

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

DARNE GERMANO DE ALMEIDA

**BIODEGRADAÇÃO DE “*BUNKER*” POR MICRO-ORGANISMOS
CONSORCIADOS DA REGIÃO PORTUÁRIA DE SUAPE – PE**

RECIFE
2013

DARNE GERMANO DE ALMEIDA

**DEGRADAÇÃO DE “*BUNKER*” MF-380 POR MICRO-ORGANISMOS
CONSORCIADOS DA REGIÃO PORTUÁRIA DE SUAPE – PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vieira de Queiroz Souza.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão.

**RECIFE
2013**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

A447D Almeida, Darne Germano de

Biodegradação de Bunker MF-380 por micro-organismos consorciados da região portuária de Suape -PE / Darne Germano de Almeida. – Recife: O Autor, 2013.

89 f. : il., fig. tab.

OrientadorA: Maria de Fátima Vieira de Queiroz Souza

CoorientadorA: Norma Buarque de Gusmão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Biodegradação 2. Biorremediação 3. Petróleo I. Souza, Maria de Fátima Vieira de Queiroz (orientadora) II. Gusmão, Norma Buarque de (coorientadora) III. Título.

620.112.23

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-211

DARNE GERMANO DE ALMEIDA

**BIODEGRADAÇÃO DE *BUNKER* POR MICRO-ORGANISMOS CONSORCIADOS
DA REGIÃO PORTUÁRIA DE SUAPE – PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa
UFPE

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
UFPB

Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo
UNICAP

Recife, 28 de Fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Quero registrar aqui os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente me deram aquela grande força e apoio na realização deste trabalho:

Agradeço à Prof^a Dr^a Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa, à qual expresso a minha mais profunda gratidão por tudo que me proporcionou, que desde o início aceitou meu pedido e me orientou de forma excepcional, com muito profissionalismo, disciplina, paciência, sendo uma das pessoas mais humanas, acolhedora e solidária que já conheci;

À Prof^a Dr^a Norma Gusmão, que também não encontro palavras para expressar minha gratidão, a qual desde o início cedeu as linhagens e contribuiu enormemente para a ideia central deste trabalho, tendo sido decisiva na minha orientação, com colocações objetivas e sempre oportunas;

À minha eterna companheira Maria da Glória, pelo amor, carinho, amizade, cumplicidade, à qual tenho grande respeito e admiração pela grande capacidade escondida por trás dessa pessoa que é simplesmente incrível;

À MSc^a. Débora de Souza Pereira Silva, pelas lições iniciais relativas ao trabalho com biodegradação de petroderivados, a qual foi importante para minha adaptação inicial ao laboratório de processos fermentativos;

Aos alunos de iniciação científica Davi Cavalcanti, João Cavalcante, Tayane Mendes e Patrícia Nazaré pela extrema dedicação e entusiasmo devotados às atividades ligadas a este trabalho;

À Prof^a Dr^a Jaciana Santos Aguiar e ao mestrando Temístocles Ítalo de Santana pela aquela grande força com os testes de toxicidade;

À Prof^a Dr^a Gláucia e ao aluno Emerson pela ajuda com a identificação molecular das bactérias;

À Prof^a Dr^a Neiva e ao aluno Renan pela ajuda com a identificação molecular dos fungos;

A todos os meus professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial da UFPE Alexandre José da Silva Góes, Ana Maria Souto-Maior, Ester Ribeiro Gouveia, Glícia Maria Torres Calazans, Janete Magali de Araújo, Márcia Vanusa da Silva, Sebastião José de Melo, Teresinha Gonçalves da Silva, Ricardo Oliveira da Silva e Wagner Eduardo da Silva, que além de me

proporcionarem conhecimento, serviram como bom exemplo de profissionais sérios preocupados com as questões científicas e tecnológicas e com os problemas sociais;

Aos meus colegas de curso Clarissa Brito Carvalho de Sá, Maria Carolina de Albuquerque Wanderley, Danilo Ramos Cavalcanti, Edkarlla Sousa Dantas de Oliveira, Glêzia Renata da Silva, Guilherme Carvalho Ribeiro Rodrigues, Gustavo Bartolomeu Pedrosa Gomes da Silva (Gustavo Pardal), Mariana de Lucena Soares, Rebeka Cristiane Silva dos Santos, Sandrine Maria de Arruda Lima, Bruno Souza dos Santos, Ednaldo do Amaro dos Santos Filho, Márcia Josefa da Silva (Marcinha) e Milca Rachel da Costa Ribeiro Lins pelo companheirismo, amizade, apoio, brincadeiras, alegrias e desesperos compartilhados, pelos bons momentos;

A todos os funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial Betania Alves, Suely Cavalcanti, Klayton Cabral, Clara Domingos e Emerson (vigia), por sempre “quebrar” nosso galho quando a gente mais precisa, além de dar aquela força amiga, nos apoiando e torcendo pelo nosso sucesso;

A todos os meus colegas do Departamento de Antibióticos, em especial Diego e Eliz (laboratório da Prof^a Magali), Bruna, Jéssica, Cyntia Coimbra, Thiago, Solange, Fernanda Vaz e Aldiane (laboratório de Ana Souto-Maior), Prof^a Eulália, pela aquela grande força em diversas situações, às vezes até mesmo inusitadas;

Aos meus velhos amigos Rogério Lemos, Iolanda Ramalho, Gilka Batista, Livia, pela amizade e incentivo;

Aos meus amigos do Inglês Arlindo, Rafinha, Ítalo, Natália e Arine pela eterna amizade e companheirismo, e por me darem a honra de mantê-los pra sempre na minha memória e no meu coração;

Aos meus pais, Dário Almeida e Audilene Lima, e ao meu irmão Demis Almeida, sem os quais não seria quem sou, pelo amor, apoio, dedicação, preocupação, incentivo, os quais são a base da minha vida, e à minha sobrinha Beatriz, à qual dedico este trabalho;

Deus abençoe a todos, um forte abraço!!!

***"Infelicidade é se lamentar por
tudo aquilo que não se tem;
Felicidade é agradecer por tudo
aquilo que se tem".***

Darne Almeida.

RESUMO

O presente estudo objetivou selecionar um consórcio microbiano misto quanto à biodegradação de *bunker*, bem como estudar as condições mais favoráveis para esse processo. Inicialmente, linhagens isoladas da água do mar da região portuária de Suape – PE foram submetidas a um teste para avaliar a ocorrência de interações microbianas e, em seguida, consórcios microbianos foram montados e o mais promissor foi selecionado por meio de indicadores redox. As linhagens do consórcio selecionado foram aclimatadas a teores crescentes de *bunker* (1%, 2% e 3%, v/v) e de NaCl (1%, 2% e 3%, p/v). Um ensaio prévio, em frascos agitados, foi realizado para caracterizar o crescimento do consórcio selecionado. Posteriormente, aplicou-se um planejamento experimental 2³ para investigar a influência das variáveis (temperatura, pH, relação C:N) no processo de biodegradação e finalmente um experimento em biorreator empregando as melhores condições encontradas no planejamento experimental. A avaliação das interações microbianas permitiu compor oito diferentes consórcios (C1 a C8). Os testes com os indicadores redox apontaram o consórcio C5 como o mais promissor, sendo constituído por 3 bactérias, 1 levedura e 2 fungos filamentosos. No ensaio prévio de biodegradação, o consórcio C5 alcançou degradação dos constituintes alifáticos e aromáticos superior a 70% e a 30%, respectivamente, o que demonstrou a importância da execução precedente de um processo de aclimação. As variáveis estudadas: relação C:N, temperatura e pH foram estatisticamente significativas nesta sequência, obtendo-se uma biodegradação de hidrocarbonetos totais de 93,5%. O ensaio em biorreator foi conduzido nas melhores condições encontradas no planejamento experimental (temperatura = 25°C, pH = 6, relação C:N = 150:1), e se alcançou níveis de degradação otimizados para os constituintes do *bunker*. Tanto no ensaio prévio de biodegradação como no experimento em biorreator, o consórcio C5 apresentou um crescimento apreciável em duas fases, sugerindo um comportamento diáuxico. Portanto, o consórcio C5 é capaz de degradar o óleo combustível marítimo em questão, podendo ser utilizado como agente biorremediador em técnicas de biorremediação *ex-situ* de ambientes poluídos por *bunker*.

Palavras-chave: Biodegradação. Biorreator. Biorremediação. *Bunker*. Crescimento diáuxico. Consórcio Microbiano Misto. HPAs. Região Portuária de Suape – PE.

ABSTRACT

The present study aimed to select a mixed microbial consortium regarding the biodegradation of bunker and study the most favorable conditions for this process. Initially, strains isolated from sea water of the port of Suape – PE were subjected to a test to assess the occurrence of microbial interactions and then microbial consortia were mounted and the most promising was selected by redox indicators. The selected strains of the consortium were acclimated to increasing levels of bunker (1%, 2% and 3%, v/v) and NaCl (1%, 2% and 3%, w/v). A preliminary test in shake flasks was performed to characterize the growth of the consortium selected. Subsequently, It was applied an experimental design 2^3 to investigate the influence of variables (temperature, pH, C: N ratio) in the biodegradation process and finally an experiment in bioreactor employing the best conditions found in the experimental design. The assessment of microbial interactions allowed compose eight different consortia (C1 to C8). Tests with redox indicators pointed to a consortium C5 as the most promising, consisting of three bacteria, one yeast and two filamentous fungi. In the preliminary test, the consortium C5 reached degradation of aliphatic and aromatic constituents over 70% and 30%, respectively, which demonstrated the importance of the implementation of a previous acclimatization process. Variables studied: C:N ratio, pH and temperature were statistically significant in this sequence, obtaining a total hydrocarbon biodegradation of 93.5%. The test bioreactor was conducted under the best conditions found in the experimental design (temperature = 25 °C, pH = 6, C: N ratio = 150:1), and reached levels of degradation optimized for the constituents of the bunker. In both preliminary test of biodegradation and the bioreactor experiment, the consortium C5 showed appreciable growth in two phases, suggesting diauxic behavior. Therefore, the consortium C5 is capable of degrading marine fuel oil in question, can be used as an agent biorremediador in ex-situ bioremediation techniques of environments polluted by bunker.

Key-words: Biodegradation. Bunker. Microbial consortium. Bioremediation. Port of Suape – PE. Diauxic growth. PAHs. Bioreactor.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2. Específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1. Biodegradação de Petróleo e Derivados.....	17
3.2. Estratégias de biorremediação.....	19
3.3. Acidentes envolvendo derrames de combustível marítimo.....	22
3.4. Combustíveis Marítimos.....	23
3.5. Toxicidade dos compostos do petróleo.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. Amostra de <i>bunker</i>	26
4.2. Micro-organismos.....	26
4.3. Composição do Inóculo.....	27
4.4. Meios de cultura e manutenção das linhagens.....	29
4.5. Avaliação de interações antagônicas entre as linhagens e composição de consórcios microbianos.....	30
4.6. Seleção do consórcio mais promissor.....	31
4.7. Aclimação do consórcio selecionado.....	31
4.8. Ensaio prévio de biodegradação.....	32
4.9. Planejamento experimental.....	32
4.10. Experimento em Biorreator.....	36
4.11. Avaliação da biomassa nos ensaios.....	38
4.12. pH.....	38
4.13. Índice de emulsificação.....	38
4.14. Técnicas analíticas utilizadas no preparo das amostras para cromatografia.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Caracterização química da amostra de <i>bunker</i>	42

5.2. Avaliação de interações antagônicas entre as linhagens e composição de consórcios microbianos.....	43
5.3. Seleção do consórcio mais promissor.....	46
5.4. Composição do Inóculo.....	49
5.5. Aclimação das linhagens do consórcio C5.....	49
5.6. Ensaio prévio de biodegradação.....	51
5.7. Planejamento Experimental.....	55
5.9. Experimento em Biorreator.....	63
5.8. Índice de emulsificação.....	69
6. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO A – Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ do ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Procedimentos para estimar a biomassa.....	28
Figura 2 – Teste de antagonismo: linhagens dispostas em posições equidistantes.....	31
Figura 3 – Biorreator de bancada, modelo BioFlo 110, da New Brunswick Company FS-5.....	36
Figura 4 – Aspecto da coluna de vidro empacotada com sílica gel após separação das frações de saturados e aromáticos.....	40
Figura 5 – Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa.....	41
Figura 6 – Resultados do teste de antagonismo.	43
Figura 7 – Halo de inibição ao redor do bloco de ágar, evidenciando reação antagônica do fungo P12F4B contra a bactéria P11B4.....	44
Figura 8 – Aspecto do halo de inibição formado ao redor dos blocos de ágar das linhagens que apresentaram reação antagônica contra o fungo P132.....	44
Figura 9 – Resultado da redução dos indicadores para o consórcio C5 selecionado.....	47
Figura 10 – Perfis de biomassa e pH das linhagens do consórcio C5, após 21 dias de aclimação.....	50
Figura 11 – Perfil de crescimento do consórcio C5 submetido ao ensaio prévio de degradação.....	52
Figura 12 – Perfil de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio C5 após 35 dias a 3% de <i>bunker</i> e 3% de NaCl.....	53
Figura 13 – Percentuais de degradação obtidos nos ensaios do planejamento experimental 2 ³	55
Figura 14 – Diagrama de Pareto, mostrando os efeitos das variáveis estudadas e de suas interações ao nível de significância de 95% (p=0,05).....	57
Figura 15 – Curvas de contorno para o efeito do pH e da temperatura sobre a degradação do <i>bunker</i>	58
Figura 16 – Curvas de contorno para o efeito da relação C:N e da temperatura sobre a degradação do <i>bunker</i>	58
Figura 17 – Curvas de contorno para o efeito da relação C:N e do pH sobre a degradação do <i>bunker</i>	59
Figura 18 – Valores preditos pelo modelo proposto x valores observados.....	62
Figura 19 – Perfil de crescimento do consórcio C5 no ensaio em biorreator contendo 3% (v/v) de <i>bunker</i> e 3% (p/v) de NaCl.....	63

