/ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE GEÓLOGOS DE PETRÓLEO, RIO´98, SHORT COURSE NOTES, RIO DE JANEIRO, BRASIL, 1998.
- MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. IMMOBILIZATION OF BIOCATALYSTS FOR ENZYMATIC POLYMERIZATIONS: POSSIBILITIES, ADVANTAGES, APPLICATIONS. BIORESOURCE TECHNOLOGY. V.115, P.126–135, 2012.
- MOHAMAD, R. N.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHA, R. A. AN OVERVIEW OF TECHNOLOGIES FOR IMMOBILIZATION OF ENZYMES AND SURFACE ANALYSIS TECHNIQUES FOR IMMOBILIZED ENZYMES. BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT. V.29, P.205–220, 2015. MOOD ET AL., 2013;
- MORALES, D. L. BIODEGRADAÇÃO DA FRAÇÃO BTX E ETANOL DA GASOLINA COMERCIAL E DA GASOLINA PURA POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LOCAIS IMPACTADOS. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE) – INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, 118P., 2008.
- MOREIRA J. F. M.; D'ALMEIDA A. L. INDÚSTRIA DE PETRÓLEO E GÁS: ANÁLISE COMPARATIVA DA LEGISLAÇÃO AMBIENTAL DOS EUA E BRASIL. THE JOURNAL OF ENGINEERING AND EXACT SCIENCES – JCEC, VOL. 05 N. 02 (2019). DOI: 10.18540/JCECVL5ISS2PP0174-0178
- MOREIRA, T. M. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BIOSSORVENTES ALTERNATIVOS NA RECUPERAÇÃO DE CORPOS HÍDRICOS CONTAMINADOS POR DERRAMAMENTO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO. 2018. 109 P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM TECNOLOGIA NUCLEAR MATERIAIS), INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES, IPEN-CNEN/SP, SÃO PAULO.
- MPE-AM (1999). "LAUDO PERICIAL REFERENTE AO PROCESSO Nº 010/99 - VMAQA."

- MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A.; MAKHIJANI, K. GREEN CHEMISTRY AND BIOSURFACTANT RESEARCH. IN: MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. TAYLOR & FRANCIS GROUP, 2014. BIOSURFACTANTS: RESEARCH TRENDS AND APPLICATIONS, V. 1, P. 1-30.
- MURADO, M. A., VÁZQUEZ, J. A., RIAL, D., & BEIRAS, R. DOSE-RESPONSE MODELLING WITH TWO AGENTS: APPLICATION TO THE BIOASSAY OF OIL AND SHORELINE CLEANING AGENTS. JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS, V.185(2-3), P.807-817, 2011.
- MUZAMIL AHMAD RATHER, PANCHI RANI NEOG, KULDEEP GUPTA, MANABENDRA MANDAL, CHAPTER 25 - MICROBIAL BIOFILM-MEDIATED BIOREMEDIATION OF HEAVY METALS: A SUSTAINABLE APPROACH, EDITOR(S): JUNAID AHMAD MALIK, MICROBES AND MICROBIAL BIOTECHNOLOGY FOR GREEN REMEDIATION, ELSEVIER, 2022. PAGES 485-502, ISBN 9780323904520, [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/B978-0-323-90452-0.00030-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90452-0.00030-X).
- NETA, J. L. V. UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO ORIUNDO DO CULTIVO DO GIRASSOL NA OBTENÇÃO DE SUPORTE LIGNOCELULÓSICO PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS. TESE DE DOUTORADO. UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS – PEP (2017).
- NIKOLIC, T. ; KOSTIC, M. ; PRASKALO, J. ; PEJIC, B. ; PETRONIJEVIC, Z. ; SKUNDRIC, B. SODIUM PERIODATE OXIDIZED COTTON YARN AS CARRIER FOR IMMOBILIZATION OF TRYPSIN. CARBOHYDRATE POLYMERS, V. 82, N. 3, P. 976–981, 2010.
- NIOSH: NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. NIOSH CARCINOGEN LIST, 2006. DISPONÍVEL EM: [HTTP://0-WWW.CDC.GOV.MILL1.SJLIBRARY.ORG/NIOSH/HOMEPAGE.HTML](http://0-www.cdc.gov.mill1.sjlibrary.org/niosh/homepage.html). ACESSO EM 17 JUL. 2021.
- NWAKANMA, CHIOMA & OBIH, EKENE. (2015). THE INVESTIGATION OF BACTERIAL DEGRADATION OF CRUDE OIL BY GRAVIMETRIC ANALYSIS. INTERNATIONAL JOURNAL OF CURRENT SCIENCE AND TECHNOLOGY. 3. 122-126.
- OLIVEIRA, D. W. F; FRANÇA, I. W. L; FÉLIX A. K. N; MARTINS, J. J. L; GIRO, M. E. A; MELO, V. M. M; GONÇALVES, L. R. B. KINETIC STUDY OF BIOSURFACTANT PRODUCTION BY BACILLUS SUBTILIS LAMI005 GROWN IN CLARIFIED CASHEW APPLE JUICE, COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES, VOLUME 101, 1 JANUARY P. 34-43, 2013.
- OTENIO, MARCELO HENRIQUE *ET AL*. BENZENE, TOLUENE AND XYLENE BIODEGRADATION BY PSEUDOMONAS PUTIDA CCM1 852. BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY. SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, V. 36, N. 3, P. 258-261, 2005. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://HDL.HANDLE.NET/11449/20093](http://hdl.handle.net/11449/20093)>. ACESSO EM 17 JUL. 2021.

