



LABS10

Latin American Biodeterioration
and Biodegradation Symposium

ONLINE Conference - 19-22 november, 2023

Edited by:

FÁTIMA MENEZES BENTO

MÁRCIA T. S. LUTTERBACH

CHRISTINE C. GAYLARDE

FLÁVIO A. DE O. CAMARGO



Porto Alegre March, 2025



Latin American Biodeterioration
and Biodegradation Symposium

10th Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium
ONLINE Edition - November 19th to 23th, 2023

Acknowledgment



International Biodeterioration & Biodegradation Society



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO





10th Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium
ONLINE Edition - November 19th to 23th, 2023

Editado por:

Prof. Fátima Menezes Bento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/UFRGS
Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e BIOcombustíveis

Dra Marcia T. S. Lutterbach

Instituto Nacional de Tecnologia

Dra. Christine Claire Gaylarde

Department of Microbiology and Plant Biology
Oklahoma University, USA

Prof. Flavio A.O. Camargo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Faculdade de Agronomia - Departamento de Solos
Laboratório de Biorremediação

1ª edição: 2025
Tiragem: edição digital

Diagramação e capa: Flávio A. de O. Camargo
Imagem da capa: Montagem Instituto Nacional de Tecnologia
Revisão de texto: Fátima Bento e Christine Gaylarde
Revisão final: Fatima Bento

Comite Organizador

Prof Dr. Fátima Menezes Bento, UFRGS
Prof Dr. Christine Claire Gaylarde, IBBS
Dra. Marcia Lutterbach, Instituto Nacional de Tecnologia
Dra Adriane R. Zimmer-POSDOC/LABBIO, UFRGS.
Dra.Sabrina Beker- POSDOC/LABBIO, UFRGS.
MSc Marcela Marmitt-Bolsista CNPq/LABBIO,UFRGS
Emily G. Brilhante Bolsista CNPq/LABBIO, UFRGS

Comité Científico Nacional

Prof Dr. Fátima Menezes Bento, UFRGS
Prof Dr. Christine Claire Gaylarde IBBS
Dra. Marcia Lutterbach, Instituto Nacional de Tecnologia
Prof Dr. Enilson Luis Saccol de Sá, PPGMAA,UFRGS
Prof Dr. Ana Paula Guedes Frazzon, PPGMAA,UFRGS
Prof Dr. Márcia Nitschke, UFSCar, SP
Prof Dra. Francielle Bucker -UNIVATES
Prof Dr. Robson Andreazza, UFPel, RS
Prof Dr. Vanessa Sacramento Cerqueira, UFPel, RS
Dra. Juciana C. Cazarolli – DEMIP-ICBS, UFRGS

Comité Científico Internacional

Dr. Frederick Passman, IBBS
Prof Dr. Christine Claire Gaylarde, IBBS
Prof Dr. Benjamin Otto Ortega-Morales, UC, México
Prof Dr. Brenda Little, United States Navy, USA
Prof Dr. Nuno Mesquita UC, Portugal
Dr. Oscar Ruiz, Air Force Research Laboratory, USA



Este trabalho está licenciado sob a Creative Commons Attribution 4.0 International. Para ver uma cópia desta licença, visite <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- L3571 Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium (10. : 2023 : *Online*)
- LABS10 : Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium [recurso eletrônico] / Editado por Fátima Menezes Bento ... [et al.] – Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2025.
- 1 arquivo PDF (89 f.) : il. color.
- ISBN 978-65-5973-453-5
1. Biodegradação ambiental – Eventos. 2. Biocidas. 3. Biorremediação. I. Bento, Fátima Menezes, org. II. Título.

CDU 628.5(063)

Dedicado a:
Dedicated to:

Prof. João Ruy Jardim Freire

Por sua contribuição à Ciência Brasileira e pela criação do PPGMAA
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
*For his contribution to Brazilian Science and to the creation of the
Postgraduate Program in Agricultural and Environmental Microbiology*

Profa. Christine C. Gaylarde

Pela dedicação e consolidação da Pesquisa em
Biodeterioração e Biodegradação no Brasil
*For dedication and consolidation of Research in
Biodeterioration and Biodegradation in Brazil*

Apresentação

O objetivo desta publicação é apresentar os RESUMOS das Palestras proferidas e dos trabalhos enviados na forma de vídeo pelos autores e apresentados na primeira edição ONLINE no 10º Simpósio Latino Americano de Biodeterioração e Biodegradação (LABS10) promovido pela Sociedade Internacional de Biodeterioração e Biodegradação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Instituto Nacional de Tecnologia no período de 19 á 23 de novembro de 2023.

O Simpósio Latino Americano de Biodeterioração e Biodegradação desde a sua primeira edição visa promover a interação entre indústrias, academia e órgãos governamentais preocupados com a presença de organismos vivos em materiais e nos mais variados processos. Este tipo de Simpósio tem atendido pesquisadores de universidades e de indústrias, gerentes responsáveis pela gerência de processos industriais, funcionários de museus e arquivos públicos; engenheiros e interessados no controle do processo de biodeterioração de materiais, no tratamento de resíduos pela biodegradação. Este tipo de evento também tem proporcionado a apresentação de pesquisas que tem como foco os principais mecanismos e novos métodos de controle da biodeterioração e biodegradação, assim como o relato de casos ocorridos no ambiente industrial.

Introduction

This publication contains those articles from LABS10 which have been presented by keynote speakers and submitted by the authors. The Symposium, held from 19th to 23th November, 2023, was sponsored by the International Biodeterioration and Biodegradation Society, and by the Federal University of Rio Grande do Sul and the National Technology Institute.

The Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposia aim to promote interaction between industry, academia and governmental institutions concerned with the positive and negative effects of living organisms on materials and processes. Delegates include university and industrial researchers, managers of industrial processes, workers in museums and public archives, engineers, and those interested in the control of materials biodeterioration or the treatment of wastes by biodegradation. The Symposia have also allowed the presentation of research results focussing on the principal mechanisms and new control methods of biodeterioration and biodegradation, as well as of case histories from industry.

Agradecimentos

Os editores agradecem em especial à equipe do LAB-BIO Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis da UFRGS, sem a qual o evento não teria sido possível. A equipe formada por alunos bolsistas de pesquisa do CNPq (Graduação, mestre e doutores) auxiliaram no planejamento, organização e apresentação dos palestrantes nas Sessões do Evento ONLINE. Agradecemos à todos os palestrantes nacionais e internacionais que nos honraram com suas magníficas apresentações, assim como aos participantes que enviaram vídeos com a apresentação oral de seus trabalhos em cada Sessão do Evento.

À todos participantes, alunos, profissionais e professores, que assistiram os dias do evento, pelos quais, temos plena convicção que voltaram à suas instituições, motivados para continuar a desenvolver este caminho da pesquisa tão instigante, multidisciplinar e com tantas áreas a explorar. Nossos especiais agradecimentos à: Sociedade Internacional de Biodeterioração e Biodegradação, ao Instituto Nacional de Tecnologia do Rio de Janeiro e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pelo apoio na realização da 10ª Edição do Simpósio Latino Americano de Biodeterioração e Biodegradação (LABS 10).

Nossos agradecimentos especiais ao CNPq e às empresas ZEISS do Brasil (RJ), TERMOLAB-Central Analítica (RS) e BIOSUMOS-Insumos Biotecnológicos (RS) que nos agraciaram com brindes para o sorteio entre os participantes .

Acknowledgements

The editors would like to thank especially the LAB-BIO team from the Laboratory for Biodeterioration of Fuels and Biofuels of UFRGS, without whom the event would not have been possible. This is a team composed of students, from undergraduate to post-doctoral level, who helped in the planning and organization, as well as assisting the invited speakers before, during and after the event. We also thank all the speakers for their magnificent presentations, as well as those who brought their work to show during the poster session.

Our special thanks go to the International Biodeterioration and Biodegradation Society, the Federal University of Rio Grande do Sul, and to the Post-Graduate Program in Agricultural and Environmental Microbiology of UFRGS.

We also thank CNPq for funding and the firms ZEISS do Brasil (RJ), TERMOLAB-Central Analítica (RS) and BIOSUMOS -Insumos Biotecnológicos (RS), who provided prizes for the participant draws in the intervals.

ÍNDICE / INDEX

Apresentação / Introduction.....	Pag. 04
Agradecimentos / Acknowledgements.....	05

ABERTURA / OPENING CEREMONY 10

A BRIEF HISTORY OF IBBS FROM 1969 TO 2023 AS RECORDED BY DENNIS ALLSOPP	
Frederick Passman.....	10

PALESTRAS / CONFERENCES 13

BIODETERIORAÇÃO / BENS CULTURAIS **BIODETERIORATION / CULTURAL PROPERTY** 14

FUNGAL BIODETERIORATION IN LIMESTONE: COMBINING METHODOLOGIES FOR A MORE REALISTIC COMMUNITY CHARACTERIZATION	
Nuno Mesquita.....	14

CONSERVAÇÃO PREVENTIVA DO PATRIMÔNIO CULTURAL ASSOCIADA A ALTERNATIVAS LIMPAS CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS	
Douglas Boniek.....	17

COLONIZAÇÃO BIOLÓGICA DE LIQUENS NAS ROCHAS DO SÍTIO HISTÓRICO SÃO MIGUEL ARCANJO: IMPLICAÇÕES NA CONSERVAÇÃO DO PATRIMÔNIO CULTURAL.	
Inaê Carolina Sfalcin.....	19

ACTIONS CARRIED AT MAST ON BIOLOGICAL CONTROL TO PRESERVE COLLECTIONS	
Ozana Hannesch & Alessandro Wagner Alves da Silva.....	22

BIODETERIORAÇÃO POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM REVESTIMENTOS DE ARGAMASSA	
Fernanda Lamego Guerra.....	24

BIODETERIORAÇÃO DE COMBUSTÍVEIS FUEL BIODETERIORATION 26

THE CONTINUED IMPORTANCE OF ANTIMICROBIALPESTICIDES FOR CONTROLLING MICROBIAL CONTAMINATION IN INDUSTRIAL PROCESS FLUID SAND SYSTEMS.	
Frederick Passman.....	26

UNDERSTANDING FUEL BIODETERIORATION THROUGH FUNCTIONAL GENOMICS AND TRANSCRIPTOMICS	
Oscar Ruiz.....	28

BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

HYDROCARBONS BIODEGRADATION

29

ABORDAGEM METAGENÔMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA ASSOCIADA AO ÓLEO PESADO DERRAMADO NA COSTA BRASILEIRA E IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIODEGRADADORES

Vânia Maria de Melo..... 30

BACTÉRIAS COMO AGENTES BIOLÓGICOS EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS)

Victor Valiati..... 32

BIOCORROSÃO / BIOFILMES BIOCORROSION / BIOFILMS

36

PROGRESS IN UNDERSTANDING MICROBIALY INFLUENCED CORROSION.

Brenda Little..... 36

BIOFILMES NA BIOCORROSÃO

Alane Vermelho..... 38

BIOCIDAS BIOCIDES

39

BIOCIDAS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE ÁGUA PRODUZIDA NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO E O IMPACTO NA RESISTÊNCIA MICROBIANA

Gabriela Feix Pereira..... 39

INFLUENCE OF THE STAGE OF BIOFILM DEVELOPMENT ON THE EFFECTIVENESS OF BIOCIDES TREATMENT

Lina Dominici..... 40

POLUENTES / BIOSURFACTANTES

POLLUTANTS / BIOSURFACTANTS

42

PLASTICS - FROM PERFECTION TO POLLUTION

Christine Claire Gaylarde..... 42

BIOSURFACTANTES: ESTADO DA ARTE

Márcia Nitschke..... 44

BIORREMEDIAÇÃO / BIOREMEDIATION

45

SHIFTS IN MICROBIOME STRUCTURE, FUNCTIONS AND INTERACTIONS IN BIOFUEL-AFFECTED ÁREAS TRIGGERED BY BIOREMEDIATION TREATMENTS

Kelly J. Hidalgo Martinez..... 46

BIODEGRADAÇÃO COMO PROCESSO-CHAVE NA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS NO SETOR DE ÓLEO, GÁS E BIOCOMBUSTÍVEIS: COM O QUE MAIS PODEMOS SONHAR?

Adriana Soriano..... 47

TÉCNICAS RECENTES EM BBB (BIODETERIORAÇÃO, BIODEGRADAÇÃO & BIORREMEDIAÇÃO) RECENT TECHNIQS IN BBB (BIODETERIORATION, BIODEGRADATION & BIORREMIEDIATION)	49
--	----

INTERACTIONS OF BIOPOLYMERS WITH CALCAREOUS MATERIALS AND THEIR RELEVANCE IN CONSERVATION OF MAYAN MONUMENTS Benjamin Otto Ortega-Morales.....	49
SPATIAL PARTITIONING, COMPETITIVE EXCLUSION, AND ECOLOGICAL NICHE OF FUNGI ATTACKING CULTURAL HERITAGE Flavia Pinzari	51

APRESENTAÇÃO VIDEOS / VIDEO PRESENTATIONS 52

BIODETERIORAÇÃO BIODETERIORATION 52

IDENTIFICATION OF CONTAMINATING FUNGI OF TAXIDERMIZED ANIMALS OF THE MUSEU DA CIÊNCIA OF THE UNIVERSIDADE DE COIMBRA Emília Pereira; Nuno Mesquita.....	52
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE ASPERGILLUS NIGER EM SELANTES DE FACHADA Marciele Monique Lazzari Klein; Caroline Giordani; Fernanda Lamego Guerra; Ana Paula Bombassaro; Fernanda Gedoz Kozoroski; Angela Borges Masuero.....	54
GASOLINA DE AVIAÇÃO: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM CAPACIDADE DETERIOGÊNICA Brilhante, E. L. G.; Beker, S. A.; Bento, M. F.....	55
POTENCIAL DETERIOGÊNICO DE PSEUDALLESCHERIA BOYDII EM DIFERENTES COMBUSTÍVEIS COMERCIAIS E HIDROCARBONETOS Marmitt, Marcela, Beker, Anderson Sabrina; Bento, Menezes Fátima.....	59

BIODEGRADAÇÃO BIODEGRADATION 63

REMOÇÃO DE NITROGÊNIO ATRAVÉS DE OZONIZAÇÃO DE LIXIVIADO DE ATERRO DO MUNICÍPIO DE PELOTAS-RS Caroline Menezes Pinheiro, Louise Hoss, Jéssica Torres dos Santos, Luísa Ângelo dos Anjos, Julia Kaiane da Silva Prates, Larissa Loebens, Maurizio Silveira Quadro.	63
BIODEGRADAÇÃO DE BENZO[A]PIRENO PELA BACTÉRIA MODELO BURKHOLDERIA VIETNAMIENSIS G4 Mattos, Heitor; Marmitt, Marcela; Valiati, Victor Hugo.....	65
ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE BURKHOLDERIA VIETNAMIENSIS G4 REVELA GENES FUNCIONAIS NA DEGRADAÇÃO DE BENZO[A]PIRENO Marmitt, Marcela; Cauduro, Guilherme Pinto; Sbruzzi, Renan César; Valiati, Victor Hugo.....	68
BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO BACILLUS COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA Fraticeili,L.; Porciúncula, B.C.; Schneider, R.C.S.; Benitez, L.B.....	73

GRAPHENE-BASED ANTIFUNGAL ABSORBENTS USED AS ADVANCED MATERIALS FOR THE PREVENTIVE CONSERVATION OF CULTURAL HERITAGE

Clarissa Martins Leal Schrekker, George Gorgolis, Elena Messina, Maria Kotsidi, Maria Paola Staccioli, Elsa Lesaria Nhuch, Gabriella Di Carlo, George Paterakis, Nikos Koutroumanis, Costas Galiotis, Henri Stephan Schrekker..... 76

NANO CARBON STRUCTURED MEDIA AND SILVER NANOPARTICLES AS FILTERING DEVICES FOR DIESEL BLENDS

Rodolfo Ribas; Jossano Marcuzzo; Aristeu Tininis; Fátima Menezes Bento..... 78

EVALUATING ESSENTIAL OILS ANTIFUNGAL ACTIVITY IN ISOLATES FOUND IN MUSEUM COLLECTIONS

Luís Fernandes, Diana Paiva, Emília Pereira, Cristina Rufino, António Portugal, Célia Cabral, Nuno Mesquita..... 81

ADITIVOS COMERCIAIS COM BIOCIDAS EM SUA FORMULAÇÃO E EFEITO SOBRE MICRORGANISMOS DETERIOGÊNICOS DE COMBUSTÍVEIS

Adriane Ramos Zimmer; Fátima Menezes Bento..... 83

BIORREMEDIAÇÃO BIOREMEDIATION

87

USE OF FERMENTED BRAN AND BIOCOMPOUNDS IN BIOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH BIODIESEL

Viviane Simon, Victória Dutra Fagundes, João Felipe Freitag, Luciane Maria Colla..... 87

ANÁLISE DE MICROBIOMA DE SOLO AFETADO POR CONTAMINANTE PETROQUÍMICO EM RESPOSTA À PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Sbruzzi, Renan César; Cauduro, Guilherme Pinto; Caesar, Lilian; Marmitt, Marcela; Valiati, Victor Hugo..... 91

CERIMÔNIA DE ABERTURA OPENING CEREMONY



Latin American Biodeterioration
and Biodegradation Symposium

A 10ª edição do LABS e a primeira edição ON-LINE contou com uma palestra na cerimônia de abertura, com um resgate histórico da Sociedade Internacional de Biodeterioração e Biodegradação, pelo presidente do IBBS, Dr. Frederick Passman.



A BRIEF HISTORY OF IBBS FROM 1969 TO 2023 AS RECORDED BY DENNIS ALLSOPP

Frederick J. Passman

Biodeterioration Control Associates, Inc., Princeton NJ 08543 USA, fredp@biodeterioration-control.com

The International Biodeterioration and Biodegradation Society's (IBS) origin story dates to World War II (1941), when U.S. authorities created the Office of Scientific Research and Development (OSRD) to coordinate the military's scientific research efforts. In 1945 OSRD commissioned the Office of Deterioration Prevention (Deterioration Prevention Committee) – reflecting increased awareness of canvas biodeterioration under hot and humid conditions.

From 1948 to 1964, the Deterioration Prevention Committee was headquartered in the building that is now home to the U.S. National Academy of Sciences. The Office of Deterioration was decommissioned in 1964 and, in 1965, the first biodeterioration symposium was hosted at the London School of Tropical Medicine by the UK's Society of Chemical Industry's Microbial Group. Three years later, in 1968, the first International Biodeterioration Symposium was held at the University of Southampton. Delegates to this symposium debated whether to create a new society.

The consensus was to form The Biodeterioration Society (Later International Biodeterioration Society - IBBS) with *The Biodeterioration Bulletin* becoming the society's official journal and Howard Eggins its first president. IBS held its first annual general meeting on 09 July 1971 and first scientific meeting on 12 November of that year. The first IBS scientific meeting was held at the headquarters of the Royal Society of Arts, in London. In 1990, Harold Rossmore and others championed the name change from IBS to International Biodeterioration and Biodegradation Society (IBBS) to better reflect the broad interests of our society's members. Since our founding in 1968, IBS/IBBS has held 18 international symposia (Figure 1).

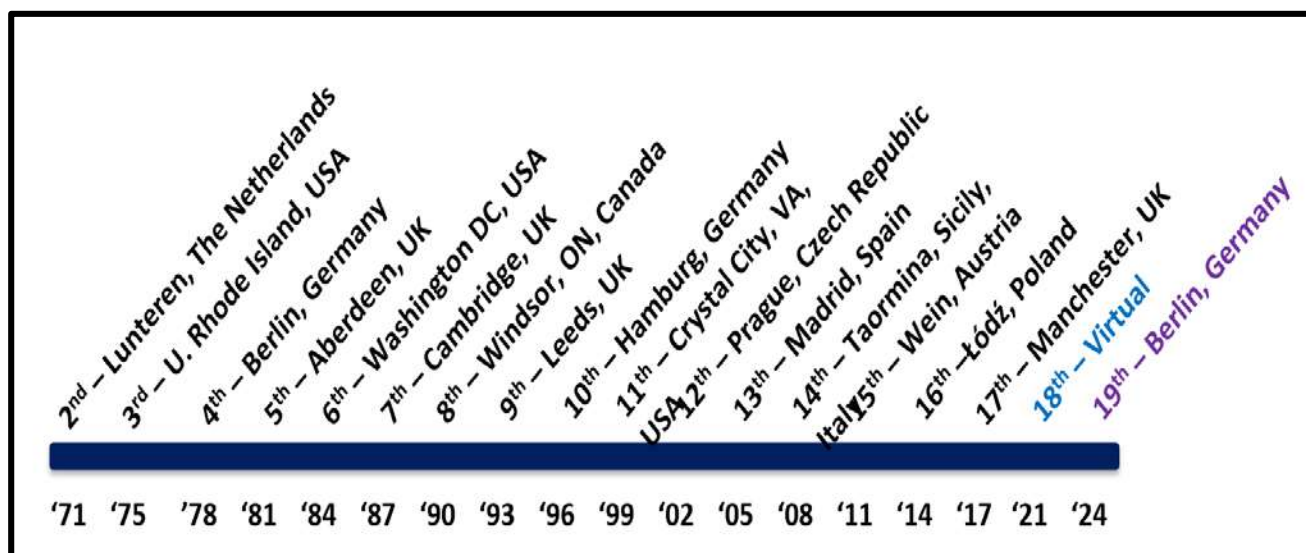


Figure 1. IBBS and IBBS symposia since 1971.

We are a member of the Federation of European Microbiology Societies and have members around the globe. Our network of 32 Country Representatives represents 28 countries at this time (Figure 2). Since 1992, the Latin American Biodeterioration Society has hosted ten regional symposia.

Today, *International Biodeterioration and Biodegradation* (Elsevier; 2022 impact factor = 4.8) is the IBBS' official journal. We also publish a quarterly newsletter, *IBBS World* ([Newsletter – latest – IBBS \(ibbsonline.org\)](https://ibbsonline.org/newsletter-latest)) and [Newsletter – archive – IBBS \(ibbsonline.org\)](https://ibbsonline.org/newsletter-archive)). The IBBS website ([IBBS \(ibbsonline.org\)](https://ibbsonline.org)) provides information about IBBS's and other societies' biodeterioration-related events, IBBS membership, and consensus standards related to biodeterioration and biodegradation research and monitoring. Prospective IBBS members can apply for membership via the website and students can apply for bursaries to support their research or meeting attendance. From the society's humble beginnings, IBBS has grown to include academic and industrial folks involved in a broad range of biodeterioration and bioremediation efforts ranging from biodegradation ecology to the development of biodeterioration control strategies. Although the founders were primarily bacteriologists and mycologists, our current membership includes entomologists, helminthologists, chemists and engineers who share the society's focus on biodeterioration and biodegradation.

PALESTRAS CONFERENCES

BIODETERIORAÇÃO / BENS CULTURAIS
BIODETERIORATION / CULTURAL PROPERTY



FUNGAL BIODETERIORATION IN LIMESTONE: COMBINING METHODOLOGIES FOR A MORE REALISTIC COMMUNITY CHARACTERIZATION.

D.S. Paiva ¹, L. Fernandes ¹, J. Trovão ^{1,2}, E. Pereira ¹, I. Tiago ¹, A. Portugal ^{1,2,3}, **N. Mesquita** ¹

¹ Centre for Functional Ecology (CFE) – Science for People & the Planet, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000–456, Coimbra, Portugal

² TERRA – Associate Laboratory for Sustainable Land Use and Ecosystem Services, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000–456, Coimbra, Portugal.

³ FitoLab – Laboratory for Phytopathology, Instituto Pedro Nunes (IPN), Rua Pedro Nunes, 3030–199 Coimbra, Portugal. Corresponding authors: dpaivaphd@gmail.com and inunomesquita@gmail.com.

INTRODUCTION

Fungi are widespread heterotrophic organisms that can adopt various structural, morphological, and metabolic strategies, enabling them to thrive in diverse environments worldwide. When colonizing stone monuments, fungi establish intricate and dynamic communities that fluctuate over time and space, frequently coexisting with other stone inhabitants. Their interactions, whether antagonistic or synergistic, are noted to play a substantial role in the deterioration of the stone often causing aesthetic (stains), chemical (interaction with minerals as a result of fungal metabolism) and physical alterations (stone penetration due to growth and nutrient-seeking).

Until recently, most information available on the colonization of cultural property by microorganisms came from the use of classical microbiology methodologies. The exclusive use of culture-dependent methods is not enough to fully characterize microbial communities, as they only capture a small portion of the total diversity present. This is verified not only because the growth conditions of many species are unknown, or difficult to reproduce, but also because of the existence of microorganisms in inactive (viable, but not cultivable) states. Additionally, they can be time-consuming and require expertise, but despite these limitations, these techniques are still extremely important due to the advantage of having pure cultures isolated to carry out physiological and metabolic studies, and to understand ecological functions and identify specific interactions with materials and other organisms. Furthermore, new strains can be obtained only with isolation for further characterization and description, thus enhancing our current knowledge of the true diversity of fungi. Metagenomic technologies have revolutionized our ability to thoroughly characterize complex microbial communities, overcoming the limitations of traditional culture-dependent methods in biodeterioration studies. By analysing DNA, these techniques have revealed a much greater microbiological diversity in such substrates than previously recognized. However, each approach has its pros and cons. Classic microbiological methods complement molecular techniques in identifying, characterizing, and describing microorganisms. Utilizing both approaches is ideal for achieving a comprehensive understanding of biodiversity within stone-colonizing communities, as they complement each other's strengths and address inherent limitations, thus providing deeper insights into microbial diversity.

Knowledge of deteriorating agents is of utmost importance for developing effective conservation strategies and well-executed restoration initiatives, ensuring the long-term preservation of these invaluable cultural heritage assets. Over the past two years, our team has conducted extensive research using high-throughput next-generation sequencing, coupled with various cultivation-dependent methodologies, to thoroughly study and characterize the fungal diversity associated with various biodeterioration phenomena in a limestone funerary art piece at the Lemos Pantheon, a national monument in Águeda, Portugal. Our combined findings allowed for detailed profiling of fungal communities in each analysed area, revealing highly diverse and distinct communities based on the observed biodeterioration. Furthermore, we confirmed that employing both cultivation and metagenomics methodologies synergistically is essential to overcome inherent limitations and provide a more realistic and accurate characterization of the community.

MATERIALS AND METHODS

Location and Sampling: The study was conducted on indoor samples collected in July 2021 at the Church of São Salvador da Trofa, a Catholic temple located in Trofa do Vouga, in the district of Aveiro, Portugal. This historic church houses the Lemos Pantheon, a 16th century burial place built in honour of the Lemos family, one of the most influential families in the region. Designated as a National Monument in 1992, it is the most important local landmark and a shining example of Portuguese funerary art. The pantheon's intricate carvings are crafted from white Ançã limestone, a unique type of Portuguese limestone that is white and highly homogeneous, with a high CaCO₃ content (<96.5%). Characterized by low compressive strength and

hardness, along with high porosity (20–27.2%) and capillary absorption (10–14%), these same features also render it highly susceptible to biological colonization.

Samples were collected from areas displaying clear signs of alteration and degradation. Four samples were collected using both micro-invasive (scalpel scraping, 0.5 g/site) and non-invasive (nitrocellulose disc swabbing, Ø 5 cm, 2/site) sampling methods in different types of biodeterioration observed: L1 - Dark and Green Biofilm (DGB); L2 - Green Biofilm (GB); L3 - Black Discoloration (BD); and L4 - Salt Efflorescence (SE). Each sample was divided into two aliquots, one for Illumina high-throughput sequencing and the other for culture-based methodologies (direct fungal isolation and after freezing incubation), suspended in 2 mL of sterile 0.9% (w/v) NaCl solution.

Fungal High-Throughput Illumina Sequencing and Data Analysis: Total DNA from each aliquot (L1, L2, L3, and L4) was extracted and used for Illumina Sequencing, with amplification targeting the hypervariable region Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) using specific primers. The sequencing and subsequent treatment of metabarcoding raw data, as well as clustering and taxonomic analyses, were conducted at GenoInseq, the Next Generation Sequencing Unit of CNC/Biocant located in Cantanhede, Portugal. Alpha diversity indices including Chao1, Abundance-based Coverage, Dominance, Equitability, Goods Coverage, observed OTUs, Shannon, and Simpson were calculated to assess the diversity and richness of fungal communities across the various samples. Additionally, Beta diversity analysis was also conducted using principal coordinate analysis (PCoA) ordination and UPGMA clustering. Differences between community structures were further evaluated through PERMANOVA, and a SIMPER analysis.

Culturable Fungal Isolation, Identification and Analysis: Each aliquot (L1, L2, L3, and L4) was vortexed, and 100 µL of the suspension was plated onto 6 different culture media: Potato Dextrose Agar (PDA); Dichloran-glycerol Agar (DG-18); Malt Extract Agar supplemented with 10% NaCl (w/v) (MEA 10%); Czapek Solution Agar (CZ); Rose Bengal Agar Base (RB); and DSMZ 372-Halobacteria medium supplemented with 10% NaCl (w/v) (HM 10%), in triplicate. Inoculated media plates were incubated aerobically in the dark at 25 ± 2 °C for 6 months. The development of colonies was checked weekly. Emerging colonies with distinct morphologies (on each culture medium) were transferred to axenic cultures in duplicate (PDA and into the medium from which they were originally recovered) and incubated for 15–30 days at the same temperature. Fungal isolates were then grouped according to their morphological traits (mycelium color, texture and form, exudates, and growth rate), and genomic DNA was extracted from pure cultures (one of each morphotype) for subsequent molecular analysis (based on subsets of ITS, *Tef*, *BenA*, *CaM*, and *Act* sequence data). To evaluate the diversity of cultivable fungal communities, Species Richness (S), Shannon–Wiener index (H), and Species Evenness (E) were calculated. After being stored in a standard freezer at low temperature for 6 months, aliquots from all 4 samples were reinoculated under the same conditions as the initial inoculation and analysed in the same manner.

Description and characterization of new taxa: Due to the low match similarity and unique morphological characteristics, two isolates of an unknown slow-growing microcolonial black fungus could not be identified at the species or genus level. To determine the taxonomic relationships of these strains with close relatives, a multi-locus phylogenetic analysis based on Internal Transcribed Spacer (ITS), 28S Large Subunit of ribosomal DNA (LSU), and the RNA Polymerase II Second Largest Subunit (*Rpb2*), coupled with morphological, physiological, and ecological examinations, were performed. As the fungal strains were originally isolated from deteriorated limestone, they were also screened for their *in vitro* biodegradative abilities through plate essays, specifically calcium carbonate (CaCO_3) dissolution, coupled with the evaluation of media pH alteration (acidification of the culture medium), calcium oxalate crystal formation, and other mineralization development.

RESULTS AND DISCUSSION

The features of the Ançã limestone that make it desirable for beautiful and detailed stonework also render it highly susceptible to fungal colonization. The study revealed highly diverse and dissimilar communities based on the type of biodeterioration observed. Green biofilms, found in samples L1 and L2, displayed a rich and diverse population composition. These biofilms are usually embedded in extracellular polymeric substances, which facilitate water retention and provide increased nutrient availability, thereby protecting organisms and promoting diversity. Sample L3 displayed a black discoloration, highly dominated by *Capnodiales* (~70%), such as black fungi, organisms that can thrive in less favourable conditions. Additionally, salt efflorescence in sample L4 created niches for halophilic species. Various biodeterioration-related organisms were also identified. Differences between fungal profiles obtained via isolation and metabarcoding were observed. While certain taxa (e.g. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Talaromyces*) were consistently identified using both methods, some of the most abundant taxa detected through metabarcoding were not found in culture-based isolates. *Fusarium*, *Mortierella*, and *Botrytis*, previously isolated from stone and known for their rapid growth and ease of cultivation, were among the taxa absent in the culture-based approach. The data obtained in this work provide an important insight to fully understand the fungal diversity and its distribution across dissimilar biodeterioration outlines in limestone, highlighting the importance of

a case-by-case approach, since material transformation is context-specific. This study also revealed that, despite HTS being a powerful tool in exploring largely diverse environments when compared with traditional cultivation methodologies, each approach tends to capture different community fractions. Our results demonstrate that through HTS we were able to characterize the diversity and abundance of the complex fungal communities present in different bio-deterioration outlines in detail, but several genera that were successfully isolated were not detected by this approach. On the other hand, with classic culture techniques for fungal isolation, we found only a few shared genera detected when both approaches were applied. The overlap and considerable differences in fungal community detected by both approaches highlight their complementarity, and their combination generates more detailed information when profiling these communities. Additionally, although the culture-dependent approach lacks the resolution needed to distinguish the complexity of communities' composition, it gave us a chance to visualize and preserve cultures to further test their functions, study their genetics and genomics, explore their environmental requirements and test cleaning agents and biocides, key information to prevent and/or control future outbreaks and consequent biodeterioration. In addition, it was proved that the use of different conditions and a wide variety of selective culture media positively influenced the great diversity of cultivable fungi obtained in this study. Finally, this study also makes a significant contribution to the inventory of stone-colonizing fungal diversity, as we were able to describe and characterize a novel genus and species of microcolonial black fungus, *Saxispiralis lemnorum*, belonging to the *Aeminiaceae* family, which had only one known representative until now. Furthermore, our evaluation of the physiological and biodeteriorative potential of this new species revealed significant deteriorative activity, suggesting its capacity to harm the substrate and induce various types of alterations.

CONCLUSION

By combining methodologies for a comprehensive characterization of microbial decay agents, we endeavour to safeguard our cultural heritage. These insights are pivotal for crafting conservation plans and restoration strategies that effectively counter biodeterioration. By understanding these processes, we can enact proactive measures to ensure the longevity and integrity of our cultural artifacts, preserving their significance for future generations.

REFERENCES

- Paiva DS, Fernandes L, Trovão J, Mesquita N, Tiago I, Portugal A. Uncovering the Fungal Diversity Colonizing Limestone Walls of a Forgotten Monument in the Central Region of Portugal by High-Throughput Sequencing and Culture-Based Methods. *Applied Sciences* 2022, 12(20): 10650. <https://doi.org/10.3390/app122010650>
- Paiva DS, Fernandes L, Pereira E, Trovão J, Mesquita N, Tiago I, Portugal A. Exploring Differences in Culturable Fungal Diversity Using Standard Freezing Incubation — A Case Study in the Limestones of Lemos Pantheon (Portugal). *Journal of Fungi* 2023, 9(4): 501. <https://doi.org/10.3390/jof9040501>
- Paiva DS, Trovão J, Fernandes L, Mesquita N, Tiago I, Portugal A. Expanding the Microcolonial Black Fungi *Aeminiaceae* Family: *Saxispiralis lemnorum* gen. et sp. nov. (*Mycosphaerellales*), Isolated from Deteriorated Limestone in the Lemos Pantheon, Portugal. *Journal of Fungi* 2023.

CONSERVAÇÃO PREVENTIVA DO PATRIMÔNIO CULTURAL ASSOCIADA A ALTERNATIVAS LIMPAS CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS

Douglas Boniek

Residente Pós-doutorado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais | ICB | PPGM | UFMG. dboniek@ufmg.br

Estudos interdisciplinares em obras de arte e no patrimônio cultural fornecem soluções eficientes para controlar o crescimento dos fungos e minimizar os efeitos negativos da biodeterioração. Além disso, a avaliação da qualidade do ar é um parâmetro microbiológico relevante para garantir a saúde dos restauradores que trabalham com o patrimônio cultural e para preservar o acervo de relevância histórica. O isolamento e identificação das espécies fúngicas anemófilas presentes no interior de um ambiente controlado são essenciais para o tratamento contra o crescimento microbiano, evitando assim, o processo de biodeterioração das obras de arte, além de prevenir contra possíveis infecções oportunistas humanas. A deterioração microbiológica é um dos mecanismos mais relevantes envolvidos na alteração negativa do patrimônio cultural, nos quais os efeitos nocivos podem ser evidenciados nas madeiras, rochas, pergaminhos, esculturas, pinturas a óleo, documentos fotográficos e tecidos.

A biodeterioração causada por fungos filamentosos é considerada uma ameaça ao patrimônio cultural e arquitetônico, principalmente nos climas tropicais caracterizados por alta umidade relativa do ar, o que favorece a disseminação e colonização de fungos, devido ao metabolismo quimiorganotrófico, à ubiquidade e à fisiologia desses micro-organismos. O ambiente externo, sistemas inadequados de ar condicionado, vegetação externa e atividades antrópicas, especialmente a atividade de restauração e visitação intensa, são os principais contribuintes da ocorrência de micro-organismos em ambientes internos. Além disso, nestes ambientes, os conídios de fungos filamentosos podem ser encontrados livremente no ar ou associados a partículas, de forma que se depositam nas superfícies, causando a biodeterioração de vários materiais. Em particular, pode-se destacar as obras de origem orgânica que apresentam uma bio-receptividade positiva para a microbiota quimiorganotrófica. Outro fator crucial associado à biodeterioração do patrimônio cultural é a presença de esporos fúngicos que podem afetar a saúde dos restauradores e visitantes, pois as formas filamentosas destes micro-organismos podem infectar as vias aéreas e os pulmões de hospedeiros humanos. Portanto, a ocorrência de certas espécies fúngicas em um ambiente fechado pode levar a quadros clínicos de micoses oportunistas e sistêmicas de acordo com o estado imunológico do hospedeiro humano. Assim, a identificação da composição da comunidade fúngica dentro destes ambientes, permite associações desses micro-organismos com as micoses respiratórias e cutâneas.