Figura 20 – Aspecto do <i>bunker</i> submetido ao biotratamento em biorreator no 6º, 12º e 24º dia de experimento. Notar a mudança de coloração do <i>bunker</i> ao longo do ensaio.....	65
Figura 21 – Perfil de degradação de constituintes alifáticos e de aromáticos do ensaio em Biorreator.....	66
Figura 22 – Comparação da degradação dos constituintes do <i>bunker</i> no ensaio prévio e em Biorreator.....	68
Figura 23 – Resultado do teste de emulsificação. Nenhuma formação de emulsão aparente.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais combustíveis de navegação comercializados pela empresa PETROBRAS Distribuidora.....	23
Tabela 2 – Aspectos físico-químicos do <i>bunker MF-380</i>	26
Tabela 3 – Linhagens de bactérias e fungos isoladas da Região Portuária de Suape – PE utilizadas neste trabalho.....	27
Tabela 4 – Meio mineral de Bushnell-Haas (BH).....	29
Tabela 5 – Meio Tryptic-Soy-Agar (TSA).....	29
Tabela 6 – Meio Sabouraud (SAB).....	29
Tabela 7 – Matrix com as condições experimentais das variáveis independentes codificadas.....	33
Tabela 8 – Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental 2 ³	33
Tabela 9 – Meios de Bushnell-Haas (BH) modificados, com variações nas concentrações da fonte de nitrogênio.....	35
Tabela 10. Principais características do biorreator BioFlo 110, New Brunswick.....	37
Tabela 11. Parâmetros e condições empregadas no experimento de degradação em biorreator.....	37
Tabela 12 – Condições operacionais empregadas nas análises cromatográficas do <i>bunker</i>	42
Tabela 13 – Resultados da análise química elementar da amostra de <i>bunker MF – 380</i>	42
Tabela 14 – Consórcios microbianos mistos montados conforme os resultados do teste de antagonismos e seguindo os critérios já estabelecidos.....	46
Tabela 15 – Resultado da seleção do consórcio mais promissor.....	48
Tabela 16 – Biomassa estimada para cada bloco de ágar circular das linhagens que compõem o consórcio C5.....	49
Tabela 17 – Valores de degradação total de hidrocarbonetos pelo consórcio C5 para os níveis das variáveis do planejamento experimental 2 ³	56
Tabela 18 – Teste ANOVA para os parâmetros estimados.....	61
Tabela 19 – Coeficientes de regressão para o modelo proposto.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA – American Public Health Association

BH – Meio mineral de Bushnell-Haas

C:N - Relação nutricional carbono-nitrogênio

CG-EM – Cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massa

DCPIP – Indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol

DQF – Departamento de Química fundamental

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

LFNA – Líquido de fase não aquosa

NMP – Número mais provável

NSO – Compostos nitrogenados, sulfurados e oxigenados

REDUC – Refinária Duque de Caxias

rpm – Rotações por minuto

SAB – Meio Sabouraud

TERMOPE – Empresa Termopernambuco

TRANSPETRO – Petrobras Transporte S.A.

TSA – Meio Tryptic-Soy-Agar

TTC – 2,3,5 – cloreto de trifeniltetrazólio

UFC – Unidade formadora de colônia

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

USEPA – United States Environmental Protection Agency

1. INTRODUÇÃO

Para atender a demanda energética da população atual, vários recursos naturais têm sido explorados, porém a principal fonte de energia no mundo ainda continua sendo os hidrocarbonetos de petróleo. Isto faz, portanto, com que estes compostos sejam os poluentes globais mais frequentes (SATHISHKUMAR et al., 2008).

O derrame de óleo por acidentes navais, especialmente a partir de navios cargueiros de grandes dimensões, tem se tornado uma das formas, cada vez mais frequentes, de poluição marinha. Estes navios comumente armazenam grandes quantidades de óleo combustível marítimo, que uma vez derramado, traz efeitos, comprovadamente, catastróficos aos ambientes aquáticos (ARA, NOJIMA e HIROMI, 2002; HUA, 2006).

Estratégias para controlar a contaminação ambiental por petróleo e ou derivados têm sido objeto de vários estudos nas últimas três décadas. Quando um derrame ocorre, a primeira ação é remover a fase oleosa por processos mecânicos ou por meios físico-químicos por meio da aplicação de agentes tensoativos para dispersar a camada de óleo (MIRANDA et al., 2007).

Devido a seus custos e benefícios, a biorremediação constitui uma alternativa muito atraente que tem sido utilizada para eliminar ou minimizar os efeitos dos poluentes, empregando micro-organismos com potencialidade para biodegradação e sendo capazes de transformar os contaminantes em substâncias menos tóxicas ou mineralizando-os (CERQUEIRA et al., 2012; SATHISHKUMAR et al., 2008).

Micro-organismos com capacidade para degradar hidrocarbonetos geralmente existem com baixa abundância em ambientes marinhos. No entanto, uma eventual poluição destes ambientes por hidrocarbonetos do petróleo pode estimular o crescimento desta microbiota e causar mudanças na estrutura das comunidades microbianas das áreas contaminadas (HARAYMA et al., 2004).

A biodegradação de hidrocarbonetos complexos geralmente requer a cooperação de mais de uma única espécie. Isto é verdade para poluentes que possuem diferentes compostos na sua composição, tais como petróleo e derivados. Micro-organismos isolados podem metabolizar apenas uma parcela limitada de hidrocarbonetos, enquanto que populações mistas com ampla capacidade enzimática são necessárias para aumentar a taxa e a extensão da biodegradação

(GHAZALI et al., 2004). Além disso, o uso de um consórcio composto por micro-organismos autóctones garante que este tenha alta tolerância à toxicidade dos hidrocarbonetos e seja resistente às variações do ambiente (HADIBARATA e TACHIBANA, 2009).

Com o aumento das atividades de prospecção de petróleo no território brasileiro, é esperado um aumento na probabilidade de ocorrência de acidentes envolvendo este produto e seus derivados. A instalação da refinaria Abreu e Lima no terminal portuário de Suape, no estado de Pernambuco, provavelmente poderá contribuir para a incidência desse problema, o que torna importante um conhecimento mais aprofundado das possíveis consequências ambientais de um derrame junto à linha de costa marítima, sendo de extrema importância ecológica o estudo da biodegradação de combustíveis por micro-organismos oriundos desse local, visto que as praias próximas estão sujeitas à contaminação por poluentes provenientes do referido complexo portuário (FARIAS, 2006; MIRANDA et al, 2007; SOUZA, 2009).

Diante do exposto, esta pesquisa teve por objetivo avaliar a capacidade de degradação de óleo combustível marítimo *bunker* por micro-organismos, em consórcio, isolados da região portuária de Suape – PE.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Promover a degradação do combustível marítimo *bunker MF – 380* utilizando um consórcio misto de micro-organismos isolados da Região Portuária de Suape – PE.

2.2. Específicos

- Realizar a caracterização química elementar do combustível marítimo (*bunker MF – 380*);
- Selecionar micro-organismos quanto à interação microbiana;
- Compor consórcios mistos e selecionar o mais promissor por meio de indicadores redox;
- Aclimatar as linhagens do consórcio selecionado a teores crescentes do combustível marítimo e também da salinidade;
- Realizar planejamento experimental em frascos agitados com o consórcio selecionado visando a otimização das condições para a degradação do *bunker*;
- Realizar ensaio em biorreator empregando as melhores condições selecionadas em frascos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodegradação de Petróleo e Derivados

A degradação microbiológica é o mais dominante mecanismo de eliminação de produtos orgânicos no ambiente. A persistência de xenobióticos representa um risco real para os ecossistemas bem como para os seres humanos. Portanto, o conhecimento da biodegradabilidade de xenobióticos é um dos aspectos mais importantes na compreensão do seu comportamento no ambiente natural e durante o tratamento biológico de águas residuais (PAIXÃO et al., 2006).

Os derivados de petróleo são uma mistura complexa de hidrocarbonetos, e sua biodegradabilidade depende da biodisponibilidade destes, bem como da sua composição, comprimento da cadeia, ramificações, e dos efeitos estéricos e eletrônicos. Geralmente, os n-alcanos são mais suscetíveis à degradação do que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, que, por sua vez, são menos degradáveis do que aromáticos monocíclicos (GOMES et al., 2009). A taxa de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) é principalmente influenciada por fatores ambientais limitantes (salinidade, nutrientes, pH, temperatura, oxigênio) e pode não ser somente devido à capacidade enzimática de micro-organismos nativos degradadores de hidrocarbonetos (ATLAS, 1981).

A biodegradação de hidrocarbonetos complexos, particularmente aqueles constituídos por uma mistura de diferentes compostos, geralmente requer a cooperação de mais do que uma única espécie. Micro-organismos individuais podem metabolizar apenas uma faixa limitada de hidrocarbonetos, enquanto que, culturas mistas com amplo espectro enzimático são necessárias para aumentar a velocidade de biodegradação do petróleo (CHEN et al., 2009).

Diversas populações microbianas têm sido detectadas em solos ou águas contaminados com petróleo. Esse fenômeno sugere fortemente que cada espécie ou gênero tem o seu papel nos processos de transformação de hidrocarbonetos. Nos últimos anos, tem-se demonstrado que muitas espécies de bactérias têm a capacidade de utilizar hidrocarbonetos de petróleo como única fonte de carbono e energia (CHEN et al., 2009).

Os fungos estão entre os micro-organismos mais ubíquos do planeta podendo ser considerados como decompositores primários de compostos orgânicos

encontrados em solos, sedimentos ou nos corpos d'água. No entanto, as atividades antropogênicas têm alterado o papel dos fungos na ciclagem de nutrientes e no acúmulo de matéria orgânica, sendo muitas espécies, hoje, também consideradas como degradadoras de hidrocarbonetos, as quais vêm sendo utilizadas em tecnologias de biorremediação de *habitats* de água doce e marinhas impactados por óleo (SADABA e SARINAS, 2010).

Uma fantástica diversidade e adaptabilidade são apresentadas por fungos na utilização de diferentes fontes de carbono, porém, suas habilidades podem diferir para degradarem hidrocarbonetos específicos, servindo como fonte de energia e biomassa. A composição química de um óleo pode também ser um fator que determina qual tipo o de fungo que pode crescer na fonte oleosa (HADIBARATA e TACHIBANA, 2009).

As taxas de absorção e de mineralização de muitos compostos orgânicos por uma população microbiana dependem da concentração do composto (SATHISHKUMAR et al., 2008). A atividade microbiana é diretamente influenciada por diversos parâmetros bióticos e abióticos, entre estes, atenção especial deve ser dada à temperatura, pH, fontes de nitrogênio e fósforo, bem como microelementos (GOMES et al., 2009). Em condições de temperatura e pH extremos, é provável uma influência negativa sobre a capacidade das populações microbianas para degradarem hidrocarbonetos (SATHISHKUMAR et al., 2008).

Quando há uma eventual poluição de ambientes marinhos por compostos do petróleo, micro-organismos hidrocarbonoclásticos, os quais geralmente existem em baixas densidades nestes ambientes, são estimulados a crescer nestas condições, causando mudanças na estrutura das comunidades microbianas das áreas afetadas (HARAYMA et al., 2004).

Como a água do mar, geralmente, é pobre em nutrientes minerais biogênicos e fontes carbono e de energia, comunidades microbianas marinhas são bem adaptadas às baixas concentrações desses substratos. Portanto, a maioria dos micro-organismos que vivem em tais ambientes oligotróficos experimenta estresse severo quando exposta a um aumento súbito nos níveis de nutrientes, como nos casos vazamentos de petróleo. No entanto, algumas espécies são capazes de se adaptar rapidamente e, conseqüentemente, como resultado, se multiplicam e superam os seus concorrentes (GERTLER et al., 2010).

A habilidade de micro-organismos halófilos ou halotolerantes em oxidar hidrocarbonetos na presença de altas concentrações de cloreto de sódio é uma vantagem para o tratamento biológico de ecossistemas salinos contaminados por petroderivados. O crescimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e a degradação em condições salinas pode ser fortemente melhorada pela adição de nutrientes, tais como o extrato de levedura (ARULAZHAGAN, VASUDEVAN e YEOM, 2010). Altas salinidades ou amplos gradientes de salinidade podem limitar a degradação microbiana de compostos orgânicos, tornando os procedimentos convencionais de biorremediação ineficientes. Nestes casos, micro-organismos tolerantes à salinidade devem ser utilizados e os fatores físico-químicos devem ser otimizados a fim de garantir uma biorremediação bem sucedida (DIAZ et al., 2000).

3.2. Estratégias de biorremediação

A contaminação por petróleo e seus derivados tem causado sérios danos à saúde e ao meio ambiente e cada vez mais atenção tem sido dada para o desenvolvimento e implementação de tecnologias inovadoras para a remoção destes contaminantes (SATHISHKUMAR et al., 2008).

Vários métodos padrão de laboratório foram desenvolvidos para avaliar a biodegradabilidade de produtos químicos, e estes são utilizados para prever a influência de biodegradação sobre o destino e transporte destes produtos químicos no ambiente. Estes métodos tentam razoavelmente simular as condições encontradas em um determinado ambiente ou ecossistema. Desta forma, os dados obtidos podem ser extrapolados para prever o que poderia ocorrer no ambiente real (PAIXÃO et al., 2006).

Os métodos de biorremediação recebem aceitação popular como tecnologias ambientalmente promissoras para o tratamento de ambientes impactados por hidrocarbonetos. Além disso, os métodos biológicos têm uma grande vantagem, em termos de custos, sobre os tratamentos físico-químicos quando aplicados *in situ* para a remoção do óleo através dos micro-organismos (SATHISHKUMAR et al., 2008).

A biorremediação pode ser descrita como a conversão de compostos químicos por organismos vivos, especialmente micro-organismos, em energia, massa celular e resíduos biológicos (SATHISHKUMAR et al., 2008). A

biorremediação se baseia na utilização de micro-organismos que possuem a habilidade de degradar poluentes, mineralizando-os ou transformando-os em compostos menos tóxicos em ambientes tanto terrestres quanto aquáticos (TROQUEST, 2003).

Um benefício da técnica de biorremediação é que uma ampla faixa de compostos do petróleo é submetida a esse processo, incluindo hidrocarbonetos alifáticos de cadeia ramificada e não ramificado e compostos aromáticos. Para avaliar a biorremediação como um processo ativo, faz-se necessário uma quantificação do número de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos presentes numa amostra. Apesar de se caminhar em direção a uma abordagem molecular, existe ainda uma grande confiança nas técnicas de quantificação tradicionais, incluindo o número mais provável (NMP) e número de unidades formadoras de colônias (UFC) (COULON et al., 2010).