- PAIM, M. A. O PETRÓLEO NO MAR: O REGIME DAS PLATAFORMAS MARÍTIMAS PETROLÍFERAS NO DIREITO INTERNACIONAL. RENOVAR, RIO DE JANEIRO, P. 9, 2011.
- PELCZAR, MICHAEL. MICROBIOLOGIA CONCEITOS E APLICAÇÕES . 2 1 V. SÃO PAULO: MAKRON BOOKS, 1996, 524 P.
- PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSEL, I. FUNDAMENTALS OF IMMOBILIZED YEAST CELLS FOR CONTINUOUS BEER FERMENTATION: A REVIEW. JOURNAL OF THE INSTITUTE OF BREWING, LONDON, V. 104, P. 19-31, 1998.
- PINHATI, FERNANDA R. *ET AL.* AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POR BACTÉRIAS PROVINIENTES DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE DE REFINARIA DE PETRÓLEO. QUÍM. NOVA, SÃO PAULO, V. 37, N. 8, P. 1269-1274, 2014. AVAILABLE FROM <[HTTP://WWW.SCIELO.BR/SCIELO.PHP?SCRIPT=SCI_ARTTEXT&PID=S0100-40422014000800002&LNG=EN&NRM=ISO](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000800002&lng=en&nrm=iso)>. ACESSO EM: 01 JUL. 2021.
- PINTO JR, H.; ALMEIDA, E.; BOMTEMPO, J.; IOOTTY, M.; BICALHO, R., (2016). ECONOMIA DA ENERGIA. FUNDAMENTOS ECONÔMICOS, EVOLUÇÃO HISTÓRICA E ORGANIZAÇÃO INDUSTRIAL. ELSEVIER. RIO DE JANEIRO.
- PRABHU, Y., PHALE, P. S. BIODEGRADATION OF PHENANTHRENE BY PSEUDOMONAS SP. STRAIN PP2: NOVEL METABOLIC PATHWAY, ROLE OF BIOSURFACTANT AND CELL SURFACE HYDROPHOBICITY IN HYDROCARBON ASSIMILATION. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 61:342-351, 2003.
- PUJOL, E. REMEDIAÇÃO DE ÁREAS. 2007. ARTIGO TÉCNICO [ONLINE]. DISPONÍVEL EM: [HTTP://PT.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/REMEDIA%C3%A7%C3%A3o_de_%C3%A1reas](http://pt.wikipedia.org/wiki/Remedia%C3%A7%C3%A3o_de_%C3%A1reas). ACESSO EM: 01 JUL. 2021.
- QUEIROZ, M. L. B.; CONCEIÇÃO, K. C. DA; MELO, M. N.; SÁNCHEZ, O. C.; ALVAREZD H. M.; SOARES, C. M. F.; FRICKS A. IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE DE RAIZ FORTE EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. QUIM. NOVA, VOL. 41, NO. 9, 1019-1024, 2018. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.21577/0100-4042.20170279](http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170279).
- QUINTERO, L. C. N. FRACIONAMENTO E ANÁLISE DE ASFALTENOS EXTRAÍDOS DE PETRÓLEOS BRASILEIROS. TESE DE DOUTORADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO DE JANEIRO - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS (2009).
- RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. VARIOUS PRETREATMENTS OF LIGNOCELLULOSICS – REVIEW. BIORESOURCE TECHNOLOGY. V.199, P.83–91, 2016.
- RABUS R, WILKES H, BEHREND S, ARMSTROFF A, FISCHER T, PIERIK AJ, WIDDEL F. ANAEROBIC INITIAL REACTION OF N -ALKANES IN A