Neste contexto, a determinação da origem da contaminação fúngica, da identidade dos micro-organismos e das consequências micro estruturais e estéticas sobre as obras de arte, justificam a relevância de uma investigação de bioprospecção microbiana. Concomitante à investigação da diversidade microbiana, a fim de inibir ou erradicar a colonização fúngica, vários procedimentos químicos, às vezes em combinação com métodos físicos, geralmente são utilizados. Os componentes ativos comuns incluem cloreto de benzalcônio, moléculas benzênicas, fluoreto de sódio ou outras moléculas aplicadas para a desinfecção de fungos e insetos. Estes compostos químicos são geralmente tóxicos e não degradáveis, sendo recalitrantes ao meio ambiente e causadores da contaminação incontrolável em áreas distantes do local de aplicação.

Nas últimas décadas, tendências no controle da biodeterioração têm indicado a necessidade de procedimentos que usam compostos biocidas não prejudiciais e não tóxicos aos humanos e cuja eficiência é mantida ao longo do tempo, além de não apresentarem efeitos adversos ao patrimônio cultural e à saúde humana. Particularmente, devido a propriedades antimicrobianas repelentes, bem conhecidas desde a antiguidade, moléculas naturais, como óleos essenciais (OE) de plantas, são aplicadas para diversos fins, entre os quais, promover a inibição da colonização microbiológica, atuando em diferentes vias metabólicas microbianas.

Os OEs derivados de diferentes espécies vegetais contêm vários metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Estes compostos agem diretamente sobre a célula fúngica utilizando diversos mecanismos: inibindo seu crescimento, induzindo a desestabilização da membrana citoplasmática, regulando o metabolismo intermediário, ativando ou inibindo reações enzimáticas ou afetando enzimas de síntese de macromoléculas. Em função disso, atualmente, os OEs têm sido aplicados em estratégias de conservação preventiva, destacando-se seus efeitos antimicrobianos com atividade contra fungos e bactérias associadas à biodeterioração de bens culturais. Ressalta-se que o método aplicado na conservação preventiva, baseado na utilização de compostos naturais, é considerado um método menos oneroso, facilmente executável, menos tóxico para os humanos, além de anteriormente já haver demonstrado excelentes resultados preliminares como potencial agente de controle microbiano.

Sendo assim, o cenário atual das reservas técnicas dos principais centros culturais permite o monitoramento da qualidade do ar neste ambiente, seja pelo método de sedimentação ou direcionada. Posteriormente, de acordo com o perfil da microbiota fúngica detectada, o uso de extratos naturais que apresentem os melhores resultados como agente fungicida ou fungistático, poderá ser uma metodologia pioneira a ser empregada neste tipo de ambiente em território brasileiro, podendo futuramente se tornar em uma referência de estudos de conservação preventiva para os ambientes fechados destinados ao acondicionamento de bens culturais.

BIOLOGICAL COLONIZATION OF LICHENS ON THE STONES OF THE SÃO MIGUEL ARCANJO HISTORIC SITE: IMPLICATIONS FOR THE CONSERVATION OF CULTURAL HERITAGE

INAÊ CAROLINA SFALCIN^{1*}, ÂNGELA DENISE HUBERT NEUFELD VIEIRA², VERÔNICA DI BENEDETTI³, ARISTON JOSÉ CORREIA FILHO⁴

¹Biologist, MSc. Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Biologist, PhD. Regional Integrated University of Alto Uruguai and Missões (URI), Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Urban planner architect, MSc. Raro Efeito Historic Properties®, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴Artwork restorer, Brazilian Institute of Museums (IBRAM), São Miguel das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: inaesfalcin@gmail.com

INTRODUCTION

The São Miguel Arcanjo Historic Site, a UNESCO World Heritage Site (Fig. 1a), encompasses the archaeological remains of the former Jesuit Reduction of the Guarani people, established in the 17th and 18th centuries, located in the current municipality of São Miguel das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil. The Church and adjacent buildings that comprise the site were constructed with blocks of sandstone (IPHAN, 2018). It is known that these rocks are subject to the weathering action of the environment and living organisms, resulting in the deterioration of the structures. This is common in tropical regions, where climatic conditions such as temperature, humidity, rainfall, and solar exposure favor the development of various organisms on the stone surfaces, such as lichens (Fig. 1b) (Crispim, Gaylarde, Gaylarde, 2003). Understanding the occurrence and distribution of the lichen community in these sites can support the development of a regular and long-term maintenance program for the ruins, beneficial for the protection of the cultural heritage site. Thus, this study aimed to investigate the distribution of the saxicolous lichen community occurring in the ruins of the Church and Cloister of the São Miguel Arcanjo Historical Site.



Figure 1. The Ruins of the Church at the São Miguel Arcanjo Historic Site (A) (Junqueira, 2018) and its stone wall (West), covered by lichens (B) (Sfalcin, 2020).

MATERIAL AND METHODS

Four sampling points were defined in the ruins of the Site, according to geographical orientation, on the external face of the stone walls of the Church and the remaining wall of the Cloister. At each sampling point, four quadrants of 50x50 cm were determined, equidistant at 3.5 m intervals, and raised 1 m above the ground, totaling 4 m² of sampling area (Fig. 2). Lichen samples were collected at these locations for genus-level identification using morphological and anatomical characters, as well as histochemical tests with potassium hydroxide, sodium hypochlorite, and potassium iodide. Concurrently, data on solar exposure, temperature, and humidity were collected at these locations, in four events distributed over the months of September and October 2020. Solar incidence (hours/day) was visually monitored at each sampling point from the beginning to the end of insolation. Relative humidity and temperature were collected at 8 a.m., 11 a.m., 2 p.m., and 5 p.m. using a digital thermo-hygrometer. The Braun-Blanquet phytosociological method (1979) was applied to obtain the degree of lichen coverage, and Pearson's Correlation was used to associate environmental variables with lichen coverage and richness, using SigmaPlot® software (version 11.0).

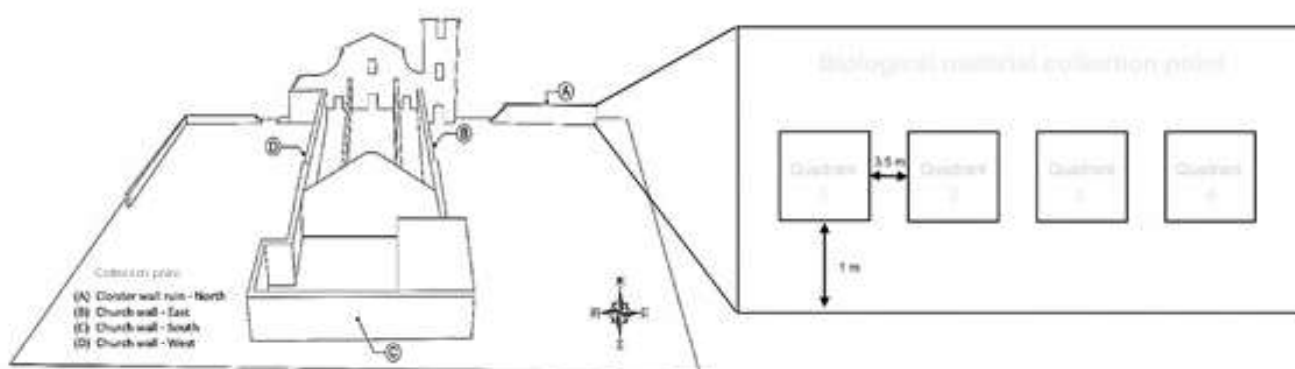


Figure 2. Collection points for biological material in the ruins of the Church and the Cloister wall, according to geographic orientation, in the São Miguel Arcanjo Historical Site, São Miguel das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil.

RESULTS

Five morphospecies of crustose lichens were identified in three genera - *Caloplaca* (3.13%), *Lecanora* (86.23%) and *Lepraria* (10.3%) (Fig. 3), whose colonization was correlated with environmental variables examined (Fig. 4). There was greater coverage of lichens on rocky surfaces more exposed to sunlight and heat (such as the North wall) while shaded, humid and colder areas, represented by the South wall (Fig. 5), had low lichen coverage and only one colonizing genus (Fig. 6). These lichen groups have been associated with the chemical degradation and mechanical breakdown of historic rock substrates in previous studies, and their biodeterioration in cultural heritage is widely recognized (Crispim, Gaylarde, Gaylarde, 2003).

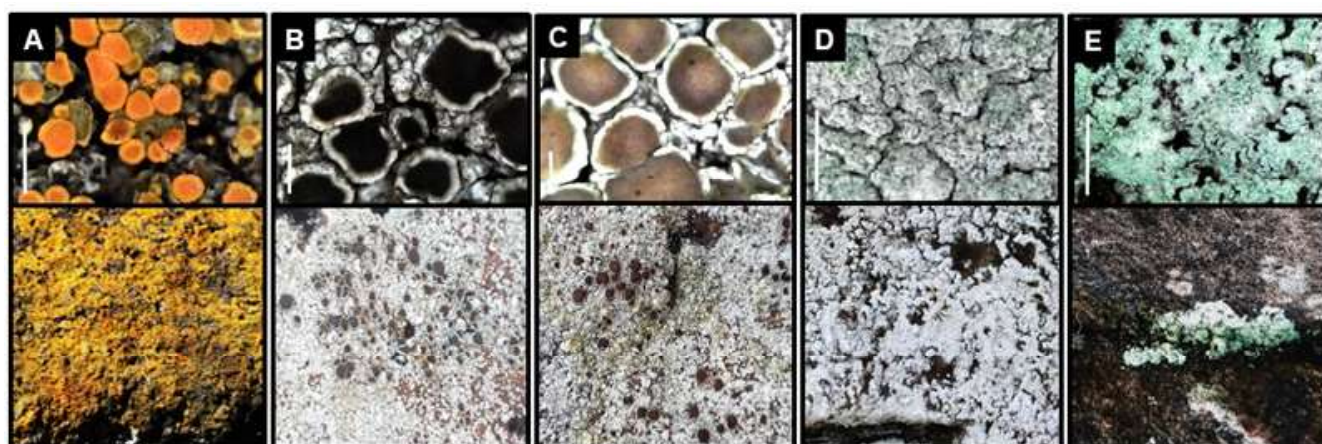


Figure 3. Lichen stems (A) *Caloplaca* sp., (B) *Lecanora* sp. I, (C) *Lecanora* sp. II, (D) *Lepraria* sp. I, (E) *Lepraria* sp. II, *in situ* (lower) and under magnification (upper), in the São Miguel Arcanjo Historical Site, São Miguel das Missões, Rio Grande do Sul, Brazil. Bar: 1 mm. Images: Inaê Sfalcin (2020).

	Colonized area		Richness	
	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>
Insolation	0.002*	0.695	0.073	0.459
Temperature	0.049*	0.499	0.145	0.381
Humidity	0.001*	-0.743	0.028*	-0.546
Col. area	-	-	0.024*	0.558

Figure 4. Pearson Correlation Coefficient between colonized area, richness of genera and the environmental variables of insolation, average temperature and air humidity (**p value* <0.05) of the São Miguel Arcanjo Historic Site. *r* = Correlation coefficient.

	Insolation (Min/day)	Temperature (C°)	Humidity (%)	Richness (n)	Colonized area (%)
North	554.25 a	24.06 a	38.12 a	2 a	51.6 a
East	350 ab	22.78 b	38.81 a	2 a	43.3 ab
South	20 b	20.46 c	41.25 b	1 b	13.5 b
West	322.75 ab	24.67 a	39.94 a	2 a	42.5 ab

Figure 5. Average sunshine, average air temperature and humidity, richness of lichen genera and area colonized by lichens on rocks at the São Miguel Arcanjo Historic Site. Means followed by equal letters in the column do not vary statistically using the Tukey test at 5% probability.

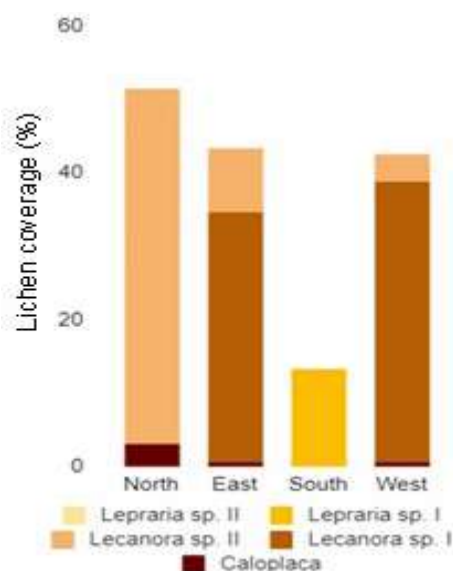


Figure 6. Distribution and coverage (%) of lichens morphospecies according to geographic orientation in the São Miguel Arcanjo Historic Site.

CONCLUSION

It was concluded that lichen colonization on the ruins of the São Miguel Arcanjo Historic Site suggests an initial stage of ecological succession, due to the predominance of crustose thalli, and may warrant further investigation regarding the significance of the biological impact of lichens on historical assets, elucidating future approaches to biological control and conservation of cultural heritage.

REFERENCES

CRISPIM C.A., GAYLARDE, P.M., GAYLARDE, C.C. (2003). Algal and Cyanobacterial Biofilms on Calcareous Historic Buildings. *Current Microbiology*, 46 (2): 79 - 82. DOI: 10.1007 / s00284 002-3815-5.

Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (2018). *Parque Histórico Nacional das Missões*. Available at: <http://portal.iphan.gov.br/pagina/detalhes/766/>. Accessed on: June 15, 2020.

ACTIONS CARRIED AT MAST ON BIOLOGICAL CONTROL TO PRESERVE COLLECTIONS

Ozana Hannesch ¹ & Alessandro Wagner Alves da Silva ²

¹Tecnologista. Conservadora-Restauradora de Papel. LAPEL-MAST

"mailto:ozana@mast.br"ozana@mast.br

²Técnico. Conservador-Restaurador. LAPEL-MAST

mailto:alessandrowagner@mast.br"alessandrowagner@mast.br

INTRODUCTION

The mission of the Museum of the Astronomy and Relation Science (MAST) is to expand society's access to scientific and technological knowledge through research, preservation of collections, dissemination and history of science and technology in Brazil. To carry out these actions, the museum is structured into departments, namely: Museology Coordination, the Documentation and Archive Coordination, the History of Science Coordination and the Science Education Coordination. The Paper Conservation and Restoration Laboratory (LAPEL) aims to apply preventive conservation, conservation and restoration measures to archival and bibliographic documents from collections acquired by MAST; research in its area of activity; qualification and training of professionals, fellows and students of the Master's Course in Preservation of Science and Technology Collections. Preventive conservation consists of numerous procedures for monitoring, inspecting, recording and controlling environmental conditions in the areas of storage, treatment, consultation and exhibition of documentary collections.

Between 2010 and 2022, a LAPEL team was responsible for the study and guidance to prevent and mitigate the microbiological deterioration of historical documents, under the coordination of researcher Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa. Based on Brazilian Resolution 176 of ANVISA (2000), the maximum number of three types of fungal colonies per sample of Petri dishes was established as an acceptable environment for the collection. More than three types were considered unsatisfactory. Samples were collected by depositing direct air impact on the plate containing potato dextrose agar, exposed for two hours, distributed in specific locations in the rooms. The plates were then closed for incubation at 23°C for 5 to 7 days.

The analysis was performed by macroscopic observation of colony growth and quantification of morphological types. Using this methodology, some collection storage areas with air-conditioning were monitored to identify the presence of microorganisms in the air. Results were based on evaluation on a Brazilian resolution that regulates accepted contamination levels in air-conditioned spaces, and on World Health Organization. Results (DA COSTA; LINO; HANNESCH, 2011) indicated low levels of bacterial and fungal populations, smaller than 50 CFU/m³. These results, compared to the outside area of the museum indicated a low internal to external ratio, around 0.131, a value far from the limit of 1.5 in the Brazilian legislation. Although those values clearly indicate low levels of contamination for human comfort, the presence of fungi from the genera *Cladosporium*, *Aspergillus* and *Penicillium* requires attention due to their possible cellulolytic activity. The spaces are permanently controlled for their temperature and relative humidity levels, to be used as a permanent repository for scientific documents.

The presence of cellulose-degrading microorganism can implicate the effective occupation of the areas due to their biodegradation effects. In another study (DA COSTA et al, 2018), on the effects of paper microbiological deterioration and its relationship with acid and alkaline supports and iron gall ink, numerous tests were used, such as: spot-tests to detect lignin and starch, chemical digestion to quantify the total iron content, studies desorption process to remove iron from papers, followed by accelerated artificial aging, scanning electron microscopy studies and biodeterioration tests. In this case, results indicated that lignin was only detected on acid papers, while starch was detected both on acid and alkaline papers. Furthermore, treatment with calcium phytate proved to be an efficient process to remove excess iron from the inks. Scanning electron microscopic images showed distinct surface spreading of inks on the papers, depending on the iron content. Finally, in the absence of any other carbon source, papers strips containing iron-gall inks proved to be amenable to biodeterioration, indicating that chemical and biochemical deterioration simultaneously occur (DA COSTA et al, 2018).

The macro biological agents that affect historical paper collections are mainly insects, such as termites, borers and beetles, moths, book lice, cockroaches and, in some cases, ants. They affect the collection, generally causing stains, loss of support and information. The detection and control of macro organisms of the MAST is carried out through disinsection companies hired toward terms of reference. It's a 4 year contract, and plus one year of renewal. After this period a new bidding should be initiated with public call of pest control companies in the city of Rio de Janeiro. Through monitoring by the LAPEL team, the contracted company carries out the inspection, monitoring and control of arboreal and soil termites, as well as those in dry wood. The type's *Copitotermes gestroi* and *havilandi*, *Hemerotermes*, *Nasutitermes* and *Cryptotermes brevis* were identified

on the MAST campus and rooms. For control, 370 underground baits with hexaflumuron were installed around the buildings, and aerial baits on the walls of affected internal areas. The results indicate that MAST has managed to create an efficient barrier and prevent collections from being affected by these biodeteriorators.

REFERENCES

ANVISA. Resolução RE/ANVISA n. 176 de 24 de outubro de 2000. Access in: www.anvisa.gov.br.

DA COSTA, A. C. A.; LINO, L. A. S.; HANNESCH, O. Total Microbial Populations in Air-Conditioned Spaces of a Scientific Museum: precautions related to biodeterioration of scientific collections. Journal of Bioprocess and Biotechniques, vol. 1, n. 3, p.1-6, 2011. Access in: <https://www.hilarispublisher.com/archive/jbpbt-volume-1-issue-3-year-2011.html>

DA COSTA, A. C. A. et al. Iron-Gall Ink Studies on Acid and Alkaline Papers and Their Relation to Cellulose microbiological Degradation. International Journal of Conservation Science, vol. 9, n. 3, p. 413-428, 2018. Access in: https://ijcs.ro/volume_9.html

BIODETERIORAÇÃO POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM REVESTIMENTOS DE ARGAMASSA

GUERRA, LAMEGO, FERNANDA ¹

¹ NORIE/UFRGS

A interface entre as diferentes áreas do conhecimento mostra-se relevante para a compreensão dos fenômenos e a busca por soluções para os problemas ou mesmo para o avanço em termos de inovação e tecnologia. Na área da construção civil, a interdisciplinaridade com as ciências biológicas auxilia em diversos aspectos, desde a compreensão de fenômenos relacionados à biodeterioração dos materiais, até a utilização de estruturas biológicas com fins benéficos ao edifício, como, por exemplo, pesquisas na área da bioautocicatrização de concretos.

Conforme a ABNT NBR 15.575 (2013), as edificações são constituídas por diferentes sistemas: estruturais, pisos, vedações verticais internas e externas (SVVIE), coberturas e hidrossanitários. De modo geral, os sistemas de vedação e de cobertura são os que permanecem constantemente expostos aos diferentes agentes ambientais exteriores, tais como ventos, radiação solar, chuvas, oscilações térmicas, poluição atmosférica e à diversidade de agentes biológicos ambientais.

A ABNT NBR 15.575 (2013) estabelece requisitos de desempenho a partir das necessidades e exigências dos usuários de edificações habitacionais, independente dos materiais constituintes e dos sistemas construtivos utilizados. Estes requisitos são descritos considerando os aspectos de segurança, de habitabilidade e sustentabilidade. Do ponto de vista da biodeterioração dos materiais, o desenvolvimento de agentes biológicos resulta na queda de desempenho, principalmente associado aos aspectos de habitabilidade e durabilidade, correlato à sustentabilidade.

Ambientes altamente contaminados por particulados biológicos voláteis podem ser responsáveis por diferentes sintomas em usuários que permanecem por longos períodos expostos às estas condições. Além disso, a durabilidade dos materiais que constituem os sistemas pode ser comprometida, através das alterações de ordem física e química promovidas por estes agentes.

Considerando as partes que compõem um edifício: sistemas, elementos, componentes e materiais, no contexto do ambiente construído, é de relevante interesse conhecer as interações que ocorrem com os fatores ambientais desde a escala microestrutural dos materiais até a compreensão do comportamento do sistema construtivo e suas trocas com o meio.

Características relacionadas à composição dos materiais quanto à disponibilização de minerais, matéria orgânica ou mesmo suas propriedades com relação à porosidade e rugosidade superficial podem favorecer o estabelecimento de comunidades biológicas. Além da escala do material, em termos de sistema construtivo, principalmente os sistemas de vedação, as trocas térmicas e favorecimento do fenômeno físico de condensação entre camadas ou mesmo na superfície, também resulta em um microclima favorável ao estabelecimento de diversas espécies de microrganismos.

Reconhecida a diversidade microbiológica existente (fungos, algas, bactérias, cianobactérias, etc.) e considerando os métodos e técnicas disponíveis para a investigação, são normalmente selecionados os agentes definidos como os predominantes ou mais ativos nos processos de deterioração. Em ambientes interiores, os fungos filamentosos têm efetiva relevância devido a sua capacidade de proliferação nos mais diversos substratos, possibilidade de adaptação às flutuações do microclima interior, por promover importantes alterações nos diversos materiais, também pelos potenciais riscos à saúde dos usuários.

Os sistemas de vedação vertical, externos e internos, no contexto brasileiro, normalmente recebem como camada de revestimento e, muitas vezes, como material de assentamento e ligação entre os componentes, as argamassas. A ABNT NBR 13.281-1 (2023) define argamassa como “Mistura homogênea de um ou mais ligantes inorgânicos, agregados miúdos e água, que pode conter fibras, adições e/ou aditivos, com características específicas de desempenho adequadas à utilização.” Entre os ligantes comumente aplicados tem-se o uso da cal hidratada e do cimento Portland.

Conforme descrito em Gallego-Cartagena, E. *et al.* (2020), a composição química dos materiais de construção possui uma correlação direta na constituição de biofilmes microbianos. Minerais como quartzo, calcita, feldspato, dolomita, gesso, entre outros, podem ser a fonte de micro e macronutrientes para algas, cianobactérias e fungos. A sinergia com os fatores ambientais (luz solar, pH, CO₂ e O₂) conformam as condições ideais para o desenvolvimento do biofilme. Cada microrganismo integrado a este biofilme tem diferentes necessidades nutricionais e demandas de oxigênio. Geralmente utilizam minerais inorgânicos e compostos orgânicos presentes nos materiais de construção como fonte direta para o seu metabolismo.

Desta forma, não apenas a caracterização biológica do fenômeno observado, mas de modo complementar, a caracterização quanto à composição química dos materiais e suas propriedades mostram-se relevantes para a correta compreensão do fenômeno e indicação de possíveis medidas eficientes para conter a extensão dos danos.

Em Guerra, F. L. *et al.* (2019) são apresentados os dados de uma análise realizada em uma edificação histórica na cidade de Porto Alegre – RS, a Casa Godoy (1907), 30°01'42,86"S; 51°13'01,53"O. Este estudo realizou o monitoramento microclimático no interior da edificação durante um ano, com a coleta horária das leituras de umidade relativa (UR) e temperatura do ar interior por uso de sensores. Além disto, foram realizadas coletas de fragmentos do material de revestimento em argamassa. Das coletas realizadas, foi feita a caracterização da composição mineralógica dos revestimentos com a determinação da proporção ligante/agregado, difração de raios X (DRX), fluorescência de raios X (FRX) e análise termogravimétrica (TG). Aplicou-se metodologia de microcultivo e extração de DNA com PCR e análise molecular para a identificação e quantificação de fungos (UFC/mL) a partir da amostragem obtida. As análises indicaram predominância de revestimento de argamassa composto por ligante à base de CaCO_3 (calcita) e MgCO_3 (magnesita) e agregado de quartzo (areia utilizada no traço) em proporção 1:2 e 1:5,4 (ligante:agregado, em massa). No interior da edificação, o microclima apresentou UR média acima de 70% e temperatura média acima de 20 °C na maior parte do tempo. Aproximadamente 60 colônias de fungos filamentosos foram isoladas, sendo identificados 13 isolados como os mais frequentes, entre eles: *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium spp.*, *Purpureocillium lillacinus*, *Lecanicillium spp.*, *Trichoderma atroviride* e *T. harzianum*.

Por tratar-se de uma edificação histórica, não ocupada no momento da pesquisa, a correlação entre a composição dos materiais em associação à falta de limpeza e manutenção (disponibilidade de nutrientes orgânicos), elevada umidade relativa (condensação nas superfícies e problema de infiltração) corroborou com a diversidade de espécies de fungos filamentosos identificados e quantificados na edificação. A compreensão abrangente do fenômeno permite a elaboração de estratégias efetivas de controle no momento da intervenção e recuperação de edificações históricas, como a apresentada neste estudo.

Uma das estratégias largamente estudadas para o tratamento e prevenção de superfícies de materiais construtivos, históricos ou convencionais, é a aplicação de fotocatalisadores nanométricos, como o dióxido de titânio que, através das propriedades autolimpantes (predomínio na fase anatase) reduz a disponibilidade de nutrientes orgânicos aos microrganismos, proporciona superhidrofilicidade, reduzindo, assim, a absorção de água, além de interagir com a parede celular de muitos microrganismos, apresentando comportamento biocida. Análises realizadas com o TiO_2 P25 foram conduzidas em substratos de composição com base em revestimentos históricos contra isolados de fungos e descritas em Guerra, F. L. *et al.* (2023).

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15.575: Edificações habitacionais - Desempenho. ABNT: 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13.281_1: Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - requisitos. ABNT: 2023.

Euler Gallego-Cartagena^a, Héctor Morillas^b, Maite Maguregui^d, Karen Patiño-Cameloe^e, Iker Marcaidab, Wendy Morgado-Gamerof, Luis F.O. Silva^a, Juan Manuel Madariagab. A comprehensive study of biofilms growing on the built heritage of a Caribbean industrial city in correlation with construction materials. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 147 (2020), 104874.

Fernanda L. Guerra, William Lopes, Juciana C. Cazarolli, Mariane Lobato, Angela B. Masuero, Denise C.C. Dal Molin, Fátima M. Bento, Augusto Schrank, Marilene H. Vainstein. Biodeterioration of mortar coating in historical buildings: Microclimatic characterization, material, and fungal **Community. Building and Environment**. 155 (2019) 195–209.

Fernanda Lamego Guerra, Caroline Giordani, Lais Zucchetti, Rodolfo Ribas, Angela Borges Masuero, Denise Carpena Coitinho Dal Molin and Fatima Menezes Bento. The Effectiveness of Spraying nTiO₂ on Coating Mortars in Historical Buildings Aimed at Reducing Fungal Growth. **Buildings**. 13 (2023) 2751.

THE CONTINUED IMPORTANCE OF ANTIMICROBIAL PESTICIDES FOR CONTROLLING MICROBIAL CONTAMINATION IN INDUSTRIAL PROCESS FLUIDS AND SYSTEMS

Frederick J. Passman

Biodeterioration Control Associates, Inc., Princeton NJ 08543 USA, fredp@biodeterioration-control.com

ABSTRACT

Microbicides (also known as biocides or antimicrobial pesticides) have been used in water miscible metalworking fluids (MWF) for nearly 120 years – since the initial development of MWF in 1915. Not coincidentally, microbial contamination was rarely an issue in non-water miscible MWF (i.e., straight oils). However, earlier adapters of MWF quickly realized that when one creates emulsions of 3 % to 10 % MWF concentrate in water and then recirculates that emulsion at 570 L min⁻¹ they create an environment conducive to microbial growth. Left uncontrolled, microbial contaminants in MWF generate malodorous gases, adversely affect emulsion stability, contribute to corrosion, and decrease the MWF's functional life. Additionally, bioaerosols represent a worker health risk – contributing to allergenic diseases ranging from eye and nose irritation to potentially fatal, hypersensitivity pneumonitis. Used properly, microbicides can minimize the risk of all these biodeterioration problems.

This in turn reduces waste, increases productivity, and creates a healthier work environment. Despite the well documented benefits of and absence of any documented adverse health effects linked to MWF microbicide use, regulatory pressures have increased steadily since the late 1980s. Consequently, the number of available active substances currently approved for use in MWF is a fraction of the number that were available two decades ago. In the U.S. microbicides are regulated under the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act and Federal Regulations section 40CFR 152 *et seq.* In the EU, microbicide use falls under Biocidal Products Regulation (BPR – REGULATION (EU) No 528/2012. The active substances approved for use in MWF are listed in BPR Article 95 Part 13. Part 13 currently lists 27 active substances (<20 % of the number available in the early 1990s).

The BPR defines a biocidal product as “Any substance or mixture, in the form in which it is supplied to the user, consisting of, containing or generating one or more active substances, with the intention of destroying, deterring, rendering harmless, preventing the action of, or otherwise exerting a controlling effect on, any harmful organism by any means other than mere physical or mechanical action.” This comprehensive definition seems all encompassing. Concerned that all MWF might all within this definition or the one for “treated article” (BPR's definition: “Treated article” means any substance, mixture or article which has been treated with, or intentionally incorporates, one or more biocidal products. It shall be noted that a treated article that has a primary biocidal function shall be considered a biocidal product.), UEIL successfully petitioned the EU's Biocidal Products Committee to exclude MWF from either definition.

Other nations and regional authorities have their own pesticide regulations. Admittedly, most microbicides are hazardous substances. They are designed to kill organisms. In the EU, decisions regarding whether the use of specific chemicals will be permitted are based on hazard assessments. In the U.S. they are based on risk assessments. The relationship between risk (R) and hazard (H) is demonstrated in equation 1:

$$R = H \times E \quad (1)$$

Where E = exposure. MWF industry personnel routinely work with hazardous chemicals (consider the acids used as pickling reagents). Regardless of the hazard, if exposure is adequately controlled, the risk is negligible. For example, since the late 1990s, when most metalworking operations were enclosed and enclosures were equipped with mist collection systems, the incidence of respiratory disease clusters has decreased substantially. The rare events that have been reported since 2000 have all been associated with system (i.e., enclosure or mist collector) failures.

Unfortunately, when the focus is hazard, the risk equation is obviated by the outrage factor – acceptability decisions based on personal beliefs rather than objective data. This is particularly true regarding the increased regulatory pressure against the use of formaldehyde-condensate (F-C) microbicides in MWF. Formaldehyde is classified as a probable human carcinogen by the U.S. National Institutes of Health (NIH). Agencies responsible for pesticide registrations have decided to equate F-C microbicides with formaldehyde. However, laboratory tests to determine the concentration of free formaldehyde in solutions at MWF pH (i.e. ≥ 8.0) and in end-use diluted MWF have determined that values are consistently below detection limits.

Moreover, air testing performed at metalworking facilities has demonstrated that formaldehyde concentrations in the air above F-C microbicide treated MWF is not significantly different from the concentration above untreated MWF. Notwithstanding these objective facts, regulators have restricted the use of F-C microbicides in MWF. This creates two challenges. First, F-C microbicides have historically represented more than 70 % of total MWF microbicide use by volume, globally. Secondly, no MWF microbicide is effective in all MWF formulations. However, MWF microbicides are stable and effective in a greater percentage of MWF formulations than any other chemical class of microbicides. Moreover, F-C microbicides are typically the least expensive options available to MWF compounders. As the number of F-C microbicides decreases, the cost to treat and availability of suitable alternatives shrinks.

New MWF microbicides are not being developed to replace those that have been withdrawn from the market. The primary expense associated with microbicide registration is toxicological testing. Testing can cost > 1 million €. Moreover, the delay between initial dossier submission and final approval (or disapproval) decision can exceed a decade. The total annual world market for MWF microbicides is not much greater than the monthly volumes used to treat mid-sized oilfields. Consequently, it is economically infeasible for microbicide manufacturers to invest in developing and registering new MWF microbicides. Any new products will be introduced into the MWF sector as an additional market for microbicide initially developed for higher volume markets. The irony is that the battery of toxicity tests needed to support microbicide registration is substantially greater than that required for technical grade products, even though technical products can be more toxic than microbicidal active substances.

As a case study, consider dicyclohexyl amine (DCHA) versus triazine (HHT – hexahydro1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-s-triazine). The oral toxicities (LD_{50}) of these two products are 200 mg kg^{-1} and 1520 mg kg^{-1} , respectively. Similarly, DCHA's and HHT's dermal LD_{50} s are 260 mg kg^{-1} and $>2000 \text{ mg kg}^{-1}$, respectively. Despite the fact that it is approximately 10x as toxic as HHT, DCHA is used to formulate MWF that are marketed as being "biocide-free."

When REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) was being developed, the guiding concept was that all chemical product registrations would be supported by the same toxicity data sets. The toxicity and environmental fate and persistence testing costs would have been the same for pesticidal and non-pesticidal products. However, technical product chemical manufacturers successfully petitioned to limit the battery of tests required. As a consequence, the playing field is not level and MWF compounders are replacing register microbicides with toxic alternatives that are not registered as antimicrobial pesticide. That leaves four alternative paths forward:

1. Formulate biocide-free MWF but use non-toxic, recalcitrant functional additives.
2. Level the requirements for toxicity and environmental fate and persistence testing required for all chemicals. Either reduce the list of required tests for microbicidal products to match the list for technical products or require the same data set for all chemicals.
3. Apropos of option 2, focus on risk rather than just hazard. Regardless of the hazard, if exposure is controlled, so is the risk. Many hazardous chemicals are used safely. Microbicides should be treated like other hazardous technical grade chemical products.
4. Return to traditional MWF formulation practices.

Before microbicides were recognized to be value added products, MWF system odors would typically become intolerable after 8 to 12 weeks in service. Systems were drained and recharged each time the odor became intolerable. With the advent of strategic biocide use and MWF condition monitoring, it has become common for MWF systems to go years between draining, cleaning and recharging events. Option 4 will increase fluid costs and decrease productivity.

Microbicides continue to serve an important role as value-added functional additives in MWF. Unless industry addresses the outrage-driven regulatory pressures that increasingly restrict the number of available active substances and permissible dosages, we will lose the ability to control microbial contamination in end-use diluted fluids.

UNDERSTANDING FUEL BIODEGRADATION THROUGH FUNCTIONAL GENOMICS AND TRANSCRIPTOMICS

Oscar N. Ruiz

Air Force Research Laboratory, Wright-Patterson AFB, Ohio USA. Oscar.ruiz@us.af.mil

Some microorganisms have evolved to survive and proliferate in extreme and highly toxic environments, including those containing hydrocarbons, heavy metals, and radiation. While liquid fuels are essential to sustain our energy driven economies and lifestyles, fuel has become a ubiquitous and serious contaminant of our natural environment. In many cases, the presence of fuel in the environment is associated with other highly toxic contaminants, including heavy metals and radionuclides, causing devastating effects in the environment. Biodegradation, the process by which microorganisms break down and consume chemical compounds, presents a great potential for environmental remediation and restoration. However, biodegradation can also present important challenges to the production, transport, and storage of fuels by affecting fuel quality and properties. The objective is to describe how a comprehensive microbiological, molecular (i.e., genomics, transcriptomics, metabolomics), and chemical characterization approach was used to understand the hydrocarbon biodegradation process and develop new detection and mitigation technologies to prevent fuel biodeterioration. The results of fundamental omics experiments and the application of the derived knowledge in the development of biosensors, biocides, and filters for prevention of fuel biodeterioration will be discussed. In conclusion, we show that by understanding the global adaptive mechanisms protecting microorganisms from hydrocarbon fuel, we can potentiate the development of new approaches to prevent fuel biodeterioration and improve the remediation of fuel waste in the environment.

BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS HYDROCARBONS BIODEGRADATION



METAGENOMIC APPROACH TO THE MICROBIAL COMMUNITY ASSOCIATED WITH HEAVY OIL SPILLED ON THE BRAZILIAN COAST AND IDENTIFICATION OF POTENTIAL BIODEGRADERS

VÂNIA M.M. MELLO

Federal University of Ceará, Laboratory of Microbial Ecology and Biotechnology vmmelo@ufc.br

Crude oil is a non-renewable resource of great global economic importance. Despite advances in safety, oil exploration is a practice susceptible to environmental disasters. In Brazil, between August 2019 and January 2020, a heavy oil spill contaminated more than 3,000 km of the Northeast coast and part of the Southeast, causing serious economic, social and environmental impacts. Chemical analysis proved that the contaminant originated from Venezuelan oil reservoirs, presenting profiles of isoprenoids pristane and phytane, absence of light hydrocarbons, predominance of long-chain paraffin, and a mixture of unresolved compounds, which increases the likelihood of negative effects for coastal organisms and ecosystems.

Over millions of years, hydrocarbons present in the environment have led to the evolution of a variety of microorganisms that can grow or transform these hydrocarbons. Therefore, bacteria that degrade hydrocarbons and produce surface-active compounds are potential candidates for applications in bioremediation. Having that in mind, the total DNA was extracted from oiled sand samples, amplified independently using primer pairs designed for V3-V4 fragments of 16S rRNA gene, and sequenced by a Next Generation Sequencing platform (Miseq – Illumina®). Concomitantly, an enrichment cultivation was performed to assess the microbial dynamics and succession events in microcosms with the oil as sole carbon source in Bushnell Haas broth (BH), supplemented with 3% NaCl (g/v). The oiled sand (OS) samples were collected from six locations along the northeast coast of Brazil, from September 2019 to March 2020. Four samples were collected in the state of Ceará. Composite beach samples were collected in the state of Alagoas, in Maceió, and in the state of Rio Grande do Norte, in Natal.