Para otimizar o processo de biorremediação, além do micro-organismo com capacidade de degradar a fonte de carbono contaminante, outros parâmetros devem ser levados em consideração tais como água, oxigênio e recursos nutricionais de nitrogênio e de fósforo. A falta de qualquer um dos parâmetros mencionados faz com que o processo de recuperação, em condições naturais, seja ineficiente (TYAGI et al., 2011). No entanto, o componente-chave na biorremediação são os micro-organismos, que produzem as enzimas envolvidas nas reações de degradação que conduzem à eliminação ou desintoxicação do poluente químico (CERQUEIRA et al., 2012).

Estratégias que envolvem a adição de culturas semeadas (bioaumentação) ou a adição de nutrientes (bioestimulação) visam promover uma melhora nas taxas de degradação (TYAGI et al., 2011). A bioaumentação tem sido proposta como uma alternativa para o aumento da eficiência do processo de degradação em ambientes contaminados. Esta técnica consiste na adição de micro-organismos e/ou enzimas ao ambiente contaminado, a fim de aumentar a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos. Um passo crucial para o sucesso desse processo é o isolamento e seleção de um organismo ou um consórcio de micro-organismos capaz de promover a degradação eficiente da molécula em estudo (CERQUEIRA et al., 2012; HADIBARATA e TACHIBANA, 2009).

A bioaumentação pode fazer uso de micro-organismos autóctones e/ou alóctones. Há um interesse particular na busca de micro-organismos com potencial

de degradação os quais sejam próprios dos locais contaminados devido às suas vantagens quando comparados com micro-organismo alóctones. Micro-organismos autóctones apresentam maior adaptabilidade para o meio, são mais resistentes às variações das condições ambientais locais, menos susceptíveis às variações genéticas causadas pelo estresse no meio, dentre outros (CERQUEIRA et al., 2012).

A bioaumentação pode ser efetuada através da adição de cultura pura ou de consórcio microbiano ao local contaminado por compostos recalcitrantes tóxicos. A introdução de consórcio microbiano tem a vantagem sobre a cultura pura, porque o consórcio pode resistir a grandes variações no ambiente natural (CHEN et al., 2009; TYAGI et al., 2011). Esta técnica é mais adequada para os locais que (1) não têm células microbianas suficientes ou (2) a população nativa não possui as vias metabólicas necessárias para metabolizar os compostos alvos (TYAGI et al., 2011).

A bioestimulação envolve a identificação e correção de fatores, tais como nutrientes que podem influenciar na taxa de biodegradação dos contaminantes por micro-organismo autóctone no local afetado, através da areação e/ou adição de micronutrientes selecionados. Entretanto, ela só é eficaz quando há populações microbianas degradadoras do substrato considerado (YAKUBU, 2007; TYAGI et al., 2011).

Tem sido demonstrado que a degradação de hidrocarbonetos do petróleo por uma dada população microbiana nativa pode ser favorecida pela presença de nutrientes necessários ao local contaminado. Hidrocarbonetos de petróleo derramados representam uma fonte substancial de carbono para os micro-organismos autóctones, enquanto que, na maioria dos ambientes, a presença de nitrogênio e de fósforo é limitada. Assim, bioestimulação acelera a taxa de descontaminação, com a adição de um ou mais nutrientes limitantes da velocidade para melhorar o potencial de degradação das populações microbianas (TYAGI et al., 2011).

Além do tipo e da concentração dos nutrientes, os parâmetros físicos e ambientais também influenciam na taxa de mineralização de hidrocarbonetos por parte de bactérias degradadoras. Estes fatores incluem a composição química, o estado físico e a concentração do óleo cru ou de hidrocarbonetos do petróleo, juntamente com a temperatura, disponibilidade de oxigênio, salinidade, água, pressão e pH do local (TYAGI et al., 2011).

A biorremediação pode ser aplicada *in situ* ou *ex situ*. Dentre as tecnologias *ex-situ*, o uso de biorreatores apresenta maior aplicabilidade no tratamento de poluentes, permitindo o monitoramento efetivo do processo com maior controle das variáveis de processo, possibilitando uma redução do tempo de biotratamento (RAIMUNDO e RIZZO, 2002; BAKER e HERSON, 1994).

3.3. Acidentes envolvendo derrames de combustível marítimo

Aproximadamente entre $1,7$ a $8,8 \times 10^6$ toneladas de óleo são despejadas no mar anualmente. Durante um eventual derrame de óleo, ocorre um aumento na comunidade de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos. Uma vez que os derrames implicam em perdas econômicas e ambientais, as autoridades e a indústria petroquímica foram forçadas a reduzir o risco de derrames através de modificações nas normas técnicas e procedimentos operacionais (GOMES et al., 2009; SADABA e SARINAS, 2010).

Em 2006, o petroleiro Solar M/T naufragou na costa sul da Guimaras, Filipinas, e descarregou mais de 2×10^6 litros de óleo *bunker C*, que afetou sensivelmente os *habitats* costeiros. Houve alteração na composição das espécies de fungos e de outras espécies dos sedimentos de mangue ou das praias afetadas. Em 2006, foram encontradas apenas 15 espécies de fungos nos locais contaminados, com a predominância de *Aspergillus spp.*, sugerindo que estas espécies têm a habilidade para secretar enzimas que degradam o óleo, permitindo que elas usem os hidrocarbonetos como fonte de energia ou sugerindo que estas espécies tolerem altas concentrações de óleo e alta toxicidade, permitindo-lhes prosperar em áreas impactadas por derrame de óleo. Em três anos, isto é, 2009, foram coletadas dezoito espécies também com predominância do gênero *Aspergillus spp.* (SADABA e SARINAS, 2010).

Em janeiro de 2000, no Brasil, houve o rompimento de um duto da Petrobras, localizado na baía de Guanabara, próximo às margens do manguezal adjacente à REDUC (Refinaria Duque de Caxias), que liberou cerca de 1,3 milhão de litros de óleo tipo combustível marinho *bunker MF – 380*, causando grandes danos às áreas de manguezais preservadas (FARIAS, 2006).

3.4. Combustíveis Marítimos

“Óleo combustível” é conhecido tipicamente como um LFNA (Líquido de Fase Não Aquosa) e inclui muitos outros produtos líquidos do petróleo, empregado na queima em fornos ou caldeiras para a geração de calor ou utilizado em motores para a geração de energia. É produzido a partir de um processo de destilação de petróleo e contém principalmente hidrocarbonetos de cadeia longa, em particular alcanos, cicloalcanos e aromáticos (LEE et al., 2011).

Existem vários tipos de óleos combustíveis marítimos, também conhecido como *bunker*. No portal da empresa distribuidora de referência no Brasil, PETROBRAS, são listados vários tipos de combustíveis marítimos (Quadro 1), sendo que o do tipo *Bunker C* é o mais relatado pela literatura em casos de derrames ou em trabalhos que focalizam a biodegradação de combustíveis de navegação (MOHR, LASLEY e BURSIA, 2008; SCHWARTZ et al., 2004; RICHMOND, LINDSTROM e BRADDOCK, 2001).

Tabela 1 – Principais combustíveis de navegação comercializados pela empresa PETROBRAS Distribuidora.

Combustíveis marítimos
Óleo Combustível Marítimo Bunker C
Óleo Combustível Marítimo MF-30
Óleo Combustível Marítimo MF-40
Óleo Combustível Marítimo MF-60
Óleo Combustível Marítimo MF-80
Óleo Combustível Marítimo MF-100
Óleo Combustível Marítimo MF-120
Óleo Combustível Marítimo MF-150
Óleo Combustível Marítimo MF-180
Óleo Combustível Marítimo MF-280
Óleo Combustível Marítimo MF-320
Óleo Combustível Marítimo MF-380

Fonte: PETROBRAS (2012)

Alguns trabalhos nacionais tratam de acidentes e processos de remediação de ambientes poluídos pelo combustível marítimo *MF – 380*. Um dos acidentes mais conhecidos com esse combustível foi o que ocorreu na baía de Guanabara no ano 2000 (FARIAS, 2006; MENICONI, 2007).

Alguns trabalhos de pesquisa internacionais, além do *bunker C*, tratam também de acidentes e processos de biodegradação e biorremediação envolvendo o *bunker A*. No entanto, de um modo geral, são poucos os trabalhos sobre a degradação de petróleo e derivados que tratam de combustíveis marítimos (ARA, NOJIMA e HIROMI, 2002; KIM et al., 2000).

O tipo mais comum de óleo nos ambientes marinhos é o óleo combustível *bunker C*, que é transportado ao longo das rotas marítimas e usado para alimentar os motores dos navios. (MOHR, LASLEY e BURSIAN, 2008).

O combustível marítimo *bunker C* é um produto refinado do petróleo e o mais pesado dos óleos combustíveis, sendo constituído por diversas frações de hidrocarbonetos, dentre as quais a saturada, a aromática, as resinas, os asfaltenos, compostos contendo enxofre, dentre outras (RICHMOND, LINDSTROM e BRADDOCK, 2001; ZAJIC, SUPPLISSON e VOLESKY, 1974). Possui altas concentrações de n-alcanos, variando entre n-C12 e n-C34 e quantidades apreciáveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de quatro a seis anéis fusionados, representando 5% ou mais da concentração total do óleo (RICHMOND, LINDSTROM e BRADDOCK, 2001).

Devido à sua composição química e características físicas, o *bunker C* é lentamente degradado no ambiente, e dependendo das condições ambientais, pode persistir, relativamente inalterado, durante anos (MOHR, LASLEY e BURSIAN, 2008; SCHWARTZ et al., 2004). Quando derramado no mar, o *bunker C* tem comportamento semelhante ao petróleo, onde as frações mais leves, tais como os n-alcanos, são perdidas mais rapidamente, muito provavelmente pela ação microbiana, restando frações mais pesadas, tais com as resinas e os compostos polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio, resultando, conseqüentemente, num óleo altamente viscoso (RASHID, 1974; STROBEL e BRENOWITZ, 1981).

3.5. Toxicidade dos compostos do petróleo

A contaminação de solos e ambientes aquáticos por hidrocarbonetos de petróleo, como consequência de derrame acidental, pode causar graves danos aos organismos vivos. Os efeitos tóxicos do petróleo bruto incluem necrose hepática, congestão do fígado, degeneração da gordura e dissociação de hepatócitos. Pássaros e animais em áreas contaminadas com óleo são encontrados

apresentando emulsão preta no trato digestivo com odor de petróleo (SATHISHKUMAR et al., 2008; GOMES et al., 2009).

O *bunker C* é bem mais tóxico do que os outros óleos do petróleo devido ao seu alto conteúdo em HPAs, que têm sido associados aos seguintes danos vitais: insuficiência reprodutiva, genotoxicidade, imunotoxicidade e mudanças hematológicas em animais marinhos (SCHWARTZ et al., 2004; MOHR, LASLEY e BURSIAN, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra de *bunker*

A amostra de *bunker*, utilizada em todos os ensaios, foi cedida pela empresa Petrobras Transporte S.A – TRANSPETRO. O *bunker* em questão é identificado como óleo combustível marítimo *MF-380*, cuja caracterização físico-química está sumarizada na tabela 2.

Tabela 2: Aspectos físico-químicos do *bunker MF – 380*.

Propriedades físico-químicas	
Aspecto	Líquido viscoso e escuro
Odor	Característico de hidrocarbonetos
Ponto de fulgor	60 °C
Taxa de evaporação	Muito lenta
Inflamabilidade	Produto inflamável
Densidade	0,9878 g/mL
Viscosidade	0,00038 m ² /s

Fonte: PETROBRAS (2012).

A análise química elementar do *bunker* foi realizada para a determinação das percentagens em massa de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) presentes na amostra oleosa. Essa análise foi executada pela Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE (Central Analítica - DQF/UFPE).

4.2. Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho (Tabela 3) foram isolados de diferentes pontos da água do mar, nas proximidades da empresa TERMOPE, localizada no Porto de Suape – PE, por meio da técnica de enriquecimento utilizando *bunker* ou óleo diesel como única fonte de carbono, e foram cedidos pelo Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE). Estas culturas microbianas foram mantidas em meios de cultura apropriados, a 4 °C, pelo Laboratório de Processos Fermentativos situado do DAUFPE.

Tabela 3: Linhagens de bactérias e fungos isoladas da região portuária de Suape – PE.

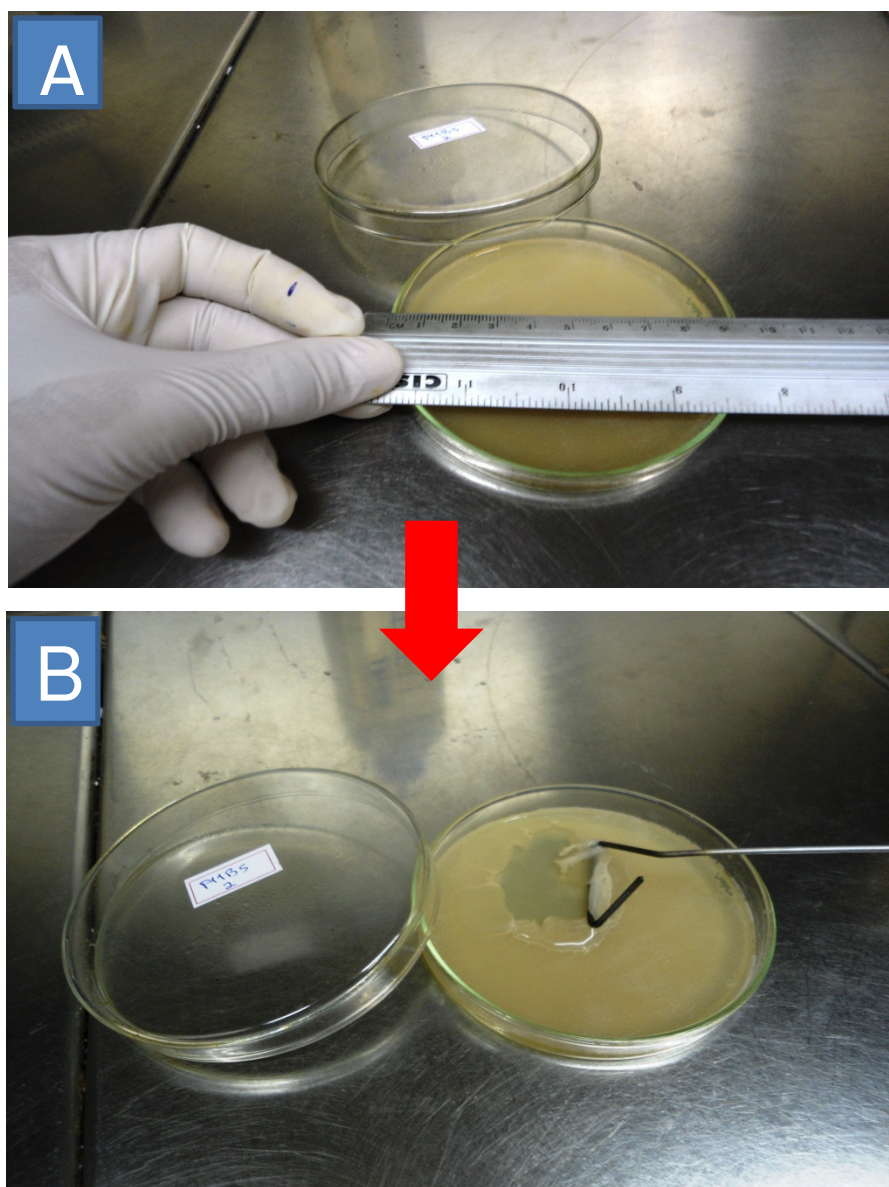
	Linhagens isoladas
Bactérias	P11B1
	P11B2
	P11B3
	P11B4
	P11B5
Leveduras	P12
Fungos filamentosos	P13F2A
	P13F2B
	P132
	P12F4B
	P22F2A
	P22F2B
	P23F4

4.3. Composição do Inóculo

Os inóculos foram utilizados na forma de blocos de ágar circulares ($\varnothing = 6$ mm) onde cada linhagem é semeada e mantida a 30 °C. Para as bactérias, os blocos de ágar foram retirados após 24 h de cultivo em meio Triptic-Soy-Agar – TSA (Tabela 5 do item 4.4). Para as leveduras e fungos filamentosos, os blocos foram retirados após 48 h e 72 h de cultivo em meio Sabouraud – SAB (Tabela 6 do item 4.4), respectivamente. Para os consórcios, os inóculos foram constituídos tomando-se um bloco de ágar de cada linhagem que compõe os consórcios.