DENITRIFYING BACTERIUM: EVIDENCE FOR (1-METHYLPENTYL)SUCCINATE AS INITIAL PRODUCT AND FOR INVOLVEMENT OF AN ORGANIC RADICAL IN N -HEXANE METABOLISM. J BACTERIOL 2001;183:1707–1715.

RADWAN, S. S., SORKHOH, N. A., FELZMANN, H. & EL-DESOUKY, A.-F. (1996). UPTAKE AND UTILIZATION OF N-OCTACOSANE AND N-NONACOSANE BY ARTHROBACTER NICOTIANAE KCC B35. J APPL BACTERIOL 80, 370–374.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A COMPREHENSIVE REVIEW ON PRE-TREATMENT STRATEGY FOR LIGNOCELLULOSIC FOOD INDUSTRY WASTE: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES – REVIEW. BIORESOURCE TECHNOLOGY. V.99, P.92–102, 2016.

REIS P, WITULA T, HOLMBERG K. MESOPOROUS MATERIALS AS HOST FOR AN ENTRAPPED ENZYME. MICROPOROUS MESOPOROUS MAT. 2008;110(2-3):355-62.

RIAZI, M. R. CHARACTERIZATION AND PROPERTIES OF PETROLEUM FRACTIONS. 1 ED. BALTIMORE: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM), 2005.

RIBEIRO, PAULO LEONARDO LIMA. EFEITO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL E DE ESTIRPES MICROBIANAS (CUPRIAVIDUS NECATOR IPT 027 E BURKHOLDERIA CEPACIA IPT 438) NA PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E COMPOSIÇÃO DE COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIALCANOATOS. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – 2014.

ROCKNE, K. J., J. C. CHEE-SANFORD, R. A. SANFORD, B. P. HEDLUND, J. T. STALEY, AND S. E. STRAND. 2000. ANAEROBIC NAPHTHALENE DEGRADATION BY MICROBIAL PURE CULTURES UNDER NITRATE-REDUCING CONDITIONS. APPL ENVIRON MICROBIOL 66:1595-1601.

RODRIGUES, G. M. A. ATIVIDADE DE ARMAZENAMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE COMBUSTÍVEL NOS CENTROS URBANOS: OS POSTOS DE COMBUSTÍVEIS E A SAÚDE PÚBLICA. 2015. 88 F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS)- FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- USP, SÃO PAULO, 2015.

RUBIÃO, P. P. T. A UTILIZAÇÃO DO GÁS NATURAL NO BRASIL. MONOGRAFIA. UNIVERSIDADE CANDIDO MENDES (2012).

RUETER, P., R. RABUS, H. WILKES, F. AECKERSBERG, F.A. RAINEY, H.W. JANNASCH & F. WIDDEL. 1994. ANAEROBIC OXIDATION OF HYDROCARBONS IN CRUDE OIL BY NEW TYPES OF SULPHATE-REDUCING BACTERIA. NATURE. 372: 455-458.

SAFDARI, M. S.; KARIMINIA, H. R.; RAHMATI, M.; FAZLOLLAHI, F.; POLASKO, A.; MAHENDRA, S.; FLETCHER, T. H. DEVELOPMENT OF BIOREACTORS FOR COMPARATIVE STUDY OF NATURAL ATTENUATION, BIOSTIMULATION, AND BIOAUGMENTATION OF PETROLEUM-HYDROCARBON

CONTAMINATED SOIL. JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS, V.342, P.270-278, 2018.