Our analyses revealed that the most abundant bacterial orders in all samples were Alteromonadales and Oceanospirillales, both Gammaproteobacteria, which accounted together for at least 29.3 % and up to 43.5 % of the ASVs (Amplicon sequence variants). Other abundant orders were Rhodospirillales, Rhodobacterales, Flavobacteriales, Vibrionales, Caulobacterales and Rhizobiales. Seventeen genera, including three genera candidates, were found in all samples (core). *Marinobacter*, *Alcanivorax* and *Thalassospira* were the most abundant genera within the core taxa.

In the enrichment cultures, Proteobacteria was the most abundant phylum at 15, 30 and 45 days, whereas the phyla Fusobacteriota and Amatinomadota were detected only at 15 and 30 days of enrichment, respectively. Flavobacteriales, of class Bacteroidia, was the most abundant order, reaching almost 40% of the ASVs. Other abundant orders were Oceanospirillales, Rhodobacterales, Immundisolibacterales and Pseudomonadales. At genus level, *Xanthomarina*, *Alcanivorax* and *Immundisolibacter* were most abundant. *Alcanivorax* and *Marinobacter* are present in all enrichment times, whereas *Pseudoalteromonas* showed great abundance at the beginning and decreased along the enrichment. Some genera had their abundance favored by enrichments, such as the genus *Immundisolibacter*. Other genera, however, were observed more abundantly only at specific intervals, such as *Acinetobacter*, which was more abundant at 15 and 30 days. *Vibrio* was present only at the beginning and the genus *Blastopirellula* was detected only at the end of enrichment. The environmental response to an episode of oil spills and the consequent entry of hydrocarbons into the environment, results from this intricate configuration of microbial community. Microorganisms capable of degrading these pollutants, previously present at lower rates, are thus enriched. Therefore, the change in the microbial community can be correlated with the oil composition since it undergoes structural variations as the hydrocarbons are degraded. Since oil is a complex mixture of hydrocarbons in different fractions, there is competition between representatives of bacteria for specific hydrocarbon substrates. Thus, the first taxa enriched in the community are those responsible for the most generalized hydrocarbon degradation and then, groups more specialized in degrading more persistent hydrocarbons are favored.

Acinetobacter species, for example, efficiently degrade tetradecane, while hexadecane and octacosane are efficiently degraded by *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alteromonas* and *Oceanospirillales*. PAH, such as naphthalene and phenanthrene, are specific substrates for *Thalassospira* and *Pseudomonas*. Straight and branched chain alkanes, such as pristane and phytane, are degraded by *Alcanivorax* spp. a genus found in this study that becomes abundant after oil spills in the ocean. *Immundisolibacter*, which had their abundance favored throughout the enrichment, is known to degrade aromatic compounds, such as PAHs, TPH and aminobenzoate.

The genetic potential was predicted for the taxa identified in the enrichment cultures to allow the association with chemical compounds present in the oil. Seven metabolic pathways were investigated which degrade either aliphatic or aromatic

compounds. Overall, the pathways with stronger functional abundance were those of alkane degradation, benzoate degradation, and the xenobiotics metabolism by cytP450. Among the classified genera, *Alcanivorax*, *Xanthomarina* and *Martelella* represented the highest contributions to oil-degrading function.

The taxonomic composition of the bacterial community associated with the oil spilled in Brazil is similar that found in other marine and terrestrial environments contaminated with oil, such as the phylum Proteobacteria, which is especially abundant, Bacteroidetes, Actinobacteriota and Firmicutes. Besides, the genera *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Thalassospira* and *Vibrio* detected in current study are known as hydrocarbonoclastic and are abundant after oil spills. Twenty-four pure cultures analyzed so far were obtained from the enrichments and identified as representatives of the genera *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Corynebacteria*, *Idiomarina*, *Aquamicrobium*, *Psychroflexus*, *Dietzia*, *Martelella*, *Sinomicrobium*, *Pseudomonas*, *Tistrella* and *Demequina*. Among the isolates, eight stood out as promising hydrocarbonoclastic strains. This knowledge combined with further studies indicates the possibility of application of promising bacterial strains in consortium to clean-up the residual oil buried in the coastal ecosystems.

BACTÉRIAS COMO AGENTES BIOLÓGICOS EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS)

VALIATI, VICTOR HUGO¹

¹ LGBM - Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. valiati@unisinos.br

O petróleo é a principal commodity utilizada no mundo, desempenhando um papel crucial na economia global como a maior fonte de energia utilizada no planeta e matéria-prima para inúmeros produtos industriais (ADEBIYI, 2022). No entanto, o petróleo também é conhecido por ser uma fonte significativa de poluentes. Durante todas as etapas de produção, refino e transporte do petróleo, ocorre emissão de poluentes no ar, na água e no solo, gerando impactos ambientais e alterando a qualidade de vida das comunidades próximas (OTITOLAIYE; AL-HARETHIYA, 2022). Um exemplo são os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), compostos orgânicos formados por anéis benzênicos fundidos, gerados durante a combustão incompleta de matéria orgânica (GENNADIEV et al., 2015; SAKSHI; SINGH; HARITASH, 2019). Os HPAs são divididos em dois grupos: os de baixo peso molecular, compostos por dois a três anéis benzênicos, e os de alto peso molecular, compostos por quatro ou mais anéis. Essa classificação influencia suas propriedades físicas, químicas e biológicas, tornando os HPAs de alto peso molecular mais resistentes à degradação e persistentes no ambiente (GHOSAL et al., 2016; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003). A presença de HPAs no ambiente representa uma séria problemática ambiental, visto que a contaminação do solo pode afetar a saúde humana e a biodiversidade local, uma vez que esses compostos são considerados tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (ABDEL-SHAFFY; MANSOUR, 2016). Dentre todos os HPAs conhecidos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) destaca 16 deles como prioritários para a remediação: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, naftaleno e pireno (KEITH, 2015). Frente aos danos gerados por esses compostos, um dos principais desafios enfrentados pelos pesquisadores e pela indústria é a busca por técnicas que diminuam os impactos causados por esses poluentes, de maneira segura, ambientalmente correta e com baixo custo.

Nesse sentido, uma das estratégias que vem ganhando destaque é a biorremediação, técnica que utiliza o metabolismo de organismos vivos com a capacidade de transformar os poluentes em substâncias menos nocivas ao meio ambiente ou da mineralização em água e gás carbônico (OMOKHAGBOR ADAMS et al., 2020). A biorremediação se mostra como uma estratégia promissora por ser economicamente vantajosa e mais sustentável em comparação com outros processos físico-químicos já utilizados (VARJANI, 2017). Dentre os organismos comumente utilizados, as bactérias ganham maior destaque por conta de suas habilidades metabólicas especiais, menor custo de manuseio e menor impacto ambiental. Outros fatores que favorecem o uso de bactérias são sua alta taxa de reprodução, rápida adaptabilidade a diferentes ambientes e a produção de surfactantes, substâncias que ajudam na degradação dos hidrocarbonetos (DVOŘÁK et al., 2017; MAIER; GENTRY, 2015). Entretanto, quando se trata dos HPAs, nem todos os grupos de bactérias são capazes de degradá-los, tornando-se necessário prospectar bactérias com essa capacidade específica para o sucesso na biorremediação, e a bioprospecção nesse contexto é importante pois, busca organismos, genes e enzimas que possam ter importância e valor econômico como um produto para o desenvolvimento de novas biotecnologias.

Cauduro et al., (2021) realizaram a bioprospecção de bactérias capazes de degradar HPAs em uma área de depósito de lodo ativado excedente de uma estação de tratamento de águas residuais petroquímicas. Após o isolamento utilizando HPA como única fonte de carbono, caracterização por métodos bioquímicos e identificação com base em análises genéticas, chegou-se à quatro cepas bacterianas que pertencem ao gênero *Burkholderia*: *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. cepacia* e *B. multivorans*. O gênero *Burkholderia* é descrito com a capacidade de degradação de HPAs e algumas espécies já são comumente utilizadas em processos de biorremediação de áreas impactadas e como modelo em estudos que avaliam a degradação de compostos orgânicos (CAUDURO et al., 2023; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; O'SULLIVAN et al., 2007). Sendo assim, testes de degradação *in vitro* foram realizados utilizando as bactérias prospectadas para avaliar sua capacidade de degradar o benzo[a]pireno, um HPA de alto peso molecular, que devido à sua estrutura química, é considerado prioritário, pois tem elevada resistência à degradação e é recalcitrante no ambiente. Para isso, foram realizados testes com as cepas individuais e em consórcio, após 20 dias de experimento o consórcio foi capaz de degradar 30% do poluente.

Estudos realizados *in situ*, com diferentes tipos de manejos de biorremediação, como a bioaugmentação e bioestimulação, em uma área contaminada com resíduo petroquímico, pode-se mostrar a capacidade de degradação por cepas bacterianas do gênero *Burkholderia* em matrizes complexas como o solo. A bioestimulação consiste em ajustar os nutrientes e o pH do solo para aumentar o potencial das comunidades bacterianas indígenas das áreas contaminadas. No caso da bioaugmentação

envolve a aplicação de culturas microbianas, que podem ser puras ou em consórcio, com capacidade de degradação testada *in vitro* (OMOKHAGBOR ADAMS et al., 2020). Nesse contexto, com a *Burkholderia vietnamiensis* G4, foi alcançada uma degradação média de 30 % para os compostos de alto peso molecular ao longo de um ano de experimento (CAUDURO et al., 2023). Em um trabalho que está sendo finalizado com o consórcio formado pelas cepas bioprospectadas, foi alcançada uma degradação média de 66,7 % para os compostos de alto peso molecular ao longo de um ano de experimento (CARVALHO, 2020). Trabalhos nesse sentido são de grande relevância para a implementação de novas técnicas e aumento do conhecimento da biorremediação como produto de biotecnologia final.

Considerando que os microrganismos são elementos essenciais nos processos de biorremediação, o desafio é aprofundar o conhecimento sobre as vias metabólicas, fisiologia, ecologia, e mecanismos reguladores dos metabolismos dos microrganismos responsáveis pela biodegradação, além de identificar os fatores limitantes que influenciam as taxas e dinâmicas de degradação com o objetivo de diminuir os custos de aplicação, aumentar a eficiência e reduzir o impacto ambiental (VARJANI, 2017). Nesse contexto, abordagens metagenômicas são cruciais para o sucesso de planos que utilizam técnicas de biorremediação (HIDALGO et al., 2020; HIDALGO-MARTINEZ et al., 2024). O reconhecimento da microbiota e sua dinâmica espacial e temporal fornece as informações necessárias para compreender como ocorre a degradação de componentes causadores de problemas ambientais, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A análise metagenômica possibilitou a caracterização das comunidades bacterianas existentes na fazenda de lodo petroquímico e a avaliação dos efeitos causados pela utilização de técnicas de manejo de bioaugmentação e bioestimulação com agente exógeno, a bactéria *Burkholderia vietnamiensis* G4 (submetido à publicação). Os microrganismos em nível de filo, família e gênero, encontrados no estudo foram também presentes em análises de comunidades bacterianas de solo em diferentes estudos (MHETE et al., 2020). Além disso, os resultados encontrados demonstram que embora os tratamentos sejam de certa forma uma interferência nas comunidades microbianas nativas, as estratégias utilizadas de bioaugmentação com a inserção da *B. vietnamiensis* G4, espécie exógena, não interferiram significativamente na área manejada, evidenciando o sucesso das técnicas testadas na área contaminada com HPAs.

Nessa busca por otimizações nas técnicas de biorremediação, as análises dos genes envolvidos nas vias metabólicas, produção enzimática e processos ambientais importantes, nos permite conhecer como os microrganismos respondem frente a condições estressantes (VILCHEZ-VARGAS et al., 2013), abrindo caminhos para a otimização destes processos por meio de edição gênica de genes alvos ou até produzir organismos geneticamente modificados (OGMs) com alta capacidade de degradação (JAISWAL; SINGH; SHUKLA, 2019). A transcriptômica possibilita a busca e identificação dos genes envolvidos nas vias metabólicas e produção de enzimas pelos microrganismos, e a quantificação da expressão desses genes permite entender como se dá a metabolização destes compostos e os processos biológicos envolvidos. Cauduro et al. (2020) utilizaram a transcriptômica para análise da expressão diferencial de genes da *B. vietnamiensis* linhagem G4 envolvidos na degradação do benzo[a]pireno. Os autores encontraram 88 genes com elevada expressão no grupo exposto ao poluente, sendo estes relacionados a vários mecanismos celulares que mantêm o funcionamento da bactéria em situações de estresse. A expressão validação desses genes foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR). A expressão de doze genes de interesse foi quantificada em 1, 12 e 24 horas (submetido à publicação). Além disso, a quantificação da degradação, a avaliação da viabilidade celular e a emissão de fluorescência do benzo[a]pireno assimilado foram realizadas após 28 dias de exposição da bactéria ao poluente. Os genes regulados positivamente são importantes para a sobrevivência bacteriana em situações de stress, para a decomposição e metabolização de compostos orgânicos e para o transporte e absorção de nutrientes. Além disso, foi observada uma redução de 52% do poluente *in vitro*, não houve variação significativa na taxa de viabilidade das células e a fluorescência indicou uma acumulação de benzo[a]pireno. Esses resultados demonstraram a adaptabilidade da bactéria e sua capacidade de modular a expressão de genes em diferentes momentos e conforme a necessidade.

De maneira geral, o trabalho desenvolvido nas duas últimas décadas permitiu a prospecção de bactérias autóctones que se demonstraram eficientes no manejo de áreas impactadas por HPAs em experimentos *in situ*. Ademais, demonstrou-se que as estratégias utilizadas nos processos de biorremediação não afetaram a microbiota existente, só a tornaram mais eficientes na utilização dos HPAs disponíveis. Por fim, os resultados das diferentes estratégias experimentais estão auxiliando a melhor compreensão dos genes potencialmente envolvidos na utilização destes HPAs em seus processos metabólicos.

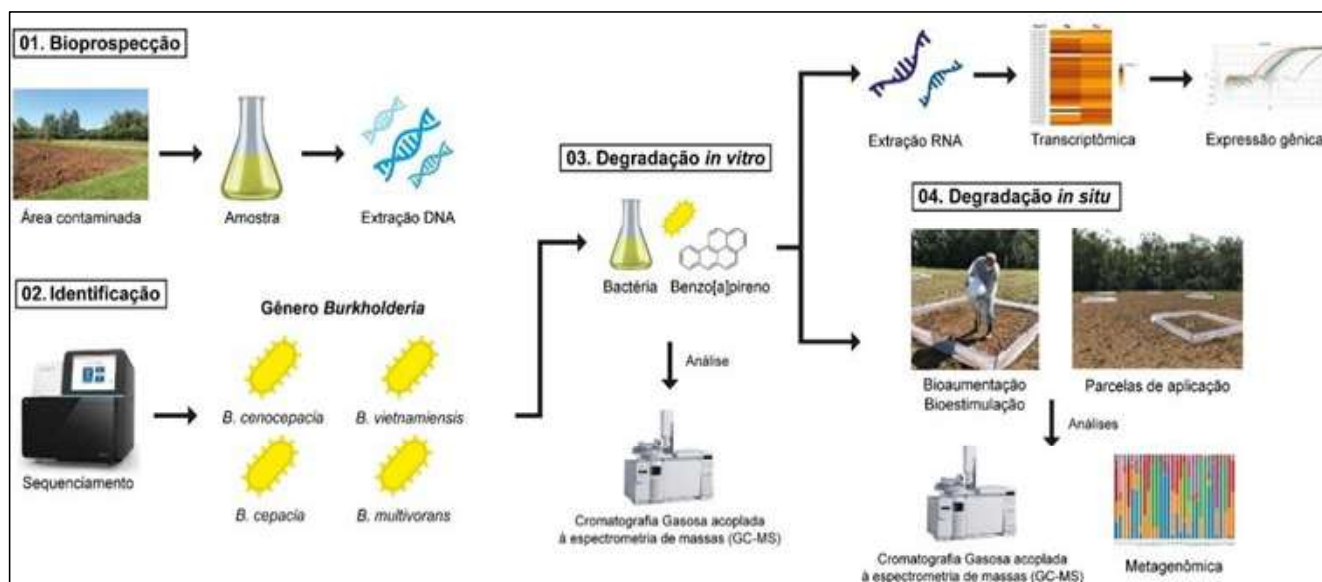


Imagem 1: Fluxograma com o resumo do trabalho apresentado.

REFERÊNCIAS:

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107–123, mar. 2016.

ADEBIYI, F. M. Air quality and management in petroleum refining industry: A review. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 4, p. 89–96, 2022.

CARVALHO, A. Estratégias de biorremediação in situ para a redução de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos prioritários em fazenda de lodo ativado. **Dissertação (Mestrado em Biologia)** – Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos. Rio Grande do Sul, p. 65. 2020.

CAUDURO, G. P. et al. Differential Expression and PAH Degradation: What *Burkholderia vietnamiensis* G4 Can Tell Us? **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–9, 27 ago. 2020.

CAUDURO, G. P. et al. New benzo(a)pyrene-degrading strains of the *Burkholderia cepacia* complex prospected from activated sludge in a petrochemical wastewater treatment plant. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, n. 4, p. 163, abr. 2021.

CAUDURO, G. P. et al. *Burkholderia vietnamiensis* G4 as a biological agent in bioremediation processes of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge farms. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 1, p. 116, jan. 2023.

DVOŘÁK, P. et al. Bioremediation 3.0 : Engineering pollutant-removing bacteria in the times of systemic biology. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 7, p. 845–866, nov. 2017.

GENNADIEV, A. N. et al. Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (Review). **Eurasian Soil Science**, v. 48, n. 10, p. 1076–1089, out. 2015.

GHOSAL, D. et al. Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 31 ago. 2016.

HIDALGO, K. J. et al. Taxonomic and functional diversity of the microbiome in a jet fuel contaminated site as revealed by combined application of in situ microcosms with metagenomic analysis. **Science of The Total Environment**, v. 708, p. 135152, mar. 2020.

HIDALGO-MARTINEZ, K. et al. Shifts in structure and dynamics of the soil microbiome in biofuel/fuel blend–affected areas triggered by different bioremediation treatments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 23, p. 33663–33684, 30 abr. 2024.

- JAISWAL, S.; SINGH, D. K.; SHUKLA, P. Gene Editing and Systems Biology Tools for Pesticide Bioremediation: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 87, 13 fev. 2019.
- KEITH, L. H. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 35, n. 2–4, p. 147–160, 15 mar. 2015.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 144–156, fev. 2005.
- MAIER, R. M.; GENTRY, T. J. Microorganisms and Organic Pollutants. Em: **Environmental Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 377–413.
- MARMITT, M.; CAUDURO, G. P.; SBRUZZI, R. C.; CAESAR, L.; OLMEDO, G. M.; LEAL, A. L.; VALIATI, V. H., Comparative metagenomics of bacterial communities in areas affected by petrochemical pollutants in response to bioremediation processes. **No prelo.**
- MARMITT, M.; CAUDURO, G. P.; SBRUZZI, R. C.; VALIATI, V. H., Evaluation of differentially expressed candidate genes in benzo[a]pyrene degradation by *Burkholderia vietnamiensis* G4. **No prelo.**
- MHETE, M. et al. Soil properties influence bacterial abundance and diversity under different land-use regimes in semi-arid environments. **Scientific African**, v. 7, p. e00246, mar. 2020.
- OMOKHAGBOR ADAMS, G. et al. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28–39, 29 out. 2020.
- O'SULLIVAN, L. A. et al. Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 1017–1034, abr. 2007.
- OTITOLAIYE, V. O.; AL-HARETHIYA, G. M. Impacts of petroleum refinery emissions on the health and safety of local residents. **Journal of Air Pollution and Health**, 13 mar. 2022.
- SAKSHI; SINGH, S. K.; HARITASH, A. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 10, p. 6489–6512, out. 2019.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503–549, dez. 2003.
- VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, jan. 2017.
- VILCHEZ-VARGAS, R. et al. Analysis of the microbial gene landscape and transcriptome for aromatic pollutants and alkane degradation using a novel internally calibrated microarray system: Catabolic gene landscape and transcriptome. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 1016–1039, abr. 2013.

PROGRESS IN UNDERSTANDING MICROBIALY INFLUENCED CORROSION (MIC)

Brenda Little

Montgomery, Texas, USA 77356

Microorganisms from the three kingdoms of life, i.e., bacteria, archaea and eucaryotes, influence multiple corrosion mechanisms. Microbially influenced corrosion (MIC) mechanisms are microorganism-substratum-electrolyte specific. Consequently, any reference to or description of MIC should include specifics about the causative microorganism(s), the composition and vulnerability of the corroding material, and the composition and handling (e.g., temperature, aeration, flow) of the electrolyte in which the corrosion took place. In laboratory experiments the electrolyte is often a defined culture medium tailored for the growth of microorganisms to produce a specific corrosion-related reaction. The composition and handling of the electrolyte determines which microorganisms grow and their growth rate. Electrolytes influence abiotic corrosion reactions and microbial growth can increase the abiotic corrosivity of an electrolyte. For example, corrosion inhibitors, e.g., nitrates and phosphates, are consumed during microbial growth. Consequently, the ratio of aggressive ions (e.g., chloride) to inhibiting ions increases. (Little, 2003). Much of the data regarding MIC assumes that bacterially mediated reactions by viable cells are responsible for the corrosion-related observations. For example, MIC can occur as the result of metabolic products from live microorganisms, e.g., acids and hydrogen sulfide, i.e., chemicals that react with susceptible substrata, e.g., carbon steel and copper alloys ("chemical MIC") (Enning and Garrelfs, 2014). However, natural biofilms can contain living microorganisms from multiple kingdoms, dead cells and extracellular polymeric substances (EPS). In aerobic saline environments both living and dead cells, as well as abiotic EPS can produce differential aeration or under deposit corrosion of some metals, e.g., carbon steel and stainless steels containing below 20% chromium (Roe et al., 1996; Little et al., 2008). The composition of EPS varies with bacterial communities and environments, including electrolyte chemistry, temperature, flow and pressure; biofilm age and the substrata on which biofilms have formed. EPS components typically include polysaccharides, proteins, nucleic acids (e.g., extracellular DNA), humic substances, lipids, enzymes and electrochemically active components (e.g., cytochrome c) (Wang et al., 2022). The influence of bacterial EPS on MIC has been evaluated in laboratory studies using three approaches: (1) extraction of EPS from pure cultures grown in culture media, (2) extraction of EPS from multispecies natural or tailored biofilms and (3) preparation of artificial EPS. The approaches are designed to assess the abiotic contributions of EPS to corrosion by eliminating the biological components. The extent to which the three laboratory approaches provide EPS identical to those found at natural metal/biofilm interfaces has not been demonstrated.

The influence of biofilms on MIC should not be generalized, i.e., biofilms can accelerate or inhibit corrosion or have no impact. Similarly, the precise influence of EPS on MIC depends on microorganism-substratum-electrolyte interactions. Isolated EPS can accelerate or inhibit corrosion or have little influence (Wang et al., 2022). Mechanisms for EPS influenced corrosion can involve the chemical properties of EPS and the nature of immobilized constituents. Anionic groups, such as carboxyl, hydroxyl, phosphate and amino groups in EPS can bind metal cations from solution (e.g., Ca^{2+} and Mg^{2+}) or from a corroding substratum (e.g., Fe^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+}). Some biominerals can form dense uniform protective films, e.g., CaCO_3 , and isolate the substratum metal from dissolved oxygen and aggressive anions (e.g., Cl^-) and inhibit corrosion. A patch distribution of the same precipitated biomineral can cause under deposit corrosion on low alloy stainless steels (Little et al., 2015). Exoenzymes and redox active compounds in EPS can influence ennoblement and extracellular electron transfer, respectively. Ennoblement, a positive shift in the open circuit potential (OCP) of passive alloys, increases the likelihood of localized corrosion as the OCP may reach the pitting potential (Little et al., 2008). Scotto and Lai (1998) reported that exoenzymes in EPS (e.g., glucose oxidase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase) were responsible for accelerated cathodic reactions and the modified electrochemical behavior of the substratum. Electroactive microorganisms can accept electrons from substratum metals, e.g., Fe0 (Zhou et al., 2022). Xiao et al., (2017) concluded that most microbial cell walls are enveloped by EPS (up to 1 μm thick) and microbial cells cannot directly contact the substratum. Using electroactive microorganisms with different cell wall compositions, the authors concluded that EPS acted as electron transfer media to maintain a distribution of electrochemically active electron shuttles to fill gaps between electron donors and electroactive cells.

REFERENCES:

Enning, D. & Garrelfs, J., Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. Applied and environmental microbiology 80, 1226-1236 (2014).

Little, B. J., A Perspective on the Use of Anion Ratios to Predict Corrosion in Yucca Mountain. Corrosion 59(8):701-704 (2003).

Little, B. J., Lee, J. S. & Ray, R. I., The influence of marine biofilms on corrosion: a concise review. *Electrochimica Acta* 54, 2-7 (2008).

Little B.J., Gerke T.J., Ray R.I., Lee J.S., The mineralogy of microbiologically influenced corrosion In: *Mineral Scales & Deposits: Scientific & Technological Approaches* edited by Zahid Amjad and Konstantinos D. Demadis. Pp. 107-120 (2015).

Roe, F. L., Lewandowski, Z., Funk, T., Simulating microbiologically influenced corrosion by depositing extracellular biopolymers on mild steel surfaces. *Corrosion* 52, 744-752 (1996).

Scotto, V. & Lai, M., The ennoblement of stainless steels in seawater: a likely explanation coming from the field. *Corrosion Science* 40, 1007-1018 (1998).

Wang, Y. et al. Extracellular polymeric substances and biocorrosion/biofouling: recent advances and future perspectives. *Recent Advances and Future Perspectives. Int. J. Mol. Sci.* 23:5566. <https://doi.org/10.3390/ijms23105566> (2023).

Xiao, Y. et al. Extracellular polymeric substances are transient media for microbial extracellular electron transfer. *Science advances* 3, e1700623 (2017).

Zhang, Y. et al. Metagenomic resolution of functional diversity in copper surface-associated marine biofilms. *Frontiers in microbiology* 10, 2863 (2019).

Zhou, E., Lekbach, Y., Gu, T. & Xu, D., Bioenergetics and extracellular electron transfer in microbial fuel cells and microbial corrosion. *Current Opinion in Electrochemistry* 31, 100830 (2022).

BIOFILM IN BIOCORROSION

Alane Beatriz Vermelho

Laboratório da Rede de Biotecnologia BIONOVAR - Unidade de Biocatálise, Bioprodutos e Bioenergia, UFRJ

Microbiologically influenced corrosion (MIC) of metals is a significant problem for the oil and gas industry, causing human and environmental risks and considerable economic losses. The global scale of the corrosion problem is staggering, with the cost of corrosion reaching \$2.5 trillion in 2016. Corrosion steel infrastructure alone costs \$3- 7 billion annually, including maintenance, repairs, and replacement. It is important to register that MIC impacts not only pipelines but also a diversity of other structures and devices, such as nuclear waste storage facilities, heat exchangers, reinforced concrete, oil and gas infrastructure, water utilities, fuel systems, power plants, underground storage tanks, marine platforms, offshore wind turbines, and dental devices.

In most instances, corrosion is an abiotic electrochemical reaction of metal oxidation with oxygen and water. Abiotic corrosion in the absence of oxygen is theoretically and technically insignificant. However, the extreme corrosion observed in anoxic environments demonstrates the essential role of the biological process in iron and steel corrosion. Microorganisms are the agents of corrosion reactions in subsea pipelines containing water/oil in anoxic conditions. Microorganisms can deteriorate the quality of several metals, including aluminum, copper, nickel, and titanium. However, most microbiological research has focused on the role of microorganisms in the corrosion of iron-containing ferrous(carbon and stainless steel). Corroding iron metals are typically covered with biofilms that initially promote the deterioration of the metal by oxidizing Fe⁰ to ferrous ions. Distinct microbial communities have been observed in biofilms and circulating fluids, indicating selection in the biofilm community. Different bacterial and archaeal lineages have been identified in corrosive biofilms depending on environmental conditions (temperature, salinity, biocide treatment). The microbial lineages associated with corrosive biofilms generally include sulfate-reducing microorganisms: methanogens, iron reducers, iron oxidizers (oxides de ferro), and fermenters.

Offshore oil facilities provide a vast, nutrient-rich environment for microorganisms becoming vulnerable to MIC. During the reinjection of produced water, nutrients and electron acceptors, primarily sulfate from the seawater and hydrocarbons from the oil, provide the necessary carbon, energy, and oxidants for microorganisms.

There are distinct types of microbial corrosion. One is the electrical microbiologically influenced corrosion (EMIC) or type I MIC. Specific microorganisms directly attack the metal using direct electron uptake in this case. Electrons from iron and steel oxidation directly fuel the metabolism of bacteria. The exact process involved in electron transfer still needs to be better understood. Direct electron transfer from Fe⁰ or electroconductive iron sulfide deposits to microorganisms has been suspected in deltaproteobacterial lineages in a process potentially involving multiheme cytochromes, conductive pili (nanowires), and/or extracellular electron shuttles (e.g., riboflavin, quinone containing molecule, Extracellular enzymes such as hydrogenases and formate dehydrogenases were also observed as potential mediators of the reaction in *Methanococcus maripaludis* incubations.

In chemical microbiologically influenced corrosion (CMIC) or type II corrosion, microorganisms can indirectly attack the metal by producing corrosive metabolites such as hydrogen sulfide. Sulfidogenic microorganisms such as sulfate, sulfite, thiosulfate, sulfur reducers, and sulfur oxidizers that produce hydrogen sulfide directly as an end-product of their metabolism can also be involved in CMIC. In addition, fermentative bacteria producing hydrogen that will react with elemental sulfur, leading to hydrogen sulfide formation, can also be implicated in CMIC. Corrosion via other corrosive metabolic products such as CO₂, nitrite, oxidized sulfur compounds, or volatile fatty acids produced by acid-producing fermentative bacteria is also implicated in CMIC.

Biocide treatment alone appears less efficient since biofilms often resist chemical treatments. Pigging of the pipeline removes most of the biofilms and deposits and improves the biocide action. This strategy might lead to the selection of fast-growing and biocide-resistant microorganisms, and there is no guarantee that the new microbial community will be less corrosive than the initial microbial community. Furthermore, mechanical destruction of the biofilm can potentially promote the dispersion of corrosive organisms from the biofilm to other sections of the pipeline. Dispersion is exacerbated when fluid is recycled and reinjected in the pipeline network without further treatment.

Green biocides, novel biological metal alloys, metal coatings, antibiofilm agents (chelator, surfactants, biologically produced chemicals), biofilm dispersal agents (amino acids, peptides, quorum-sensing inhibitors), bifunctional corrosion inhibitors, and phage therapy are new strategies that have been developing to combat biocorrosion.

BIOCIDES USED IN PRODUCED WATER TREATMENT AND ITS IMPACT ON BACTERIAL RESISTANCE

Gabriela Feix Pereira

DORF KETAL, RS, BRASIL gabriela.pereira@dorfketal.com

The impact of bacterial activity in the oil and gas industry extends from oil extraction and storage to the transportation and refining processes. One of the major sources of microbiological contamination is produced water, whose physicochemical composition varies according to geographical conditions and the specific chemical processes of each platform. Certain bacterial groups, such as sulfate-reducing bacteria (SRB) and acid-producing bacteria (APB), are commonly found in produced water. Their development is associated with increased hydrogen sulfide (H₂S) generation, elevated corrosion rates in metal structures, and even clogging of pipes and filters due to biofilm accumulation. The application of biocides is a mitigation strategy for this issue. However, the use of biocides without proper selection and monitoring leads to suboptimal dosing, which increases selective pressure and promotes the emergence of more resistant bacteria. In this context, it is important to know the microbiome composition of produced water to determine its impact in resistance to biocides commonly used in the oil industry.

Amplicon sequencing of the 16S rRNA gene was used to assess the taxonomy of produced water samples, and evaluations of minimum inhibitory concentration (MIC), biofilm inhibition, and eradication were used to assess biocide resistance. The taxonomic evaluations of the produced water samples indicated different microbiological compositions among all samples analyzed. The MIC of APB and SRB consortia varied depending on the biocide. However, when biofilms were evaluated, the most commonly used biocide in Brazilian oil fields, tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS), showed a tendency to increase biofilm formation, even when overdosed. Regarding the maintenance of the SRB microbiome after enrichment in culture medium, a higher diversity was observed in produced water, indicating that most of the SRB present in the samples were not cultivable.

These results raise an alert concerning the need for detailed planning of microbiological control treatments in the oil industry, highlighting the importance of selecting appropriate monitoring methods that accurately represent the microbiological scenario found on the platforms.

INFLUENCE OF THE STAGE OF BIOFILM DEVELOPMENT ON THE EFFECTIVENESS OF BIOCIDES TREATMENT

Lina E. Dominici^{*1}, María T. Del Panno², Marisa R. Viera¹

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT), CICPBA-CONICET-UNLP, Avenida 52 s/n e/ 121 y 122, CP 1900, La Plata, Argentina.

² Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), CONICET-UNLP, Calle 50 y 115, CP 1900, La Plata, Argentina. *corresponding author: l.dominici@cidepint.ing.unlp.edu.ar

INTRODUCTION

Biocorrosion is one of the major concerns in the global oil and gas industry, influenced by several factors including the microbial community, electrolyte, and characteristics of metallic surfaces (Little et al., 2020). In this context, Argentina has a significant petroleum industry, particularly in regions like the Neuquén Basin and the San Jorge Gulf Basin, where biocorrosion affects petroleum facilities, resulting in substantial costs and environmental risks. The formation of biofilm on metallic surfaces presents a significant challenge due to its role in biocorrosion and the difficulty of mitigation. Sulfate-reducing microorganisms (SRM), methanogens (MA), methanotrophs (MT), sulfur-oxidizing bacteria (SOB) and hydrocarbon degrading bacteria (HDB) are microbial groups involved in the biocorrosion process (Rajala et al., 2019, Salgar-Chaparro and Machuca, 2019).

The use of biocides, such as tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS), plays a crucial role in preventing biocorrosion due to its efficacy against sulfate-reducing bacteria, ability to dissolve iron sulfide particles, and low environmental impact (Jones et al., 2012; Kahrilas et al., 2014). Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of THPS biocide on the microbial community of biofilm at different stages of development.

MATERIALS & METHODS

To conduct the experiment, a continuous flow reactor simulating a petroleum storage tank with pipelines was constructed, containing water, carbon steel coupons, and a layer of crude oil as a carbon source. Sediment was used as inoculum to establish a site-specific microbial community. The reactor was incubated for 14 months, following which THPS treatment was administered, consisting of an initial dose of 400 ppm followed by a second dose of 600 ppm after 15 days. Biofilm samples were collected at different intervals during treatment, along with water and coupon samples.

RESULTS AND DISCUSSION

The abundance of bacteria, archaea, SRM and MA was estimated using qPCR. It was observed that 15 days after the first THPS dose, there were no significant changes in the copy numbers of bacterial ($\sim 10^3$ copies/cm²) and archaeal ($\sim 10^5$ copies/cm²) 16S rRNA gene in mature biofilm compared to pre-treatment levels, while both populations in the initial biofilm were notably higher ($\sim 10^6$ copies/cm²). Subsequently, treatment with two doses of THPS led to a significant increase in the number of bacteria adhering to coupons in mature biofilm ($\sim 10^4$ copies/cm²), along with the increase of SRM, MA, MT, SOB, HDB, while no observable changes were noted in the archaeal populations. Conversely, treatment of the initial biofilm resulted in a significant reduction in both bacterial and archaeal populations, with no detectable presence of SRM, MA, MT, SOB or HDB, indicating effective inhibition. Therefore, biocide treatment on the initial biofilm was effective in reducing the number of microorganisms, however, mature biofilms, which are generally found in the field, showed ineffective and counterproductive treatment.

Sequencing analysis of 16S rRNA gene revealed changes in the microbial community composition during treatment. The biocide caused the disappearance of certain microbial groups such as Lactobacillales, as also reported by Dominici et al. (2024). At the end of treatment, members of Archaea belonging to Methanobacteriales and Methanomicrobiales orders, as well as sulfate-reducing bacteria, were found in mature biofilm. Meanwhile, initial biofilm contained members of Pseudomonadales and Campylobacteriales; microorganisms belonging to these orders were found associated with biocide resistance (Bedoya et al., 2021).

Changes in corrosion rate and electrochemical mechanisms were observed after THPS treatment. Although biocide application reduced corrosion rate measured by techniques like weight loss and linear polarization resistance, the values remained high, and an increase in dissolved iron and manganese concentrations in water post-treatment indicated a corrosive process.

CONCLUSIONS

These findings suggest that, in this specific site, THPS treatment creates a more corrosive environment and increases metal susceptibility to corrosion. Moreover, treatment effectiveness varies depending on biofilm developmental stage and microbial composition, emphasizing the importance of thoroughly assessing biofilm status when considering biocide treatments in petroleum facilities. Prior to biocide application in the field, it is crucial to consider specific environmental conditions. Comprehensive testing of biocides on the microbial community at the site of interest is recommended. This will help determine microbial resistance, assess treatment efficacy, establish appropriate dosages, and design a treatment plan tailored to site-specific needs.