Para estimar a biomassa em cada bloco de ágar, as linhagens foram semeadas com o auxílio de *swabs* em placas de Petri ($\varnothing = 90$ mm) contendo os meios TSA ou SAB, conforme o micro-organismo (Figura 1A). Após incubação a 30 °C, toda a biomassa crescida na superfície dos meios em cada placa foi raspada com o auxílio de uma alça de Drigalski (Figura 1B) e lavada com água destilada estéril, tomando-se o cuidado para não carregar também o meio de cultivo sólido e, em seguida, a suspensão foi filtrada em membranas de porosidade igual a 0,22 μ m e a biomassa retida seguiu para a determinação de peso seco. Deste modo, sabendo-se quanto de biomassa há em uma área circular correspondente a uma placa de Petri de $\varnothing = 90$ mm, é possível estimar quanto de biomassa há em uma área correspondente a um bloco de ágar circular de 6 mm de diâmetro.

Figura 1 – Procedimentos para estimar a biomassa. A – Medida do diâmetro interno da placa de Petri. B – Remoção da biomassa para quantificação por peso seco.



4.4. Meios de cultura e manutenção das linhagens

Os meios de cultura utilizados estão descritos nas tabelas 4 a 6.

Tabela 4. Meio mineral de Bushnell-Haas (BH).

Componente	
KH ₂ PO ₄	1,00g
K ₂ HPO ₄	1,00g
NH ₄ NO ₃	1,00g
MgSO ₄	0,20g
FeCl ₃	0,05g
CaCl ₂	0,02g
Ágar	15g*
Água destilada	1L

*Quando o meio é sólido.

Fonte: (ATLAS, 1995)

Tabela 5. Meio Tryptic-Soy-Agar (TSA).

Componente	
Trypticase	15,0g
Peptona de soja	5,0g
NaCl	5,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	1L
pH 7,3 ±0,2	

Fonte: (ATLAS, 1995)

Tabela 6. Meio Sabouraud (SAB).

Componente	
Peptona	10,0g
Glicose	40,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	1L
pH 6,5 ±0,2	

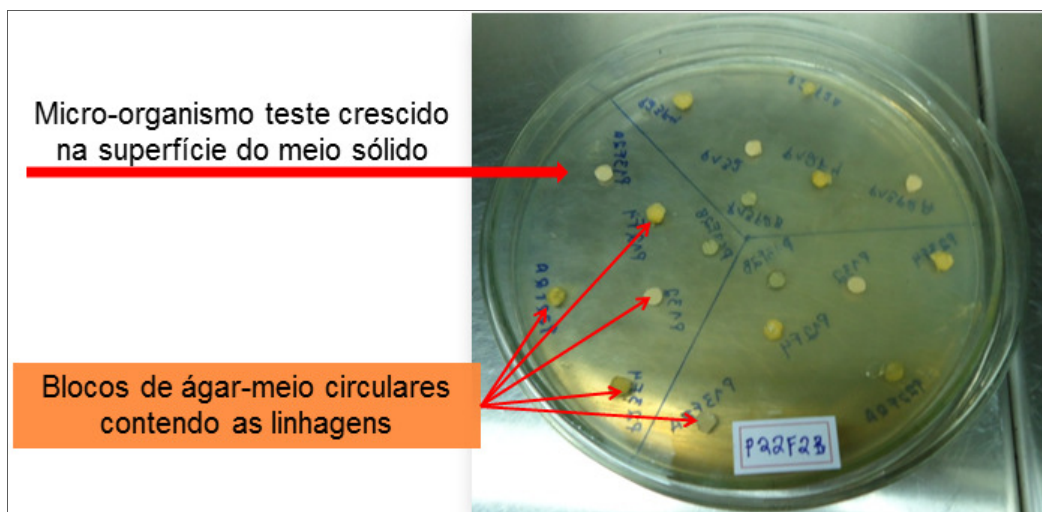
Fonte: (ATLAS, 1995)

As linhagens foram mantidas a 4°C em placas de Petri contendo o meio TSA (Tabela 5) ou SAB (Tabela 6), conforme a natureza do micro-organismo, acrescidas de 1% (v/v) de *bunker*. Mensalmente, foram realizados repiques para renovar o meio de cultivo e manter as linhagens nestas condições.

4.5. Avaliação de interações antagônicas entre as linhagens e composição de consórcios microbianos

As linhagens foram submetidas ao teste de antibiose, baseado no método de Bauer et al (1966), para verificar a ocorrência de interações antagônicas entre elas. Para isso, cada micro-organismo foi semeado em placas de Petri ($\varnothing = 15$ cm) com o auxílio de *swabs*, contendo o meio apropriado para cada grupo microbiano. Em seguida, blocos de ágar ($\varnothing = 6$ mm), contendo cada linhagem já crescida a ser testada, foram transferidos para as placas dos micro-organismos teste e dispostos invertidos em posições equidistantes, conforme a figura 2. As placas foram incubadas a 30°C, sendo verificadas diariamente a ocorrência ou não da formação de halos de inibição em torno de cada bloco, indicando ocorrência ou não de antagonismo. Qualquer halo produzido, independente do seu diâmetro, foi considerado como inibição. Posteriormente, consórcios microbianos foram montados de modo a não conter linhagens que apresentem antagonismo. Um segundo critério empregado na composição dos consórcios exigiu a presença de bactérias, levedura e fungos filamentosos, a fim de aumentar a possibilidade da degradação do *bunker*, em função da diversidade microbiana (GHAZALI et al., 2004).

Figura 2 – Teste de antagonismo: linhagens dispostas em posições equidistantes.



4.6. Seleção do consórcio mais promissor

Para a seleção do consórcio mais promissor quanto à capacidade em degradar *bunker*, foram utilizados, separadamente, dois indicadores redox: 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) e 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Estes indicadores atuam como aceptores finais de elétrons, tendo a mesma função do oxigênio no processo de oxidação biológica, sendo possível prever se os consórcios a serem testados são capazes de oxidar algum dos constituintes presentes no *bunker* pela mudança de coloração do meio de cultura (HANSON, DESAI e DESAI, 1993; GOMES et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2012). O DCPIP, quando reduzido, muda a coloração do meio de azul para incolor. Já o TTC, quando sofre redução, muda a coloração do meio de incolor para rosa. Os consórcios foram cultivados em frascos de Erlenmeyer (250 ml) contendo 50 ml de meio mineral de Büshnell-Haas (BH), 0,25ml de DCPIP ou TTC e 1% (v/v) de *bunker* como única fonte de carbono, submetidos à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação de 150rpm. Controle abiótico foi utilizado em todos os ensaios. O consórcio que ocasionou a redução dos indicadores mais rápido foi o selecionado para os testes subsequentes.

4.7. Aclimação do consórcio selecionado

As linhagens que compõem o consórcio microbiano selecionado foram submetidas a um processo de aclimação durante 21 dias, variando-se,

simultaneamente, a concentração de *bunker* e de cloreto de sódio (NaCl) antes de serem utilizadas nos ensaios de biodegradação. A aclimação para cada linhagem foi realizada em frascos de Erlenmeyer (500mL) contendo o meio BH (tabela 4 do item 4.4) com o pH inicial ajustado para 7.0, dois blocos de ágar ($\varnothing = 6$ mm) do micro-organismo e concentrações crescentes de *bunker* (1%, 2% e 3%, v/v) e de NaCl (1%, 2% e 3%, p/v). Os frascos foram mantidos à temperatura de 30°C, sob agitação de 150rpm (Incubadora Tecnal, modelo TE-421, com agitador orbital) e as transferências ocorreram a cada 7 dias, sendo transferido um volume do material bioprocessado equivalente a 10% para compor o inóculo da próxima condição. Após a etapa final, a biomassa e o pH foram avaliados. As linhagens aclimatadas foram mantidas sob refrigeração à 4°C.

4.8. Ensaio prévio de biodegradação

Para avaliar sua habilidade em crescer em *bunker* como única fonte de carbono bem como caracterizar seu tempo médio de crescimento neste combustível, o consórcio selecionado foi cultivado em frascos de Erlenmeyer (500 ml) contendo o meio mineral de Büshnell-Haas acrescido de NaCl (3%, p/v) e *bunker* (3%, v/v) e incubado a 25°C sob agitação de 150 rpm durante 35 dias. As amostras foram coletadas nos tempos: 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de experimento. O controle consistiu do meio mineral BH acrescido de NaCl (3%, p/v) adicionado da fonte de carbono sem a inoculação do consórcio. O experimento foi realizado em duplicata. Ao longo do ensaio foram realizadas determinações de biomassa e pH e ao final de 35 dias a degradação dos constituintes do *bunker* foram avaliados.

4.9. Planejamento experimental

Com o consórcio selecionado e aclimatado foi realizado um planejamento experimental com o objetivo de elucidar quais as condições que mais favorecem o processo de biodegradação do *bunker*. Para este fim, foi aplicado um planejamento fatorial completo 2^3 com dois níveis (-1 e +1) sem réplicas e três réplicas no ponto central, gerando onze ensaios experimentais (Tabela 7). As variáveis independentes estudadas nos ensaios (Tabela 8) foram as seguintes: temperatura, pH inicial e

relação carbono/nitrogênio (C:N), as quais foram escolhidas com base nos trabalhos relacionados com este tipo de combustível (KIM et al, 2000; MULKINS-PHILLIPS & STEWART, 1974; ZAJIC, SUPPLISSON, VOLESKY, 1974), e a variável resposta foi a porcentagem de biodegradação dos constituintes do *bunker*.

Tabela 7 – Matriz com as condições experimentais das variáveis independentes codificadas.

Ensaio	Temperatura	pH	C:N
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 8 – Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental 2³.

Variáveis	Níveis		
	- 1	0	+ 1
Temperatura (°C)	25	30	35
pH inicial	6.0	7.0	8.0
Relação C:N	150:1	100:1	50:1

Para calcular as relações C:N, foram consideradas a massa total de carbono e de nitrogênio presentes no *bunker*, e a massa total de nitrogênio presente no nitrato de amônio (NH₄NO₃), uma das substâncias componentes do meio de Bushnell-Haas (BH). Sendo assim, para saber a quantidade de NH₄NO₃ a ser adicionada ao meio mineral de BH de modo a obter as relações desejadas, foram utilizadas as seguintes equações:

$$mN = \frac{mCb - X * mNb}{X} \quad (1)$$

$$m(NH_4NO_3) = \frac{mN * MM(NH_4NO_3)}{MMN} \quad (2)$$

Onde:

mN = massa de nitrogênio desejada;

m Cb = massa total de carbono presente na amostra de *bunker* utilizada (2,58g);

m Nb = massa total de nitrogênio presente na amostra de *bunker* utilizada (0,00725g);

X = relação C:N desejada (150:1, 100:1 ou 50:1);

m(NH₄NO₃) = massa de nitrato de amônio para compor o meio BH modificado;

MM(NH₄NO₃) = massa molar do nitrato de amônio (80g/mol);

MMN = massa molar referente a dois átomos de nitrogênio presentes no nitrato de amônio (28g/mol).

As massas totais 'mCb' e 'mNb' correspondem a um volume de 3ml de *bunker* utilizado em cada ensaio. Estas massas foram obtidas da seguinte forma:

$$mb = Db * Vb \quad (3)$$

$$mb = 0,9878 \left(\frac{g}{mL} \right) * 3mL = 2,9634g$$

$$\begin{array}{rcl} 100g \text{ bunker} & - & 87,0938gC \\ 2,9634g \text{ bunker} & - & mCb \\ mCb & = & 2,58g \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 100g \text{ bunker} & - & 0,2447gN \\ 2,9634g \text{ bunker} & - & mNb \\ mNb & = & 0,00725g \end{array}$$

Onde:

Dd = densidade do *bunker*;

mb = massa do *bunker*;

Vb = volume de *bunker*;

C = Carbono;

N = Nitrogênio;

Desse modo, empregando as equações 1 e 2, foram obtidas, para cada relação C:N, concentrações de nitrato de amônio correspondentes a um volume de 97ml do meio de Bushnell-Haas, já que a concentração de *bunker* deve ser de 3%. Portanto, para 1000 ml do mesmo meio, as concentrações de nitrato de amônio foram iguais às apresentadas na tabela 9 para cada meio modificado de Bushnell-Haas.

Tabela 9 – Meios de Bushnell-Haas (BH) modificados, com variações nas concentrações da fonte de nitrogênio.