SAH, D., GHOSH, A., CHAKRABORTY, M., RAI, J. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICACY OF FREE AND IMMOBILIZED BACTERIA IN DEGRADATION OF DIESEL OIL. THE PHARMA INNOVATION JOURNAL 2023; 12(6): 2043-2048.

SAKAI Y, MAENG JH, TANI Y, KATO N (1994) USE OF LONG-CHAIN N-ALKANES (C13-C44) BY AN ISOLATE, ACINETOBACTER SP. M-1. BIOSCI BIOTECHNOL BIOCHEM 58:2128-2130.

SALIM, R.M.; CHOWDHURY, A.J.K.; RAYATHULHAN, R.; YUNUS, K.; SARKAR, MD. BIOSORPTION OF PB AND CU FROM AQUEOUS SOLUTION USING BANANA PEEL POWDER. DESALINATION AND WATER TREATMENT, V.57, P. 303-314, 2015. DOI: 10.1080/19443994.2015.1091613

SAMANTA, S. K., CHAKRABORTI, A. K., JAIN, R. K. DEGRADATION OF PHENANTHRENE BY DIFFERENT BACTERIA: EVIDENCE FOR NOVEL TRANSFORMATION SEQUENCES INVOLVING THE FORMATION OF 1-NAPHTHOL. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, V. 53, P. 98-107, 1999.

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS: ENVIRONMENTAL POLLUTION AND BIOREMEDIATION. TRENDS BIOTECHNOL., V. 20, P. 8-243, 2002. SANTOS *ET AL.*, 2016

SAMHAN F.A., ELLIETHY M.A., HEMDAN B.A., YOUSSEF M., EL-TAWEEL G.E. BIOREMEDIATION OF OIL-CONTAMINATED WATER BY BACTERIAL CONSORTIUM IMMOBILIZED ON ENVIRONMENT-FRIENDLY BIOCARRIERS. JOURNAL OF THE EGYPTIAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 92 (1) , PP. 44-51, 2017.

SANTOS, ADEILTON MALAFAIA DOS. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM LEVEDURA IMOBILIZADA EM COLMOS DE BAMBU E EM FIBRA DE COCO. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, 2008).

SANTOS, E. C. S. *ET AL.* APROVEITAMENTO DA CASCA DO CUPUAÇU PARA A PRODUÇÃO DE ENERGIA. 5º ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL. CAMPINAS / SP: [S.N.]. 2004. P. 08. SBAITE, P. EXTENSÃO DA CURVA DE PONTO DE EBULIÇÃO VERDADEIRO PARA PETRÓLEOS PESADOS NACIONAIS ATRAVÉS DO PROCESSO DE DESTILAÇÃO MOLECULAR. 2005. TESE DE DOUTORADO - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, SÃO PAULO, 2005.

SANTOS, J. F. DOS. PROTEÍNAS DE BACILLUS PUMILUS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E DIESEL. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (2014).