REFERENCES

- Bedoya, K., Niño, J., Acero, J., Cabarcas, F., Alzate, J.F. (2021). Assessment of the microbial community and biocide resistance profile in production and injection waters from an Andean oil reservoir in Colombia. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 157(4), 1–9.
- Dominici, L.E., Del Panno, M.T., Viera, M.R. (2024). Effect of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) on the microbial community and corrosion of carbon steel in a simulated crude-oil storage tank environment. *Geoenergy Science and Engineering*. 236, 212775.
- Jones, C., Downward, B., Edmunds, S., Curtis, T., Smith, F. (2012). THPS: a Review of the First 25 Years, Lessons Learned, Value Created and Visions for the Future. NACE International. Corrosion/2012. Paper No. 1505.
- Kahrilas, G.A., Blotevogel, J., Stewart, P.S., Borch, T. (2014). Biocides in hydraulic fracturing fluids: a critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity. *Environmental Science & Technology*, 49(1), 16–32.
- Little, B.J., Blackwood, D.J., Hinks, J., Lauroc, F.M., Marsili, E., Okamoto, A., Rice, S.A., Wade, S.A., Flemming, H.-C. (2020). Microbially influenced corrosion—any progress? *Corrosion Science*, 170, 108641.
- Rajala, P., Huttunen-Saarivirta, E., Bomberg, M., Carpén, L. (2019). Corrosion and biofouling tendency of carbon steel in anoxic groundwater containing sulfate reducing bacteria and methanogenic archaea. *Corrosion Science*, 159, 108148.
- Salgar-Chaparro, S.J., Machuca, L.L. (2019). Complementary DNA/RNA-Based profiling: characterization of corrosive microbial communities and their functional profiles in an oil production facility. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–18.

PLASTICS: FROM PERFECTION TO POLLUTION

Christine C. Gaylarde¹, Jose Antonio Baptista Neto² and Estefan Monteiro da Fonseca²

¹IBBS and Hon. Researcher at Department of Microbiology and Plant Biology, Oklahoma University, USA

²Department of Geology and Geophysics/LAGEMAR, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, RJ, Brazil

INTRODUCTION

The history of plastics began in 1846, with the accidental discovery of nitrocellulose in Europe. In 1862, “parkesine”, a plastic derived from cellulose, was invented by Alexander Parkes, a British metallurgist, as a cheap substitute for the more expensive natural materials ivory and tortoiseshell, and this was followed by Bakelite (a phenol-formaldehyde resin) in 1909. Our current understanding of plastics as condensation products began in the 1930s with the production of the polyamide Nylon and this was followed by the commercial development of thermoplastics such as polyvinyl chloride (PVC), low-density polyethylene (LDPE) and polystyrene (PS). The rapidly gaining popularity of these plastics was due to their wide range of use, durability, resistance to degradation by microorganisms and relatively low cost. Most of the biodeterioration problems with plastics were caused by fungal growth (Fig 1).

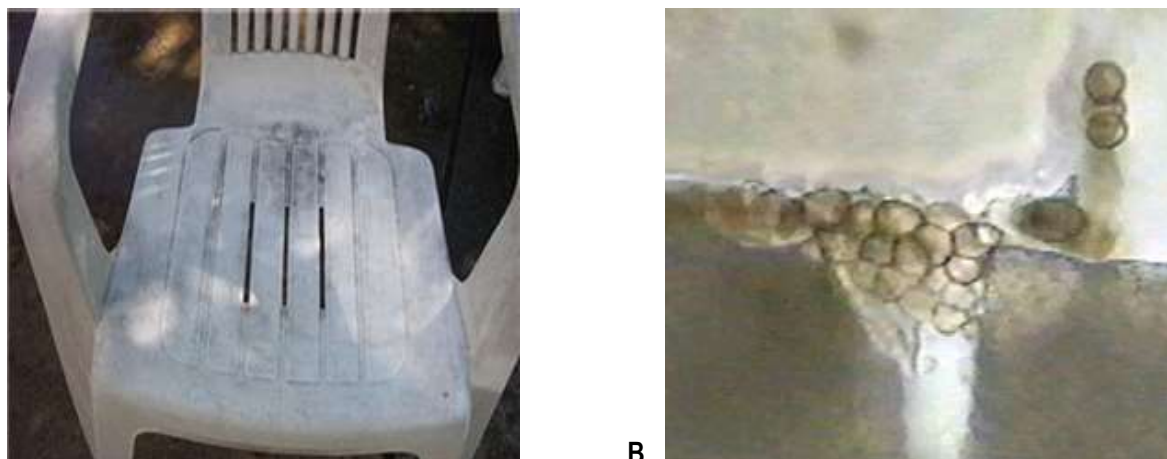


Figure 1. Fungal growth on plastic chair (a); cells of the fungus *Aureobasidium* growing within the plastic (b)

The great advantages of plastics, their durability and wide range of application, have now led to the well-publicized current environmental problems. Plastic fragments were first found in seabirds in the 1960s (Ryan and Jackson, 1987); at the same time the “Great Pacific Garbage Patch” became famous, as a massive area of floating plastic waste in the North Pacific Gyre (Hedgpeth, 1970). The problems of microplastics (MPs), degraded plastic particles and fibers less than 5mm in diameter (Fig. 2), were pointed out by Thompson et al. (2004); we are now aware that even smaller degraded plastic particles, nanoplastics, 1-1000nm, exist and are more dangerous because of their greater ability to enter and disrupt living cells, causing cytotoxic and genotoxic effects (He et al., 2023).



Figure 2. Microplastic fibers from Guanabara Bay sediments (A, C) and an air conditioner filter (B) in Rio de Janeiro

MPs are omnipresent on the Earth, being found in all environments, atmospheric, aqueous and terrestrial, as well as the organisms found therein. Their prejudicial effects on the latter have led to attempts to increase their degradation in the environment, both by replacing synthetic, hydrocarbon-based MPs with so-called “biodegradable” plastics like

polycaprolactone, chitosan and polybutylene adipate terephthalate. However, not only are these potential substitutes inferior in their properties, they also produce MPs during their degradation. Additionally, high levels of hydrocarbon-based MPs are already present in our environment, even in polar ice, whence they will be slowly released, or more rapidly with global warming (Gaylarde et al., 2023).

Increasing the degradation of such MPs could be attempted by bioremediation processes and considerable research is ongoing. Polyhydroxybutyrate, for example, is a bio-based polymer that is completely microbially degraded through the TCA cycle, but is not yet suitable to replace current plastics (Popa et al., 2022). Many microorganisms capable of degrading plastics have been reported over the years (Cai et al., 2023; Zhang et al., 2024), in attempts to produce a plastic-degrading consortium for use, for example, in sewage treatment. More recently, enzyme engineering has been attempted to increase plastic breakdown without the necessity for microbial growth (e.g., the cold-active laccase from *Psychrobacter* sp. NJ228 that has been engineered onto the outer membrane of *E.coli*), but there is still some way to go before this technology becomes a real possibility.

CONCLUSIONS

MPs are of significant and increasing global concern

They affect animal and plant metabolism and the Earth's biogeochemical cycles

Even if plastic production is reduced, or if alternatives are found, the amount of microplastics and their sources in the environment will ensure that pollution continues for many years. MPs in ice and permafrost will be released by global warming.

Current methods for dealing with MPs are ineffective

REFERENCES

Cai, Z., Li, M., Zhu, Z., Wang, X., Huang, Y., Li, T., Gong, H. and Yan, M., 2023. Biological degradation of plastics and microplastics: A recent perspective on associated mechanisms and influencing factors. *Microorganisms*, 11(7), p.1661.

Gaylarde, C.C., Neto, J.A.B. and da Fonseca, E.M., 2023. Microplastics in the cryosphere-a potential time bomb?. *Water Emerg Contam Nanoplastics*, 2:20 DOI: 10.20517/wecn.2023.27

He, T., Qu, Y., Yang, X., Liu, L., Xiong, F., Wang, D., Liu, M. and Sun, R., 2023. Research progress on the cellular toxicity caused by microplastics and nanoplastics. *Journal of Applied Toxicology*, 43(11), pp.1576-1593.

Hedgpeth, J.W., 1970. The oceans: world sump. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 12(3), pp.40-47.

Popa, M.S., Frone, A.N. and Panaitescu, D.M., 2022. Polyhydroxybutyrate blends: A solution for biodegradable packaging? *International Journal of Biological Macromolecules*, 207, pp.263-277.

Ryan, P.G. and Jackson, S., 1987. The lifespan of ingested plastic particles in seabirds and their effect on digestive efficiency. *Marine Pollution Bulletin*, 18(5), pp.217-219.

Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W., McGonigle, D. and Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 304(5672), pp.838-838.

Zhang, Z., Zhang, Q., Yang, H., Cui, L. and Qian, H., 2024. Mining strategies for isolating plastic-degrading microorganisms. *Environmental Pollution*, p.123572. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123572>

Zhang, A., Hou, Y., Wang, Y., Wang, Q., Shan, X. and Liu, J., 2023. Highly efficient low-temperature biodegradation of polyethylene microplastics by using cold-active laccase cell-surface display system. *Bioresource Technology*, 382, p.129164.

BIOSURFACTANTS: STATE OF THE ART

Marcia Nitschke.

Microbial Biotechnology Lab.São Carlos Institute of Chemistry – University of São Paulo – Brazil.

Microbial surfactants also known as biosurfactants (BS) are surface-active compounds produced by prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as bacteria, molds, and yeasts. The trend for a more sustainable society boosts the search for natural-based surfactants to replace synthetics in many industrial sectors. In this sense, surfactants of microbial origin have drawn attention in the last decades, once their production fulfills most principles of green chemistry and is aligned with the circular bioeconomy concept. The inherent amphiphilic and self-assembly character of BS associated with their low ecotoxicity, biodegradability, biocompatibility, structural diversity, biological activity, and production from renewable resources are potential advantages over synthetic surfactants. Biosurfactants can act as emulsifiers, demulsifiers, wetting and foaming agents, solubilizers, viscosity reducers, and cleansing agents in different industrial fields. Traditionally, they were utilized in enhanced oil recovery and bioremediation of oil spills in the petroleum industry and for bioremediation of heavy metals and other pollutants. However, their unique features are attracting attention in cosmetics, biomedical, food, agriculture, household & laundry, and nanotechnology. Regardless of the traditional concerns about the relative higher production costs of BS, some strategies as the use of metabolic engineering and hyper-producing strains, low-cost substrates, effective downstream processes, and co-production with other bioproducts have been proposed. The lack of robust information about their oral toxicity and impact on human microbiome especially for pharmaceutical and food applications is also a problem to overcome. Bioinspired surfactants, produced by enzymatic synthesis are considered the next generation of BS once they can be obtained with high purity and uniformity (single congeners), can be tailored to specific applications, and are highly scalable using cell-free systems rendering a typical natural product. In addition, the enzymatic modification of natural BS and investigation of BS from extremophiles are unexploited fields of research that can offer novel products and opportunities.



Latin American Biodeterioration
and Biodegradation Symposium

BIOREMEDIATION SESSION



MODERN TECHNIQUES IN BBB



FINANCING IN BBB



SHIFTS IN MICROBIOMESTRUCTURE, FUNCTIONS AND INTERACTIONS IN BIO-FUEL-AFFECTED ÁREAS TRIGGERED BY BIOREMEDIATION TREATMENTS

Kelly J. Hidalgo Martinez

Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil kellyjhm@unicamp.br

As a result of climate and energetic crises, as well as the environmental implications of fossil fuel consumption, the use of biofuels has expanded in recent decades. In Brazil, biodiesel is used in blends with diesel (also known as B12 – 12% Biodiesel / 88% Diesel) and ethanol in blends with gasoline also named gasohol (also known as E27 – 27% ethanol / 63% gasoline). The growing use of such blends increases the risk of biofuel contamination in soil, surface water, and groundwater. Previous studies suggest that the presence of biofuels affects petroleum hydrocarbon degradation rates and dynamics. However, little is known about the microbial community composition, structure, and function in microbiomes of soil polluted with fuel blends followed by bioremediation treatments. This work aimed to characterize the microbiome of four soil areas contaminated with different blends of biofuels and fossil fuels (e.g., biodiesel/ diesel or ethanol/ gasoline) and submitted to different bioremediation treatments using multi-omics techniques such as metataxonomics and metagenomics (gene-centric and genome-centric approaches). The study revealed clear differences between the microbial community composition, co-occurrence patterns and functional profiles depending on the blend, as well as before and after the bioremediation treatment. The microbiome associated with soil contaminated with biodiesel was shown to be more complex and diverse. Soils not submitted to any bioremediation treatment for a long period of time were more resilient to perturbations. Our results showed that the more abundant keystone species are well known hydrocarbon degraders. On the other hand, the results clearly showed the increase of the abundance of hydrocarbon degradation genes after the bioremediation treatments. Nevertheless, it was observed that the same hydrocarbon degradation and associated genes were enriched after the bioremediation treatments in the different areas, although they were affiliated to different taxa. Altogether, these findings contribute to expanding our understanding of the effects of bioremediation approaches over the microbiome in biofuel/ fossil fuel impacted soils, helping to define the most appropriate and efficient treatment according to the type of contamination.

BIODEGRADAÇÃO COMO PROCESSO-CHAVE NA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS NO SETOR DE ÓLEO, GÁS E BIOCOMBUSTÍVEIS: COM O QUE MAIS PODEMOS SONHAR?

Adriana Ururahy Soriano*; Dalton de Sousa Ximenes; Luiz Fernando Martins; André Moreira de Souza Filho e Marcus Paulus Martins Baessa

Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello, CENPES/PETROBRAS – Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil * adrianasoriano@petrobras.com.br

Há mais de 25 anos, o Centro de Pesquisas da PETROBRAS (CENPES) vem desenvolvendo, em parceria com várias Universidades e Instituições de PD&I no Brasil e no exterior, pesquisas científicas e soluções tecnológicas inovadoras, com foco na proteção e reabilitação de áreas contaminadas por vazamentos acidentais na indústria do petróleo, gás e biocombustíveis. Ao longo dessa trajetória, diversos conhecimentos, produtos e processos vêm sendo gerados e aplicados na prevenção e no gerenciamento da contaminação, contribuindo para que os esforços e os recursos sejam aplicados de forma mais segura, econômica e sustentável, prioritariamente em áreas de maior risco. Dentre eles, os processos biotecnológicos que se baseiam na biodegradação de poluentes merecem destaque.

De 1995 a 2000 foram ressaltadas as preocupações com os impactos ambientais causados no solo e nas águas subterrâneas pela disposição de resíduos oleosos e as primeiras contribuições tecnológicas envolvendo processos biológicos de tratamento de borras oleosas, busca de alternativas para a recuperação de *Landfarmings*, estudos para entendimento do comportamento ambiental de misturas de etanol e gasolina, bem como de biorremediação de solos argilosos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.

De 2000 a 2005, a derivação (2001), revisão e ampliação dos primeiros Valores Orientadores de Qualidade de Solo e de Água Subterrânea no Estado de São Paulo (CETESB, 2005) e a ocorrência de acidentes envolvendo vazamentos de óleo tanto em ambiente terrestre, quanto aquático (ex. Baía de Guanabara, e Paraná), impulsionaram a realização de PD&I voltados ao gerenciamento de áreas contaminadas e sua sistematização, considerando os diferentes elos do ciclo e suas interconexões – Investigação, Avaliação de Risco à Saúde Humana e Remediação. Foi um período marcado pela resposta a emergências (Contenciosos) e pelo início dos estudos associados à Recuperação Natural Monitorada.

Entre 2005 e 2010, os processos até então desenvolvidos em laboratório e com forte conteúdo biotecnológico – tais como Biopilha, Biorreator Piloto para Tratamento de Solos (Rizzo *et al.* 2010) e Fitorremediação - começaram a ter sua escala ampliada para aplicação em campo, possibilitando a recuperação da qualidade do solo para reuso na recomposição de áreas impactadas e no desenvolvimento de agroflorestas. Também foi uma época influenciada pela publicação da 1ª Resolução brasileira voltada ao Gerenciamento de Áreas Contaminadas (Resolução CONAMA 420/2009), que impulsionou ainda mais a aplicação sistemática do fluxo de gerenciamento na recuperação de áreas contaminadas no Setor de Óleo & Gás, culminando com a disponibilização das primeiras versões do *Software* Solução Corretiva Baseada no Risco (SCBR), aplicável desde a previsão de cenários de vazamentos até a definição de estratégias de remediação com base no risco à saúde humana.

De 2010 a 2015, o desenvolvimento de processos biológicos baseados no emprego de espécies vegetais para a recuperação de áreas salinizadas ganhou força e intensificaram-se os estudos em campo voltados à compreensão do comportamento de misturas de biocombustíveis e combustíveis em subsuperfície e processos de recuperação, estudos esses pioneiros no Brasil e no mundo (Corseuil *et al.*, 2011). Foi dada a largada, no país, na aplicação com base científica de processos de Atenuação Natural Monitorada, Atenuação Natural Incentivada e associação de processos físico-químicos, químicos e biológicos para recuperação de solos e de águas subterrâneas afetadas pelas referidas misturas. Em paralelo, as ocorrências de grandes vazamentos de óleo em mar no cenário internacional acenderam um alerta quanto à necessidade de também se pensar em processos e produtos biotecnológicos para a proteção e recuperação de ambientes marinhos.

Aproveitando o acelerado desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e de bioinformática em complemento às técnicas de microbiologia clássica baseadas em cultivo, começou-se entre 2015 e 2020, a se explorar as diversidades microbianas de diferentes matrizes ambientais, o que possibilitou, em associação com técnicas de caracterização de alta resolução e com a aplicação de análises isotópicas e utilização de armadilhas microbianas, a geração de Modelos Conceituais muito mais realistas (Teramoto *et al.*, 2020; Hidalgo *et al.*, 2020), além do desenvolvimento de produtos para ambientes marinhos, capazes de biodegradar óleo e proteger corais (Silva *et al.*, 2021).

Toda essa trajetória – na qual os Processos de Biodegradação tiveram papel extremamente relevante – culmina agora, entre 2020 e 2025, com a geração de contribuições de elevada maturidade técnica e comercial, que envolvem: (1) *softwares* - SCBR; *Software* para avaliação estatística não paramétrica do decaimento de contaminantes e Suíte integrada de simuladores matemáticos para a avaliação da migração, recuperação e seleção de técnicas de remediação de fase livre; (2) Protocolos de remediação *in situ* e descomissionamento de áreas contaminadas por combustíveis, biocombustíveis e suas misturas (Soriano *et al.*, 2023); (3) Sistema Termodinâmico de Monitoramento de Fontes (STMF), ferramenta para monitoramento em tempo real da depleção natural de contaminantes na zona da fonte; (4) Especificações Técnicas para inserção das análises moleculares em contratos de gerenciamento de áreas contaminadas para suporte a tomada de decisão quanto à aplicação e à otimização de Processos de Biorremediação; (5) Inoculantes para Processos de Fitorremediação de áreas salinizadas e/ou contaminadas; (6) Bioprodutos microbianos para respostas a vazamentos de óleo em mar em ambientes sensíveis (Villela *et al.*, 2023); (7) publicações científicas e formação de recursos humanos.

O presente apresentou um panorama histórico dessa trajetória científica e tecnológica, que enfatizou a importância da geração de conhecimento e o potencial de contribuição dos Processos Biotecnológicos para melhoria do gerenciamento de áreas contaminadas.

REFERÊNCIAS:

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2005). Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005. *Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências.*

CORSEUIL, H. X.; MONIER, A. L.; FERNANDES, M.; SCHNEIDER, M. R.; NUNES, C. C.; **ROSÁRIO, M.** and ALVAREZ, P. J. J. (2011). BTEX Plume Dynamics Following an Ethanol Blend Release: Geochemical Footprint and Thermodynamic Constraints on Natural Attenuation. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45, 8, 3422–3429. doi: 10.1021/es104055q

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2009). Resolução 420, de 28 de dezembro de 2009. *Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.*

HIDALGO, K. J.; TERAMOTO, E.H.; **SORIANO, A.U.**; VALONI, E.; **BAESSA, M. P.**; RICHNOW, H. H.; VOGT, C.; CHANG, H. K.; OLIVEIRA, V. M. (2020). Taxonomic and functional diversity of the microbiome in a jet fuel contaminated site as revealed by combined application of in situ microcosms with metagenomic analysis. *Science of the Total Environment*, v.708, p.135152, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135152

RIZZO, A. C. L.; DOS SANTOS, R. M.; DOS SANTOS, R. L. C.; **SORIANO, A. U.**; DA CUNHA, C. D.; ROSADO, A. S.; SOBRAL, L. G. S.; LEITE, S. G. F. (2010). Petroleum-contaminated soil remediation in a new solid phase bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.85, p.1260 - 1267, 2010. doi:10.1002/jctb.2425

SILVA, D. P.; VILLELA, H. D. M.; SANTOS, H. F.; DUARTE, G. A. S.; RIBEIRO J. R.; GHIZELINI, A. M.; VILELA, C. L. S.; ROSADO, P. M.; FAZOLATO, C. S.; SANTORO, E. P.; CARMO, F. L.; **XIMENES, D. S.**; **SORIANO, A. U.**; RACHID, C. T. C. C.; THURBER, R. L. V and PEIXOTO, R. S. (2021). Multi-domain probiotic consortium as an alternative to chemical remediation of oil spills at coral reefs and adjacent sites. *Microbiome*, 2021; 9(1):1-19. doi: 10.1186/s40168-021-01041-w.

SORIANO, A. U.; SCHNEIDER, M. R.; **BAESSA, M. P. M.**; BORTOLASSI, A. C. C.; GIACHINI, A. J. (2023). Remediação de áreas contaminadas por vazamentos de hidrocarbonetos de petróleo e biocombustíveis – Protocolo Técnico. 1ª Edição. Editora Synergia, Rio de Janeiro, 2023. E-book (PDF) ISBN: 978-65-86214-98-7. 348p.

TERAMOTO, E. H.; VOGT, C.; **BAESSA, M. P. M.**; POLESE, L.; **SORIANO, A. U.**; CHANG, H. K.; RICHNOW, H. H. (2020). Dynamics of hydrocarbon mineralization characterized by isotopic analysis at a jet-fuel-contaminated site in subtropical climate. *Journal of Contaminant Hydrology*, v.234, p.103684, 2020. doi:10.1016/j.jconhyd.2020.103684

VILLELA, H.; MODOLON, F.; SCHULTZ, J.; DELGADILLO-ORDOÑEZ, N.; CARVALHO, S.; **SORIANO, A. U.** and PEIXOTO, R.S. (2023). Genome analysis of a coral-associated bacterial consortium highlights complementary hydrocarbon degradation ability and other beneficial mechanisms for the host. *Scientific Reports*, 2023; 13:12273. doi: 10.1038/s41598-023-38512-z

TÉCNICAS RECENTES EM BBB (BIODETERIORAÇÃO, BIODEGRADAÇÃO & BIORREMEDIAÇÃO) **RECENT TECHNIQS IN BBB (BIODETERIORATION, BIODEGRADATION & BIORREMEDIATION)**

INTERACTIONS OF BIOPOLYMERS WITH CALCAREOUS MATERIALS AND THEIR RELEVANCE IN CONSERVATION OF MAYAN MONUMENTS

Ortega-Morales, Benjamín Otto* & Camacho-Chab, Juan Carlos

Center for Research in Environmental Microbiology and Biotechnology, Autonomous University of Campeche, Av. Agustín Melgar S/N Entre Juan de la Barrera y Calle 20, Col. Buenavista., C.P. 24039 San Francisco de Campeche, Campeche, México Email: beortega@uacam.mx

Biopolymers have attracted great interest in the scientific community due to their unique characteristics: they are biodegradable, biocompatible, renewable and have high resistance to different environmental factors. Like synthetic polymers, they are made up of monomeric units that are linked together into long chains to create large molecules. Generally, they are derived from biological sources such as plant biomass, microorganisms and agricultural waste, and are composed of different biomolecules such as nucleic acids, proteins, polysaccharides and lipids. For example, carbohydrate-based biopolymers include chitosan, cellulose, lignin, starch, and pectin, while gelatin, collagen, fibroin, and keratin are examples of protein-based biopolymers. Biocompatibility and biodegradability, together with their low toxicity, make biopolymers extremely versatile, allowing their use in various applications. These properties of biopolymers are generating great interest in the field of construction and conservation materials science (Rydz et al., 2014; Caruso et al., 2023).

Historical and modern buildings, being constantly exposed to the elements, deteriorate due to physical, chemical and biological factors that act simultaneously. To address this problem, consolidants are used whose objective is to restore the compactness and adhesion lost between the surface layers, avoiding the loss of material and improving its mechanical properties. An ecological approach is gaining ground in the area of cultural heritage research, where conservators and scientists seek innovative conservation materials that consider environmental sustainability. In this context, microbial bioconsolidants, products of biotechnology, present various properties with applications in the preservation of cultural heritage (Ortega-Morales and Gaylarde, 2021).

Microbial bioconsolidants include the bioproduction of minerals in the reconstruction processes (Ivanov et al., 2015). This is based on the use of microorganisms that can colonize the rock and induce the formation of CaCO_3 within the porous system or through the production of extracellular biopolymers with binding properties. Most microorganisms accumulate at interfaces to form microbial aggregates called biofilms. The matrix is the extracellular material produced by the microorganisms themselves and is formed by a conglomerate of different types of hydrated biopolymers including polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids (Rodríguez-Navarro et al., 2003; Decho, 2010).

The chemical composition of biopolymers plays an important role in the adhesion and affinity to calcareous substrates. A study carried out by May-Crespo et al. (2016) mentions that the humidity conditions presented by calcareous materials are a critical factor that leads to the deterioration of the stone. However, this process can be controlled through the application of biopolymers that have the ability to modify water transport within the porosity of the material. This quality of biopolymers is due to the fact that on the surface they form a thin layer of polymeric film with great adhesion, related to the chemistry of biopolymers, in particular due to the presence of acetate and pyruvate.

The interactions of biopolymers with calcareous materials and their effect on consolidation were previously determined in a laboratory study by Camacho-Chab et al. (2022). Bacterial biopolymers synthesized by biofilm bacteria colonizing Mayan limestone buildings were evaluated on the surface properties of solid limestone block samples, including disaggregation, hardness, and total color change at the laboratory level. The biopolymers produced by the bacterial isolates TM1B-488 and TM1B-489 influenced the surface properties at different levels. The partial chemical characterization of the biopolymers suggests a glycoprotein nature, whose constitutive acidic monosaccharides probably contributed to greater adhesion to limestone surfaces, stabilizing and hardening the surface and decreasing surface decohesion.

Subsequently, a short-term study was conducted to evaluate the performance under natural conditions of limestone blocks exposed to tropical conditions of a selected bacterial biopolymer (TM1B-488) and a previously unreported Mayan plant biopolymer known as “Escobilla” (*Sida rhombifolia*, Malvaceae) used in conservation procedures. Surface hardness (Leeb units) and color (L*a*b* coordinates) were measured and statistically tested for two types of limestone blocks (healthy and deteriorated). Both biopolymers increased surface hardness, decreased surface disaggregation, and did not alter color. The biopolymers evaluated are rich in carbohydrates, and were characterized by tangential filtration, overall chemical composition and monosaccharide composition of the hydrolyzed polymer. These results indicate that biopolymers of a heteropolysaccharide nature made up of some anionic charge residues could contribute to the stabilization and consolidation of the surface, although a longer exposure time is necessary to fully evaluate their applicability in the restoration of architectural heritage.

REFERENCES:

- Camacho-Chab, J. C., Pereañez-Sacariás, J. E., Camacho-Chab, P. A., Gaylarde, C., Arena-Ortiz, M. L., Ortiz-Alcántara, J. M., Chan-Bacab, M. J., Quintana-Owen, P., & Ortega-Morales, B. O. (2022). Influence of bacterial biopolymers on physical properties of experimental limestone blocks. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03438-7>
- Caruso, M. R., D’Agostino, G., Milioto, S., Cavallaro, G., & Lazzara, G. (2023). A review on biopolymer-based treatments for consolidation and surface protection of cultural heritage materials. *Journal of Materials Science*, 58(32), 12954–12975. <https://doi.org/10.1007/s10853-023-08833-5>
- Decho, A. W. (2010). Overview of biopolymer-induced mineralization: What goes on in biofilms? *Ecological Engineering*, 36, 137–144.
- Ivanov, V., Chu, J. & Stabnikov, V. (2015). Basics of construction microbial biotechnology. *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering*, 12, 21–56.
- May-Crespo, J., Ortega-Morales, B. O., Camacho-Chab, J. C., Quintana, P., Alvarado-Gil, J. J., Gonzalez-García, G., Reyes-Estebanez, M., & Chan-Bacab, M. J. (2016). Photoacoustic monitoring of water transport process in calcareous stone coated with biopolymers. *Applied Physics. A, Materials Science & Processing*, 122(12). <https://doi.org/10.1007/s00339-016-0594-6>
- Ortega-Morales, B. O., & Gaylarde, C. C. (2021). Bioconservation of historic stone buildings—an updated review. *Applied Sciences*, 11(12), 5695. <https://doi.org/10.3390/app11125695>
- Rodríguez-Navarro, C., Rodríguez-Gallego, M., Ben-Chekroun, K. & González-Muñoz, M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*- induced carbonate mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2182-2193.
- Rydz, J., Sikorska, W., Kyulavska, M., & Christova, D. (2014). Polyester-based (bio)degradable polymers as environmentally friendly materials for sustainable development. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 564–596. <https://doi.org/10.3390/ijms16010564>

SPATIAL PARTITIONING, COMPETITIVE EXCLUSION AND ECOLOGICAL NICHE OF FUNGI ATTACKING CULTURAL HERITAGE

Flavia Pinzari^{*1,2}, Lorenzo Pin¹

¹Istituto per i Sistemi Biologici (ISB), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Monterotondo (Rome), Italy, Europe

² Natural History Museum, London, UK **email:** flavia.pinzari@cnr.it

INTRODUCTION

Biodeterioration of natural or human-modified materials by saprophytic microorganisms is based on colonization and turnover mechanisms that depend on macro- and micro-environmental and especially nutritional factors. In parallel with changes in the physicochemical conditions of the material, different colonizers invade the organic substrate and then disappear as the depletion of some resources proceeds and others are made available. Several species of microfungi, that is, different colonies with similar trophic needs, often grow simultaneously on a surface, sharing nutrients from the same material. Competition phenomena between fungal and bacterial species are little studied in the context of biodeterioration; in particular, very few observations have been made on chemical interactions between multiple colonies of microorganisms competing spatially on heritage materials. When the materials are able to offer decomposers a wide variety of substrates, as in the case of polymeric objects (think of a painting but also a photograph or an illuminated parchment) saprophytic organisms have a high capacity to coexist in small spaces. This faculty is mainly due to the abundance and heterogeneity of resources. As the biodegradative process progresses, the nutrient content of the substrate decreases and tends to become more and more chemically homogeneous: at this stage, the number of available niches decreases and, consequently, the diversity of species on the materials also decreases. For a proper analysis of the mechanisms of biodeterioration of materials of cultural interest, the presence and turnover of biodeteriogenic microorganisms should be studied by considering multiple aspects, since the process, in addition to depending on factors inherent to the physical and chemical state of the material, is closely linked to the competitive ability of the individual saprophytes involved.

Likewise, the high substrate specificity that some microorganisms require and the critical role they play in some key stages of decomposition are the result of complex morphological and metabolic adaptations.

Micro-habitats and substrates are of considerable importance in determining the distribution of fungal species and, according to some authors, local differences in distribution are greater than continental differences. In addition to their diversity and importance, the global distribution of fungal species attacking cultural property and their functional groups has been poorly documented. Metabarcoding analysis of cultural property attacked by microorganisms has begun in some cases to show that macroclimatic factors, followed by substrate-related variables, are only some of the predictors of the distribution of biodeteriogens on a global scale. Sometimes the mechanisms have to be sought in material manufacturing processes or microclimatic aspects. In this communication, some examples will be given of how ecological mechanisms may matter in understanding the reasons for certain undesirable biotic manifestations on cultural property and how useful it is to leverage ecological theories to prevent and treat biodeterioration.

APRESENTAÇÃO VIDEOS

VIDEO PRESENTATIONS

BIODETERIORAÇÃO

BIODETERIORATION

IDENTIFICATION OF CONTAMINATING FUNGI OF TAXIDERMIZED ANIMALS OF THE SCIENCE MUSEUM OF THE UNIVERSITY OF COIMBRA

Emília Pereira^{1*}; Diana Paiva¹; Luís Fernandes¹; Cristina Rufino²; António Portugal¹; Nuno Mesquita¹

¹ Centre for Functional Ecology (CFE) - Science for People and the Planet, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal

² Museu da Ciência da Universidade de Coimbra, Laboratório Chimico, Largo Marquês de Pombal, 3000-272 Coimbra, Portugal

* corresponding author: emiliamaria1999@gmail.com

Biodeterioration holds significant implications within the realm of cultural heritage, as it manifests in various cultural artifacts such as monuments, wall paintings, stone, wood, paper, as well as organic works of art comprising plant and animal fibers, as well as parchment. Identifying the factors underlying these phenomena is important, because of their detrimental effects. The University of Coimbra, an institution with a history spanning over seven centuries, houses the Science Museum within one of its buildings. The Science Museum of the University of Coimbra encompasses collections dating back to the 18th and 19th centuries, totaling approximately 600.000 specimens across diverse fields, including anthropology, zoology, mineralogy, and geology.

Given that biodeterioration is also a problem for museum collections, particular attention has been directed toward its impact on the Science Museum's holdings. One persistent issue is the contamination of specimens by organisms like fungi, which degrade organic materials, leading to the deterioration of historically and culturally significant pieces. To address this concern, a study was carried out focusing on a particular bat collection that belonged to the Governor of Macau and Timor, which is approximately 150 years old and comprises about 100 specimens. The objectives of this study entail identifying fungal species present in the bat collection at the Science Museum of the University of Coimbra and confirming their proteolytic activity. This investigation was conducted within the Mycology and Biodeterioration Laboratory of the Department of Life Sciences at the University of Coimbra. Sampling involved the use of sterilized cotton swabs, gently passed over affected areas of the specimens. The swab tips were then placed in microtubes, cut using scissors, and sealed. Subsequent inoculation into Potato Dextrose Agar (PDA) and Malt Extract Agar (MEA) media was performed, followed by molecular identification via Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizing the Internal Transcribed Spacer (ITS) region for molecular-based identification, employing specific primers for species-level identification. The analysis of proteolytic activity is pending, with Skim Milk Agar media set to be utilized. This assay aims to determine whether the fungi present are actively degrading the specimens or are merely present without causing damage, indicated by the presence of halos around the fungi denoting degradation of the media, and therefore proteolytic activity. Although the present organisms may not be actively degrading the specimens via proteolysis, their presence and growth on the surface may lead to other damaging processes, such as discoloration, deterioration via acid production, and others. Till date, sampling was conducted on eight bats, revealing the presence of approximately 26 fungi belonging to genera such as *Penicillium*, *Talaromyces*, and *Cladosporium*. Results regarding proteolytic activity are forthcoming.

Museums house extensive collections of immense historical and heritage value, which over time are susceptible to deterioration and even complete destruction due to microbial activity. Through this study, we aspire to comprehend the factors contributing to biodeterioration occurrences, essential for the prevention and conservation of these invaluable assets, in this and other institutions.

REFERENCES:

DeAraujo, A., Vasanthakumar, A., Sepulveda, M., Standen, V., Arriaza, B., & Mitchell, R. (2016). Investigation of the recent

- microbial degradation of the skin of the Chinchorro mummies of Ancient Chile. *Journal of Cultural Heritage*, 22(July), 999–1005. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2015.11.004>
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A., & de Vries, R. P. (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007>
- Paiva, D. et al. (2023). *Exploring Differences in Culturable Fungal Diversity Using Standard Freezing Incubation—A Case Study in the Limestones of Lemos Pantheon (Portugal)*. *Journal of Fungi*, 9, 501. <https://doi.org/10.3390/jof9040501>
- Pangallo, D., Kraková, L., Chovanová, K., Šimonovičová, A., de Leo, F., & Urzi, C. (2012). Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2015–2027. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1004-7>
- Schorsch, D., & Manuels, M. (2002). Biodeterioration in Museum Collections. *Met Objectives*, 3, 1–12.
- Shabbir, A., Akbar, M., Khan, A. M., Iqbal, M., Shabbir, A., Khan, M. A., Khan, A. M., Iqbal, M., & Ahmad, F. (2007). Fungal Biodeterioration: a Case Study in the Zoological Museum of the Punjab University. *J. Anim. Pl. Sci*, 17(4), 2007. <https://www.researchgate.net/publication/268116951>
- Sterflinger, K. (2010). Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews*, 24(1–2), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.03.003>
- Trovão, J., & Portugal, A. (2021). Current knowledge on the fungal degradation abilities profiled through biodeteriorative plate essays. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/app11094196>
- Werlang Schuster, F. P., Maffessoni, C., Attili de Angelis, D., Giachini, A. J., Cardoso, D. H., Moroni, L. S., Skoronski, E., & Kempka, A. P. (2019). Screening and evaluation of filamentous fungi potential for protease production in swine plasma and red blood cells-based media: qualitative and quantitative methods. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21(August). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101313>
- Zhang, M., Hu, Y., Liu, J., Pei, Y., Tang, K., & Lei, Y. (2022). Biodeterioration of collagen-based cultural relics: A review. *Fungal Biology Reviews*, 39, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.12.005>

AValiação DO Crescimento DE *ASPERGILLUS NIGER* EM SELANTES DE FACHADA

¹ Marciele Monique Lazzari Klein* ; Caroline Giordani¹; Fernanda Lamego Guerra¹; Ana Paula Bombassaro¹; Fernanda Gedoz Kozoroski¹; Angela Borges Masuero¹

¹ NORIE/UFRGS

* autor correspondente e apresentador: marcielemlk@gmail.com

INTRODUÇÃO:

A biodeterioração de elementos construtivos representa um desafio para a durabilidade das edificações. Sua envoltória, a fachada, está suscetível a ações externas, pelo intemperismo e por agentes biológicos. Além da adequada especificação de materiais, é imprescindível a execução de juntas, interrupções executadas nos revestimentos de fachada, que contribuem para dissipar tensões. Estas são preenchidas com selantes elastoméricos, e devem garantir estanqueidade, aderência ao substrato, elevada capacidade de movimentação e resistência ao intemperismo. Como diversos materiais de construção, os selantes podem estar suscetíveis às alterações biológicas promovidas, principalmente, por fungos filamentosos, contribuindo para a redução da durabilidade e queda de desempenho. Portanto, em sua formulação, é adequado adicionar compostos para reduzir sua bioreceptividade. O objetivo do trabalho foi avaliar a suscetibilidade ao crescimento de *Aspergillus niger*, normalmente identificado em elementos construtivos, em selantes com diferentes composições químicas utilizados em fachadas, bem como verificar a fenomenologia resultante do crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS:

Foram ensaiados três selantes de fachada monocomponentes na cor cinza, com bases silicone (A), híbrido STPE - *Silane-terminated polyethers* (B e C). A matriz experimental avalia estes selantes isoladamente e em conjunto com argamassa de revestimento. No primeiro caso, os selantes foram moldados em recipientes plásticos (diâmetro=10mm), constituindo cinco amostras. Outras cinco amostras seguiram as recomendações da norma ABNT NBR ISO 11600 (2021), consistindo de dois substratos de argamassa (25x12x75mm), unidos pelo selante no formato de um cordão de 12x12mm e comprimento de 50mm. A cura do selante ocorreu por 21 dias. Após esse período, das cinco amostras de cada formato, duas delas foram mantidos em condições padrões (T=23°C e UR de 50%), enquanto as outras três receberam o inóculo de *Aspergillus niger* (concentração = 10⁶ esporos/mL em água estéril), sendo 1ml nas amostras com argamassa e 0,1ml nos materiais isolados. As amostras com inóculo, foram mantidas por 4 meses em ambiente com temperatura de 30°C e com lâmina de água estéril sob as amostras. Antes e durante a incubação, obtiveram-se imagens fotográficas e em lupa estereoscópica para verificação das estruturas morfológicas e sua interação com o substrato, analisando o crescimento sobre os selantes e na interface com a argamassa.