Componentes / C:N	Concentração (g/L)		
	150:1	100:1	50:1
KH ₂ PO ₄	1,00	1,00	1,00
K ₂ HPO ₄	1,00	1,00	1,00
NH₄NO₃	0,29	0,55	1,30
MgSO ₄	0,20	0,20	0,20
FeCl ₃	0,05	0,05	0,05
CaCl ₂	0,02	0,02	0,02
pH = 7,0 ± 0.2			

Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer (500mL), contendo 97ml do meio BH modificado, 3ml de *bunker*, 30g/L de NaCl, 1 bloco de gelose ($\varnothing$ = 6mm) de cada micro-organismo do consórcio. Os experimentos obedeceram às condições do planejamento fatorial 2³ (Tabelas 7 e 8) e foram submetidos à agitação de 150rpm durante 14 dias. Ao final dos ensaios, os resultados dos percentuais de degradação dos constituintes do *bunker* (variável resposta) foram analisados pelo software STATISTICA 10.0.

4.10. Experimento em Biorreator

Após ter selecionado as condições que mais favoreceram o processo de biodegradação do *bunker* pelo melhor consórcio selecionado em frasco, procedeu-se ao experimento em maior escala utilizando um biorreator de bancada, modelo BioFlo 110, da New Brunswick (Figura 3), dotado de controle de aeração, agitação, nível de espuma, temperatura e pH, cujas características estão sumarizadas na Tabela 10. Os valores de temperatura, relação C:N e pH para este ensaio foram estabelecidos a partir do melhor resultado obtido no planejamento fatorial em frascos.

Figura 3 – Biorreator de bancada, modelo BioFlo 110, da New Brunswick Company FS-5.

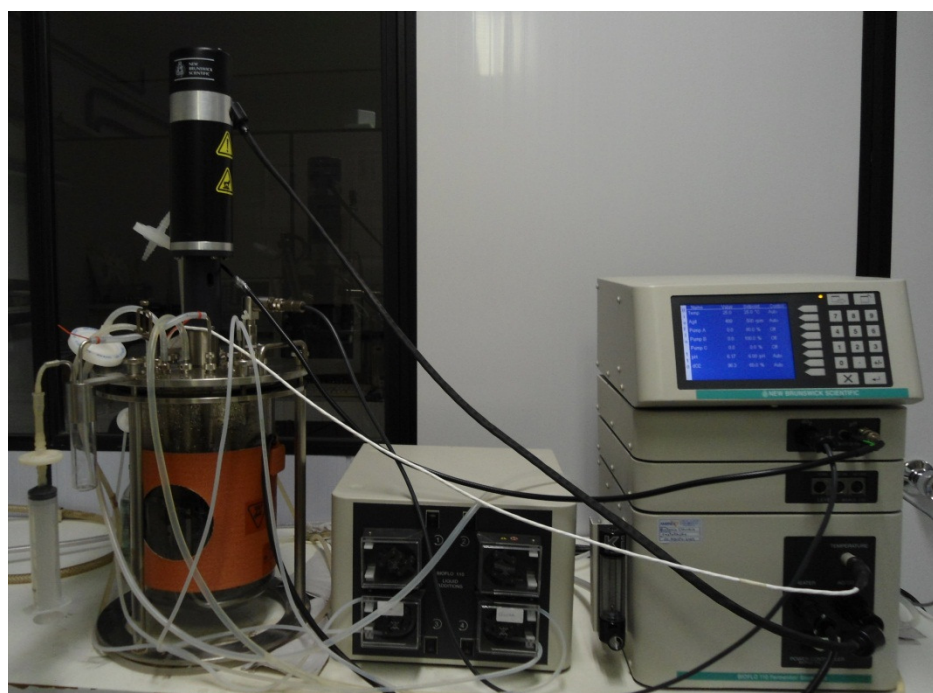


Tabela 10. Principais características do biorreator BioFlo 110, New Brunswick Company.

Características	Valores e faixas de operação
Altura da cuba	49,5 cm
Diâmetro da cuba	29 cm
Volume total	7,5 L
Volume útil	1,5L – 5,6L
Peso do vaso	18 kg
Faixa de temperatura	5°C – 70°C
Vazão máxima de ar	11.000 cm ³ /min
Velocidade de agitação	30 – 1200 rpm

O ensaio foi realizado por 24 dias empregando-se as condições e parâmetros sumarizados na Tabela 11. O inóculo foi obtido a partir de ensaio prévio com o consórcio selecionado durante sete dias, nas mesmas condições do experimento em biorreator.

Tabela 11. Parâmetros e condições empregadas no experimento de degradação em biorreator.

Parâmetros	Valores
Taxa específica de aeração	1 v.v.m.
Volume de <i>bunker</i> (3%, v/v)	120 mL
Volume do inóculo (10%, v/v)	400 mL
Volume do meio BH modificado + NaCl (3%)	3480 mL
Volume da amostra	40 mL
Intervalo de amostragem	3 dias
Velocidade de agitação	500 rpm
Temperatura	25°C
Relação C:N	150:1
pH ajustado	6,0

Com a finalidade de se retirar amostras representativas durante os procedimentos de amostragem, minutos antes da retirada de cada amostra, a agitação foi elevada para 700 rpm, visando, assim, reduzir a heterogeneidade do meio. Para monitorar o tratamento biológico do *bunker*, foram realizadas determinações de biomassa através do método do peso seco do consórcio selecionado. Ao final do experimento, avaliou-se a degradação do poluente por cromatografia gasosa.

4.11. Avaliação da biomassa nos ensaios

A biomassa das linhagens e do consórcio em todos os ensaios foi determinada por gravimetria pela técnica de peso seco. Alíquotas das amostras do meio, após o processo de biodegradação, foram filtradas em membranas de porosidade ($\varnothing$) igual a 0,22 μ m. As membranas com a biomassa retida foram colocadas em placas de Petri previamente pesadas e levadas a estufa a uma temperatura de 80°C durante 24h. Após este período, foram colocadas em dessecador por mais 30min, e depois foram pesadas até peso constante. O conteúdo em biomassa foi calculado pela diferença entre o peso final e inicial das placas de Petri contendo as membranas com relação a cada alíquota utilizada. Em seguida, os valores obtidos foram transformados em g/L tomando-se o volume da alíquota correspondente.

4.12. pH

Durante os ensaios em frascos, o pH foi medido usando um potenciômetro digital (DIGIMED® modelo DM – 21).

4.13. Índice de emulsificação

A avaliação do índice de emulsificação foi realizada após a filtração das amostras em membrana, conforme descrito no item 4.12, ao final de cada ensaio. Alíquotas de 2 mL de meio foram agitadas com 2 mL de querosene em tubos de ensaio (100 mm x 15 mm) por 2 min, utilizando um agitador de tubos. A estabilidade da emulsificação foi determinada após 24 h (COOPER e GOLDENBERGER, 1987) e o índice de emulsificação foi determinado, segundo a equação abaixo:

$$E(24)\% = \left(\frac{A}{B}\right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

E (24)% = índice de emulsificação medido após 24 h;

A = altura do óleo emulsionado;

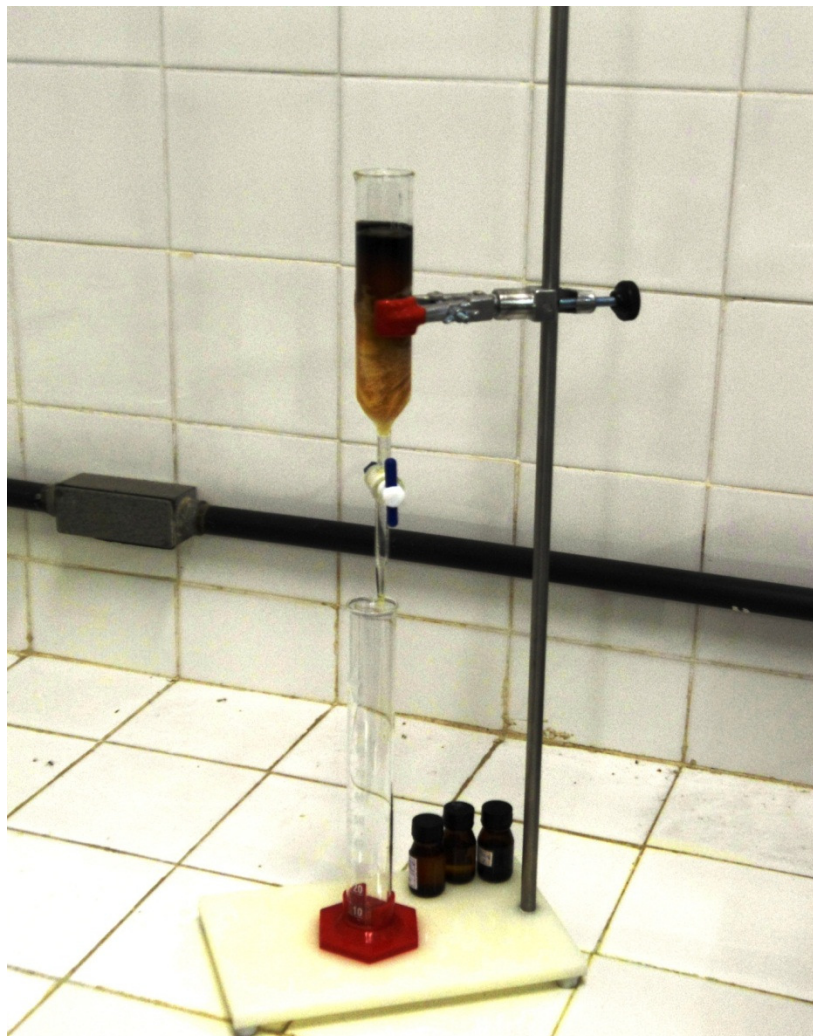
B = altura total do líquido do tubo.

4.14. Técnicas analíticas utilizadas no preparo das amostras para cromatografia.

Ao final dos ensaios de biodegradação, o meio residual foi submetido ao processo de extração líquido-líquido. Cada amostra residual foi colocada em um funil de separação, seguida da adição de 100 ml de hexano. O sistema foi agitado por dois minutos, abrindo-se periodicamente a válvula para a saída de gases e deixando o sistema em repouso para ocorrer a separação das fases. A fase orgânica foi separada e se adicionou sulfato de sódio anidro para a retirada da umidade residual, e posteriormente, foi filtrada com papel de filtro faixa branca para a remoção de resíduos. O extrato final foi mantido em frasco âmbar até ser utilizado na próxima etapa.

A fase de *clean up* (Figura 4), foi realizada em colunas de vidro empacotadas com sílica gel ativada a 800°C em forno mufla durante 1h. Nessa etapa, o extrato foi separado em frações de hidrocarbonetos saturados e aromáticos. Inicialmente, a coluna foi eluída com 60 mL de hexano a fim de condicioná-la. Após essa operação, a fração de saturados foi eluída com 60 mL de hexano, seguido pela eluição da fração de aromáticos com 60 mL de diclorometano. Cada fração foi recolhida em frascos âmbar, concentrada em fluxo de nitrogênio e mantidas sob refrigeração (4°C - 10°C) até ser injetada no cromatógrafo gasoso.

Figura 4 – Aspecto da coluna de vidro empacotada com sílica gel após a separação das frações de hidrocarbonetos saturados e aromáticos.



Após o *clean up*, as frações, saturada e aromática, de cada amostra, seguiram para a análise cromatográfica. Para este fim, foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG – EM), marca Shimadzu®, modelo 17A/QP5050A (Figura 5). Os percentuais de degradação dos constituintes que compõem as frações saturada e aromática foram calculados em função do decréscimo dos picos de concentração em função do tempo de retenção. As condições operacionais da análise cromatográfica estão sumarizadas na tabela 12. Utilizou-se uma coluna VB-5 (30 m x 0,25 mm) e o espectrômetro de massa com ionização elétrica e detector do tipo Multiplicador secundário de elétrons operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV, temperatura da fonte de íons de 290 °C e varredura entre 35 – 500 m/z.

Figura 5 – Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa.



Tabela 12 – Condições operacionais empregadas nas análises cromatográficas do *bunker*.

Parâmetros	Descrição / Valores
Temperatura inicial de injeção (°C)	290
Temperatura da interface (°C)	290
Modo de controle	Split
Pressão de entrada (Kpa)	45,4
Fluxo da coluna (mL/min)	1
Velocidade linear (cm/seg)	35,2
Fluxo total (mL/min)	102,1
Gás de arraste	Hélio
Volume injetado (µL)	1

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química da amostra de *bunker*

Os resultados da análise química elementar do *bunker* estão apresentados na Tabela 13. A análise revela que a amostra de não possui alguma fonte de enxofre, ou seja, compostos polares sulfurados, e possui baixas quantidades de nitrogênio.

Tabela 13 – Resultados da análise química elementar da amostra de *bunker MF – 380*.

Elementos analisados	Porcentagem em massa (%)
C	87,0938
H	11,3164
N	0,2447
S*	0,0000

* Não foi detectado presença de enxofre.

5.2. Avaliação de interações antagônicas entre as linhagens e composição de consórcios microbianos

Observou-se que 85% dos micro-organismos testados apresentaram reação antagônica contra pelo menos um dentre os testados (Figura 6).

Figura 6 – Resultados do teste de antagonismo. Os quadrados marcados estão indicando, simultaneamente, as linhagens que provocaram inibição (situadas à esquerda) e as que sofreram inibição (situadas na parte superior).

Linhagens que provocaram inibição, colocadas na forma de blocos de ágar		Linhagens que sofreram inibição, semeadas como tapete												
		P11B1	P11B2	P11B3	P11B4	P11B5	P12	P13F2A	P13F2B	P132	P12F4B	P22F2A	P22F2B	P23F4
BACTÉRIAS	P11B1													
	P11B2							X						
	P11B3		X						X	X				
	P11B4		X	X										
	P11B5		X											
LEVEDURA	P12						X							
FILAMENTOSOS	P13F2A													X
	P13F2B							X				X		X
	P132													
	P12F4B				X			X	X	X				
	P22F2A								X	X	X			
	P22F2B							X	X	X	X			X
	P23F4							X	X	X	X			

Dentre as linhagens estudadas, as únicas que não provocaram qualquer tipo de inibição aos demais micro-organismos foram: a bactéria P11B1 e o fungo filamentoso P132. As linhagens que não sofreram qualquer inibição foram: as bactérias P11B1 e P11B5, a levedura P12 e o fungo filamentoso P22F2B (Figura 6). As figuras 7 e 8 ilustram os aspectos dos halos de inibição quando o “tapete” microbiano é constituído por uma bactéria e por um fungo filamentoso, respectivamente.

Figura 7 – Halo de inibição ao redor do bloco de ágar, evidenciando reação antagônica do fungo P12F4B contra a bactéria P11B4.