- SANTOS, W. C. DOS; LIMA, M. DE L. A. A.; LIMA, H. C. CUPUAÇU: RESUMOS INFORMATIVOS. EMBRAPA-CPAA, 1992. 91P.
- SEBASTIAN, S; HURTIG, A. K. OIL DEVELOPMENT AND HEALTH IN THE AMAZON BASIN OF ECUADOR: THE POPULAR EPIDEMIOLOGY PROCESS, SOCIAL SCIENCE MED, 60, P.799–807. 2005.
- SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. 2009. BACTERIAL DEGRADATION OF AROMATIC COMPOUNDS. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH . 6: 278-309
- SHAHABY, A. F.; ALHARTHI, A. A.; EL TARRAS A. E. BIOREMEDIATION OF PETROLEUM OIL BY POTENTIAL BIOSURFACTANT-PRODUCING BACTERIA USING GRAVIMETRIC ASSAY. INT.J.CURR.MICROBIOL.APP.SCI (2015) 4(5): 390-403.
- SILVA, L. G. DA. ALTERNATIVAS DE RESÍDUOS PARA MATERIAL SUPORTE DE REATOR BIOLÓGICO NO TRATAMENTO DE ESGOTOS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2016.
- SILVA, L. M. DA. BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR RIZOBACTÉRIAS EM SOLO DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA CONTAMINADO COM PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL. TESE DE DOUTORADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (2018).
- SILVA, R. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. APPLICATIONS OF BIOSURFACTANTS IN THE PETROLEUM INDUSTRY AND THE REMEDIATION OF OIL SPILLS. INTERNACIONAL. JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCE, N.15, P.12542-12523, 2014.
- SIMÕES, A. J. F. PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS: DESAFIOS ESTRATÉGICO NO MUNDO E NO BRASIL. IN: CONFERÊNCIA NACIONAL DE POLÍTICA EXTERNA E POLÍTICA INTERNACIONAL. 1, 2006, RIO DE JANEIRO. O BRASIL NO MUNDO QUE VEM AÍ. BRASÍLIA, DF: FUNDAÇÃO ALEXANDRE DE GUSMÃO, 2007. DISPONÍVEL EM: [HTTP://PT.SCRIBD.COM/DOC/86507696/%0BCONFERENCIA-NACIONAL-DE-POLITICA-EXTERNA](http://pt.scribd.com/doc/86507696/%0BCONFERENCIA-NACIONAL-DE-POLITICA-EXTERNA). ACESSO EM 22 JUL. 2021.
- SIRIPORNADULSILSURASAK, THANWISAILALITA E SIRIPORNADULSILWILAILAK. 2014. ALTERAÇÕES NO PROTEOMA DA BACTÉRIA TOLERANTE AO CÁDMIO CUPRIAVIDUS TAIWANENSIS KCU2500-3 EM RESPOSTA À TOXICIDADE DO CÁDMIO. JORNAL CANADENSE DE MICROBIOLOGIA . 60 (3): 121-131. [HTTPS://DOI.ORG/10.1139/CJM-2013-0713](https://doi.org/10.1139/CJM-2013-0713).
- SIRISHA, V. L.; ANKITA JAIN, A.; JAIN, A. ENZYME IMMOBILIZATION: AN OVERVIEW ON METHODS, SUPPORT MATERIAL, AND APPLICATIONS OF IMMOBILIZED ENZYMES. ADVANCES IN FOOD AND NUTRITION RESEARCH. V.79, P.179–211, 2016.

- SMITS, T. H., BALADA, S. B., WITHOLT, B., AND VAN BEILEN, J. B. (2002) FUNCTIONAL ANALYSIS OF ALKANE HYDROXYLASES FROM GRAM-NEGATIVE AND GRAM-POSITIVE BACTERIA. J BACTERIOL 184:1733-1742.
- SOCHA, L. B.; PINHEIRO, R. B. M. CUPUAÇU: A FRUTA GLOBALIZADA – ESTUDO DE CASO. REVISTA GESTÃO & SUSTENTABILIDADE AMBIENTAL, V. 4, P. 554-567, 2016.
- SOUZA, FRANCISCO DE ASSIS. ANÁLISE DE ADESÃO E CRESCIMENTO BACTERIANO EM SUPERFÍCIES MODELO : UMA AVALIAÇÃO EM AMPLA ESCALA DE COMPRIMENTO. TESE (DOUTORADO) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, CENTRO DE CIÊNCIAS, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA , FORTALEZA, 2017.
- SOUZA, F. DE A. ANÁLISE DE ADESÃO E CRESCIMENTO BACTERIANO EM SUPERFÍCIES MODELO: UMA AVALIAÇÃO EM AMPLA ESCALA DE COMPRIMENTO. TESE (DOUTORADO) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, CENTRO DE CIÊNCIAS, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA , FORTALEZA, 2017.
- SOUZA, F. R. IMPACTO DO PREÇO DO PETRÓLEO NA POLÍTICA ENERGÉTICA MUNDIAL. 2006. 160F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS EM PLANEJAMENTO ENERGÉTICO) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO, 2006.
- SOUZA, T. C. ; FONSECA, T. S. ; COSTA, J. A. ; ROCHA, M. V. P.; MATTOS, M. C. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. ; GONÇALVES, L. R. B. ; SANTOS, J. C. S. CASHEW APPLE BAGASSE AS A SUPPORT FOR THE IMMOBILIZATION OF LIPASE B FROM CANDIDA ANTARCTICA: APPLICATION TO THE CHEMOENZYMATIC PRODUCTION OF (R)-INDANOL. JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATIC, V. 130, P. 58–69, 2016.
- SOUZA-NETO, J. N; ARAÚJO, S.P; BATISTA, I. H.; PEREIRA, J. O; ANDRADE, E.V. PROTEOMIC ANALYSIS OF PETROLEUM DEGRADING BACTERIA, BMC PROCEEDINGS, 8:(4): P240, 2014.
- SPEIGHT, J. G. HANDBOOK OF PETROLEUM PRODUCT ANALYSIS. JOHN WILEY & SONS, INC., NEW YORK, 2001.
- SZKLO, A.; ULLER, V. C. FUNDAMENTOS DO REFINO DE PETRÓLEO: TECNOLOGIA E ECONOMIA. 2ª ED. RIO DE JANEIRO: EDITORA INTERCIÊNCIA, 2008.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. ACID-BASIS HYDROLISIS FOR ETHANOL FROM LIGNOCELLULSIC MATERIALS: A REVIEW. BIORESOURCES, V. 2, N. 3, 2007.
- THOMAS, JOSÉ EDUARDO. FUNDAMENTOS DE ENGENHARIA DE PETRÓLEO. RIO DE JANEIRO: INTERCIÊNCIA, 2001.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. MICROBIOLOGIA. 6ED. ED. [S.1.]: EDITORA ARTMED, 2000. 2º REIMPRESSÃO, 2003.