RESULTADOS: As análises visuais revelam que os três tipos de selante avaliados forneceram disponibilidade nutricional para promover o desenvolvimento de fungos, embora em diferentes níveis. O desenvolvimento se mostrou mais intenso e abrangente no selante com base silicone (A), seguido da forma híbrida (B), porém, ocorreu de forma menos contínua e menos acentuada no híbrido (C). Observou-se também que o crescimento fúngico ocorreu predominantemente na superfície do selante, em detrimento à região da interface com a argamassa.

CONCLUSÃO: O desenvolvimento de fungos em selantes de fachada pode representar um sério problema de biodeterioração. Os resultados indicam que a formulação dos selantes de fachada pode desempenhar um papel relevante na promoção do crescimento de *Aspergillus niger*, principalmente quando for constituído por silicone. Porém, a fenomenologia do crescimento de fungos inclui, além de alterações relacionadas ao manchamento e sujidade nas superfícies dos materiais estudados, possíveis alterações em suas propriedades, análises que se encontram em andamento e que necessitam de métodos complementares para avaliação.

GASOLINA DE AVIAÇÃO: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM CAPACIDADE DETERIOGÊNICA

Brilhante, E. L. G.¹; Beker, S. A.¹; Bento, M. F.¹

LABBIO - Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS: Rua Ramiro Barcelos, n° 2.600, sala 536. Porto Alegre/RS - Brasil.

¹Autor correspondente: emily.gross@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

A gasolina de aviação, também conhecida como AVGAS, é uma complexa mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, possuindo como característica marcante a coloração azulada conferida por corante, que a difere dos outros combustíveis. Segundo a ANAC (Agência Nacional de Aviação Civil), a gasolina de aviação é definida como um combustível de alta octanagem usada em motores a explosão de aviões a hélice. No Brasil, a gasolina de aviação não recebe etanol, porém recebe a adição de tetraetil de chumbo (0,56%), um aditivo que aumenta a octanagem e que é reconhecido por ser altamente tóxico e cancerígeno, levando a sua proibição em combustíveis automobilísticos desde 2002. O AVGAS é comumente utilizado em aviões de pequeno porte envolvidos com serviços de transporte, pulverização agrícola, treinamento de pilotos, serviços de propaganda, saltos de paraquedismo e aviação particular, diferentemente da aviação habitual de motor a jato, que utiliza o querosene de aviação (JET-A1), o qual tradicionalmente recebe atenção especial durante a estocagem, devido sua conhecida suscetibilidade à contaminação microbiana. A recomendação para evitar o desenvolvimento microbiano nos combustíveis de aviação é o uso de biocidas como o Biobor e Kathon F. P 1.5 (PASSMAN, 2013; REPETTO et al 2016). A utilização do carbono presente nos hidrocarbonetos pelos microrganismos foi constatada por MYOSHE (1895), quando isolou o fungo *Botrytis cinerea* crescendo em parafina. Neste sentido, tanto o querosene de aviação quanto a gasolina de aviação, são misturas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, que são suscetíveis ao crescimento microbiano. O primeiro registro de contaminação microbiana em combustível de aviação data do século passado para o querosene (BAKANAUKAS, 1958) nos Estados Unidos, e Gutheil (1966) no Brasil (BENTO et al., 2016). Na medida que os hidrocarbonetos podem ser utilizados como uma fonte de carbono por uma vasta população de microrganismos, as condições de armazenagem podem estabelecer, devido a presença de água, a formação de resíduos biológicos. A origem dessa água está relacionada à condensação da umidade do ar, que gradualmente separa-se do combustível formando uma camada inferior e depositando-se no fundo dos tanques (SHAPIRO et al., 2021a; TENG CHEN et al., 2022). Como consequência direta da contaminação e desenvolvimento microbiano durante a estocagem de combustíveis fósseis, biocombustíveis e misturas, é possível observar a formação de um biofilme (biomassa) na interface combustível-água que produz metabólitos ácidos, podendo comprometer a qualidade final do combustível, além de risco para o funcionamento dos motores em geral, e de aeronaves (PASSMAN, 2013; HU, et al., 2019; SHAPIRO et al., 2021 a, b; LOBATO et al., 2023).

Embora os microrganismos possam utilizar os hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e ou policíclicos aromáticos, como fonte de carbono e energia, a fração de cadeias curtas presente no AVGAS (misturas de alcanos lineares e ramificados, cicloalcanos (31–55%); alcenos (2–5%) e aromáticos (20–50%)), pode ser tóxico devido ao efeito do solvente sobre membranas celulares para muitos microrganismos (GAYLARDE et al., 1999; MARCHAL et al., 2010; PASSMAN, 2013; SHAPIRO et al., 2021a). No entanto, não há estudos sobre a contaminação microbiana de AVGAS em sua armazenagem, portanto, é de fundamental importância investigar sobre sua suscetibilidade quanto a biodeterioração. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico utilizando Bases de Dados sobre a biodeterioração do AVGAS no armazenamento, isolar e caracterizar microrganismos com capacidade deterio-gênica do AVGAS, prospectados de tanques de estocagem de um aeroclube no Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Levantamento bibliográfico: Foi realizado um levantamento na literatura utilizando os buscadores de assuntos avançados do Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), nas seguintes bases de dados: Pubmed, Scopus, Web of Science, Embase e Compendex, no período de setembro a novembro de 2023. Nestes buscadores foram pesquisados principalmente artigos científicos que continham como assunto e palavras-chaves com as seguintes estratégia de busca: (**Gasoline*** OR AVGAS OR "**aircraft fuel**" OR "**jet fuel**" OR "**fuel tank**" OR Hydrocarbon*) AND (**Aviation** OR plane OR Airplane OR jet) AND (**Microbiology** OR Microbiol* OR deterioration* OR contamination* OR microorganism* OR microbe* OR **bacteria*** OR Eubacteria* OR **fungi*** OR Fungus).

Gasolina de aviação: A coleta de AVGAS foi realizada em tanque de estocagem aéreo e no tanque de aeronave do aeroclube (Rio Grande do Sul, Brasil) em frascos estéreis, levados ao laboratório e mantidos sob refrigeração a 4 °C até o processamento das amostras.

Prospecção dos microrganismos: Para a prospecção dos microrganismos do AVGAS, a norma ASTM D 6974-03 foi seguida. As amostras foram filtradas usando membranas de 0,22 µm de porosidade, em condições assépticas, utilizando uma bomba a vácuo em um sistema Kitassato com objetivo de reter os microrganismos contidos no AVGAS. Em seguida, as respectivas membranas foram depositadas em diferentes meios de culturas em placas de Petri, contendo meio Sabouraud, BHI, TSA, R2A, PCA e ágar malte. Além disso, os sedimentos visíveis das amostras foram coletados com suabes estéreis e inoculados em meios de cultura. Todos os meios de cultura inoculados foram mantidos sob incubação a 28°C por 14 dias. Após o crescimento das colônias de fungos e bactérias, os microrganismos foram isolados para a obtenção de culturas puras. As bactérias foram avaliadas quanto à caracterização celular (forma, arranjo e coloração diferencial de Gram) e os fungos foram submetidos à técnica de microcultivo a fim de identificar a nível de gênero.

Ensaio preliminar de biodegradabilidade: A biodegradabilidade do AVGAS foi avaliada utilizando o indicador 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (HANSON *et al.*, 1993). O princípio desta técnica está baseado na oxidação microbiana de uma fonte de carbono onde os elétrons são transferidos para aceptores de elétrons, tais como oxigênio, nitrato e sulfato na cadeia respiratória. A partir da incorporação de umceptor artificial de elétrons (DCPIP), no meio de cultura, é possível determinar a capacidade de um microrganismo em utilizar um substrato na medida que ocorre a mudança de coloração do meio azul (oxidado) para incolor (reduzido) e confirmado pela presença de biomassa formada. O ensaio foi realizado com dois fungos filamentosos (identificados como P1 e P2), em frascos de vidro estéreis de 15 mL, contendo uma fase aquosa de 4 mL composta do indicador redox DCPIP (0,025%), diluído no meio mineral Bushnell-Haas (pH 7,2) e 500 µL de AVGAS, como fonte de carbono. Os tratamentos foram frascos com e sem o inóculo dos fungos (10⁵ esporos/mL), que foram incubados a 28°C, em triplicata, durante 84 dias. A mudança de cor do indicador redox de sua forma reduzida (azul) para a forma oxidada (incolor) foi monitorada visualmente a cada 48 horas, nos primeiros 10 dias. Após a incubação de 84 dias, foi realizada a investigação de viabilidade dos esporos, pela inoculação em meio de cultura (Ágar Sabouraud). Além disso, o pH da fase aquosa das amostras foi medido.

Análise de formação de biomassa: A biomassa dos fungos filamentosos formada nos microcosmos foi avaliada por gravimetria (mg) após 84 dias. Previamente, as membranas de papel filtro (gramatura 80, porosidade 14 µm) foram colocadas em estufa à 30°C por 48 horas para remoção de umidade e depois mantidas no dessecador por 24 horas para posterior pesagem em balança de precisão. Ao final do experimento, foi realizada a filtragem e separação da biomassa fúngica utilizando as membranas de papel filtro. A seguir, as membranas foram colocadas na estufa por 48 horas e em dessecador por 24 horas antes da pesagem. O peso seco da biomassa foi realizado a partir da diferença entre o peso final e o peso inicial das membranas, os resultados foram expressos em miligramas e a média da triplicata foi obtida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Levantamento bibliográfico: No levantamento bibliográfico realizado foram selecionados 2.681 resultados com informações sobre combustíveis de aviação e deterioração. De posse desse levantamento considerou-se as seguintes informações: quantidade de documentos encontrados e ano de publicação, sendo selecionados artigos entre 2023 a 2013 (10 anos). A maioria dos trabalhos selecionados de combustível de aviação se referem a QAV (Jet A1) ou a gasolina automotiva. Dentre o período avaliado de busca, não foi encontrado nenhum artigo científico sobre investigação de contaminação microbiana durante o armazenamento envolvendo o AVGAS. Deve-se considerar que os combustíveis de aviação recebem atenção especial no armazenamento, com rotinas rígidas de inspeção, manutenção e uso de biocidas (Biobor e Kathon F. P 1.5) para evitar a contaminação por microrganismos e outras possibilidades de degradação do produto (PASSMAN *et al.*, 2013).

Isolamento e caracterização: Utilizando o critério de diferença macroscópica das colônias na etapa de isolamento, após os procedimentos de purificação e caracterização celular foram obtidos 18 isolados bacterianos e 6 isolados fúngicos, em que houve predominância de bactérias bastonetes Gram-positivas e fungos do gênero *Penicillium sp.* (Figura 1).

Dentre os fungos filamentosos, o gênero *Penicillium sp.* e bactérias gram positivas são frequentemente isolados de combustíveis como o querosene de aviação, óleo diesel e gasolina (GAYLARDE *et al.*, 1999; BENTO *et al.*, 2016; SHAPIRO *et al.*, 2021 a, b). Em levantamento realizado por HU *et al.*, (2019) em amostra de querosene de aviação em um aeroporto foram identificados Proteobacteria (47%), Actinobacteria (21%) e Ascomycota (>99%, fungi) foram os mais abundantes filos, sendo o filo archaea também detectado. Neste sentido, os autores chamaram a atenção de que métodos moleculares de detecção (PCR em tempo real) das amostras mostraram alta nível de contaminação e que a contaminação por fungos ainda é uma preocupação para o combustível de aviação.

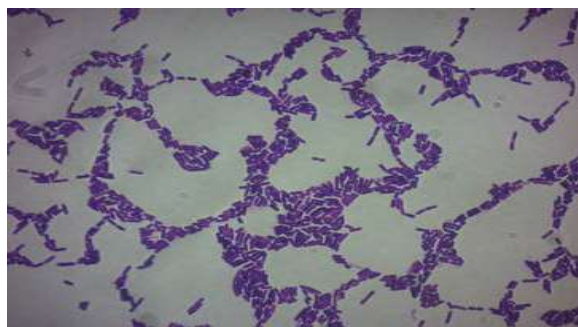
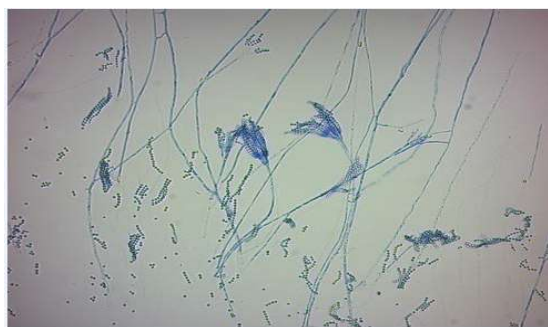


Figura 1. (A) Imagem em microscópio óptico de um microcultivo (40x) de um dos isolados fúngicos (*Penicillium*), e (B), bactérias bastonetes gram-positivas (1000x).

Teste preliminar com o indicador redox: com relação ao teste de degradabilidade preliminar do AVGAS, com os dois fungos filamentosos prospectados, observamos que para ambos os fungos, a mudança de coloração do meio mineral ocorreu no oitavo dia (Figura 2.A), porém sem biomassa visível.

Avaliação da Biomassa: os microcosmos foram mantidos sob incubação por aproximadamente 3 meses (84 dias), para a realização da estimativa da biomassa formada por gravimetria. Os dois isolados fúngicos P1 e P2 (gênero *Penicillium*) foram capazes de crescer às expensas do AVGAS como fonte de carbono, com a produção de 12,2 e 13,4 mg respectivamente. A biomassa recuperada, para a condição Controle (caldo de cultura Sabouraud), condição ótima de nutrientes, foi 43,8 e 53,1 mg respectivamente. As medidas do pH da fase aquosa dos microcosmos com os fungos P1 e P2 reduziram de 7,2 (T_0) para 5 e 6, respectivamente. Os resultados obtidos até o momento, mostraram pela produção de biomassa e redução do pH da fase aquosa dos microcosmos, que os dois isolados fúngicos do gênero *Penicillium* sp. apresentaram potencial deteriogênico para o AVGAS. Os demais isolados fúngicos e bacterianos prospectados, também serão testados quanto a atividade deteriogênica no AVGAS e avaliação da degradação das frações de hidrocarbonetos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas (GC-MS). Após a comprovação do potencial de deterioração dos microrganismos, serão encaminhados para a identificação por métodos moleculares e por MALDI-TOF.

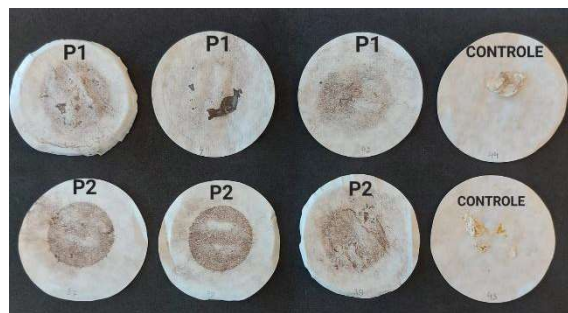
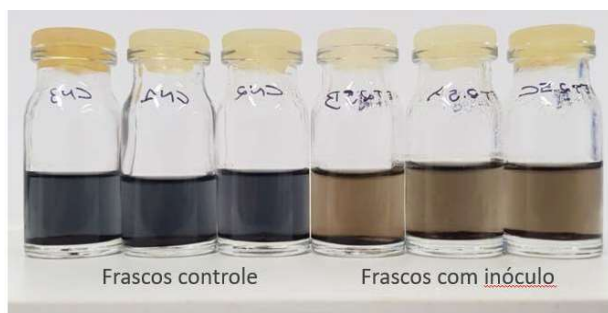


Figura 2. A. Frascos com meio mineral BH adicionado do indicador redox-DCPIP (0,025%) e AVGAS após 8 dias. B. Aspecto das membranas (3 repetições) utilizadas para a retenção da biomassa formada, após 84 dias de incubação de P1 e P2 (isolados fúngicos- *Penicillium*) e do Controle 1 (caldo Sabouraud).

CONCLUSÃO

Não foi encontrado nenhum artigo científico de investigação sobre contaminação microbiana durante o armazenamento envolvendo o AVGAS, publicado de acordo com as Bases de Buscas utilizadas (Pubmed, Scopus, Web of Science, Embase e Compendex). Foi possível realizar o isolamento de microrganismos (bactérias e fungos) de AVGAS coletada, utilizando os métodos de filtração e cultivo em meios de cultura. Após o isolamento e purificação dos isolados microbianos foram obtidas 18 bactérias e 6 fungos filamentosos. O teste de degradabilidade preliminar em frascos com meio mineral e AVGAS de dois isolados fúngicos de *Penicillium*, mostrou a mudança de cor do indicador redox em 8 dias, sendo a biomassa média quantificada de 12,8 mg, após 84 dias de incubação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BAKANAUUKAS, S. Bacterial Activity in JP-4 Fuel. [S. l.]: Wright Air Develop Center Rept., 1958. p. 32-58

BENTO, F. M. et al. Diagnóstico, Monitoramento e controle da contaminação microbiana em biodiesel e misturas durante o

armazenamento. In: PINHO, D. M.M.; SUAREZ, P. A. Z. (Orgs.). **Armazenagem e uso de Biodiesel: problemas associados e formas de controle**. Brasília: CDT; UNB, 2016. p. 112-175.

GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p. 01-10, 1999.

GUTHEIL, N.G. Ocorrência de *Cladosporium resinae* (Lindau) de Uries em Querosene de aviação no Brasil. Porto Alegre: Instituto Tecnológico do RS, 1966.

HANSON, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 10, p. 745-748. 1993.

HU, D. et al. A survey of microbial contamination in aviation fuel from aircraft fuel tanks. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 2, p. 371–380, 7 ago. 2019.

MARCHAL, R.; S. PENET, F. SOLANO-SERENA, J. P. VANDECASTEELE, Gasoline and Diesel Oil Biodegradation, **Oil & Gas Science and Technology**, v. 58 (4): 441-448, 2010.

REPETTO; S.L.; COSTELLO, J.F.; PARMENTER, D. Current and Potential Aviation Additives for Higher Biofuel Blends in Jet A-1. **Biofuels for Aviation**, p. 261–275. 2016.

PASSMAN, F.J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 - a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 88–104. 2013.

SHAPIRO, T. *et al.* Revealing of non-cultivable bacteria associated with the mycelium of fungi in the kerosene-degrading community isolated from the contaminated jet fuel. **Journal of Fungy**, v. 7, n. 1, p. 43. 2021a.

SHAPIRO, T. N. *et al.* Community of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria in Petroleum Products on the Example of TS-1 Jet Fuel and AI-95 Gasoline. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 57, nº 9, p. 949–61. Dez. 2021b.

POTENCIAL DETERIOGÊNICO DE *PSEUDALLESCHERIA BOYDII* EM DIFERENTES COMBUSTÍVEIS COMERCIAIS E HIDROCARBONETOS

Marmitt, Marcela^{1*}, Beker, Sabrina Anderson¹; Bento, Fátima Menezes¹

¹ LABBIO- Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ICBS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

*autor correspondente: mmarmitts.tk@gmail.com

INTRODUÇÃO

O petróleo tem sido a principal fonte não renovável de energia e seu possível esgotamento promoveu a utilização dos biocombustíveis, que já são uma realidade e representam uma alternativa vantajosa para economia mundial e para o ambiente. A presença de fungos filamentosos nos ambientes com a capacidade de utilizar como fonte de energia a complexa mistura de hidrocarbonetos, que formam os combustíveis e biocombustíveis, podem ser uma vantagem em caso de derrames acidentais, entretanto, durante a estocagem dos produtos podem comprometer a qualidade final do produto. Esse potencial de degradação e deterioração, permite que algumas espécies sejam utilizadas como marcadores nos mais diversos ambientes naturais e ou industriais. O fungo filamentoso *Pseudallescheria boydii* (anamorfo *Scedosporium boydii*) foi descrito inicialmente em 1922 por Shear como *Allescheria*, e então transferido para *Pseudallescheria* por McGinnis, A.A. Padhye e Ajello em 1982. É normalmente encontrado em locais com atividades antropogênicas, como águas paradas e poluídas e solos contaminados. *P. boydii* tem sido descrito com a capacidade deteriogênica em hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (GRECO et al., 2019; KOMARIAH et al., 2022; RAINER et al., 2008; ROUGERON et al., 2018; STAMPS et al., 2020). Além disso, *P. boydii* tem sido estudado e utilizado em trabalhos de biorremediação e biodeterioração pelo grupo de pesquisa do LABBIO-UFRGS (BOELTER et al., 2018; CAZAROLLI et al., 2014; GASSEN et al., 2015; RIBAS et al., 2020), que foi isolado de solo de *landfarming*, técnica de biorremediação de solo impactado com resíduos petroquímicos (SCHULTZ, 2010). Sendo assim, o objetivo desse estudo preliminar foi avaliar o crescimento do fungo *Pseudallescheria boydii* e seu potencial deteriogênico em diferentes combustíveis renováveis e não renováveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação do inóculo: para o preparo do inóculo, o fungo *P. boydii* foi inoculado em tubos contendo ágar Sabouraud e mantido em estufa a 30 °C. Após 7 dias, foi adicionado 1 mL de Tween 80 (0,01%) e 2 mL de solução salina (0,85%) ao tubo e agitou-se brevemente. Em seguida foi feita raspagem com alça de platina para soltarem-se os esporos. A concentração do inóculo foi de 10⁴ esporos mL⁻¹, estimada por contagem de esporos em câmara de Neubauer.

Fase aquosa e oleosa: como fase aquosa foi utilizado o meio mínimo mineral BH (Bushnell & Haas, 1941) (1.0 g/L KH₂PO₄; 1.0 g/L K₂HPO₄; 1.0 g/L NH₄NO₃; 0.2 g/L MgSO₄; 0.05 g/L FeCl₃; 0.02 g/L CaCl₂) em que a única fonte de energia e carbono para os microrganismos são os compostos. É composto por água destilada e enriquecido com sais minerais com pH inicial de 7.2. Foram conduzidos experimentos com 17 compostos, representando a fase oleosa sendo eles, combustíveis renováveis: bioquerosene (farnesano), diesel verde modelo (HVO_{mod}), biodiesel de óleo de soja (B100), óleo diesel B (B12) e etanol; combustíveis não-renováveis: óleo diesel A (B0), gasolina de aviação (AVGAS), querosene de aviação (JET-A1) e gasolina comercial comum (27% de etanol); e hidrocarbonetos individuais: hexano (C₆), dodecano (C₁₂), pentadecano (C₁₅), hexadecano (C₁₆), heptadecano (C₁₇), octadecano (C₁₈), fenantreno (3 anéis aromáticos) e benzo[a]pireno (5 anéis aromáticos). Foram utilizados na proporção 1:6 (1 mL de óleo).

Esterilização dos compostos: para a esterilização dos combustíveis utilizou-se filtros de membrana com porosidade de 0,22 µm (Millipore) e foram armazenados em geladeira (4° C) em frascos de vidro estéreis até o uso.

Delineamento experimental: o experimento foi composto por triplicatas de frascos de vidro do tipo penicilina estéreis (15 mL) e dois grupos experimentais, onde o grupo exposto continha o inóculo do fungo em cada um dos compostos e o outro não continha o inóculo (Controle 1), sendo o controle dos compostos. Além disso, o fungo foi inoculado, em triplicata, em caldo Sabouraud (Controle 2), para controle de crescimento. O experimento foi realizado na temperatura de 30° C no período de 21 dias.

Indicador redox (DCPIP): o potencial de biodegradabilidade dos compostos foi avaliado utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (Hanson et al., 1993). O princípio desta metodologia é a oxidação microbiana de uma fonte de carbono, onde os elétrons são transferidos para aceptores de elétrons tais como o oxigênio, nitrato e sulfato na cadeia respiratória. A partir da incorporação de umceptor artificial de elétrons (DCPIP), no meio de cultura, é possível determinar a capacidade de um microrganismo em utilizar um substrato, na medida que ocorre a mudança de coloração do meio de azul

(oxidado) para incolor (reduzido), devido ao fluxo de elétrons oriundos da oxidação dos hidrocarbonetos pelo microrganismo. Foi utilizado 0,25 g/L do indicador redox em 1 L de Meio BH.

Efeito dos combustíveis e hidrocarbonetos na germinação e viabilidade dos esporos: após os 21 dias de contato dos esporos com os combustíveis e hidrocarbonetos, foram coletados 10 µL de cada frasco inoculado, centrifugados e os esporos sedimentados coletados e colocados em lâminas e laminulas de vidro para posterior observação sob microscopia óptica. Foi feita a observação à fresco e fixado com cristal violeta a fim de observar possíveis alterações estruturais causadas pelos compostos. A viabilidade dos esporos foi verificada em meio com ágar e caldo Sabouraud, sendo inoculados 10 µL da fase aquosa no ágar e no caldo e observado o crescimento fúngico após 7 dias.

Medidas de pH: para a detecção da produção de metabólitos ácidos ou básicos pelo fungo, realizou-se medidas de pH da fase aquosa com o auxílio de papel indicador de pH.

Análise gravimétrica: a biomassa formada pelo fungo filamentososo *P. boydii* foi retirada da região interfacial óleo/água, após 21 dias de experimento. Primeiramente, membranas de papel filtro (Unifil, gramatura 80, porosidade 14 µm) foram numeradas referente a cada frasco do experimento, submetidas à secagem em estufa bacteriológica a 30 °C por 48 h e mantidas no dessecador por 24 h para posterior pesagem em balança de precisão, sendo armazenadas novamente em dessecador. Foi realizada a separação da fase oleosa e aquosa e a biomassa fúngica recuperada por filtração adicionando-se 3 mL de hexano para remoção dos resíduos oleosos seguindo os mesmos procedimentos de secagem, remoção de umidade e pesagem acima mencionados. O peso seco da biomassa (mg) de cada triplicata foi obtido a partir da diferença entre o peso final e peso inicial das membranas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da exposição de *Pseudallescheria boydii* nos 17 compostos e combustíveis demonstraram a capacidade deteriogênica do fungo em biodiesel e óleo diesel B, com os maiores valores de biomassa registrados, menores valores de tempo de oxidação do DCPIP e de pH (metabólitos ácidos) (Figura 1).

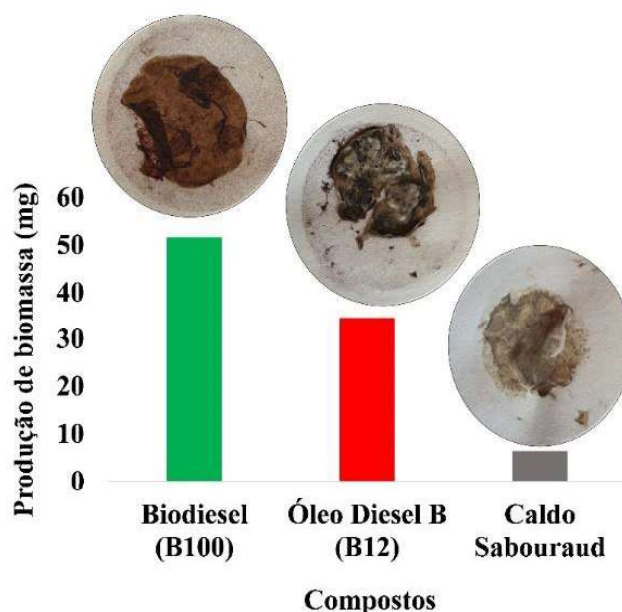


Figura 1. Valores de biomassa (mg) produzidos pelo *P. boydii* com o biodiesel (B100), óleo diesel B (B12) e o controle em caldo Sabouraud.

A capacidade de biodegradação e crescimento de *P. boydii* durante os 21 dias experimentais nos diferentes combustíveis e hidrocarbonetos foi avaliada inicialmente pela oxidação do indicador redox (azul para transparente) e produção de biomassa (peso seco). Para biodiesel de óleo de soja (B100) foi observado o menor tempo de mudança de coloração do meio, em 3 dias, e maior formação de biomassa, de 51,5 mg. Seguido do óleo diesel B (B12) com 11 dias para a mudança de coloração e formação de 34,5 mg de biomassa. Além destes, mudaram de coloração, C₁₂ em 9 dias, JET-A1 em 14 dias, HVO_{mod}, C₁₅, C₁₆, C₁₇ e C₁₈ em 21 dias, e foi observada uma pequena formação de biomassa de 1,4 mg, 1,9 mg, 1 mg, 4,4 mg, 4,9 mg, 3 mg e 2,6 mg, respectivamente. Na condição ideal, em caldo Sabouraud (Controle), o fungo produziu uma biomassa de 6,3 mg. Para os demais hidrocarbonetos (B0, AVGAS, farnesano, gasolina comercial comum, etanol, C₆, fenantreno e

benzo[a]pireno) não foi observada a mudança de coloração do meio e nem produção de biomassa. As medidas de pH das condições em que foram registrados os maiores valores de biomassa (B100 e B12) indicaram a produção de metabólitos ácidos oriundos da degradação dos ésteres e hidrocarbonetos pelo fungo com uma redução de 7.2 (pH inicial) para 3.5 e 5.5, respectivamente (ABDEL-MAKSOUUD et al., 2022; CHAI et al., 2022). Para os outros compostos avaliados não foi observada uma redução significativa no pH, que variou entre 6 e 7. A observação microscópica dos esporos permitiu avaliar o efeito dos combustíveis e hidrocarbonetos na viabilidade do esporo. Apenas para as condições com o C₆ e etanol foi observado o aspecto de desidratação dos esporos, para os demais compostos, não foi observada diferença. A viabilidade do esporo em meio de cultura permitiu indicar se ocorreu uma ação esporicida, impossibilidade de germinação ou esporostática, apenas foi inibida pela presença dos combustíveis ou hidrocarbonetos. Nas condições com C₆, etanol e gasolina comercial comum foi observada a ação esporicida, visto que, não houve crescimento fúngico durante os 21 dias no meio mineral e nos meios de cultura. A ação esporostática foi observada nas condições com B0, farnesano, AVGAS, fenantreno e benzo[a]pireno. Os resultados comparativos entre combustíveis e hidrocarbonetos de crescimento pelo *P. boydii*, após 21 dias podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados das análises de degradação preliminar do *P. boydii* nos combustíveis e hidrocarbonetos utilizados como fonte de carbono, após 21 dias de incubação

Composto/Análise	DCPIP*	Biomassa (mg)	pH	Viabilidade	Esporos	Ação
B100	3 dias	54,5	3.5	+	NA	Germinou
B12	11 dias	34,5	5.5	+	NA	Germinou
C₁₂	9 dias	1,9	6	+	NA	Germinou
JET-A1	14 dias	1,4	6	+	NA	Germinou
HVO (modelo)	21 dias	1	6	+	NA	Germinou
C₁₅	21 dias	4,4	7	+	NA	Germinou
C₁₆	21 dias	4,9	6	+	NA	Germinou
C₁₇	21 dias	3	6	+	NA	Germinou
C₁₈	21 dias	2,6	6	+	NA	Germinou
B0	NA	NA	6.5	+	NA	Esporostático
AVGAS	NA	NA	6.5	+	NA	Esporostático
Farnesano	NA	NA	7	+	NA	Esporostático
Fenantreno	NA	NA	6	+	NA	Esporostático
Benzo[a]pireno	NA	NA	6.5	+	NA	Esporostático
Gasolina comum	NA	NA	6.5	-	NA	Esporostático
Etanol	NA	NA	6.5	-	NA	Esporicida
C₆	NA	NA	6	-	A	Esporicida
Controle (Caldo)	NA	6,3	7	+	A	Germinou

Legenda: * tempo de viragem; - esporo inviável; + esporo viável; NA: Não Alterado

CONCLUSÕES

Os resultados preliminares demonstraram a capacidade da biodegradabilidade do fungo *Pseudallescheria boydii* para JET-A1, C₁₂, HVO, C₁₅, C₁₆, C₁₇ e C₁₈. Entretanto, o potencial deteriogênico foi evidenciado em biodiesel, onde foi observada a maior formação de biomassa, seguido de óleo diesel B (12% de biodiesel). Para estes mesmos combustíveis, foi observada uma produção de metabólitos ácidos, pela redução do pH de 7.2 para 3.5 e 5.5, respectivamente. A adoção das boas práticas (drenagens regulares e limpeza dos tanques) durante o armazenamento de combustíveis e biocombustíveis têm sido recomendadas para minimizar o desenvolvimento microbiano (ABNT-NBR 16732-19).

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAKSOUUD, G. et al. Fungal Biodeterioration of a Historical Manuscript Dating Back to the 14th Century: An Insight into Various Fungal Strains and Their Enzymatic Activities. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1821, 8 nov. 2022.

BOELTER, G. et al. *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii*: behavior of deteriorogenic fungi during simulated storage of diesel, biodiesel, and B10 blend in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 30410–30424, out. 2018.

CAZAROLLI, J. C. et al. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus

- Pseudallescheria boydii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 364–372, nov. 2014.
- CHAI, Y. et al. Valorization of waste biomass through fungal technology: Advances, challenges, and prospects. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115608, nov. 2022.
- GASSEN, J. et al. Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 541–547, 25 set. 2015.
- GRECO, G. et al. Mycoremediation of Oily Slime Containing a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixture. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 12, p. 3821–3831, dez. 2019.
- KOMARIAH, L. N. et al. Microbial contamination of diesel-biodiesel blends in storage tank; an analysis of colony morphology. **Heliyon**, v. 8, n. 4, p. e09264, abr. 2022.
- MCGINNIS, M.R.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L. 1982: *Pseudallescheria* Negroni et Fischer, 1943 and its later synonym *Petriellidium* Malloch, 1970. **Mycotaxon** 14(1): 94-102.
- MENEZES BENTO, F. et al. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel?mild steel?aqueous system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 135–142, mar. 2005.
- RAINER, J. et al. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 3, p. 315–322, mar. 2008.
- RIBAS, R. et al. Characterization of antimicrobial effect of organotin-based catalysts on diesel–biodiesel deteriogenic microorganisms. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 12, p. 802, dez. 2020.
- ROUGERON, A. et al. Ecology of *Scedosporium* Species: Present Knowledge and Future Research. **Mycopathologia**, v. 183, n. 1, p. 185–200, fev. 2018.
- STAMPS, B. W. et al. In situ Linkage of Fungal and Bacterial Proliferation to Microbiologically Influenced Corrosion in B20 Biodiesel Storage Tanks. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 167, 25 fev. 2020.
- SCHULTZ, FM. 2010. Avaliação de micro-organismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre.

REMOÇÃO DE NITROGÊNIO ATRAVÉS DE OZONIZAÇÃO DE LIXIVIADO DE ATERRO DO MUNICÍPIO DE PELOTAS-RS

Pinheiro, C.M¹.; Hoss, L. ¹.; dos Santos, J.T¹.; dos Anjos, L.A¹.; Prates, J.K.S. ¹.; Loebens, L. ¹.; Quadro, M.S ¹.

¹Universidade Federal de Pelotas, Centro de Engenharias, CPG em Ciências Ambientais, Pelotas, RS

INTRODUÇÃO

O lixiviado de aterro sanitário é caracterizado como uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo nitrogênio amoniacal, substâncias húmicas, refratárias, de baixa biodegradabilidade e metais (SCANDELA et al., 2021; BIDONE, 2017; HOFFMANN et al., 2020). A remoção eficiente de nitrogênio é crucial devido ao seu potencial de eutrofização de corpos d'água. Mas, isso requer sistemas de tratamento que possam lidar com a alta concentração de nitrogênio, pois sua presença pode inibir a atividade biológica e comprometer a decomposição da matéria orgânica (HOSSAKA, 2008; SOUTO, 2009; BIDONE, 2017). Portanto, o emprego de sistemas de tratamento que visam a melhor eficiência na remoção de nitrogênio é fundamental, uma vez que essa substância em forma de compostos orgânicos nitrogenados como amônia e íon de amônio em grande quantidade causam impactos ao meio ambiente (SILVA, 2009).