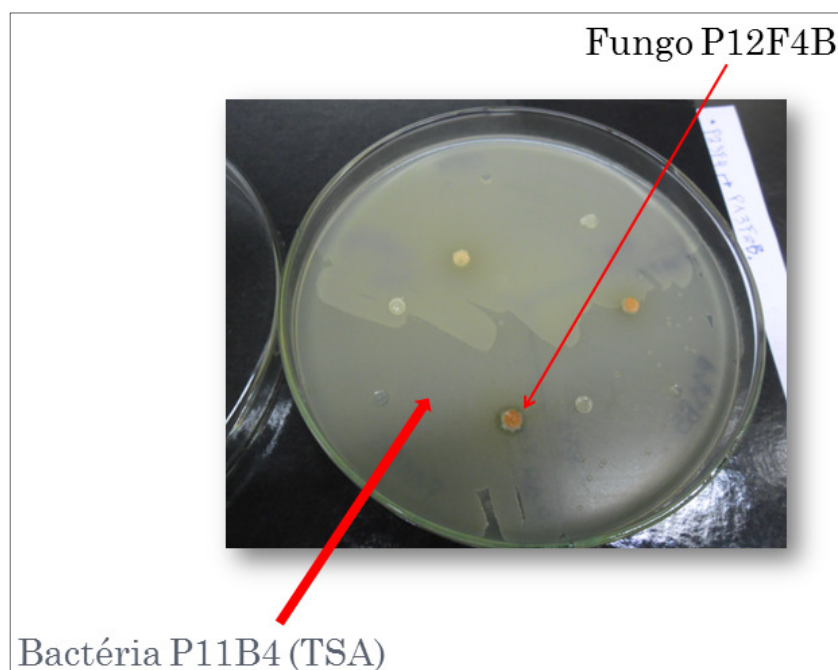
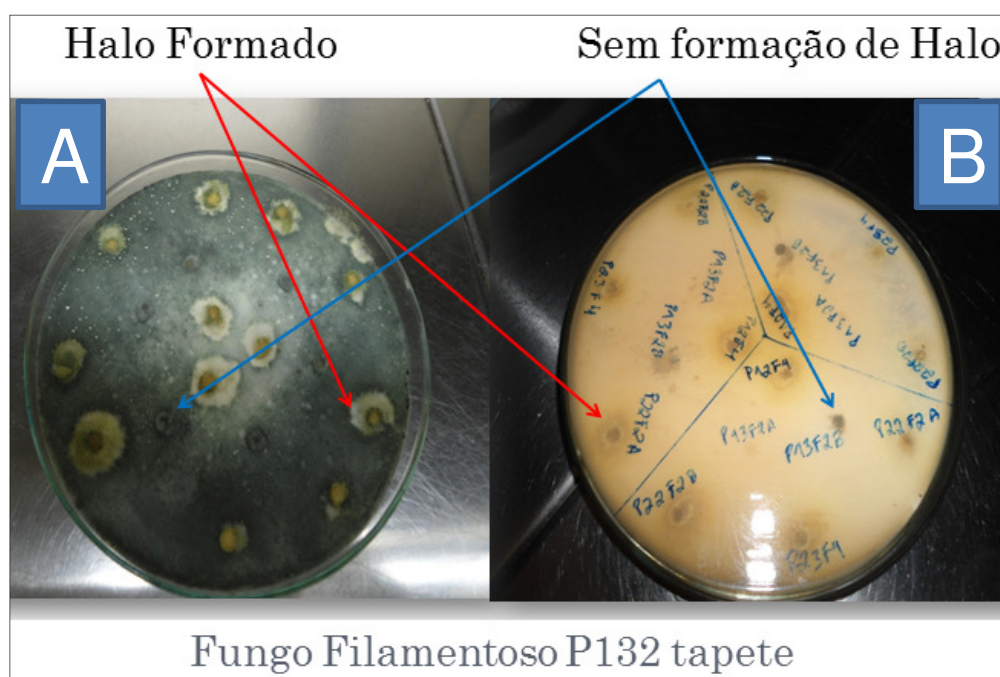


Figura 8 – Aspecto do halo de inibição formado ao redor dos blocos de ágar das linhagens que apresentaram reação antagônica contra o fungo P132 listadas na figura 6. A – Verso da placa. B – Reverso da placa.



A ocorrência de halos de inibição evidencia interações antagônicas, provavelmente, devido à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, capazes de inibir o crescimento de outros micro-organismos. Norman et al (2004) estudaram um desses metabólitos, a piocianina, que é produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, uma linhagem com capacidade para degradar n-alcanos, frequentemente isolada de locais contaminados por petroderivados, com a finalidade de melhorar sua competitividade e sobrevivência em vários ambientes. A piocianina é um pigmento capaz de inibir o crescimento de outros micro-organismos. Estes autores monitoraram durante 50 dias o efeito desse metabólito sobre uma comunidade microbiana crescendo em (1%) de óleo cru e obtiveram uma redução específica na degradação de HPAs, além de um decréscimo na diversidade dessa comunidade, em relação ao controle que estava sem piocianina.

Portanto, linhagens com interação antagônica não devem ser montados em consórcio, visto que isto inviabilizaria a sua aplicação em processos de biorremediação. Este critério de seleção é de suma importância, uma vez que permite obter consórcios microbianos onde os micro-organismos possam crescer e atuar de forma sinérgica, potencializando a degradação do óleo e, conseqüentemente, descontaminar o ambiente (ALVAREZ, 2007). Estudos posteriores são necessários para que se possa avaliar o mecanismo e o espectro de ação dos metabólitos, bem como estes influenciam na capacidade de degradação de poluentes pelas comunidades microbianas.

Com base nos resultados apresentados na Figura 6, foi possível compor oito diferentes consórcios (Tabela 14), a serem avaliados em testes posteriores, levando-se em consideração os critérios previamente estabelecidos para a composição de consórcios.

Tabela 14 – Consórcios microbianos mistos montados conforme os resultados do teste de antagonismos e seguindo os critérios já estabelecidos.

Consórcios	Micro-organismos envolvidos				
	Bactérias		Levedura		Fungos filamentosos
C1	P11B1	P11B4		P12	P13F2B P132
C2	P11B1	P11B2		P12	P13F2B P132
C3	P11B1	P11B3 P11B4 P11B5		P12	P22F2A
C4	P11B1	P11B3 P11B5		P12	P12F4B
C5	P11B1	P11B3 P11B5		P12	P22F2A P22F2B
C6	P11B1	P11B3 P11B5		P12	P22F2A P23F4
C7	P11B1	P11B4 P11B5		P12	P22F2A P22F2B
C8	P11B1	P11B4 P11B5		P12	P22F2A P23F4

5.3. Seleção do consórcio mais promissor

Dos oito consórcios testados (Tabela 14), o consórcio C5 foi o selecionado por ter causado a completa mudança de cor do meio de cultivo após 48h (meio de BH com o indicador redox DCPIP) e 72h (meio de BH com o indicador redox TTC), respectivamente (Figura 9). Os outros consórcios provocaram a redução dos indicadores testados em um período de tempo igual ou superior ao do consórcio selecionado (Tabela 15).

Figura 9 – Resultado da redução dos indicadores para o consórcio C5 selecionado. A – Viragem do indicador DCPIP de azul para incolor após 48h. Notar controle abiótico com coloração azul (à esquerda, sem viragem). B – Viragem do indicador TTC de incolor para rosa após 72h. Notar controle abiótico sem coloração (à esquerda, sem viragem).

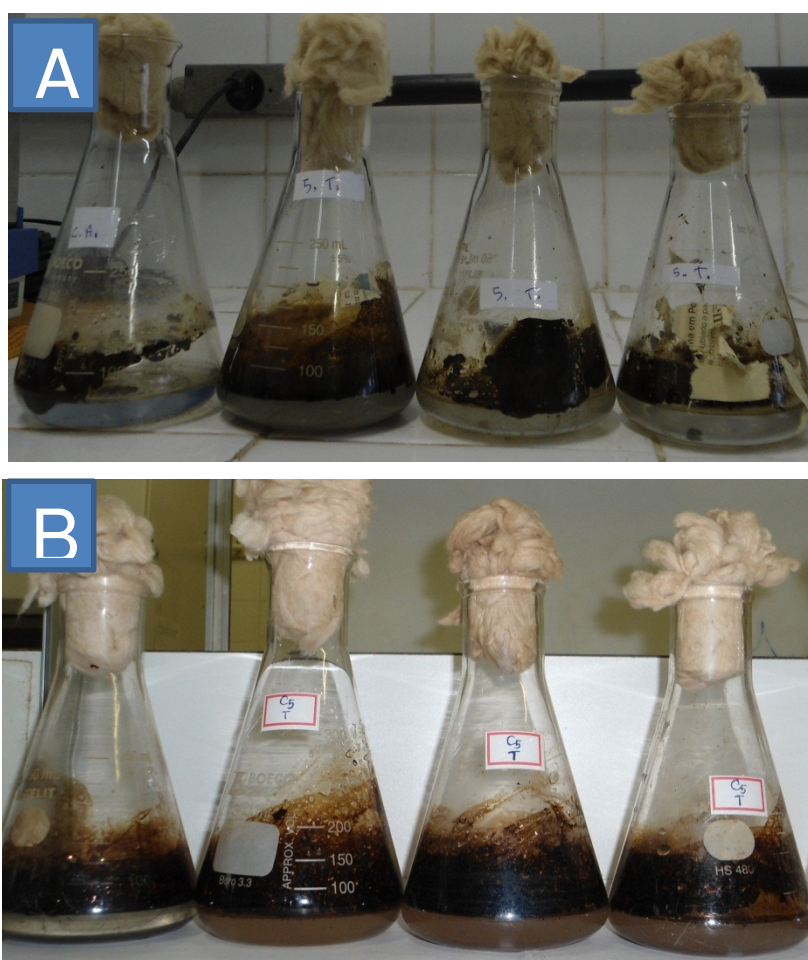


Tabela 15 – Resultado da seleção do consórcio mais promissor.

Consórcios	Indicadores redox	
	DCPIP	TTC
C1	++++	+
C2	++	++
C3	++++	++
C4	++	-
C5	++++	+++
C6	+++	++
C7	+++	+
C8	++++	++

Tempo de redução do indicador. ++++: após 48h. +++: após 72h. ++: após 120h. +: após 144h. - : não houve viragem do indicador.

Diversos autores têm reportado o uso de indicadores redox, tais como o DCPIP e o TTC, para avaliar a habilidade de diversos micro-organismos em degradar hidrocarbonetos de forma isolada (HANSON, DESAI e DESAI, 1993; GOMES et al, 2009; CERQUEIRA et al, 2012). Neste trabalho, optou-se por selecionar os micro-organismos não isoladamente, mas em consórcio, como alternativa interessante por dois motivos: (1) em consórcio, há um maior espectro enzimático atuando na degradação (GHAZALI et al., 2004), uma vez que envolve a expressão metabólica de micro-organismos pertencentes a táxons distintos, tais como bactérias e fungos; (2) devido à sua composição química complexa, o *bunker* é lentamente degradado no ambiente (MOHR, LASLEY e BURSIAN, 2008; SCHWARTZ et al., 2004). Portanto, micro-organismos consorciados aumentam a possibilidade de degradação do *bunker*, atuando de várias maneiras sobre as diferentes frações deste combustível marítimo.

5.4. Composição do Inóculo

Na Tabela 16 está apresentada a biomassa estimada de cada bloco de ágar circular para cada linhagem do consórcio C5 selecionado.

Tabela 16 – Biomassa estimada para cada bloco de ágar circular das linhagens que compõem o consórcio C5.

Linhagens	Biomassa (g) do bloco de ágar ($\varnothing = 6$ mm)
P11B1	$0,00014 \pm 0,000004$
P11B3	$0,000138 \pm 0,000026$
P11B5	$0,000446 \pm 0,0001$
P12	$0,000751 \pm 0,000035$
P22F2A	$0,00035 \pm 0,00007$
P22F2B	$0,000066 \pm 0,000037$

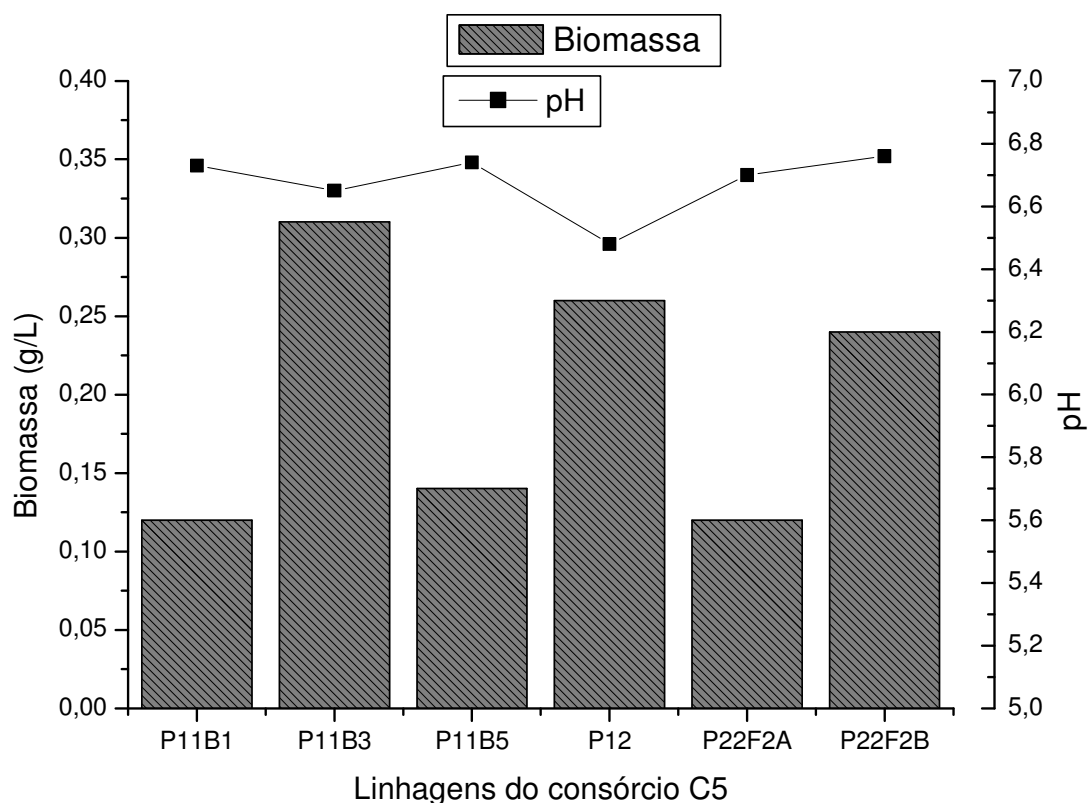
Com base na tabela 16, a biomassa inicial estimada para o consórcio C5 é de 0,002g.