- TREADWAY, S & YANAGIMACHI, KURT & LANKENAU, E & LESSARD, PHILIP & STEPHANOPOULOS, G & SINSKEY, ANTHONY. (1999). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF INDENE BIOCONVERSION GENES FROM RHODOCOCCUS STRAIN I24. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. 51. 786-93. 10.1007/S002530051463.
- TRIBEDI, Prosun; SIL, Alok K. Degradação do polietileno de baixa densidade por *Pseudomonas* sp. Biofilme AKS2. *Ciência Ambiental e Pesquisa em Poluição*, v. 20, p. 4146-4153, 2013.
- UDGIRE M., SHAH N., JADHAV M. ENRICHMENT, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF HYDROCARBON DEGRADING BACTERIA. INT. J. CURR. MICROBIOL. APPL. SCI. 2015;4(6):708–713. ISSN: 2319-7706.
- UGAZ-HOYOS J. *ET AL.* BIOSURFACTANTS IN THE BIOREMEDIATION OF HYDROCARBON-CONTAMINATED SOILS. BRAZ. J. BIOL., AGRICULTURAL SCIENCES. AVAILABLE FROM <[HTTPS://PREPRINTS.SCIELO.ORG/INDEX.PHP/SCIELO/PREPRINT/VIEW/642/VERSION/665](https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/642/version/665)>. ACESSO EM: 01 JUL. 2021.
- VAN HAMME J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. 2003. RECENT ADVANCES IN PETROLEUM MICROBIOLOGY. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS. V.67, P.503–549.
- VARJANI, S., UPASANI, V.N. COMPARING BIOREMEDIATION APPROACHES FOR AGRICULTURAL SOIL AFFECTED WITH PETROLEUM CRUDE: A CASE STUDY. INDIAN J MICROBIOL 59, 356–364 (2019). [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S12088-019-00814-0](https://doi.org/10.1007/S12088-019-00814-0)
- VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, T. S.; BUCHA VEGETAL E FERTILIZAÇÃO ORGANO-MINERAL NO CULTIVO DE DENDROBIUM NOBILE LINDL, REVISTA DA FZVA, VOL. 15, N. 1, P. 34-42, 2008.
- VILAR, DÉBORA DA SILVA *ET AL.* INVESTIGAÇÃO DE CAUSAS GERADORAS DE ACIDENTES LABORAIS DURANTE A PRODUÇÃO ONSHORE DE PETRÓLEO EM UM CAMPO DA BACIA SERGIPE-ALAGOAS. ANAIS III CONEPETRO... CAMPINA GRANDE: REALIZE EDITORA, 2018. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://EDITORAREALIZE.COM.BR/ARTIGO/VISUALIZAR/44042](https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/44042)>. ACESSO EM: 01 JUL. 2021.
- VILAR, W. D. QUÍMICA E TECNOLOGIA DOS POLIURETANOS. S.L. : VILAR CONSULTORIA, 1998.
- VINCENZA, ANDREONI & BERNASCONI, SILVANA & COLOMBO, MILENA & VAN BEILEN, JAN & CAVALCA, LUCIA. (2000). DETECTION OF GENES FOR ALKANE AND NAPHTHALENE CATABOLISM IN RHODOCOCCUS SP. STRAIN 1BN: BRIEF REPORT. ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 2. 572-7. 10.1046/J.1462-2920.2000.00134.X.
- WANG, T., SU, D., WANG, X., HE, Z. ADSORPTION-DEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOIL BY IMMOBILIZED