Estudos recentes têm preferido os Processos Oxidativos Avançados (POAs) para tratar efluentes devido à sua eficiência na degradação de substâncias complexas (SCANDELA et al., 2021; HOFFMANN et al., 2020). Entre os POAs, a ozonização se destaca por dissolver os compostos refratários e melhorar a biodegradabilidade do efluente. Especificamente para lixiviados contaminados por nitratos, métodos biológicos são ineficazes, mas a ozonização é altamente eficaz na desnitrificação, aumentando a biodegradação (CORTEZ et al., 2011). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de ozonização na remoção de nitrogênio total de lixiviado proveniente do aterro sanitário do município de Pelotas, no Estado do Rio Grande do Sul.

MÉTODO

O lixiviado usado nos experimentos veio do aterro de Pelotas, que encerrou suas atividades em 2012 após receber cerca de 1,5 milhões de toneladas de resíduos. Amostras de lixiviado bruto foram coletadas antes do tratamento biológico do aterro e armazenadas em galões de 10 L, refrigeradas a 4°C até o tratamento por ozonização. Os experimentos foram feitos em uma coluna de vidro cilíndrica com um difusor de ozônio na base, utilizando um ozonizador da marca Panozon e um compressor de ar. Cinco tratamentos foram aplicados em tempos de ozonização de 0, 60, 90, 120 e 150 minutos, correspondendo a doses de ozônio de 0, 366, 549, 732 e 915 mg de O₃ por litro, respectivamente, em um volume de amostra de 250 mL. Para a análise de NTK, foram adaptadas as metodologias de TEDESCO et al. (1995) e do Manual de Análise de Águas e Efluentes (QUADRO et al., 2016).

RESULTADOS

Os resultados referentes à remoção de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) através das doses de ozônio aplicadas variaram de 649,25 mg por litro de NTK para 504,2 mg/L de NTK, com uma eficiência máxima de 21.71% para a dose de 915 mg de O₃ por litro. No que diz respeito às demais doses de 366, 549 e 732 de O₃ por litro, ocorreu uma eficiência de remoção de NTK de 3.8, 3.8, e 10.87%, respectivamente.

Observa-se que através do aumento do tempo de ozonização, as concentrações de nitrogênio diminuem. Logo, é importante destacar que, quanto maior a dose de ozônio aplicada, melhor foi a eficiência de remoção de nitrogênio através da ozonização.

Entretanto, apesar da gradativa remoção através das doses de O₃ no experimento realizado, os valores apresentados ainda não estão de acordo com os níveis estabelecidos pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA), tendo em vista que os padrões de lançamento de NTK estabelecidos pela Resolução Consema nº 286/2014 são de até 20 mg/L e/ou cerca de 75% de eficiência de remoção.

Moravia, Lange e Amaral (2011) estudaram o tratamento de lixiviado de aterros sanitários em escala laboratorial utilizando o processo oxidativo avançado (POA) pelo reagente de Fenton. Embora tenham observado resultados positivos para parâmetros como Demanda Química de Oxigênio (DQO) e cor, o POA/Fenton não foi eficaz na remoção de poluentes como o nitrogênio, que permaneceu em alta concentração após o tratamento. Estudos de Cortez et. al (2011) indicam que mesmo após processos de oxidação, o lixiviado maduro pode conter compostos recalcitrantes e nitratos em alta concentração. Tratamentos biológicos são ineficazes para lixiviados de aterros antigos, mas sua combinação com tecnologias de oxidação pode promover a degradação de compostos orgânicos e facilitar a desnitrificação.

Parada (2019) conduziu experimentos de tratamento de efluentes da indústria de curtumes, incluindo a combinação de um reator anaeróbio UASB com ozonização. Após o tratamento, o valor inicial de 370 NTK foi reduzido para 151.7 NTK no reator UASB e ainda mais para 22.8 NTK após a ozonização. O nitrogênio presente nos aterros geralmente está na forma de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), com predominância de nitrogênio amoniacal em aterros mais antigos (SOUTO, 2009).

Considerando a maturidade do aterro, encerrado desde 2012, seria pertinente focar na quantificação exclusiva do nitrogênio amoniacal presente no lixiviado bruto e correlacioná-lo com a remoção após o tratamento. A análise de NTK engloba várias formas de compostos nitrogenados, o que pode obscurecer a verdadeira eficácia da remoção do nitrogênio amoniacal.

CONCLUSÃO

Analisando os resultados deste estudo, acrescidos da bibliografia utilizada, foi possível concluir que a quantidade de ozônio aplicada possui uma influência direta na remoção de nitrogênio do lixiviado. À medida que aumenta a dosagem de ozônio, melhor é a eficiência de remoção de nitrogênio através da ozonização. Apesar disso, as eficiências de remoção de nitrogênio alcançadas no estudo não foram satisfatórias, uma vez que o efluente não atingiu o padrão de lançamento estabelecido pela Resolução Conesma nº 286/2014. Sugere-se que mais estudos com outras doses de ozônio sejam realizados, buscando confirmar se maiores doses de O_3 são capazes de reduzir satisfatoriamente a concentração de nitrogênio. Além disso, a combinação de processos biológicos com a ozonização apresenta-se como uma alternativa interessante de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIDONE, R. F. **Tratamento de lixiviado de aterro sanitário por um sistema composto por filtros anaeróbios seguidos de banhados construídos: Estudo de caso – Central de Resíduos do Recreio, em Minas do Leão/RS**. Editora Blucher, 2017.

CORTEZ, Susana et al. Mature landfill leachate treatment by denitrification and ozonation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 148-153, 2011.

HOFFMANN, L. T., Jorge, M. C. B., AMARAL, A. G. D., BONGIOVANI, M. C., SCHNEIDER, R. M. (2020). Ozonation as a pre-treatment of landfill leachate. **Revista Ambiente & Água**, 15.

HOSSAKA, André Luiz. **Tratamento biológico de lixiviados de aterro sanitário, utilizando como pré-tratamento a remoção parcial de N-amoniacal por stripping**. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2008.

PARADA, Mabel et al. Estudio de las tecnologías para el tratamiento de los efluentes generados por una planta de curtiembres en Ecuador. 2019.

QUADRO et al. **Manual de análises de águas e efluentes**. Pelotas: Editora UFPEL, 2016.

SILVA, Diego Domingos da. **Remoção biológica do nitrogênio pela via curta de lixiviado de aterro sanitário operando um reator em bateladas sequenciais (SBR)**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SOUTO, Gabriel D. Lixiviado de aterros sanitários brasileiros: estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar (stripping). 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SCANDELAI, Ana Paula Jambers et al. Ozonização como tratamento de lixiviado de aterro sanitário: um estudo de revisão. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3404-3417, 2021.

TEDESCO, Marino José et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

BIODEGRADAÇÃO DE BENZO[A]PIRENO PELA BACTÉRIA MODELO *BURKHOLDERIA VIETNAMIENSIS* G4

Mattos, H^{1*}; Marmitt, M.¹²; Valiati, V.H.¹

¹ Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LABBIO), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *autor correspondente: heitor.hmds@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos persistentes que têm sua origem na combustão incompleta de matéria orgânica, principalmente em processos industriais como, por exemplo, a queima de combustíveis fósseis na indústria petrolífera (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2016; VARJANI et al., 2018). Quimicamente, os HPAs são caracterizados por apresentarem dois ou mais anéis de benzeno fundidos uns aos outros, formando estruturas complexas, sendo que os de alto peso molecular são quimicamente mais estáveis, possuem maior resistência à degradação e são mais persistentes no ambiente (SUMAN; SINHA; TARAFDAR, 2016). Esses são contaminantes ambientais e representam uma preocupação aos ecossistemas e riscos para a saúde pública (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2018; MALLAH et al., 2022). Dentre esses, destaca-se o benzo[a]pireno, um composto formado por cinco anéis aromáticos é considerado carcinogênico (REIZER et al., 2019; NZILA; MUSA, 2020; BUKOWSKA; MOKRA; MICHAŁOWICZ, 2022). Nesse sentido, se faz necessário buscar medidas que visem minimizar os efeitos deste poluente no ambiente, e uma das técnicas adotadas com esse princípio que vem ganhando destaque pela eficácia, baixo custo e sustentabilidade é a biorremediação mediada pelos microrganismos (REDFERN et al., 2019; RODRÍGUEZ-GONZALES; ZÁRATE-VILLARROE; BASTIDA-CODINA, 2022; DOS SANTOS et al., 2023). Esse processo de degradação oferece uma abordagem ambientalmente amigável para lidar com os poluentes, reduzindo significativamente os impactos adversos no meio ambiente. A eficácia da biorremediação, especialmente por bactérias, reside em sua habilidade de usar os contaminantes como fonte de energia e carbono para seu crescimento (ANTIZAR-LADISLAO, 2010; DAI et al., 2022). Esses microrganismos apresentam um metabolismo capaz de quebrar as ligações químicas dos HPAs, convertendo-os em substâncias menos tóxicas, tais como dióxido de carbono e água (SINGH et al., 2022). Além disso, a biorremediação mediada por bactérias, em comparação com os métodos físico-químicos tradicionais, é geralmente mais econômica e requer menos intervenção humana (SAYARA; SÁNCHEZ, 2020). Dentre os gêneros bacterianos descritos com a capacidade de biodegradação de HPAs a *Burkholderia* merece especial atenção. As bactérias pertencentes a esse gênero possuem características que as tornam eficientes na degradação de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo o benzo(a)pireno. A capacidade da *Burkholderia* de metabolizar esses compostos complexos de forma eficaz, se adaptar em ambientes adversos e ser capaz de produzir biossurfactantes, faz dela uma protagonista como biorremediadora de áreas contaminadas (O'SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005; CAUDURO et al., 2020). Por ser amplamente utilizada como bactéria modelo em estudos de biorremediação e biodegradação, o presente estudo utilizou a *Burkholderia vietnamiensis* G4, isolada de uma estação de tratamento de resíduos industriais, a fim de avaliar a capacidade desta estirpe em sobreviver, capturar e degradar o benzo[a]pireno.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental: o experimento foi composto por três frascos de 300 mL contendo Meio Mínimo Mineral (MM1), 10 mg/L de glicose, 1 mg/L do benzo[a]pireno e o inóculo bacteriano na concentração de 10⁸ células/mL. Os frascos foram incubados a 30 °C sob agitação e as coletas ocorreram em 0 horas (T₀ = tempo inicial) e 28 dias (T_F = tempo final).

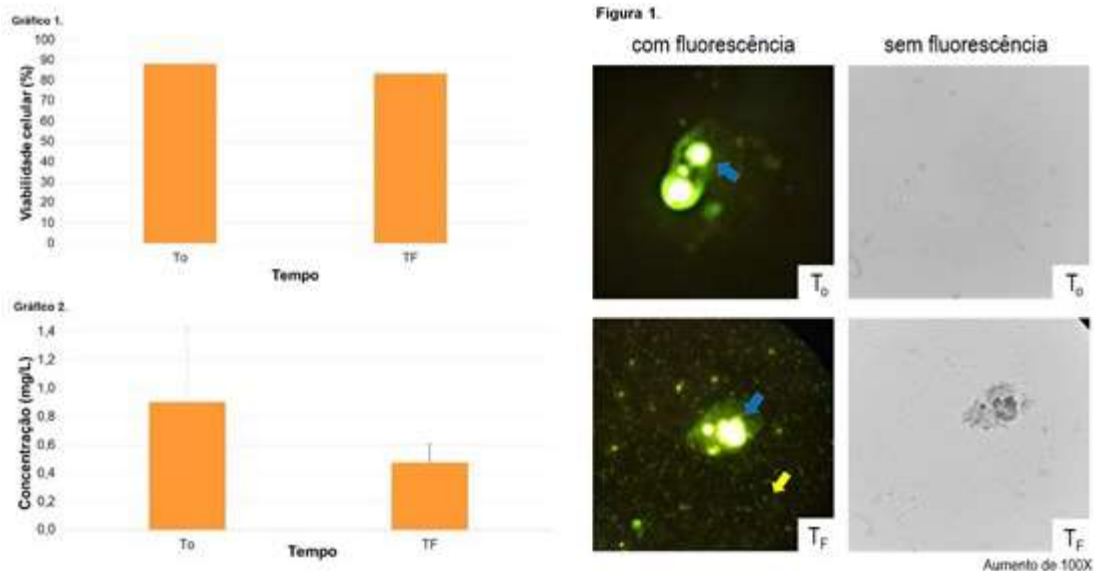
Viabilidade celular: Para avaliar a viabilidade celular, o pellet formado foi reconstituído em 1 mL de solução salina 0,9% e misturado com 1 mL de Azul de Tripán 0,4%. Após 5 minutos, o conjunto foi centrifugado novamente e 20 µL da amostra foram coletados e transferidos para uma Câmara de Neubauer e contabilizados em cinco campos distintos. Através da observação das cores das células, foram identificadas as células coradas de azul que indicam as células mortas e as não coradas que indicam as células vivas.

Microscopia de fluorescência: A assimilação e internalização do composto foi observada por microscopia de fluorescência utilizando o filtro FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) que excita a molécula em 495 nm e emite a fluorescência em 521 nm e é reconhecido pela coloração verde (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2019; LIANG et al., 2021).

Análise cromatográfica: A taxa de degradação do benzo[a]pireno pela bactéria foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas utilizando método de extração QuEChERS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de ferramentas como a cromatografia, microscopia de fluorescência e a avaliação da taxa de células viáveis da bactéria *B. vietnamiensis* G4, possibilitam demonstrar como as bactérias respondem frente à exposição ao benzo[a]pireno, um HPA de alto peso molecular. Os resultados obtidos pela viabilidade celular não apresentaram diferença significativa entre T_0 e T_F , com uma redução de menos de 5 % nas células viáveis, evidenciando a capacidade das células bacterianas de sobreviver à exposição frente ao poluente (Gráfico 1).



Junto a isso, a microscopia de fluorescência permitiu observar a captura e o acúmulo do benzo[a]pireno no interior das células bacterianas. Conforme análise, no tempo final, de 28 dias (T_F), é possível observar diversos pontos com o poluente internalizado, destacados pela seta verde, o que não é observado em T_0 . Na avaliação da degradação, foi demonstrada uma redução média de 52 % do poluente em T_F , comprovando a capacidade de biodegradação do hidrocarboneto pelas bactérias (Gráfico 2). Outros trabalhos do grupo de pesquisa já avaliaram a capacidade de biodegradação da mesma estirpe, por exemplo, Cauduro et. al (2023) realizou a biorremediação de solo contaminado com HPAs *in situ* em uma fazenda de deposição do excedente do lodo ativado de uma estação de tratamento de efluentes de indústrias petroquímicas. Utilizando diferentes tipos de manejos, foi comprovada a capacidade da bactéria em degradar os 16 HPAs prioritários para biorremediação, sendo eles de baixo e alto peso molecular. Como resultado, na aplicação trimestral da estirpe foi obtido 21,9% de degradação para os poluentes de baixo peso molecular e 34,4% para os de alto peso molecular. Além deste, Cauduro et. al (2021) avaliaram *in vitro* a capacidade de biodegradação de um consórcio bacteriano composto por quatro estirpes do gênero *Burkholderia* e observaram uma degradação de 30% do benzo[a]pireno após 20 dias de experimento. Esses resultados são similares aos encontrados por outros autores que também avaliaram a capacidade de espécies do mesmo gênero em degradar HPAs, evidenciando a capacidade de biodegradação e importância deste gênero bacteriano para a biorremediação de poluentes (AL-THUKAIR; MALIK, 2016; D'INCAU et al., 2024).

CONCLUSÃO

A contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) provenientes dos processos de refino do petróleo representa uma preocupação ambiental significativa devido aos seus impactos adversos na saúde humana e nos ecossistemas. Sendo assim, faz-se necessário buscar conhecimento e realizar estudos práticos na área da biorremediação, um método comprovadamente promissor, para maior compreensão deste processo. Dessa forma, este trabalho traz um conjunto de resultados que validam a resistência e adaptação da bactéria ao ser exposta ao benzo[a]pireno, bem como, sua elevada eficiência em metabolizá-lo, contribuindo para o entendimento da biodegradação de poluentes orgânicos realizado pela *B. vietnamiensis* G4, possibilitando a implementação de formas melhoradas em planos de biorremediação de áreas contaminadas com estes poluentes, pelo uso de estirpes mais eficientes.

REFERÊNCIAS

ABDEL-SHAIFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107–123, mar. 2016.

- AL-THUKAIR, A. A.; MALIK, K. Pyrene metabolism by the novel bacterial strains *Burkholderia fungorum* (T3A13001) and *Caulobacter* sp (T2A12002) isolated from an oil-polluted site in the Arabian Gulf. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 32–37, 1 maio 2016.
- ANTIZAR-LADISLAO, B. Bioremediation: Working with Bacteria. **Elements**, v. 6, n. 6, p. 389–394, 1 dez. 2010.
- BUKOWSKA, B.; MOKRA, K.; MICHAŁOWICZ, J. Benzo[a]pyrene—Environmental Occurrence, Human Exposure, and Mechanisms of Toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6348, 6 jun. 2022.
- CAUDURO, G. P. et al. Differential Expression and PAH Degradation: What *Burkholderia vietnamiensis* G4 Can Tell Us? **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–9, 27 ago. 2020.
- CAUDURO, G. P. et al. New benzo(a)pyrene-degrading strains of the *Burkholderia cepacia* complex prospected from activated sludge in a petrochemical wastewater treatment plant. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, n. 4, p. 163, abr. 2021.
- CAUDURO, G. P. et al. *Burkholderia vietnamiensis* G4 as a biological agent in bioremediation processes of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge farms. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 1, p. 116, jan. 2023.
- DAI, C. et al. Review on the contamination and remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal soil and sediments. **Environmental Research**, v. 205, p. 112423, abr. 2022.
- D'INCAU, E. et al. Biodegradation of a complex hydrocarbon mixture and biosurfactant production by *Burkholderia thailandensis* E264 and an adapted microbial consortium. **Biodegradation**, 22 mar. 2024.
- DOS SANTOS, V. S. et al. Chapter 18 - Hydrocarbons and environmental pollution: Metagenomics application as a key tool for bioremediation. Em: KUMAR, V. et al. (Eds.). **Metagenomics to Bioremediation**. [s.l.] Academic Press, 2023. p. 455–476.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M. et al. A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 165–174, jan. 2018.
- LIANG, J. et al. Benzo[a]pyrene might be transported by a TonB-dependent transporter in *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, p. 124037, 15 fev. 2021.
- MALLAH, M. A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overview. **Chemosphere**, v. 296, p. 133948, jun. 2022.
- NZILA, A.; MUSA, M. M. Current Status of and Future Perspectives in Bacterial Degradation of Benzo[a]pyrene. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 1, p. 262, 31 dez. 2020.
- O'SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 8–11, jul. 2005.
- REDFERN, L. K. et al. A new framework for approaching precision bioremediation of PAH contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 378, p. 120859, out. 2019.
- REIZER, E. et al. Formation Mechanism of Benzo(a)pyrene: One of the Most Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1040, 15 mar. 2019.
- RODRÍGUEZ-GONZALES, A.; ZÁRATE-VILLARROE, S. G.; BASTIDA-CODINA, A. Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. **Revista de Ciencias Ambientales**, v. 56, n. 1, p. 178–208, 1 jan. 2022.
- SAYARA, T.; SÁNCHEZ, A. Bioremediation of PAH-Contaminated Soils: Process Enhancement through Composting/Compost. **Applied Sciences**, v. 10, n. 11, 2020.

SINGH, A. et al. Chapter 6 - Potential of microbes for degradation of xenobiotics: With special focus on petroleum hydrocarbons. Em: SAMUEL, J.; KUMAR, A.; SINGH, J. (Eds.). **Relationship Between Microbes and the Environment for Sustainable Ecosystem Services, Volume 2**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 95–118.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R. et al. Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: Overexpression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 813–821, 15 fev. 2019.

SUMAN, S.; SINHA, A.; TARAFDAR, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentration levels, pattern, source identification and soil toxicity assessment in urban traffic soil of Dhanbad, India. **Science of The Total Environment**, v. 545–546, p. 353–360, mar. 2016.

VARJANI, S. J. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Petroleum Oil Industry Activities: Effect on Human Health and Their Biodegradation. Em: VARJANI, S. J. et al. (Eds.). **Waste Bioremediation**. Energy, Environment, and Sustainability. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 185–199.

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE BURKHOLDERIA VIETNAMENSIS G4 REVELA GENES FUNCIONAIS NA DEGRADAÇÃO DE BENZO[A]PIRENO

Marmitt, M.^{1,2*}; Cauduro, G.P.¹; Sbruzzi, R. C.³; Valiati, V.H.¹

¹ Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis (LABBIO), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Laboratório de Imunogenética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

*autor correspondente: mmarmitts.tk@gmail.com

INTRODUÇÃO

A utilização do petróleo e derivados nas mais diferentes atividades contemporâneas têm contribuído de forma recorrente em diversas contaminações ambientais registradas. Dentre os principais poluentes gerados, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são formados por anéis benzênicos fundidos, o que os torna estáveis quimicamente, e por isso são considerados os de maior importância, tendo o benzo[a]pireno, formado por cinco anéis aromáticos, como um dos mais persistentes no ambiente, de difícil degradação e carcinogênico (BUKOWSKA; MOKRA; MICHAŁOWICZ, 2022; CARUSO; ALABURDA, 2008; NZILA; MUSA, 2020). Neste cenário, o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias capazes de minimizar os impactos destes poluentes no ambiente de forma eficiente, é imprescindível. As técnicas de biorremediação, que utilizam a capacidade de biodegradação de microrganismos, principalmente bactérias, é uma das estratégias com este propósito (DAI et al., 2022; FUENTES et al., 2014; REDFERN et al., 2019). Nesse sentido, o gênero *Burkholderia*, em especial o Complexo *Burkholderia cepacia* (BCC) possui as características de serem fenotipicamente similares e geneticamente distintas, o que as confere a capacidade de sobreviver em diferentes ambientes e metabolizar diversos compostos, entre eles os recalcitrantes. Pertencente a este grupo, *Burkholderia vietnamiensis* G4 é reconhecida por essa capacidade e tem sido empregada como modelo em estudos de biorremediação e biodegradação (CAUDURO et al., 2020, 2021; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; NZILA et al., 2018; O'SULLIVAN et al., 2007). Ao mesmo tempo, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares dessa espécie que estariam envolvidos na degradação de HPAs. Tendo em vista a importância da *B. vietnamiensis* G4 para a biorremediação de poluentes persistentes, este estudo buscou quantificar a expressão de genes potencialmente envolvidos na degradação do benzo[a]pireno, a fim de contribuir para uma melhor compreensão dos processos genéticos implicados na degradação desse poluente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos genes: Em um estudo prévio de Cauduro et al. (2020), foi utilizada a transcriptômica para análise da expressão diferencial de genes da *B. vietnamiensis* G4 envolvidos na degradação do benzo[a]pireno. A partir do conjunto de genes diferencialmente expressos e de acordo com a bibliografia, foram selecionados doze genes de interesse para os testes de validação. Além destes, foram selecionados três genes referência para a normalização e comparação dos dados da expressão gênica.

Delineamento experimental: Para padronizar o volume de material para extração (100 mL), o experimento consistiu em três frascos para o grupo controle contendo 100 mL de meio mínimo mineral (MM1), 10 mg/L de glicose e o inóculo bacteriano na concentração de 10^4 células/mL, e três frascos para o grupo exposto, contendo 300 mL de MM1 onde foi adicionado, além da glicose e do inóculo, 1 mg/L de benzo[a]pireno. O grupo controle foi incubado por 1 hora, tempo de adaptação das células bacterianas ao meio, e coletado todo o volume dos frascos. No grupo exposto foram coletados 100 mL de cada frasco nos tempos 1 hora, 12 horas e 24 horas. Os cultivos foram incubados a 30 °C sob agitação.

Extração de RNA, síntese do cDNA e RT-qPCR: A extração dos RNAs foi realizada utilizando o Kit RNeasy Mini Kit® (QIAGEN, Alemanha), para a síntese da fita complementar do DNA (cDNA) foi utilizado o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Estados Unidos) e utilizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) com o método de detecção SYBR Green para a quantificação relativa dos genes. Foram seguidas as diretrizes presentes na MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) para definir o design experimental, controle de qualidade e interpretação dos resultados (BUSTIN et al., 2009).

Análise dos dados: Para observar a variação na expressão gênica ao longo dos tempos analisados, foi realizada ANOVA one-way com posterior teste de Tukey utilizando os valores de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para cada gene. Para inferir a diferença de expressão dos genes no grupo exposto em relação ao grupo controle, foi realizado um teste t de Student comparando o ΔCt de cada

tempo com o ΔCt do controle. Os testes foram realizados no software R com os pacotes *vegan*, *ggplot2*, *misc* e *FSA*. Foi considerado um valor de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes de interesse avaliados pertencem a diferentes vias metabólicas e de sinalização, representando diferentes processos celulares envolvidos na biodegradação do poluente. Dos doze genes analisados, foram registrados valores significativos para o aumento de sua expressão ao longo do tempo e em relação ao grupo controle para *xre*, *paaE*, *livG* e *pckA* nos três tempos analisados (Gráfico 1). O gene *xre* é um elemento de resposta à xenobióticos e é composto por genes envolvidos na regulação transcricional em bactérias, sendo essencial na resposta bacteriana frente a mudanças ambientais (SI et al., 2020), *paaE* tem sua participação na via metabólica de degradação de poluentes ambientais aromáticos (RAJKUMARI; PAIKHOMBA SINGHA; PANDEY, 2018), *livG* codifica proteínas ligadas a degradação de aminoácidos e é importante para a captação e transporte de aminoácidos, assimilação de carbonos e geração de energia para as células bacterianas (XU et al., 2017) e *pckA* também participa da captação de energia para as células bacterianas pois, codifica enzimas necessárias para a metabolização de glicose e aminoácidos (KIM et al., 2004). O aumento da expressão destes genes, nos três tempos analisados, em *B. vietnamiensis* G4 demonstra sua importância dentro dos mecanismos de degradação de compostos aromáticos. Os genes *acad*, *atoB*, *bmoA* e *proV* apresentaram sua expressão positiva em 1 hora (Gráfico 1). O gene *acad* está envolvido na quebra inicial dos hidrocarbonetos via ácidos graxos e β -oxidação além de participar nas mudanças fisiológicas e alteração da membrana celular, permitindo a entrada do poluente para interior da bactéria (WANG; LI; QU, 2019; ZHAO et al., 2017), de forma similar *atoB* também desempenha uma função na biodegradação de poluentes via β -oxidação (GULEVICH et al., 2016). Por outro lado, *bmoA* possui envolvimento em funções chaves como a absorção de carbono e energia para as células e codifica enzimas que promovem a clivagem de anéis aromáticos em espécies do gênero *Burkholderia* (SHAO et al., 2018) e *proV* faz parte de um grupo de genes, chamado sistema *proVWX*, que codificam proteínas envolvidas na sobrevivência bacteriana frente ao estresse hídrico em relação às mudanças ambientais (LI; WEN; LENG, 2021). Por fim, o gene *AstB* teve o aumento de sua expressão em 12 horas (Gráfico 1). Este gene catalisa a via de produção da enzima arginina succiniltransferase (AST) como resposta a situações de estresse, o que pode indicar a capacidade de metabolização de poluentes orgânicos e, principalmente, é uma resposta ao acúmulo de metabólitos frente a metabolização do benzo[a]pireno (HERNÁNDEZ; ARTEAGA; DUNN, 2021; O'SULLIVAN et al., 2007).

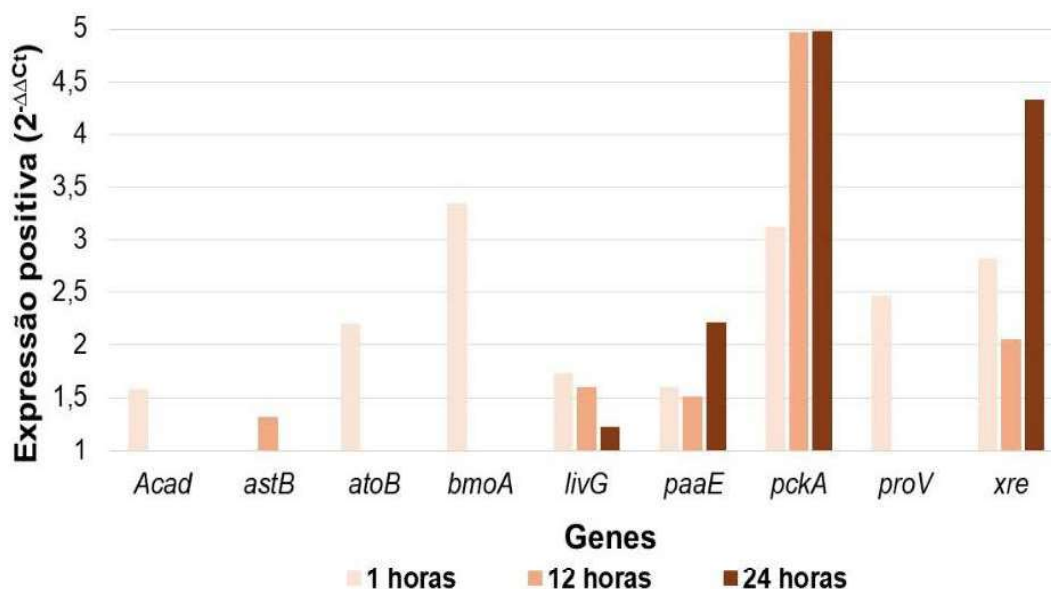


Figura 1. gráfico de barras representando no eixo Y a expressão gênica relativa obtida pelo método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ indicando o aumento nos tempos 1 hora, 12 horas e 24 horas de exposição ao benzo[a]pireno para cada gene individualmente, no eixo X. A linha no valor 1 representa a normalização em relação ao grupo controle.

Os genes encontrados com sua expressão positiva estão inseridos em vias metabólicas associadas à resposta bacteriana frente a mudanças ambientais, situações de estresse celular, degradação de poluentes ambientais, oxidação e rompimento dos anéis aromáticos, captação e transporte de aminoácidos e biodegradação de poluentes via β -oxidação. Demonstrando a adaptabilidade da bactéria e sua capacidade de modular a expressão de genes em diferentes momentos e conforme as necessidades impostas pelo ambiente.

CONCLUSÃO

A identificação de genes envolvidos em importantes atividades para a degradação de compostos orgânicos na bactéria modelo *B. vietnamiensis* G4, bem como, a compreensão dos processos de biodegradação por esta estirpe, permite sua utilização como ferramenta para a biorremediação de áreas contaminadas e abre caminhos para a padronização de biomarcadores moleculares. Além disso, oportuniza experimentos que visem o melhoramento dos genes envolvidos nessas rotas catabólicas de degradação, potencializando a capacidade de degradação pelas bactérias e tornando-as extremamente eficientes para serem utilizadas como ferramentas em planos de biorremediação de áreas contaminadas.

REFERÊNCIAS

- BUKOWSKA, B.; MOKRA, K.; MICHAŁOWICZ, J. Benzo[a]pyrene-Environmental Occurrence, Human Exposure, and Mechanisms of Toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6348, 6 jun. 2022.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.
- CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*. v. 67, n. 1, p. 1–27, 2008.
- CAUDURO, G. P. et al. Differential Expression and PAH Degradation: What *Burkholderia vietnamiensis* G4 Can Tell Us? **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–9, 27 ago. 2020.
- CAUDURO, G. P. et al. New benzo(a)pyrene-degrading strains of the *Burkholderia cepacia* complex prospected from activated sludge in a petrochemical wastewater treatment plant. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, n. 4, p. 163, abr. 2021.
- DAI, C. et al. Review on the contamination and remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal soil and sediments. **Environmental Research**, v. 205, p. 112423, abr. 2022.
- FUENTES, S. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4781–4794, jun. 2014.
- GULEVICH, A. YU. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1,3-butanediol biosynthesis through the inverted fatty acid β -oxidation cycle. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 15–22, jan. 2016.
- HERNÁNDEZ, V. M.; ARTEAGA, A.; DUNN, M. F. Diversity, properties and functions of bacterial arginases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 6, p. fuab034, 23 nov. 2021.
- KIM, P. et al. Effect of Overexpression of *Actinobacillus succinogenes* Phosphoenolpyruvate Carboxykinase on Succinate Production in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1238–1241, fev. 2004.
- LI, S.-W.; WEN, Y.; LENG, Y. Transcriptome analysis provides new insights into the tolerance and reduction of *Lysinibacillus fusiformis* 15–4 to hexavalent chromium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 20, p. 7841–7855, out. 2021.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 144–156, fev. 2005.
- NZILA, A. et al. Isolation and characterisation of bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons: phenanthrene and anthracene. 2018.
- NZILA, A.; MUSA, M. M. Current Status of and Future Perspectives in Bacterial Degradation of Benzo[a]pyrene. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 1, p. 262, 31 dez. 2020.
- O'SULLIVAN, L. A. et al. Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 1017–1034, abr. 2007.
- RAJKUMARI, J.; PAIKHOMBA SINGHA, L.; PANDEY, P. Genomic insights of aromatic hydrocarbon degrading *Klebsiella*

- pneumoniae AWD5 with plant growth promoting attributes: a paradigm of soil isolate with elements of biodegradation. **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 118, fev. 2018.
- REDFERN, L. K. et al. A new framework for approaching precision bioremediation of PAH contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 378, p. 120859, out. 2019.
- SHAO, Y.-H. et al. Glycine Betaine Monooxygenase, an Unusual Rieske-Type Oxygenase System, Catalyzes the Oxidative *N*-Demethylation of Glycine Betaine in *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 13, p. e00377-18, jul. 2018.
- SI, M. et al. MsrR is a thiol-based oxidation-sensing regulator of the XRE family that modulates *C. glutamicum* oxidative stress resistance. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 189, dez. 2020.
- WANG, J.-D.; LI, X.-X.; QU, C.-T. A Global Proteomic Change in Petroleum Hydrocarbon-Degrading *Pseudomonas aeruginosa* in Response to High and Low Concentrations of Petroleum Hydrocarbons. **Current Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 1270–1277, nov. 2019.
- XU, J. et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the global response to 17 β -estradiol in estrogen-degradation strain *Pseudomonas putida* SJTE-1. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 41682, 3 fev. 2017.
- ZHAO, D. et al. Isolation and complete genome sequence of *Halorientalis hydrocarbonoclasticus* sp. nov., a hydrocarbon-degrading haloarchaeon. **Extremophiles**, v. 21, n. 6, p. 1081–1090, nov. 2017.

BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* COM ATIVIDADE CELULOLÍTICA

FRATICELLI, L.¹; PORCIÚNCULA, B.C.²; SCHNEIDER, R.C.S.³; BENITEZ, L.B.⁴.

¹ Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

*autor correspondente: fraticelli.livia@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os resíduos provenientes de indústrias de papel ou celulose constituem uma variedade de subprodutos com alto potencial poluente (PEITZ et al., 2019). Os efluentes gerados neste ramo industrial referem-se aos resíduos líquidos resultantes dos processos industriais a partir da matéria-prima vegetal. Há uma preocupação significativa referente a esses tipos de efluentes, que conferem elevadas demandas biológicas e químicas de oxigênio (DBO e DQO), sinalizando a necessidade de tratamentos eficazes e específicos (FURLEY et al, 2015). Os compostos biodegradáveis são avaliados através da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que quantifica o oxigênio consumido durante a decomposição bioquímica da matéria orgânica. Vários compostos prejudiciais à vida aquática, como hemicelulose, ácido fórmico, ácido acético e açúcares, podem absorver oxigênio, resultando em um processo fermentativo (TEIXEIRA, 2017). Para compostos que se degradam mais lentamente, a demanda química de oxigênio (DQO) é utilizada, identificando os compostos oxidáveis presentes e sua concentração no meio. Estas substâncias, como lignina e carboidratos de elevado peso molecular, geralmente têm cor. Efluentes de celulose podem causar impactos como alterações endócrinas devido a fitoesteróis e compostos fenólicos de alta massa molecular (500 a 3000 Daltons), além de serem tóxicos para peixes e outros animais aquáticos. Em razão da sua estrutura química rígida, a celulose possui difícil degradação trazendo aos efluentes da indústria de papel e celulose, um grande potencial de causar diversos impactos ambientais (DYKSTRA et al, 2015).

A compreensão dos mecanismos de biodegradação da celulose e seus subprodutos é crucial não apenas para o entendimento dos processos ambientais, mas também para o desenvolvimento de práticas mais sustentáveis nas indústrias. A biotecnologia ambiental traz grandes avanços tecnológicos, como o uso de bactérias capazes de biodegradar poluentes, tratar efluentes e desenvolver processos industriais, além disso, suas características como alta efetividade, baixa toxicidade e custo financeiro reduzido ganham ainda mais destaques (PEITZ et al., 2019).

Bactérias do gênero *Bacillus* pertencem ao filo Firmicutes. São Gram-positivas, em forma de bastonete, aeróbias ou anaeróbias facultativas, são formadoras de esporos os quais permitem sua sobrevivência mesmo em condições extremas de desidratação e calor, além de serem capazes de sintetizar enzimas celulases termoestáveis que podem ser empregadas na geração de produtos de alto valor a partir de processos produtivos sustentáveis. (MELO; DO NASCIMENTO; SERRA, 2021); COSTA et al., 2017).