5.5. Aclimação das linhagens do consórcio C5

Os ensaios de aclimação das linhagens que compõem o consórcio C5 ao *bunker* é de extrema necessidade, pois esse óleo combustível é de composição bastante complexa, sendo rico em hidrocarbonetos recalcitrantes, tais como HPAs e substâncias polares. Por outro lado, a aclimação das linhagens à salinidade semelhante à da água do mar é importante para manter as linhagens nas suas condições de origem visando a essa aplicabilidade em ambientes marinhos.

Os resultados obtidos ao final dos experimentos de aclimação estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Perfis de biomassa e pH das linhagens do consórcio C5, após 21 dias de aclimação nas concentrações crescentes de bunker (1% a 3%, v/v) e de NaCl (1% a 3%, p/v).



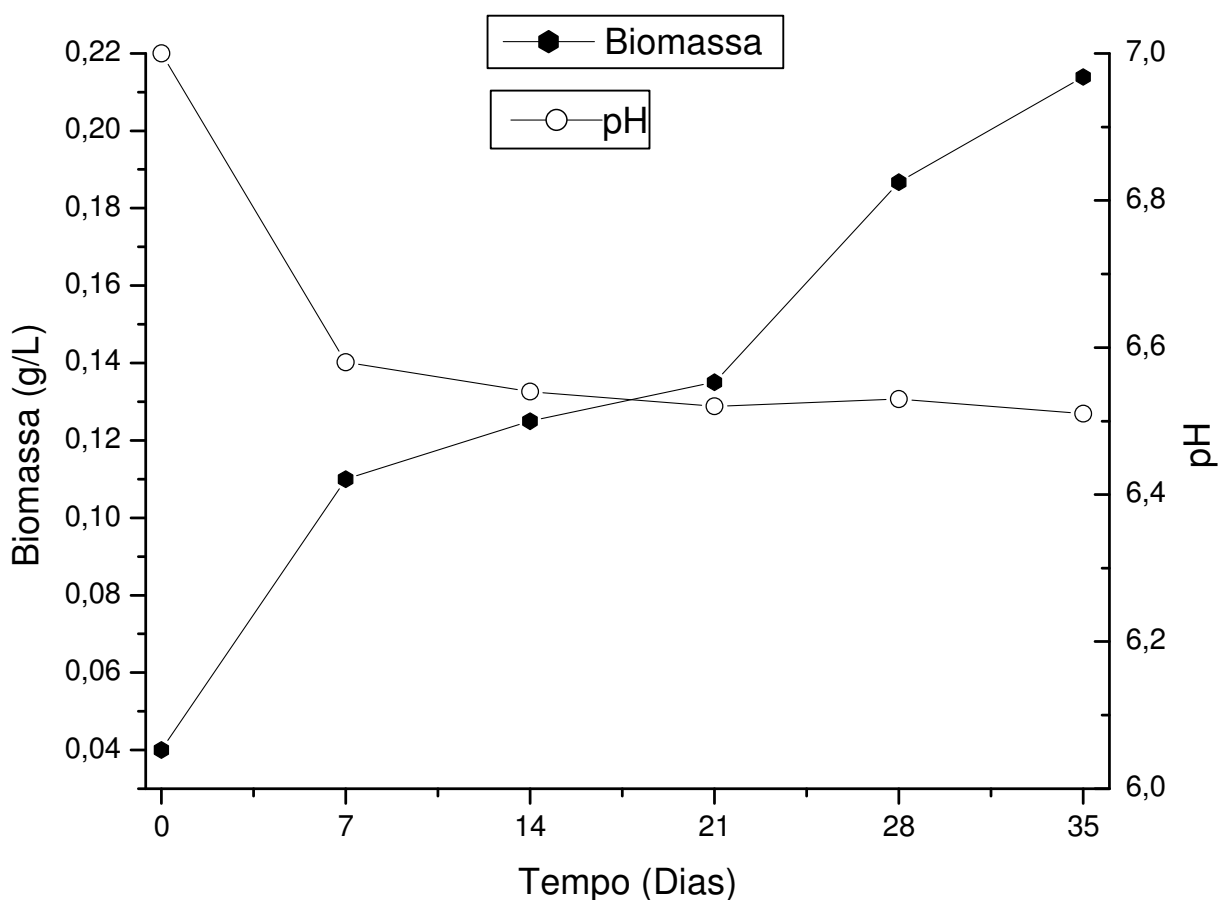
Pôde-se observar que as linhagens foram capazes de produzir biomassa e diminuir o pH inicial do meio durante o processo de aclimação a teores crescentes de *bunker* (1% a 3%, v/v) e de NaCl (1% a 3%, p/v), sugerindo que estas cepas são capazes de degradar o combustível em questão e usá-lo como fonte de carbono e energia. A diminuição do pH do meio é provavelmente devido à produção de metabólitos ácidos, decorrentes do processo de biodegradação, o qual leva a um acúmulo de ácidos orgânicos e consequentemente queda do pH (GOMES, 2004; GADD, 2000). Diversos autores têm apontado que a adaptação de culturas microbianas ao poluente é preponderante no processo de biodegradação de hidrocarbonetos e resulta em um aumento do potencial de oxidação e consequente aumento da taxa de degradação (SALLEH et al., 2003; AAMAND, JØRGENSEN e JENSEN, 1989; MIRANDA et al., 2007; LEAHY e COLWELL, 1990).

Vale ressaltar que, neste trabalho, a aclimação das linhagens até a concentração de 30g/L (3%, p/v) de NaCl se deu pelo fato de terem sido isoladas de ambiente marinho, mais precisamente da área de estuário da região portuária de Suape, cuja salinidade total S(‰) máxima da água neste local varia entre 36,45S e 37,18S entre os períodos chuvoso e seco, respectivamente (KOENING et al, 2002). Para efeito de cálculo, como a maior parte da salinidade da água do mar se deve ao cloreto de sódio, que representa 84,4% em peso de todos os sais dissolvidos (LALY & PARSONS, 1993), a quantidade de NaCl para esta área, entre os períodos chuvoso e seco, varia entre 30,76‰ e 31,38‰ (ou 3,08% e 3,1%) respectivamente, o que equivale a aproximadamente 30g/L de NaCl.

5.6. Ensaio prévio de biodegradação

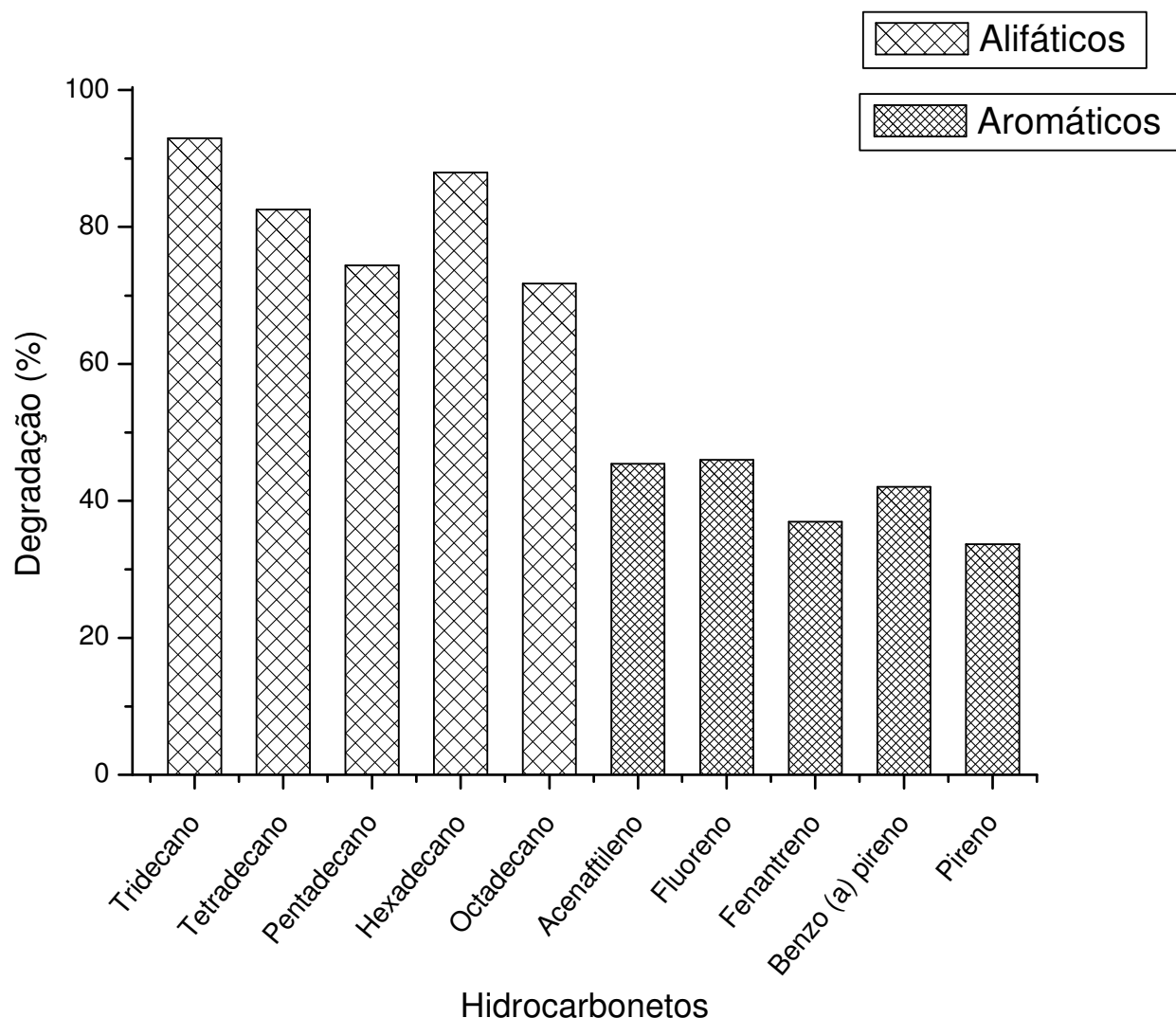
A Figura 11 mostra o perfil de crescimento do consórcio C5 bem como os valores de pH do meio. A biomassa inicialmente cresceu de 0,04 a 0,11g/L durante os primeiros sete dias. Após esse período o consórcio C5 apresentou um lento crescimento, alcançando um conteúdo em biomassa de apenas 0,135g/L no 21º dia. Em seguida, aumentou sua biomassa significativamente para 0,21g/L no 35º dia de experimento, evidenciando duas fases distintas de crescimento separadas por um período de adaptação, o que sugere um comportamento diáuxico. A Figura 12 apresenta os perfis de degradação de alguns dos constituintes alifáticos e aromáticos presentes no *bunker* após os 35 dias do experimento. Com relação aos hidrocarbonetos alifáticos, obteve-se degradação de 92,97% para o tridecano, 82,54% para o tetradecano, 74,39% para o pentadecano, 87,95% para o hexadecano e 71,73% para o octadecano. Com relação aos HPAs, obteve-se degradação de 45,42% para o acenaftileno, 46% para o fluoreno, 36,94% para o fenantreno, 42,06% para o benzo [a] pireno e 33,67% para o pireno.

Figura 11 – Perfil de crescimento do consórcio C5 submetido ao ensaio prévio de degradação.



Dada a grande diversidade de hidrocarbonetos presentes no *bunker*, provavelmente a maior parte dos constituintes deste óleo responsável pelo crescimento do consórcio C5 na primeira fase não fosse a mesma utilizada na segunda fase de crescimento, o que explica o comportamento diáuxico observado. Neste caso, como mostrado na Figura 12, os constituintes alifáticos do *bunker* provavelmente foram consumidos, na sua maioria, na primeira fase, enquanto que os HPAs começaram a ser consumidos, em grande parte, na segunda fase.

Figura 12 – Perfil de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio C5 após 35 dias do ensaio.



Há várias explicações possíveis para o comportamento diáuxico. A mais simples é a de que a fase de adaptação representa um período durante o qual enzimas estão sendo sintetizadas para metabolizar completamente os ácidos orgânicos que se acumularam no meio durante a primeira fase de crescimento (SARIASLANI, HARPER e HIGGINS, 1974). Esse acúmulo de ácidos orgânicos pode ser evidenciado pela queda brusca de pH observado durante a primeira fase de crescimento (Figura 11).

De um modo geral, o consórcio C5 alcançou degradação dos constituintes alifáticos e aromáticos acima de 70% e de 30%, respectivamente (Figura 12). Como

regra geral, n-alcanos são mais biodegradáveis do que os alcanos ramificados, que por sua vez são mais biodegradáveis do que os aromáticos monocíclicos, que por fim são mais biodegradáveis do que hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (GOMES et al., 2009). No entanto, alcanos de cadeia muito longa e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são geralmente considerados de baixa biodegradabilidade devido à sua maior hidrofobicidade (ZHANG et al., 2011).