MIXED BACTERIA AND ITS EFFECT ON MICROBIAL COMMUNITIES. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY 2020 68 (50), 14907-14916. DOI: 10.1021/ACS.JAFC.0C04752

WAUQUIER, J. PETROLEUM REFINING: CRUDE OIL, PETROLEUM PRODUCTS, PROCESS FLOWSHEETS. EDITIONS TECHNIP, 1995.

WEI YH, CHEN WC, HUANG CK, WU HS, SUN YM, LO CW, JANARTHANAN OM (2011A): SCREENING AND EVALUATION OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCING STRAINS FROM INDIGENOUS ISOLATE CUPRIAVIDUS TAIWANENSIS STRAINS. INT. J. MOL. SCI. 12, 252-265.

WEISSENFELS, W. D.; BEYER, M.; KLEIN, J. DEGRADATION OF PHENANTHRENE, FLUORENE, AND FLUORANTHENE BY PURE BACTERIAL CULTURES. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 132, 479-484, 1990.

WENTZEL, A; ELLINGSEN, T. E; KOTLAR, H. K; ZOTCHEV, S. B; THRONE-HOLST M. BACTERIAL METABOLISM OF LONG-CHAIN N-ALKANES, APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2007.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRAVITOL, A. D. DEGRADAÇÃO E BIORREMEDIÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO POR BACTÉRIAS: REVISÃO. OECOLOGIA AUSTRALIS 14(4): 1010-1020, DEZEMBRO 2010 DOI:10.4257/OECO.2010.1404.11.

WHO. WORLD HEALTH SELECTED NON-HETEROCYCLIC POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS. ORGANIZATION INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA, 1998.

WIDDEL, F., RABUS, R. ANAEROBIC BIODEGRADATION OF SATURATED AND AROMATIC HYDROCARBONS. CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, 12: 259-276, 2001.

WU, M. *ET AL.* DEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY MICROBIAL CONSORTIA ENRICHED FROM THREE SOILS USING TWO DIFFERENT CULTURE MEDIA. ENVIRONMENTAL POLLUTION, V. 178, 2013.

YUMOTO I. NAKAMURA A. IWATA H. *ET AL.* (2002). DIETZIA PSYCHRALCALIPHILA SP. NOV., A NOVEL, FACULTATIVELY PSYCHROPHILIC ALKALIPHILE THAT GROWS ON HYDROCARBONS. INT J SYST EVOL MICR 52: 85–90.

YUSTE L, CORBELLÀ ME, TURIEGANO MJ, KARLSON U, PUYET A, ROJO F (2000) CHARACTERIZATION OF BACTERIAL STRAINS ABLE TO GROW ON HIGH MOLECULAR MASS RESIDUES FROM CRUDE OIL PROCESSING. FEMS MICROBIOL ECOL 32: 69–75. ZABBÉY *ET AL.*, 2017

ZENGLER, K., RICHNOW, H.H., ROSSELLO-MORA, R., MICHAELIS, W., AND WIDDEL, F. (1999) METHANE FORMATION FROM LONG-CHAIN ALKANES BY ANAEROBIC MICROORGANISMS. NATURE 401: 266– 269.

ZÍLIO, E. L; PINTO, U. B. IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE COMPOSTOS PRESENTES NOS PETRÓLEOS BRASILEIROS, BOLETIM TÉCNICO PETROBRAS, 2002.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. INORGANIC MATERIALS AS SUPPORTS FOR COVALENT ENZYME IMMOBILIZATION: METHODS AND MECHANISMS – REVIEW. MOLECULES. V.19, P.14139–14194, 2014.