O uso de celulases microbianas maximiza a hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis ou no tratamento da biomassa lignocelulósica para uso industrial, seja na indústria de papel ou na produção de bioetanol. A maioria das celulases bacterianas tem origem no gênero *Bacillus* (ROTH;HOELTZ;BENITEZ,2020). Esta pesquisa teve como objetivo realizar a bioprospecção de bactérias do gênero *Bacillus* com potencial produtor de enzimas celulases para tratamento de efluentes com a presença de celulose e seus derivados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos ocorreram na cidade de Santa Cruz do Sul-RS/Brasil, onde foram coletadas duas amostras de árvores em processos de degradação. As amostras foram submetidas ao isolamento de microrganismos em meio de cultura seletivo. Foram realizadas as etapas de isolamento e *screening* considerando o choque térmico à 80°C com o objetivo de selecionar bactérias do gênero *Bacillus*, além dos testes de índice enzimático para celulase, análises microscópicas, contagem de células totais e esporos. As amostras foram submetidas a ensaios fermentativos em escala de bancada e de laboratório utilizando biorreatores com 7 litros, obtendo variáveis de resposta como valores de índice enzimático para celulase, taxa de esporulação, contagem de células totais por UFC mL⁻¹, variação de pH e curva de crescimento bacteriano.

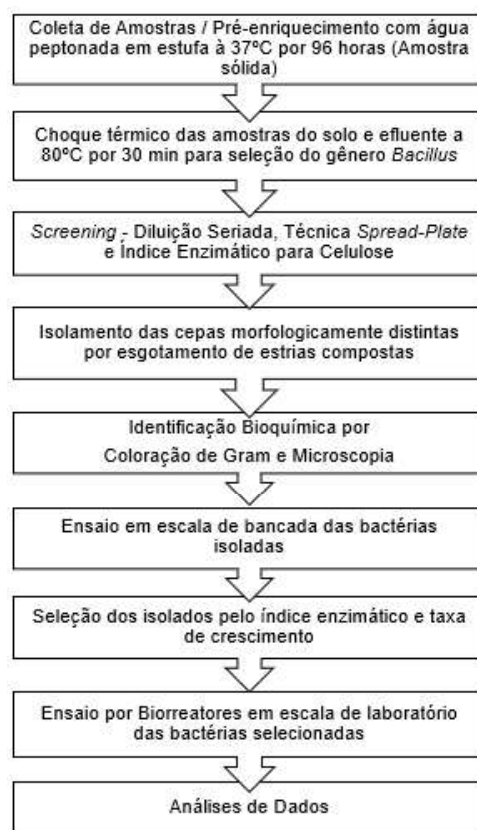


Figura 1 Diagrama resumido das atividades realizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado obteve-se um único isolado bacteriano do gênero *Bacillus*, a partir da árvore de eucalipto. O crescimento de células totais para o isolado da árvore do eucalipto foi de $1,55 \cdot 10^9$ UFC mL⁻¹ e seu índice enzimático para celulase foi de 1,16 cm, resultados semelhantes foram encontrados por ALVES (2021). A bactéria isolada foi capaz de produzir celulases logo, apresenta potencial biotecnológico e biorremediador de efluentes gerados em indústrias que utilizam celulose. A principal fonte de carbono, o carboximetilcelulose, se mostrou adequada para a seleção de isolados produtores de celulases neste estudo. No ensaio de 24 horas o pH se manteve na faixa inicial de 6,87 e finalizou com pH de 7,73. De maneira geral, pode-se concluir que é possível a utilização de técnicas de screening para seleção de bactérias do gênero *Bacillus*. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a importância da prospecção de novas linhagens de microrganismos produtores de celulases.

CONCLUSÃO

Na bioprospecção por bactérias produtoras de celulases foi possível obter uma bactéria do gênero *Bacillus* com potencial biotecnológico e biorremediador de efluentes contaminados com celulose a fim de minimizar os efeitos nocivos destes no meio ambiente. Os microrganismos são muito importantes por apresentarem habilidade na produção de biomoléculas, especialmente enzimas celulolíticas com potencial para degradar a celulose. De maneira geral, pode-se concluir que é possível a utilização de técnicas de screening para seleção de bactérias do gênero *Bacillus*. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a importância da prospecção de novas linhagens de microrganismos produtores de celulases.

REFERÊNCIAS

ALVES, BA.; ROTA, É. ; FERREIRA-MACHADO, AB.; PAIVA, AD Bioprospecção e caracterização de bactérias produtoras de celulases do solo do Cerrado brasileiro. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 10, n. 8, pág. e34010817426, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i8.17426. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/17426>.

COSTA, E. A.; FERNANDES, R. N.; CRUZ, E.; MORAES, L. P.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L.; Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA2 strain isolated from Brazilian soil.

Journal of Microbiology & Biotechnology 2017, 2, 1.

DYKSTRA, C. M. *et al.* Fate and biotransformation of phytosterols during treatment of pulp and paper wastewater in a simulated aerated stabilization basin. **Water Research**, v. 68,nº1. 589–600 2015. p, 2015.

FURLEY, T. *et al.* PRINCIPAIS FONTES E IMPACTOS DA ECOTOXICIDADE DE EFLUENTES DE CELULOSE E PAPEL. **O PAPEL**, vol. 76, num. 3, MAR 2015.

MELO, T. A. de.; NASCIMENTO, I. T. V. dá S. do.; SERRA, I. M. R. de S. The *Bacillus* genus applied to the biological control of plant diseases. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. e18110917817, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/17817>.

PEITZ, C., Schroeder L.H., Xavier C.R. AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTE DE FÁBRICA DE CELULOSE KRAFT PELA TÉCNICA DE FT-IR. **O PAPEL**, Paraná, Brasil, v. vol. 80, num. 05, p. 84 - 91, maio 2019.

ROTH, J.C.G., HOELTZ, M. & BENITEZ, L.B. Current approaches and trends in the production of microbial cellulases using residual lignocellulosic biomass: a bibliometric analysis of the last 10 years. *Arch Microbiol* **202**, 935–951 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01796-9>

TEIXEIRA, M. B. D. *et al.* O Papel: Uma Breve Revisão Histórica, Descrição da Tecnologia Industrial de Produção e Experimentos para Obtenção de Folhas Artesanais. **Revista Virtual de Química**, Brasília-DF, Brasil., v. 09, n. Número 3, 14 junho 2017.

GRAPHENE-BASED ANTIFUNGAL ABSORBENTS USED AS ADVANCED MATERIALS FOR THE PREVENTIVE CONSERVATION OF CULTURAL HERITAGE

Schrekke, C.M.L.*¹, Gorgolis, G.², Messina, E.³, Kotsidi, M.², Staccioli, M.P.³, Nhuch, E.L.¹, Di Carlo, G.³, Paterakis, G.², Koutroumanis, N.², Galiotis, C.², Schrekker, H.S.¹

¹ Multidisciplinary Group in Medical and Microbiological Chemistry and Laboratory of Technological Processes and Catalysis, Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, 91.501-970, Brazil.

² Department of Chemical Engineering, University of Patras, Foundation of Research and Technology Institute of Chemical Engineering Sciences, Stadiou Street, 1, Platani, Patras, 265 04, Greece.

³ Institute for the Study of Nanostructured Materials, National Research Council of Italy, Via Salaria km 29,300, 00015 Monterotondo, Rome, Italy.

*corresponding author: email: cla.schrekker@gmail.com

Currently, one of the major challenges in preserving cultural heritage is keeping them free from chemical contaminants and microorganisms. Many cultural objects stored in museum deposits or displayed in exhibition rooms are susceptible to volatile organic compounds (VOCs) that self-pollute many objects and cause them to lose their aesthetics and significance. Therefore, new absorbent materials need to be introduced to capture especially volatile organic compounds. Such absorbers should also protect against fungal contamination, another major problem present in these locations. Such VOCs can be emitted from objects, and their condensation on surfaces leads to the 'fogging' effect. The most common pollutants are acids, hydrochloric acid, aldehydes, hydrogen sulfide, ozone, and nitrogen oxide. In the case of a source of VOCs or other gaseous pollutants, the concentration of the outgassed compounds may increase continuously if there is no reaction or physical process to transform or capture them. Many pieces of art stored in museum deposits or displayed in exhibition rooms can be susceptible to fungal colonization. The use of an antifungal barrier can have an important role to maintain a clean and safe environment inside museums. As most pieces of art are frequently stored under harmful environmental conditions in crates and boxes of deposits, innovative absorbent materials need to be developed to capture the steadily released VOCs, creating a stable and safe climate to minimize degradation processes of cultural heritage (CH) objects within enclosures by absorption of airborne pollutants. Simultaneously, such absorbers should protect against fungal contamination. Graphene aerogels (GAs) are ultra-lightweight with stable performances under harsh environments. The VOCs absorption capacity of these spongy GA materials is of interest. Imidazolium ionic liquids (IL) are attractive as structural changes in both ions allow their design for specific applications. Various IL with strong anti-fungal activity have been identified and their incorporation in materials prevents the formation of fungal biofilms. Another interesting feature of imidazolium IL is their selective interaction with molecules through hydrogen bonds, which has been also explored in the absorption of VOCs.

Herein, graphene-based aerogels with an imidazolium IL additive were prepared, and their anti-fungal and VOCs absorption properties were investigated. Regarding the capacity of the GAs to inhibit fungal growth, *Aspergillus niger* was selected in this study as a model microorganism, which is one of the most common fungi found in museums. For the anti-fungal testing, the fungal strain was purchased from Mycotheca Universitatis Taurinensis (*Aspergillus niger* MUT 477). This strain was selected due to its first isolation from an indoor environment and was replicated using malt extract agar as culture medium. The graphene-based hybrid absorbers were prepared through an adapted procedure for the synthesis of reduced graphene oxide (rGO) aerogels and incorporation of C₁₆MImCl, to obtain aerogel monoliths. Based on their IL content, the samples were identified as rGO (0% IL), rGO0.1IL (0.1% IL), rGO0.5IL (0.5% IL), rGO1IL (1% IL) and rGO10IL (10% IL). The experiments with VOCs were performed into a closed glass vessel at 25 °C in a saturated environment. Their absorption properties were evaluated by treating them with an excess of pollutant, being either acetic acid, acetaldehyde, formic acid, or formaldehyde. The chemical interaction between absorbers and pollutants was monitored by FTIR spectroscopy. All the samples were analyzed before and after exposure to VOCs to evaluate the presence of signals due to absorbed pollutants from the aerogels and to consider their ability to capture VOCs with a stable interaction. After exposure to VOCs, all the samples showed well detectable or with a low intensity. After the treatments with aldehydes, a different behavior was observed compared to those with organic acids. As these changes were also detected after the desorption treatments, this suggests a stable interaction between absorbers and aldehyde. The C₁₆MImCl induced a significant increase in hydrophobicity, turning the interaction with the VOC molecules stronger. Also, such IL favors the formation of strong hydrogen bonds with VOCs.

To create a safe exhibition or storage environment for CH, it is important to determine whether the developed absorbers can

resist a fungal attack and at the same time can also inhibit the fungal growth in their surroundings. It grows aerobically on various substrates, including organic matter. Malt extract agar was used as culture medium since it can promote fungal growth. All the aerogels had an average diameter of 2 cm and were sterilized on both sides for 30 minutes under UV light before inoculation. The fungal strain was then inoculated in a Petri dish containing malt extract agar, placed aside the aerogels, and incubated in the dark, at 25 °C. At regular intervals, pictures of the Petri dishes were acquired, and the fungal growth evaluated by image analyses. All the tests were conducted in triplicates and the fungal strain alone was used as control. The fungal growth inhibition properties were assessed by measuring both the percentage of aerogels surface not colonized by the fungus and the Petri dish's surface covered by the fungus. In most cases, the aerogels were not attacked by the fungus by the end of the test when the control dishes were completely covered. These findings suggest that almost all the rGO-based formulations are effective in protecting their surface from a fungal attack. Several IL contents were evaluated and the graphene aerogel containing 10 wt.% IL was found to have the best anti-fungal activity, preventing the aerogel contamination with *Aspergillus niger*.

When exposed to a VOC saturated micro-environment, this aerogel was highly suitable for the absorption of acetaldehyde, formic acid, acetic acid, and formaldehyde. This combined anti-fungal and VOC absorption properties are prerequisites for bringing preventive conservation to a higher level.

NANO CARBON STRUCTURED MEDIA AND SILVER NANOPARTICLES AS FILTERING DEVICES FOR DIESEL BLENDS

Ribas, Rodolfo^{1*}; Marcuzo, Jossano²; Bento, Menezes Fátima¹

¹ LABBIO - Laboratório de BIODETERIORAÇÃO de Combustíveis e BIOCOMBUSTÍVEIS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICBS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. * 1presenting author: rodolfo.ribas@gmail.com

² JMHP Carbon Ltda Jacaré, São Paulo, Brasil

INTRODUCTION

Microbial growth control is a significant concern across various sectors involving storage, ranging from food to fuels. The presence of microbes during fuel storage, such as in diesel oil, is recognized as a chronic issue. Since the introduction of biodiesel into conventional diesel, microbial contamination has led to increased sediment generation, primarily consisting of biomass. This problem has been exacerbated by the hygroscopic nature of biodiesel, which attracts water, a critical factor in microbial proliferation. This contamination not only leads to fuel degradation but also causes operational issues in engines, such as clogged filters and fuel injectors, ultimately increasing maintenance costs.

To mitigate these issues, approaches to control microbial growth in fuels have traditionally involved physical removal techniques such as filtration and centrifugation, as well as the use of antimicrobial compounds, including morpholines, isothiazolones, and formaldehyde derivatives. However, the effectiveness of these methods can be limited by the chemical complexity of fuel blends and the adaptive capabilities of microbial communities. As a result, there is a growing need for more effective and sustainable solutions to manage microbial contamination in fuel systems.

Nanotechnology has emerged as a promising approach to address these challenges, particularly through the use of nanoparticles for microbial control. Nanoparticles, due to their small size and large surface area, exhibit unique properties that make them effective in hindering microbial growth. Among various types of nanoparticles, silver nanoparticles (Ag-NPs) are particularly notable for their potent antimicrobial activity. Silver has been used for centuries to reduce the development of fungi and bacteria, and the advent of nanotechnology has expanded its applications in various fields, from drug administration to surface treatment. The integration of Ag-NPs into activated carbon fibers (ACF) creates a nano carbon structured media (NCM) that enhances the filtration process. This composite material not only physically traps microorganisms but also exerts an antimicrobial effect through the release of silver ions, which can disrupt microbial cell membranes, interfere with metabolic processes, and induce oxidative stress. This dual-action approach is particularly valuable in the context of fuel filtration, where both the physical and biological integrity of the fuel must be maintained.

OBJECTIVES

The primary objective of this study was to evaluate the efficacy of NCM ACF filters, both with and without the presence of Ag-NPs, in controlling the growth of deteriorogenic microorganisms in diesel-biodiesel blends. Specifically, this research focused on the B20 blend, which consists of 20% biodiesel and 80% conventional diesel, under simulated storage conditions that mimic real-world scenarios. The study aimed to determine whether the incorporation of Ag-NPs into the ACF filters would enhance their ability to reduce microbial load and prevent fuel degradation over extended periods of storage.

METHODS

Fuel filtration tests were conducted with different levels of microbial contamination to assess the performance of the NCM ACF filters. The tests involved two primary contamination scenarios: low contamination, representing fuel as received, and high contamination, simulating worst-case storage conditions. The microbial contaminants included a range of fungi and bacteria known to be problematic in fuel storage, such as *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium citrinum*, *Pseudoallescheria boydii*, and a non-characterized inoculum based on ASTM E1259-10 standards.

The NCM ACF filters were prepared by integrating Ag-NPs into the ACF matrix. The Ag-NPs were synthesized using a chemical reduction method, which involved reducing silver nitrate with sodium borohydride in the presence of a stabilizing agent. The resulting Ag-NPs were then deposited onto the ACF substrates through immersion in the nanoparticle suspension, followed by drying at controlled temperatures to ensure uniform distribution of the nanoparticles across the filter fibers. Characterization of the filters was performed using scanning electron microscopy (SEM) to examine the morphology of the ACF fibers and the distribution of Ag-NPs. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was used to confirm the presence of silver on the filters and to quantify the nanoparticle loading. Additionally, X-ray diffraction (XRD) analysis was conducted to

investigate the crystalline structure of the Ag-NPs, which is known to influence their antimicrobial activity.

To evaluate the antimicrobial efficacy of the filters, inhibition tests were conducted in both liquid and solid media. In the liquid medium tests, the filters were immersed in Sabouraud broth inoculated with the target microorganisms, and microbial viability was monitored over time. In the agar diffusion assays, filter discs were placed on solid media inoculated with the microorganisms, and the zone of inhibition around each disc was measured to assess the antimicrobial activity of the Ag-NPs. The effectiveness of the filters was further evaluated by comparing the microbial load in the fuel before and after filtration. Samples were taken at regular intervals, and microbial counts were determined using plate count methods. The results were analyzed to determine the extent of microbial reduction achieved by the filters and to assess the impact of Ag-NPs on filter performance.

Data from the microbial growth inhibition tests were subjected to statistical analysis to determine the significance of the results. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the performance of the different filter types, and post-hoc tests were conducted to identify specific differences between treatment groups. The significance level was set at $p < 0.05$ for all statistical tests.

RESULTS

The results of the fuel filtration tests demonstrated a significant reduction in microbial load in the B20 blend when filtered through NCM ACF filters. The filters effectively removed a substantial portion of the microbial contaminants, thereby reducing the risk of fuel degradation. In the low contamination scenario, the NCM ACF filters achieved up to a 90% reduction in microbial load compared to the unfiltered control. In the high contamination scenario, the filters still performed well, achieving a 70% reduction in microbial load. The incorporation of Ag-NPs into the ACF filters provided additional antimicrobial benefits. The Ag-NP-loaded filters showed enhanced inhibition of fungal growth, particularly for the ASTM inoculum, where a 40% reduction in mycelial development was observed compared to the filters without Ag-NPs. This suggests that the Ag-NPs were effective in disrupting fungal metabolism and preventing biofilm formation on the filter surfaces.

However, the presence of Ag-NPs did not significantly improve the overall filtration efficiency in terms of microbial removal. While the Ag-NP-loaded filters did exhibit some antimicrobial activity, their performance was comparable to that of the non-loaded filters in terms of physical filtration. This indicates that the primary mechanism of microbial reduction was the physical trapping of microorganisms by the ACF fibers, with the Ag-NPs providing an additional, albeit modest, antimicrobial effect. Further analysis of the filters using SEM and EDS confirmed the presence of Ag-NPs on the ACF fibers. The nanoparticles were evenly distributed across the filter surface, with an average size of 20-30 nm. XRD analysis revealed that the Ag-NPs were crystalline in nature, with a face-centered cubic (FCC) structure, which is known to be favorable for antimicrobial activity.

The agar diffusion assays provided additional insights into the antimicrobial efficacy of the filters. The Ag-NP-loaded filters produced clear zones of inhibition around the filter discs, indicating the release of silver ions into the surrounding medium. The size of the inhibition zones varied depending on the microorganism, with the largest zones observed for *Pseudoallescheria boydii** and the ASTM inoculum. These results suggest that the Ag-NPs were effective in inhibiting the growth of certain fungi, but their efficacy varied depending on the specific microbial species.

DISCUSSION

The findings of this study highlight the potential of NCM ACF filters, particularly those loaded with Ag-NPs, as effective tools for controlling microbial contamination in diesel-biodiesel blends. The dual-action mechanism of physical filtration combined with antimicrobial activity offers a promising approach to managing microbial load in fuel storage systems. However, the results also indicate that the effectiveness of Ag-NPs as antimicrobial agents in fuel filtration is influenced by several factors, including nanoparticle size, concentration, and the specific conditions of the fuel environment. While the Ag-NPs did provide some level of microbial inhibition, their impact on overall filtration efficiency was limited. This suggests that further optimization of the nanoparticle loading and filter design may be necessary to maximize the benefits of this technology.

The study also raises important considerations regarding the long-term stability and environmental impact of Ag-NP-loaded filters. The release of silver ions into the environment, particularly in the context of large-scale fuel storage and distribution systems, could have ecological implications. Future research should focus on assessing the environmental impact of Ag-NP use in fuel filtration and exploring alternative antimicrobial agents that offer similar benefits with reduced environmental risks.

CONCLUSION

The use of NCM ACF filters, particularly those incorporating Ag-NPs, shows promise for reducing microbial contamination in diesel-biodiesel blends. While the presence of Ag-NPs provided additional antimicrobial benefits, the overall impact on filtration efficiency was modest. The study suggests that the primary mechanism of microbial load reduction is physical filtration, with Ag-NPs offering supplementary antimicrobial effects. Future work should focus on optimizing the nanoparticle loading and exploring the potential of other nanomaterials in fuel filtration applications. Additionally, long-term studies are needed to evaluate the stability and environmental impact of Ag-NP-loaded filters in real-world fuel storage and distribution systems.

REFERENCES

- Abdelghany, A. M., et al. (2018). Nanomaterials for antimicrobial control: silver nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology*.
- Choudhury, R., et al. (2021). Recent advances in silver nanoparticle research. *Nanomaterials*.
- Akram Shaikh, A., et al. (2021). Nanoparticles in antimicrobial control. *Journal of Nanomaterials and Nanoengineering*.
- Henly, W., et al. (2019). The antimicrobial efficacy of silver. *International Journal of Microbial Research*.
- Bhardwaj, V., et al. (2021). Nanoparticle applications in environmental remediation. *Journal of Environmental Science and Technology*.
- Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*.
- Franco, D., et al. (2021). Silver nanoparticles in medicine: A review of their antimicrobial activity and potential risks. *Nano Reviews and Experiments*.
- Jian, Y., et al. (2021). Antifungal efficacy of silver nanoparticles against *Fusarium graminearum*. *Journal of Applied Microbiology*.
- Lansdown, A. B. G. (2006). Silver in healthcare: its antimicrobial efficacy and safety in use. *Royal Society of Chemistry*.
- Omidkhoda, A., et al. (2019). Silver nanoparticles against *Candida albicans*: Antifungal activity and mechanisms. *Journal of Medical Mycology*.
- Percival, S. L., et al. (2012). Antimicrobial properties of silver-containing dressings: a comprehensive review. *Journal of Wound Care*.
- Pulit, J., et al. (2013). Silver nanoparticles: characterization, properties, and applications. *Journal of Nanomaterials*.
- Ribeiro, A. I., Dias, A. P., & Zille, A. (2022). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, and application. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.
- Saravanan, M., et al. (2021). Antimicrobial activity of silver nanoparticles. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Sathiyaraj, S., et al. (2020). Antimicrobial applications of silver nanoparticles. *Nanomedicine Journal*.
- Wahab, A., et al. (2021). Silver nanoparticles in water treatment: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*.
- Urnukhsaikh, E., et al. (2021). Applications of silver nanoparticles in microbiology. *International Journal of Nanomedicine*.
- Varna, N., et al. (2022). Advances in nanoparticle research. *Nano Today*.
- Yildirim, T., et al. (2021). Nanoparticle applications in biomedicine. *Materials Science and Engineering*.
- Xu, Y., et al. (2013). Comparative antimicrobial study of silver nanoparticles and Natamycin. *Journal of Microbial Biotechnology*.

EVALUATING ESSENTIAL OILS ANTIFUNGAL ACTIVITY IN ISOLATES FOUND IN MUSEUM COLLECTIONS

Fernandes, L.,^{1*} Paiva, D.¹, Pereira, E.¹, Rufino, C.², Portugal, A.^{1,3,4}, Cabral, C.⁵, Mesquita, N.²

¹ Centre for Functional Ecology (CFE) – Science for People & the Planet, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456, Coimbra, Portugal

² Museu da Ciência da Universidade de Coimbra, Laboratório Chimico, Largo Marquês de Pombal 3000-272 Coimbra

³ FitoLab – Laboratory for Phytopathology, Instituto Pedro Nunes (IPN), Rua Pedro Nunes, 3030-199 Coimbra, Portugal

⁴ TERRA – Associate Laboratory for Sustainable Land Use and Ecosystem Services, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456, Coimbra, Portugal.

⁵ iCBR/CIBB/FMUC – Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research, Centre for Innovative Biomedicine and Biotechnology, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

*autor correspondente: luis.dsfernandes@hotmail.com

INTRODUCTION

Cultural heritage, in its many forms, is an important part of every culture and every country. It is, however, under constant threat of deterioration from multiple sources, including organisms. This phenomenon is known as biodeterioration, where living organisms, via either mechanical or chemical processes, compromise the aesthetics and/or integrity of historically relevant artifacts¹. Among the plethora of microorganisms capable of biodeterioration, fungi are of great relevance due to their ubiquity, ability to grow in extreme environments and their complex and diverse metabolic pathways. These allow them to colonize and consequently aesthetically and structurally damage historically relevant objects^{2,3}. In this context, it is important to find an effective strategy to fight fungal contamination of cultural heritage that does not negatively impact the treated artifacts in any way. This solution should also have a negligent impact on both environmental and human health. One potential candidate that fits these criteria and has been recently studied in the cultural heritage context are plant essential oils. These have a proved antifungal activity, including against fungi isolated from cultural heritage⁴⁻¹³.

In this study, a polyphasic and multidisciplinary approach is conducted as to characterize the fungal communities present in two different museum collections and archives in Portugal, namely the Santa Maria da Vitória Monastery (Batalha Monastery) and the Science Museum of the University of Coimbra. Afterwards, an analysis of the fungicidal effects of plant essential oils, obtained via hydrodistillation, is performed and their impact on the treated artifacts is assessed. This is crucial to developing a strategy that can be put in place by these institutions. In the Batalha Monastery collections, we can find architectural, tomb and devotional oolithic limestone sculptures dating from the 15th and 16th centuries, wooden artifacts and models, studies and stained-glass cards, among other historically relevant documents that present clear signs of fungal contamination. In the Science Museum of the University of Coimbra on the other hand, we can find tens of thousands of pieces, such as several animal species, both in taxidermy and skeleton forms, along with other artifacts, with several pieces also showing signs of fungal contamination.

Given the historical and cultural importance of these institutions and the artifacts that compose their collections, it is important to understand the biodeterioration phenomena that threaten them and develop a solution that can effectively combat it.

MATERIAL AND METHODS

Artifacts belonging to the Science Museum of Coimbra with obvious signs of fungal contamination were sampled by non-invasive methods (swabbing). The collected samples were then washed with sterile physiological serum and the resulting suspension was plated in Potato Dextrose Agar (PDA) plates and incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark. Emerging fungal colonies were further isolated into axenic cultures in PDA plates until mycelial growth was sufficient for DNA extraction. The obtained DNA was then used as a template for several PCR reactions to amplify the ITS, *β -tub*, *Cal* and *rpb2* barcoding regions. The PCR products were then sequenced by Sanger sequencing method and the resulting sequences were used for molecular identification of each isolate using NCBI's Blast tool.

Plant essential oils (EO's) were obtained via hydrodistillation of plants belonging to the *Cymbopogon*, *Mentha*, *Margotia* and *Thapsia* genera, in accordance with the Portuguese Pharmacopeia's norms. Antifungal activity of each of the obtained EO's volatilized fraction was then assessed by inoculating calibrated spore suspensions of the obtained isolates onto PDA plates, which were then exposed to the volatilized fraction of the aforementioned EO's and CFU numbers were evaluated through a period of 30 days and compared with control plates, which weren't exposed to the EO's.

RESULTS AND DISCUSSION

This research is still ongoing, and as such, no definitive results have been obtained. However, some diversity of isolates has been already identified from the pieces sampled thus far, as well as some preliminary results regarding essential oils show the potential of several of the ones tested in terms of antifungal activity. Some of the isolates found in the pieces sampled thus far belong to the species of *Trichoderma longibrachiatum*, *Wallemia sebi*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus pseudoglaucum* and *Penicillium brevicompactum*, some of which have been previously described to have biodeteriogenic potential¹⁴. Of the tested EO's, most impacted spore germination and fungal growth, with some being able to fully inhibit the growth of most fungi even at the lowest tested concentrations.

CONCLUSIONS

As mentioned above, this work is still ongoing. Nevertheless, it is already clear that the cultural heritage objects that compose these collections are under threat of biodeterioration caused by a very diverse fungal community. At the same time, our preliminary results show that EO's have great potential as antifungal agents for combating cultural heritage contamination and preventing biodeterioration in museum collections.

REFERENCES

- KAKAKHEL, M. A. *et al.* 2019. Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* vol. 143 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104721>
- GADD, G. M. *et al.* 2012. Geomycology: Metals, actinides and biominerals. *Environmental Microbiology Reports* vol. 4 270–296
- STERFLINGER, K. 2010. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews* vol. 24 47–55
- PALLA, F. *et al.* 2020. Essential oils as natural biocides in conservation of cultural heritage. *Molecules* **25**
- NAZZARO, F. *et al.* 2017. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals* vol. 10
- STUPAR, M. *et al.* 2014. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African Journal of Botany* **93**, 118–124
- MARCO, A. *et al.* 2020. Basil essential oil as an alternative to commercial biocides against fungi associated with black stains in mural painting. *Build Environ* **167**
- VENERANDA, M. *et al.* 2018. Evaluating the exploitability of several essential oils constituents as a novel biological treatment against cultural heritage biocolonization. *Microchemical Journal* **138**, 1–6
- ELSAYED, Y. & SHABANA, Y. 2018. The effect of some essential oils on *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* infestation in archaeological oil paintings. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry* **18**, 71–87
- RAKOTONIRAINY, M. S. & LAVÉDRINE, B. 2005. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *Int Biodeterior Biodegradation* **55**, 141–147
- CAMPANELLA, L. *et al.* 2021. Capsulated essential oil in gel spheres for the protection of cellulosic cultural heritage. *Nat Prod Res* **35**, 116–123
- EL-HEFNY, M. *et al.* 2019. Essential and recovery oils from *Matricaria chamomilla* flowers as environmentally friendly fungicides against four fungi isolated from cultural heritage objects. *Processes* **7**
- ILIEȘ, D. C. *et al.* 2021. Investigations of the surface of heritage objects and green bioremediation: Case study of artefacts from Maramureș, Romania. *Applied Sciences (Switzerland)* **11**

ADITIVOS COMERCIAIS COM BIOCIDA EM SUA FORMULAÇÃO E EFEITO SOBRE MICRORGANISMOS DETERIOGÊNICOS DE COMBUSTÍVEIS

Zimmer, Adriane Ramos^{1*} Bento, Menezes Fátima¹

¹ LABBIO - Laboratório de BIODeterioração de Combustíveis e BIOcombustíveis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICBS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. * autor correspondente: bio_didi@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A formação de borras (lodos) que pode ter origem química e ou microbiana em combustíveis, principalmente no óleo diesel, é considerado um problema crônico durante o armazenamento e reconhecido ao nível mundial (PASSMAN, 2013; KOMARIAH et al 2022). Além da origem do petróleo, a adição de biodiesel (higroscópico e instável quimicamente) e a falta de rotinas rígidas de manutenção, agravam o problema, que tem como consequência o comprometimento da qualidade final do produto. Para se evitar a formação de resíduos microbianos nos tanques, deve-se adotar as “Boas Práticas” durante o armazenamento, como a drenagem regular da água que se forma nos tanques. Uma outra abordagem é a utilização de produtos antimicrobianos, conhecidos como biocidas (PASSMAN, 2013; NEVES et al. 2020; YAN et al., 2023). No Brasil o uso de biocidas para proteção de combustíveis ainda não possui regulamentação estabelecida (LUZ et al, 2018), permitindo que biocidas possam ser comercializadas sob a forma de aditivos e com rotulagem pouco clara. Assim, a oferta de aditivos para proteção de óleo diesel com biocida em sua formulação tem aumentado no mercado, visando a qualidade final do produto estocado. Em uma rápida busca virtual é possível encontrar diversos aditivos para óleo diesel que prometem tratar o combustível, porém, alguns são comercializados sem informações básicas como ingrediente ativo biocida ou sua concentração no produto. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de 4 aditivos comerciais para óleo diesel que possuem em sua formulação os biocidas oxazolidina, morfolina e mistura de isotiazolona, todos biocidas recomendados para uso em combustíveis (PASSMAN 2013; ABNT ABNT16732-19; YAN et al., 2023) e que são atualmente comercializados com a promessa de controlar a população microbiana que se desenvolve em tanques de armazenamento de óleo diesel-biodiesel.

MATERIAL E MÉTODOS

Aditivos comerciais: Foram testadas quatro formulações de aditivos comercializados no Brasil como aditivos para tratamento de diesel (exceto D) com biocida em sua formulação. Os produtos avaliados foram designados com base em seu ingrediente ativo: **A.** oxazolidina, **B.** oxazolidina, **C.** morfolina e **D.** isotiazolonas - CMIT/MIT. Destes, apenas o ativo D (MIT/CMIT 14%) não é um aditivo comercial e sim o biocida puro. Para cada produto foi confeccionado uma solução estoque com o dobro da concentração para tratamento de choque recomendada pelo fabricante. Foram preparadas soluções de estoque de 10.000 ppm para o aditivo **A** e de 2.000 ppm para os aditivos **B**, **C** e **D**. Para o biocida **A** a primeira concentração testada foi 5000 ppm, diluída sucessivamente até 5 ppm. Para os demais aditivos (**B**, **C** e **D**) foram realizadas diluições a partir de 1000 ppm até 1 ppm.

Microrganismos: Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterobacter kobei*; *Penicillium citrinum* e *Pseudallescheria boydii* em cultura pura. As bactérias e o fungo *P. citrinum* foram isolados de sedimento de tanques de armazenamento de óleo diesel (S10) e biodiesel (B100 óleo de soja) e identificados através de MALDI-TOF. O fungo *P. boydii* é oriundo da Coleção de Culturas do LABBIO-UFRGS.

Preparação do inóculo: As suspensões celulares foram obtidas a partir do crescimento das culturas por 24h em caldo BHI, a 28°C. O inóculo foi padronizado para uma turbidez padrão 0,5 McFarland (CLSI, 2018), utilizando-se um densitômetro McFarland Den-1B- Grant-bio e posteriormente foi diluído 1:20, para se obter a concentração final de 10⁵ UFC.mL⁻¹ nos poços. A suspensão de esporos foi preparada a partir de culturas com 7 dias em tubos com ágar malte inclinado. O inóculo foi padronizado com auxílio de um hemocitômetro e ajustado para uma concentração final de 10⁵ esporos.mL⁻¹. A concentração utilizada para ambos inóculos foi baseada em uma condição de alta contaminação microbiana (ABNT16732-19).

Delineamento experimental: Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo de cultura (CLSI, 2018; KOWALSKA-KROCHMAL e DUDEK-WICHER, 2021). Para a avaliação das bactérias, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços estéreis com 180 µL de meio de cultura (caldo BHI) com aditivo nas concentrações determinadas e 20 µL do inóculo em cada poço, em triplicata. Para os fungos utilizou-se placas de 12 poços com 3,6 mL de caldo sabouraud com aditivo nas concentrações determinadas e 400 µL de inóculo, em duplicata. Foram realizados dois controles, i) apenas o meio de cultura (sem microrganismos); ii) meio de cultura e microrganismos (0 ppm). O aditivo **A**, ao ser misturado, exibiu a cor avermelhada (Figura 1a), sendo assim, utilizou-se uma placa adicional (controle), com duas réplicas de cada concentração avaliada de

cada aditivo (sem microrganismos), para se observar o comportamento do produto durante o período de avaliação. As placas foram incubadas sob a temperatura de 28°C. Os tempos amostrais foram 0, 1h, 8h, 24h e 48h para bactérias e 0, 1h, 8h, 24h, 48h, 5 e 7 dias para os fungos.

Determinação de CMI e CMB: A determinação da CMI foi realizada visualmente tendo como critério a turvação do meio para bactérias e o crescimento do micélio para os fungos. Para a determinação da CMB, em cada tempo amostral retirou-se uma alíquota de 5µL de cada concentração testada, que foi inoculada em meio sólido (BHI/Sabouraud). Estas placas foram incubadas a 28°C por 24h para as bactérias e até 7 dias para os fungos. Foi considerada CMB a concentração onde não foi verificado crescimento em placa. Para bactérias, o acompanhamento do desenvolvimento bacteriano nas diferentes concentrações de aditivo foi também realizado, medindo-se a turbidez nos poços em um leitor de microplacas Anthos Zenyth 200rt (BiochromLtd.) em 600 nm (AbsDO₆₀₀). Os valores foram obtidos considerando-se o valor médio da leitura das triplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes de solubilidade dos biocidas: A solubilidade e compatibilidade dos aditivos em água e na fase oleosa foi avaliada pelo aspecto visual das soluções estoque (Concentrações **A**: 10.000 ppm e **B, C e D**: 2000 ppm) em água destilada estéril (Figura 1a) e no diesel comercial estéril (mistura B12) (Figura 1b) utilizando a escala HAZE (ASTM D 4176-04), como referência.

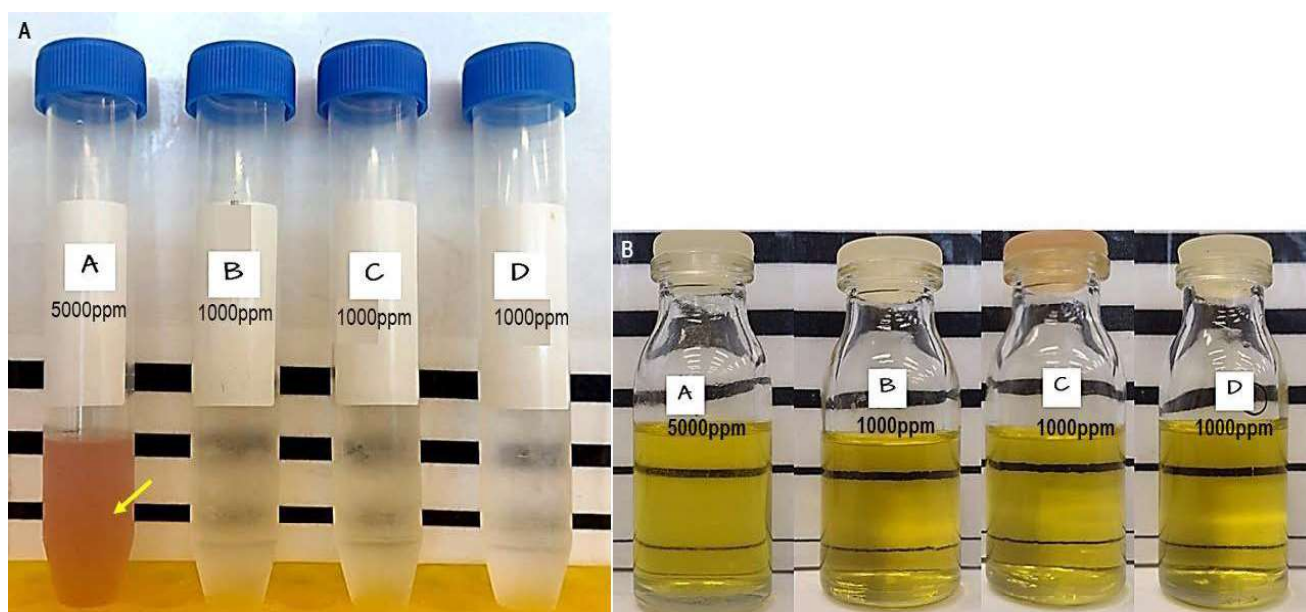


Figura 1. Aspecto visual da solubilidade dos aditivos. **a.** Solução estoque dos aditivos diluídos em água destilada estéril. (concentrações: Aditivo **A** (10.000 ppm), **B, C e D** (2.000 ppm)). **b.** Aditivos **A, B, C e D** diluídos em óleo diesel B (mistura B12). Concentrações: aditivo **A** 10.000 ppm; **B, C e D** 2.000ppm. A seta amarela destaca a alteração de cor da água.

Na água (água fria, destilada, estéril), todas as formulações foram solúveis, porém a formulação **A**, apresentou menor solubilidade, em relação aos demais aditivos, sendo possível observar gotículas do aditivo dispersas na água e também produziu uma solução de cor avermelhada (Figura 1a). No combustível verificou-se que todas as formulações testadas foram solúveis e não causaram qualquer tipo de alteração visual neste veículo (Figura 1b), que pudesse provocar alguma inconformidade prevista nas especificações de qualidade para o óleo diesel rodoviário, normalizadas na resolução ANP, 50/2013 e no Regulamento técnico nº4/ 2014.

Determinação de CMI e CMB

Os resultados do teste de microdiluição em caldo com os aditivos comerciais são apresentados na Tabela 1, com as concentrações de CMI e CMB para cada produto e cada microrganismo avaliado.

Na avaliação da atividade antimicrobiana, o aditivo **D**, (isotiazolona) foi o mais efetivo, seguido pelo aditivo **C** (morfolina), aditivo **B** (oxazolidina) e o aditivo **A** (oxazolidina). A isotiazolona apresentou efeito “cida” (morte das células e esporos) em concentrações menores que 31 ppm para todos os organismos testados, sendo efetiva após 2h de contato. O aditivo **C** foi efetivo em concentrações menores que 250ppm. Os aditivos **A e B**, apresentaram efeito bioestático sobre *P. aeruginosa*, e

“cida” após 48h para *E. kobei*, em concentrações de 5000 e 1000 ppm, respectivamente, mas não foram efetivos para os fungos. A bactéria *P. aeruginosa* foi o organismo mais resistente a todos os aditivos testados, enquanto a bactéria *E. kobei* foi o mais sensível. Os fungos, de modo geral, apresentaram uma susceptibilidade intermediária, mas *P. boydii* foi mais suscetível ao aditivo C, com uma CMB de 62 ppm, enquanto *P. citrinum* apresentou uma CMB de 125 ppm. Para os aditivos com oxazolidina na formulação ambos os fungos e a bactéria *P. aeruginosa* não se mostraram susceptíveis.

Tabela 1. Valores de CMI e CMB dos aditivos comerciais avaliados para óleo diesel sobre os microrganismos isolados.

Avaliação	Microrganismo	Tempo			
		A	B	C	D
CMI	<i>P. aeruginosa</i>	5000	+	62	15
	<i>E. kobei</i>	5000	1000	31	4
	<i>P. boydii</i>	+	+	125	7
	<i>P. citrinum</i>	+	+	125	7
CMB	<i>P. aeruginosa</i>	-	+	250	31
	<i>E. kobei</i>	5000	+	62	4
	<i>P. boydii</i>	+	+	62	7
	<i>P. citrinum</i>	+	+	125	7

+ não houve inibição do crescimento; - sem crescimento visível, Valores em ppm de produto.

Aditivo A: concentrações testadas: 5000 ppm, 2500 ppm, 1250 ppm, 625 ppm, 312,5 ppm, 156,25 ppm, 78,12 ppm, 39ppm, 19,53 ppm, 9,76 ppm, 4,88 ppm e 0 ppm (zero = sem biocida). **Aditivo B, C e D:** Concentrações testadas: 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,62 ppm, 7,8 ppm, 3,9 ppm, 1,9 ppm, 1ppm, e 0 ppm (zero = sem biocida).

Os resultados obtidos em testes de CMI e CMB em caldo são preditivos para a eficácia de antimicrobianos disponíveis (KOWALSKA-KROCHMAL e DUDEK-WICHER, 2021). Porém, constituem apenas uma avaliação orientativa das concentrações dos aditivos, considerando que são testes que ocorrem sob condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos (nutrientes, pH, temperatura) e não refletem a condição real de um tanque. Desta forma, as concentrações determinadas como inibitórias nesta condição, podem não corresponder às concentrações necessárias para controlar uma população em condições reais, mas servem como valores de referência e informam o espectro de ação do produto (ZIMMER & BENTO, 2020; KOWALSKA-KROCHMAL;DUDEK-WICHER, 2021). Neste estudo destacaram-se os produtos contendo isotiazolonas (YAN et al., 2023) e morfolina como biocidas em sua composição, mas para a próxima etapa selecionamos produtos com morfolina, uma vez que muitos casos envolvendo dermatite de contato em trabalhadores com uso das isotiazolonas vêm sendo reportados em diferentes setores da indústria (SCHWENSEN et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Durante o monitoramento dos microrganismos expostos a diferentes concentrações dos aditivos com medidas de turbidez (Abs DO₆₀₀), foi observado que para a bactéria *P. aeruginosa*, a exposição a subdosagens dos aditivos promoveu um incremento na DO₆₀₀ acima do controle. Alguns aditivos, incluindo biocidas, se adicionados em concentrações sub-letais, podem ser utilizados como fonte de nutrientes pela população microbiana, acelerando o seu desenvolvimento (HILL, 1990). Um efeito semelhante foi observado por BUCKER et al (2014) para um aditivo contendo oxazolidina na concentração de 0,05% em condição de baixa contaminação. Estudos recentes também indicam a possibilidade de desenvolvimento de tolerância e resistência em populações microbianas submetidas a concentrações subinibitórias de biocidas (CAMPA et al., 2019; JENNEMAN et al 2022;). Estes resultados ilustram os riscos de se adotar medidas corretivas inapropriadas para o sistema que se deseja tratar.

CONCLUSÕES

Os resultados dos testes de microdiluição em caldo mostraram que dentre os aditivos testados com a mistura de isotiazolonas ou morfolina como biocidas em sua composição, foram os mais efetivos em uma concentração máxima de 31ppm e 250ppm para fungos e bactérias, erradicando os microrganismos teste em até 48h. Os produtos contendo oxazolidina na formulação, um biocida com características preservantes, não foram capazes de controlar o crescimento microbiano na concentração máxima utilizada 5000 ppm.

REFERÊNCIAS

CLSI (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI standard M07, 11th Edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.2018.
AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP Nota técnica 10/2021. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução ANP Nº 50, de 23 de dezembro de 2013. DOU 24.12.2013. Regulamenta as especificações do óleo diesel de uso rodoviário, contidas no Regulamento Técnico ANP nº 4/2013, e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. Disponível em: . Acesso em: 20 out. 2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS ABNT NBR 16732: combustíveis líquidos e sistemas associados: requisitos para prevenção, monitoramento e controle de contaminação microbiana. Rio de Janeiro, 2019.

BÜCKER F, BARBOSA CS, QUADROS PD, BUENO MK, FIORI P, TE HUANG C et al Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *Int Biodeterior Biodegrad* 95:346–355. 2014.

CAMPA, M.F., WOLFE, A.K., TECHTMANN, S.M., HARIK, A.-M., HAZEN, T.C.. Unconventional oil and gas energy systems: an unidentified hotspot of antimicrobial resistance? *Front. Microbiol.* 10, 2392. 2019.

HILL, E.C. Biocides for the future. *International biodeterioration*, 26 (2-4): 281-285. Special Issue: Biocides. 1990.

JENNEMAN, G. E.; DE LEON, K. B. Environmental stressors alter the susceptibility of microorganisms to biocides in upstream oil and gas systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 169, p. 105385, 2022.

KOWALSKA-KROCHMAL, B., AND DUDEK-WICHER, R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens* 10:165. 2021.

LUZ GVS, SOUSA BASM, GUEDES AV, BARRETO CC, BRASIL LM. Biocides Used as Additives to Biodiesels and Their Risks to the Environment and Public Health: A Review. *Molecules*. Oct 19;23(10):2698. 2018.

YAN X, HAN R, FAN W, SHAN B, YANG J, ZHAO X. Mechanism of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (CMIT) in controlling microbial problems in aircraft fuel systems. *RSC Adv.* Jun 28;13(28):19485-19494, 2023.

PASSMAN FJ. *Int Biodeterior Biodegradation* 81:88–104.2013
Resolução ANP 50.. Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP 50 de 23.12.2013. DOU 24.12.2013. 2013.

SCHWENSEN J, JOHANSEN JD Isotiazolinoni. In *Kanerva's Occupational Dermatology* (John S, Johansen J, Rustemeyer T, Elsner P, Maibach H, eds). Springer, Cham, Switzerland, pp 507–520, 2020.

SILVA V, SILVA C, PEDRO SOARES P, GARRIDO EM, BORGES F, GARRIDO J. Isothiazolinone biocides:chemistry, biological, and toxicity profiles. *Molecules* 25(4):991–1013, 2020.

ZIMMER, A. & BENTO, F.B. Seleção de biocidas para uso em misturas diesel-biodiesel in *Coletânea Estudos Ambientais e Agrônomicos: resultados para o Brasil / Camila Pinheiro Nobre e Anna Christina Sanazario de Oliveira (Org.)*. — São Luís: EditoraPascal LTDA,. 330 f. P 25-47. 2020; il. – (Estudos Ambientais e Agrônomicos; v. 1)

USE OF FERMENTED BRAN AND BIOCOMPOUNDS IN BIOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH BIODIESEL

Simon, V.¹, Fagundes, V.D.¹, Freitag, J. F.¹, Lorenzato, J.¹, Zanfiri, R.², Colla, L.M.¹

¹ Postgraduate Program in Civil and Environmental Engineering, University of Passo Fundo.

² Undergraduate Course in Biological Sciences, University of Passo Fundo.

INTRODUCTION

In recent years, environmental balance has been compromised by the high concentration of pollutants generated by anthropogenic processes. Soil pollution with petroleum-derived compounds, widely used in industrial activities and transportation, is a significant concern due to the damage it causes to the environment and public health (Abdollahinejad et al., 2020). To mitigate these contaminations and promote the use of renewable energy, Brazil incorporated 10% biodiesel into diesel oil in 2019 (Brasil, 2018). Although biofuels have environmental advantages compared to petroleum derivatives, decontamination techniques are still necessary when they contaminate the soil (Meyer et al., 2014).

Remediation techniques, such as thermal treatment, oxidative processes, and soil washing, are effective but require large amounts of water and energy, increasing costs (Casasso et al., 2020; Liu et al., 2020; Ren et al., 2020). Bioremediation, which uses microbial action to degrade contaminants, offers a more cost-effective and environmentally friendly alternative. The success of bioremediation depends on the metabolic capacity of microorganisms, whether through bioaugmentation or biostimulation (Baniasadi & Mousavi, 2018; Quintella et al., 2019).

Biocompounds such as lipases and biosurfactants are particularly effective in the bioremediation of oily substrates, promoting the catalysis of reactions involving fatty acids and the interaction of immiscible phases (Júnior et al., 2016; Decesaro et al., 2017). Solid-state fermentation (SSF) is a promising technique for the production of these biocompounds, utilizing agro-industrial residues as a nutritional source, which reduces economic and environmental impacts (Sadh et al., 2018). Various microorganisms, especially fungi such as *Aspergillus niger*, are studied for this purpose due to their ability to produce lipases and biosurfactants simultaneously (Sperb et al., 2018; Colla et al., 2010).

The aim was to evaluate the bioremediation of contaminated soil by the addition of fermented bran containing the active *Aspergillus niger* fungus and the biocompounds produced (bioremediation) and to compare this technique with natural attenuation.

MATERIAL AND METHODS

Solid state fermentation (SSF) was carried out using wheat bran and corncob (proportion 80:20), and inoculation was carried out with the fungus *Aspergillus niger* previously prepared in PDA medium. The cultivation conditions followed optimization carried out by the research group, for the simultaneous production of lipases and biosurfactants. Subsequently, the bioremediation test was performed using 10% of the fermented bran containing the active fungus and the biocompounds produced in soil contaminated with 20% biodiesel. A controlled trial was conducted without the addition of bran. The tests were evaluated for 90 d, with samples being taken at times 0 d, 15 d, 30 d, 60 d, and 90 d to evaluate the biodegradation of the contaminant through oil and grease methodology, using an ultrasonic probe (Kreling et al., 2020). The analysis of the data was carried out using Tukey's test at a 95% confidence level.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Figure 1 presents the biodiesel degradation results over the 90 days of bioremediation, accompanied by Tukey's test. According to Tukey's test, induced bioremediation showed the highest averages ($74.40 \pm 1.76\%$) and a statistical difference ($p < 0.05$) for the 90-day period. At the end of the 90 days, this technique resulted in $14.31 \pm 1.24\%$ more contaminant degradation compared to natural attenuation ($60.09 \pm 0.52\%$), indicating the advantage of using induced bioremediation with the addition of fermented bran containing biocompounds and fungi.

Biosurfactants increase the bioavailability of hydrocarbon contaminants by forming emulsions, a characteristic process of high molecular weight biosurfactants like those produced by *A. niger*. In this process, the hydrophobic fraction of the contaminant

interacts with the hydrophilic fraction of the aqueous soil phase (Chu & Chan, 2003), enhancing the contaminant's bioavailability for use as a nutritional source by indigenous microorganisms (Decesaro et al., 2016). Lipases aid in the hydrolysis of triglycerides present in the oily contaminant into glycerol and free fatty acids, facilitating the use of the oily compound as a microbial nutritional source (Karigar & Rao, 2011). Additionally, the use of fermented bran is a sustainable alternative, as it is a renewable product that can be used as a supplementary carbon source and as a support for medium aeration. Among the benefits of using this technique are economic and environmental viability, with reduced production costs of biocompounds and the reuse of agro-industrial residues. Furthermore, it is possible to produce two high-value bioproducts in one process without the need for extraction or purification for bioremediation application (Colla et al., 2010).

At the initial time point, for both techniques used, the lowest contaminant degradation values were observed ($31.42 \pm 0.61\%$ for AN and $41.90 \pm 0.99\%$ for Induced Bioremediation), which are associated with the adsorption of the contaminant in the soil matrix. Contaminant adsorption values at the initial time of bioremediation can vary between 30 and 50% due to the adherence of the contaminant to the soil, with very similar values found when both Natural Attenuation (NA) and Induced Bioremediation techniques are used. Contaminant adsorption to the soil can vary over time, occurring concurrently with biodegradation. In this regard, the use of Induced Bioremediation resulted in different initial contaminant adsorption values, showing higher values compared to Natural Attenuation (Kreling, 2017; Decesaro, 2016; Cecchin, 2014). Thus, the removal rates obtained may be masked together with the retention of the contaminant in the soil.

For both assays, there was statistical equivalence between the 30d and 60d times with $p = 0.9994$ for Induced Bioremediation and $p = 0.9989$ for NA. These data may be associated with the production of lipases and biosurfactants in the soil. Both NA and Induced Bioremediation showed the highest productions at 30d, possibly corresponding to the stationary phase of microbial growth. Degradation is higher in the initial times (0d – 15d) where there is greater availability of the contaminant, especially the lighter fractions (molecular weight) that are easily assimilated by microorganisms. During this stage, microorganisms commonly undergo an adaptation phase with high metabolic activity, using the compound as a source of lipid carbon for cellular development. Subsequently, heavier fractions persist in the medium, coinciding with the peak production of lipases and biosurfactants (30d), a phenomenon that microbiota uses to overcome the situation and utilize oily compounds as an energy source. As the contaminant is degraded, its availability in the medium decreases and the microbiota diminishes due to competition for food. Furthermore, the biocompounds produced, being biodegradable, are consumed in the medium, reducing their concentrations (Lin et al., 2011;).

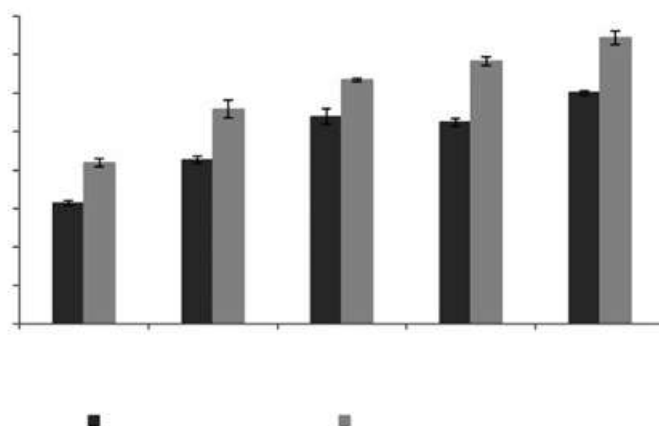


Figure 1 – Comparison of contaminant degradation using NA and Induced Bioremediation techniques (%)*.

*Equal letters indicate no statistical difference ($p < 0.05$) by Tukey's test for means $\pm$ standard deviation, when comparing all assays at all time points.

The lowest means and statistical differences ($p < 0.05$) were observed in the NA assay at 15d of bioremediation ($31.42 \pm 0.61\%$). Also, over the 90 days of bioremediation, a slower degradation rate was observed compared to the Induced Bioremediation assay at all evaluated times. This phenomenon can be explained because soils generally have nutritional limitations that subject microorganisms to challenging conditions, reducing the effectiveness of degradation (Dellagnezze et al., 2014). Even with the production of biocompounds in the NA assays, the local microbiota faced development difficulties, as the biodegradation process is limited to the peripheral zones of the contaminated area when high concentrations of contaminants are present, making the environment extremely hostile to microorganism proliferation, as verified in this study (Rabus; Heider, 1998). Decesaro et al. (2017) simulated ex situ soil contamination with biodiesel and evaluated contaminant biodegradation using natural attenuation and bio-stimulation + bio-augmentation techniques. The highest contaminant biodegradation was observed when bio-stimulation and bio-augmentation techniques were combined (88.76%). Regarding

the biodegradation of oily compounds in experiments using natural attenuation, this was significantly lower, reaching 42.37% after 60 days of testing. According to Nikolopoulou and Kalogerakis (2009), the combination of microorganisms, nutrients, and biocompounds allows autochthonous microorganisms to perform better in contaminant degradation, with greater and faster adaptation, as observed in this study.

Asquith et al. (2012) investigated the use of bio-stimulation, bio-augmentation, and biocompound use in the bioremediation of soil contaminated with total petroleum hydrocarbons. After 195 days, untreated soil (control) showed the lowest removal percentages (10% to 32%). Bio-augmentation achieved removal of 69%, and bio-stimulation achieved removal percentages of 49%. When biocompounds were added, contaminant removal reached up to 80%. These results support the findings of this study, which showed greater contaminant degradation when using bio-stimulation, bio-augmentation, and biocompound addition.

CONCLUSION

The Induced Bioremediation assay, using fermented bran with biocompounds and active fungi, showed significant advantages over natural attenuation in a 90-day experiment. It achieved the highest contaminant degradation rate (74.40% vs. 60.09% for natural attenuation), marking a 14% increase in efficiency. This method proved economically and environmentally superior as it avoided the need for extraction and purification processes for biocompound utilization. The study concludes that this bioremediation technique is effective for biodiesel removal, leveraging enzyme and biosurfactant production, while its use of agro-industrial waste promotes environmental sustainability by reducing associated impacts.

FUNDING

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code: 88881.846894/2023-01

REFERENCES

- ABDOLLAHINEJAD, B.; PASALARI, H.; JAFARI, A. J.; ESRAFILI, A.; FARZADKIA, M. Bioremediation of diesel and gasoline-contaminated soil by co-vermicomposting amended with activated sludge: Diesel and gasoline degradation and kinetics. **Environmental Pollution**, p. 114584, 2020.
- ASQUITH, E.A.; GEARY, P. M.; NOLAN, A. L.; EVANS, C. A. Comparative bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by biostimulation, bioaugmentation and surfactant addition. **Journal of Environmental Science and Engineering**. A, 1(5A), 2012.
- BANIASADI, M.; MOUSAVI, S. M. A Comprehensive Review on the Bioremediation of Oil Spills. **In: Microbial Action on Hydrocarbons** (p. 223-254). Springer, Singapore, 2018.
- BRASIL. Lei 13.263, de 29 de outubro de 2018. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2018.
- CASASSO, Alessandro et al. How Can We Make Pump and Treat Systems More Energetically Sustainable?. **Water**, v. 12, n. 1, p. 67, 2020.
- CECCHIN, I.; REGINATTO, C.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M.; REDDY, K. R. Influence of physicochemical factors on biodiesel retention in clayey residual soil. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, n. 4, p. 04015093-1-04015093-8, 2016.
- CHU, W.; CHAN, K.H. The mechanism of the surfactantaided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. **Science of the Total Environment**, v. 307 n. (1-3), p. 83-92, 2003.
- COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource technology**, v. 101(21), p. 8308-8314, 2010.
- DECESARO, A.; MACHADO, T. S.; CAPPELLARO, A. C.; REINEHR, C. O.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Biosurfactants during

in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 26, p. 20831-20843, 2017.

DECESARO, A.; MACHADO, T. S.; CAPPELLARO, A. C.; REINERH, C. O.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 26, p. 20831-20843, 2017.

DELLAGNEZZE, B. M.; SOUSA, G. V.; MARTINS, L. L.; DOMINGOS, D. F.; LIMACHE, E. E. G.; VASCONCELLOS, S. P.; CRUZ, G. F.; OLIVEIRA, V. M. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum Reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, p. 191-200, 2014.

JÚNIOR D. M. W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26-34, 2016.

KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

KRELING, N. E., SIMON, V., FAGUNDES, V. D., THOMÉ, A., COLLA, L. M. Simultaneous production of lipases and biosurfactants in solid-state fermentation and use in bioremediation. **Journal of Environmental Engineering**, v. 146(9), p. 04020105, 2020.

KRELING, N. E.; Produção de Biossurfactantes extracelulares por *Saccharomyces cerevisiae* e sua aplicação em biorremediação. Dissertação (Mestrado), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.

LIN, T. C.; PAN, P. T.; YOUNG, C. C.; CHANG, J. S.; CHANG, T. C. Evaluation of the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 1487-1496, 2011.

LIU, F.; OTURAN, N.; ZHANG, H.; OTURAN, M. A. Soil washing in combination with electrochemical advanced oxidation for the remediation of synthetic soil heavily contaminated with diesel. **Chemosphere**, v. 249, p. 126176, 2020.

MEYER, D. D.; BEKER, S. A.; BÜCKER, F.; PERALBA, M. D. C. R.; FRAZZON, A. P. G.; OSTI, J. F.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 356-363, 2014.

NIKOLOPOULOU, M.; KALOGERAKIS, N. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process*, **Environmental & Clean Technology**, v. 84, n. 6, p.802-807, 2009.

QUINTELLA, C. M., MATA, A. M., LIMA, L. C. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. **Journal of environmental management**, v. 241, p. 156-166, 2019.

RABUS, R.; HEIDER, J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes indenitrifying and sulfate-reducing bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 170, p. 377-384, 1998.

REN, J.; SONG, X.; DING, D. Sustainable remediation of diesel-contaminated soil by low temperature thermal treatment: Improved energy efficiency and soil reusability. **Chemosphere**, v. 241, p. 124952, 2020.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5(1), 2018.

SPERB, J. G. C.; COSTA, T. M.; BERTOLI, S. L.; TAVARES, L. B. B. Simultaneous production of biosurfactants and lipases from *aspergillus niger* and optimization by response surface methodology and desirability functions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35(3), p. 857-868, 2018.

ANÁLISE DE MICROBIOMA DE SOLO COM CONTAMINAÇÃO PETROQUÍMICA SOB TRATAMENTO DE BIOAUMENTAÇÃO COM *BURKHOLDERIA VIETNAMIENSIS* G4

Sbruzzi, R.C.^{1,2*}; Cauduro, G.P.¹; Caesar, L.³; Marmitt, M.^{1,4}; Valiati, V.H.¹.

¹LGBM - Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil;

²Laboratório de Imunogenética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

³Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA;

⁴LABBIO - Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ICBS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

*autor correspondente: renansbruzzi@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera é um dos principais setores responsáveis pelas contaminações e danos ambientais da atualidade (JONES, 2021). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos de origem petrogênica, de difícil degradação e apresentam potencial carcinogênico (LAWNICZAK et al., 2020). Esses compostos representam uma preocupação significativa devido aos seus efeitos adversos na saúde humana e no ecossistema, destacando a necessidade do desenvolvimento e aplicação de estratégias eficazes de mitigação e controle. Uma das etapas de tratamento dos efluentes industriais com contaminantes é a utilização do lodo ativado como tratamento biológico, que envolve a biodegradação de poluentes orgânicos através da atividade microbiana em um sistema aeróbio. Por se tratar de microrganismos vivos, sua reprodução gera o aumento da massa desse resíduo, resultando no lodo excedente, que é retirado do sistema de tratamento e depositado nas chamadas fazendas de lodo (ORHON, 2015). Qualquer poluente não degradado no processo de tratamento fica adsorvido aos flocos remanescentes do lodo (LIU; WANG; FAN, 2011) e acaba contaminando o local onde é disposto. Neste contexto, técnicas de biorremediação por bioaumentação tem se mostrado uma estratégia eficiente para a redução dos impactos desses compostos no ambiente. A técnica de bioaumentação consiste em selecionar linhagens bacterianas metabolicamente capazes de degradação de compostos alvos e aplicá-las em um ambiente ou substrato impactado com o objetivo de aumentar a taxa de degradação dos poluentes (ROY et al., 2018). A bactéria *Burkholderia vietnamiensis* G4 é um dos organismos sabidamente capazes de degradar compostos orgânicos e de sobreviver em ambientes impactados por poluentes de petróleo, sendo utilizada para biorremediação desses compostos (MORYA; SALVACHÚA; THAKUR, 2020; O'SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005). Este estudo tem como objetivo caracterizar as comunidades bacterianas e avaliar os impactos gerados pelo manejo por meio da a técnica de bioaumentação utilizando *Burkholderia vietnamiensis* G4 na composição da comunidade bacteriana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área experimental e amostragem: O experimento foi realizado em uma fazenda de lodo com aproximadamente 2500 m², localizada em um polo de tratamento de resíduos petroquímicos que recebe o lodo excedente do tratamento de efluentes das indústrias. Para o experimento, foram montadas quatro parcelas amostrais de 9 m² com diferentes técnicas de manejo: Anual (A), tendo uma única aplicação, bimensal (B) e trimestral (T). Foram coletados solos em triplicatas compostas de cada parcela nos tempos zero (0), 15 dias (0.5 m), 6 meses (6 m) e 12 meses (12 m).

Extração de DNA e análise de microbioma: O material genômico foi extraído das amostras de solo com o kit comercial DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. A região hipervariável V4 do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando os primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Os produtos das reações, com suas sequências identificadoras, foram purificados com AMPure XP PCR Purification Kit (Beckman Coulter), e amplificados usando Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific). As bibliotecas foram sequenciadas com Ion Torrent (Ion Torrent PGM, Life Technologies), usando Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). A qualidade das sequências foi avaliada com os pacotes FastQC e MultiQC. O processamento dos dados e inferência de sequências foi realizado no RStudio, com o pacote DADA2 e a classificação taxonômica a nível de gênero das variantes de sequências de amplicons (ASVs) foi realizada com o banco de dados SILVA 16S rRNA (v136). As análises posteriores bem como a visualização de dados foram realizadas utilizando os pacotes Phyloseq e ggplot2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ASVs identificadas se distribuíram em 54 filos, sendo os três filos de maior abundância: *Proteobacteria* (23,9%),

Acidobacteriota (21,1%) e *Actinobacteriota* (8,1%) (Figura 1a). Foram encontradas 221 famílias, sendo Chitinophagaceae (7,1%) o mais abundante, seguido de Gemmatimonadaceae (5,4%), Pyrinomonadaceae (5,3%) e Xanthobacteraceae (5,2%) (Figura 1b). Foram encontrados 397 gêneros diferentes ao longo do experimento. O gênero *Acidobacteria* RB41 (9,1%) foi o mais abundante, seguido de *Chthoniobacteraceae Candidatus Udaeobacter* (6,3%), *Sphingomonas* (5,4%) e *Pseudolabrys* (3%). Abaixo desta abundância encontram-se, também, os gêneros *Nitrospira* (2,9%), *Bradyrhizobium* (2,6%), *Haliangium* (2,5%), *Gemmatimonas* (2,4%) e *Nocardioides* (2,1%) (Figura 1c). Os microrganismos em nível de filo, família e gênero, encontrados no nosso estudo foram também presentes em análises de comunidades bacterianas de solo em diferentes estudos. Os filos *Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Actinobacteria*, por exemplo, são altamente abundantes em diferentes tipos de solos e estão envolvidos na ciclagem de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e vários outros elementos (HUBER et al., 2022; MHETE et al., 2020; ZHANG et al., 2019). Além disso, diferentes estudos indicaram que organismos desses filos estão envolvidos na degradação de diferentes HPAs (SINGLETON et al., 2018; SONG et al., 2016; SU et al., 2016; WANG et al., 2018; WOLF; CRYDER; GAN, 2019). Não foi observada diferença significativa entre os organismos identificados nos diferentes tempos experimentais, indicando que os tratamentos não impactaram a estrutura da comunidade microbiana de forma significativa a nível de filo e família. A nível de gênero, *Sphingomonas* foi mais abundante nos últimos períodos de tratamento em B e T quando comparados com A.

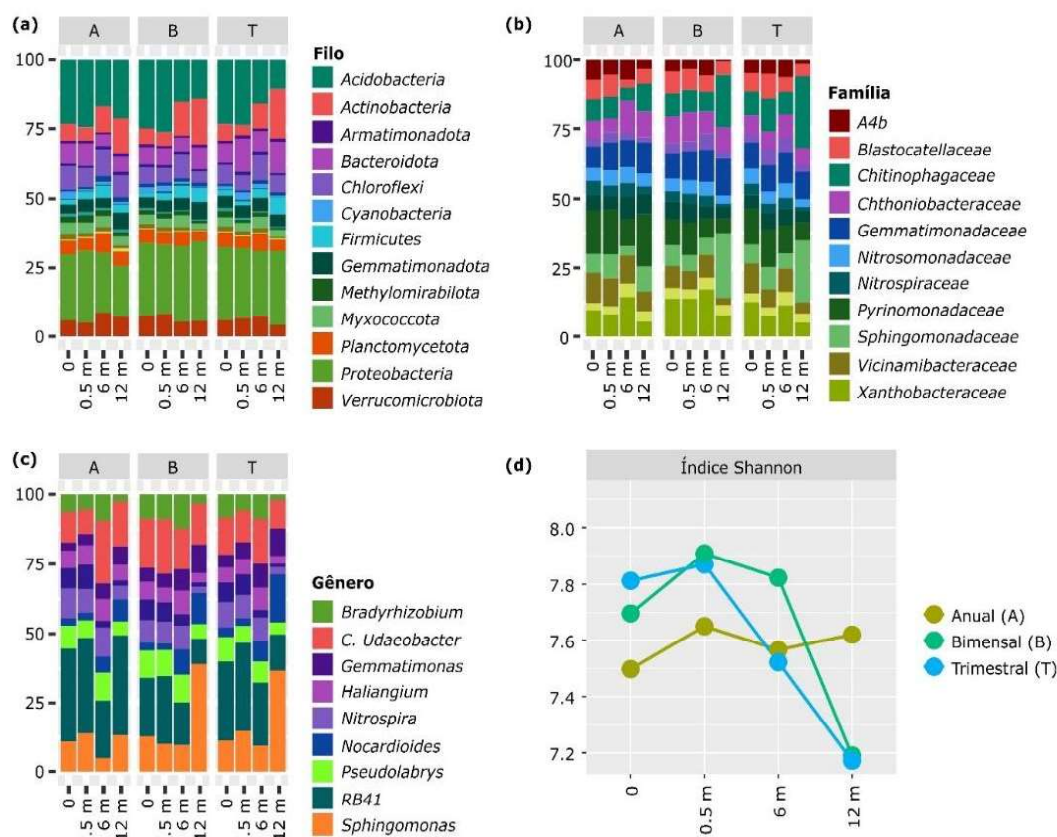


Figura 1. Resultados das análises de microbioma. Abundância relativa a nível de filo (a), família (b), gênero (c), e índice de diversidade Shannon (d) para as diferentes estratégias de manejo ao longo dos tempos de tratamento.

A diversidade alfa, avaliada pelo índice de Shannon (Figura 1d), nas áreas amostrais que sofreram manejo não foram significativamente distintas ao longo do tempo experimental e, mesmo com a inserção de um agente bacteriano exógeno, não se observou impacto diferencial significativo na diversidade geral. Todas as parcelas avaliadas apresentaram uma redução na diversidade, ao longo do período do experimento, devido a predominância de um filo, gênero ou família, excetuando-se a parcela A, com a aplicação do agente biorremediador feita de forma anual, que apresentou valores mais semelhantes ao longo do tempo e próximos do valor no tempo zero. A estabilidade na diversidade ou o retorno do índice a valores iniciais é o cenário ideal durante um tratamento de remediação, indicando a ausência de impacto na comunidade em adição à redução dos poluentes.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que, embora os tratamentos sejam uma forma de interferência nas comunidades microbianas nativas, as estratégias utilizadas com a inserção de uma espécie exógena acabaram não interferindo significativamente nas áreas manejadas. As alterações encontradas em todas as parcelas podem ser resultantes das influências sazonais e não pela inserção da *B. vietnamiensis* G4 ao local, evidenciando o sucesso das técnicas aplicadas na área em questão, contaminada com HPAs resultantes de um complexo industrial petrolífero.

CONCLUSÃO

Este estudo caracterizou o microbioma do solo de uma fazenda de lodo ativado extensamente contaminada por HPAs em relação aos organismos nativos e demonstrou a ausência de impactos significativos nas comunidades bacterianas com a aplicação das diferentes estratégias de biorremediação ao longo do período avaliado. Sendo assim, o estudo fornece um conjunto de evidências que apontam a eficiência e aplicabilidade da técnica avaliada utilizando o organismo modelo, *B. vietnamiensis* G4, para aplicação na biorremediação de HPAs nesse tipo de local e impacto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HUBER, K. J. et al. Editorial: Acidobacteria – Towards Unraveling the Secrets of a Widespread, Though Enigmatic, Phylum. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 960602, 24 jun. 2022.
- JONES, K. C. Persistent Organic Pollutants (POPs) and Related Chemicals in the Global Environment: Some Personal Reflections. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 14, p. 9400–9412, 20 jul. 2021.
- LAWNICZAK, L. et al. Microbial Degradation of Hydrocarbons—Basic Principles for Bioremediation: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 856, 14 fev. 2020.
- LIU, J. J.; WANG, X. C.; FAN, B. Characteristics of PAHs adsorption on inorganic particles and activated sludge in domestic wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 9, p. 5305–5311, maio 2011.
- MHETE, M. et al. Soil properties influence bacterial abundance and diversity under different land-use regimes in semi-arid environments. **Scientific African**, v. 7, p. e00246, mar. 2020.
- MORYA, R.; SALVACHÚA, D.; THAKUR, I. S. Burkholderia: An Untapped but Promising Bacterial Genus for the Conversion of Aromatic Compounds. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 963–975, set. 2020.
- ORHON, D. Evolution of the activated sludge process: the first 50 years. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 608–640, abr. 2015.
- O’SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus Burkholderia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 8–11, jul. 2005.
- ROY, A. et al. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 22–32, abr. 2018.
- SINGLETON, D. R. et al. Polyphasic characterization of four soil-derived phenanthrene-degrading Acidovorax strains and proposal of Acidovorax carolinensis sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 460–472, set. 2018.
- SONG, M. et al. Bacteria capable of degrading anthracene, phenanthrene, and fluoranthene as revealed by DNA based stable-isotope probing in a forest soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 50–57, maio 2016.
- SU, J. et al. Responses of endophytic and rhizospheric bacterial communities of salt marsh plant (*Spartina alterniflora*) to polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. **Journal of Soils and Sediments**, v. 16, n. 2, p. 707–715, fev. 2016.
- WANG, B. et al. Effect of mixed soil microbiomes on pyrene removal and the response of the soil microorganisms. **Science of The Total Environment**, v. 640–641, p. 9–17, nov. 2018.
- WOLF, D. C.; CRYDER, Z.; GAN, J. Soil bacterial community dynamics following surfactant addition and bioaugmentation in pyrene-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 231, p. 93–102, set. 2019.
- ZHANG, B. et al. Variation in Actinobacterial Community Composition and Potential Function in Different Soil Ecosystems Belonging to the Arid Heihe River Basin of Northwest China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2209, 24 set. 2019.

LABS10

Latin American Biodeterioration
and Biodegradation Symposium

ONLINE Conference - 19-22 november, 2023

ORGANIZATION



International Biodeterioration & Biodegradation Society



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



SPONSORS



ISBN 978-65-5973-453-5