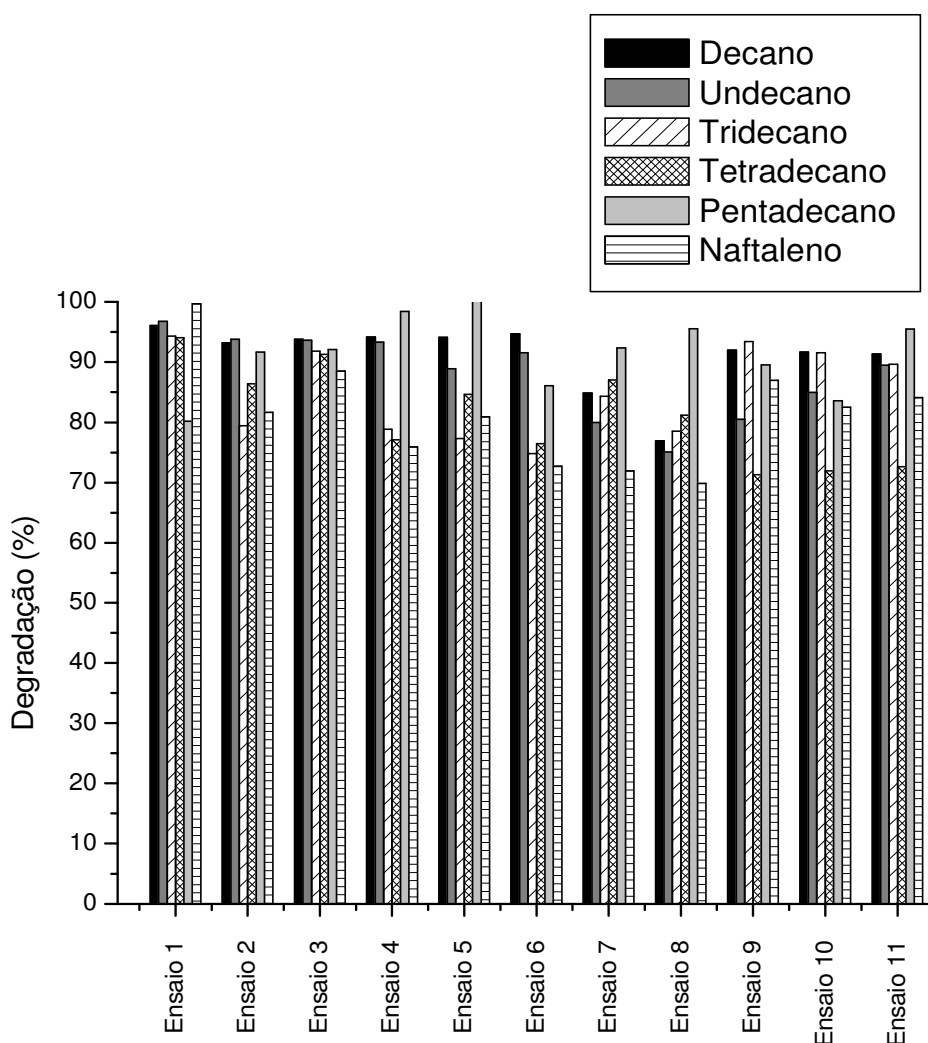
Ainda com relação ao crescimento do consórcio C5, pode-se observar que não houve uma fase *lag* aparente (Figura 11), demonstrando que a execução prévia de um processo de aclimação é de suma importância para aumentar a eficiência da taxa de degradação nos ensaios subsequentes. De acordo com os estudos de AAMAND et al (1989), a duração da fase *lag* está relacionada com o grau de adaptação à exposição prévia aos hidrocarbonetos. Também é possível observar que ao 35º dia de experimento o consórcio C5 ainda estava crescendo, sugerindo que óleos combustíveis complexos, tais como o *bunker*, necessitam de um intervalo de tempo maior para serem efetivamente degradados. Alguns autores investigaram a biodegradação de *bunker* têm relatado intervalos de várias semanas para uma degradação ou transformação aparente deste combustível (MULKINS-PHILLIPS e STEWART, 1974; HUA, 2006; RICHMOND et al., 2001).

ZAJIC et al (1974), avaliando o crescimento de três bactérias quanto à biodegradação de *bunker* C (1%, v/v), durante um período de 15 dias em condições similares às deste ensaio, observaram que, dos componentes majoritários do *bunker*, somente a fração alifática decresceu durante a biodegradação, enquanto a fração aromática permaneceu praticamente intacta. RICHMOND et al (2001) avaliaram o potencial de mineralização de constituintes do *bunker* C (1%, v/v) por micro-organismos isolados da areia de praia contaminada com este combustível. Após 21 dias de incubação em meio BH contendo 3% (p/v) de NaCl e 1% de *bunker* como única fonte de carbono, obtiveram uma degradação expressiva de hexadecano, seguida de uma degradação sutil de fenantreno, no entanto, sem degradação aparente de pireno e fluoreno. Esses autores concluíram que devido à recalcitrância dos HPAs, ensaio com maior tempo de incubação é necessário para permitir um aumento na mineralização desses compostos.

5.7. Planejamento Experimental

Na Figura 13 estão apresentados os resultados dos percentuais de degradação de constituintes do *bunker* que foram analisados, referentes ao o planejamento experimental dos onze ensaios. Pode-se observar que, de um modo geral, todos os hidrocarbonetos investigados pela análise cromatográfica (decano, undecano, tridecano, tetradecano, pentadecano e naftaleno) apresentaram degradação acima de 70% em todos os ensaios.

Figura 13 – Percentuais de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio C5 obtidos nos ensaios do planejamento experimental 2^3 .



A Tabela 17 apresenta a matriz estendida do planejamento experimental, considerando a degradação total dos hidrocarbonetos analisados (Figura 13) para

cada ensaio. Os símbolos -1, +1 e 0 que aparecem na frente dos valores reais indicam os níveis inferior, superior e do ponto central das variáveis codificadas, respectivamente.

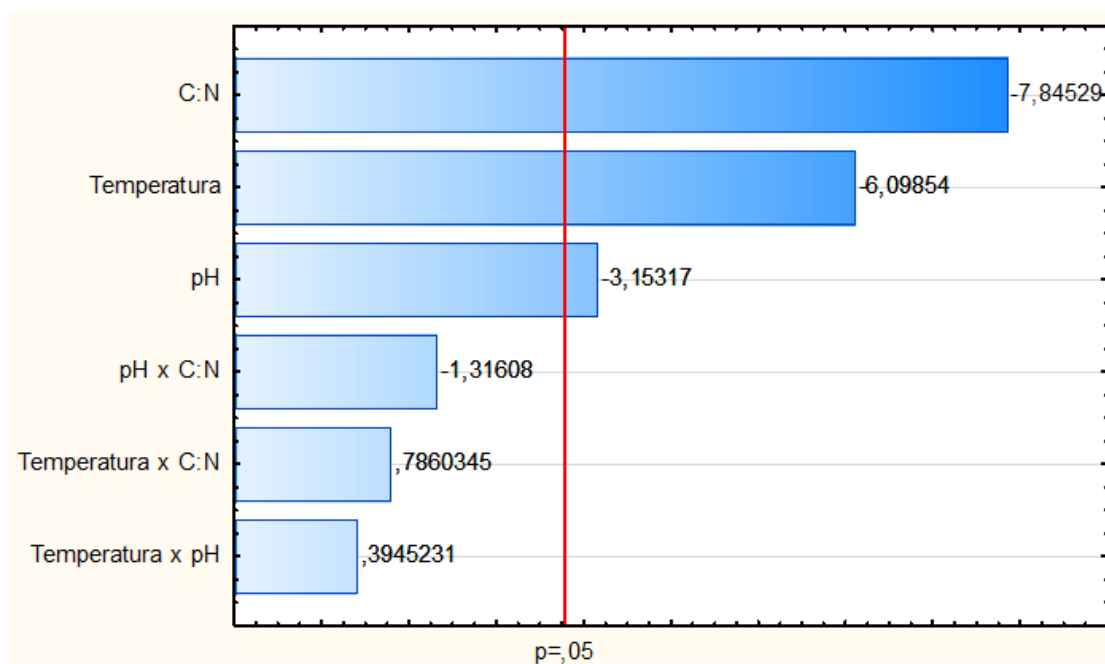
Tabela 17 – Valores de degradação total de hidrocarbonetos pelo consórcio C5 para os níveis das variáveis do planejamento experimental 2^3 .

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Relação C:N	Degradação total(%)
1	-1 (25)	-1 (6)	-1 (150:1)	93,53
2	1 (35)	-1 (6)	-1 (150:1)	87,68
3	-1 (25)	1 (8)	-1 (150:1)	91,87
4	1 (35)	1 (8)	-1 (150:1)	86,29
5	-1 (25)	-1 (6)	1 (50:1)	87,65
6	1 (35)	-1 (6)	1 (50:1)	82,72
7	-1 (25)	1 (8)	1 (50:1)	83,42
8	1 (35)	1 (8)	1 (50:1)	79,53
9	0 (30)	0 (7)	0 (100:1)	85,63
10	0 (30)	0 (7)	0 (100:1)	84,38
11	0 (30)	0 (7)	0 (100:1)	87,12

Pode-se observar que a variação nas condições dos ensaios pertencentes ao planejamento experimental ocasionou mudanças no percentual de degradação total de hidrocarbonetos, e identificou-se que as condições mais favoráveis para a degradação do *bunker* foram aquelas empregadas no ensaio 1 (Temperatura = 25°C, pH = 6, relação C:N = 150:1), ou seja, nos níveis inferiores. Como uma análise de significância das variáveis e de seus efeitos de interação é necessária para uma interpretação mais completa dos resultados obtidos, gerou-se um diagrama de Pareto (Figura 14). Neste diagrama, a linha vermelha representa o nível de significância de 95% ($p=0,05$). Quanto mais à direita desta linha estiverem as barras, mais estatisticamente significativos serão os efeitos das variáveis e da interação entre elas sobre o processo de biodegradação.

No diagrama de Pareto pode-se observar que os efeitos das variáveis relação C:N, temperatura e pH foram estatisticamente significativas, enquanto que os efeitos das interações entre as variáveis não apresentaram significância estatística ao nível de confiança de 95% ($p=0,05$).

Figura 14 – Diagrama de Pareto, mostrando os efeitos das variáveis estudadas e de suas interações ao nível de significância de 95% ($p=0,05$).



A relação C:N foi a variável que apresentou maior efeito sobre a degradação dos constituintes do *bunker* analisados, e juntamente com as variáveis temperatura e pH, apresentou valores negativos para os efeitos, o que significa que a variável resposta (% degradação) apresenta melhores resultados quando as variáveis independentes (relação C:N, temperatura e pH) foram mantidas no seu nível inferior (-1), o que explica o ensaio 1 ter apresentado o melhor resultado para a variável resposta (Tabela 17).

Curvas de contorno (Figuras 15 a 17) foram empregadas para examinar os efeitos das interações entre as variáveis sobre o processo de biodegradação, embora estes efeitos não tenham apresentado significância estatística, conforme o diagrama de Pareto (Figura 14). Nas figuras 15 a 17, a melhor resposta está concentrada na região vermelha mais escura da superfície e os valores -1, 0 e +1 na escala representam os níveis das variáveis codificadas.

Figura 15 – Curvas de contorno para o efeito do pH e da temperatura sobre a degradação do *bunker*.

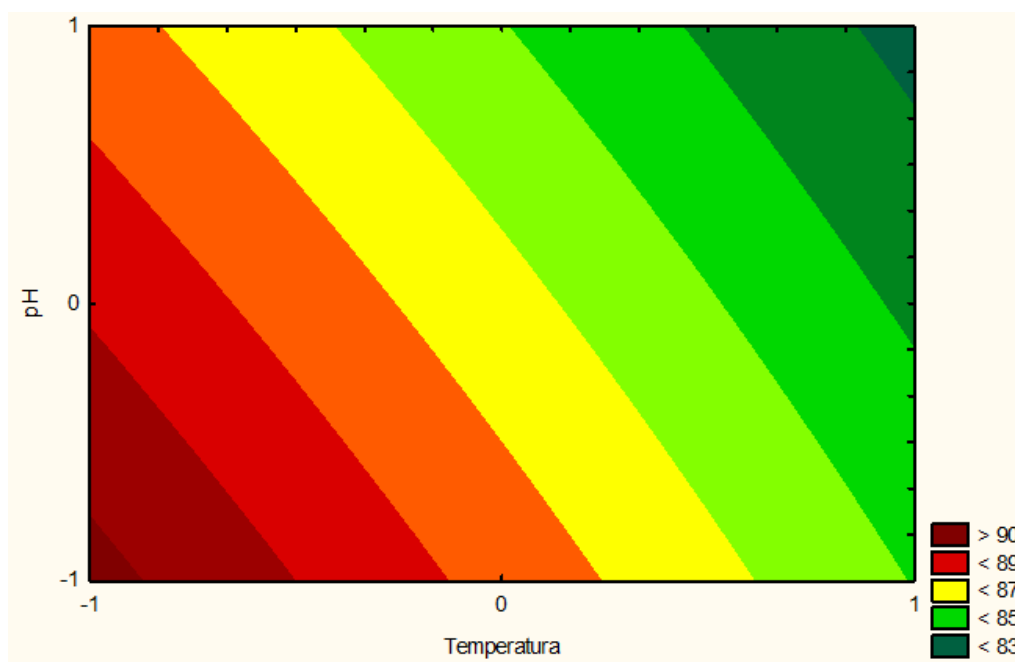


Figura 16 – Curvas de contorno para o efeito da relação C:N e da temperatura sobre a degradação do *bunker*.

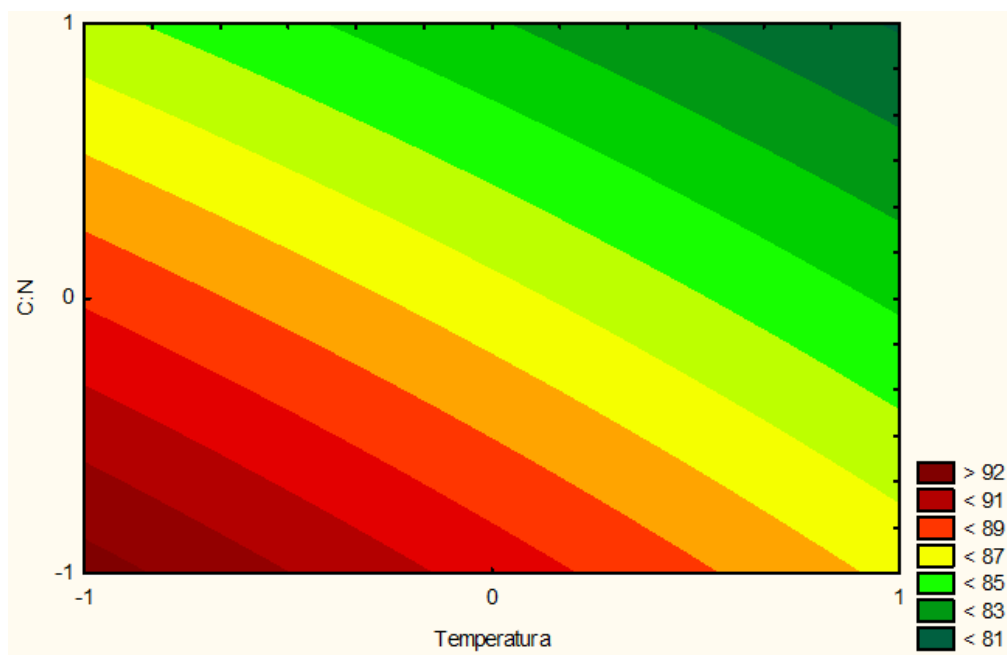
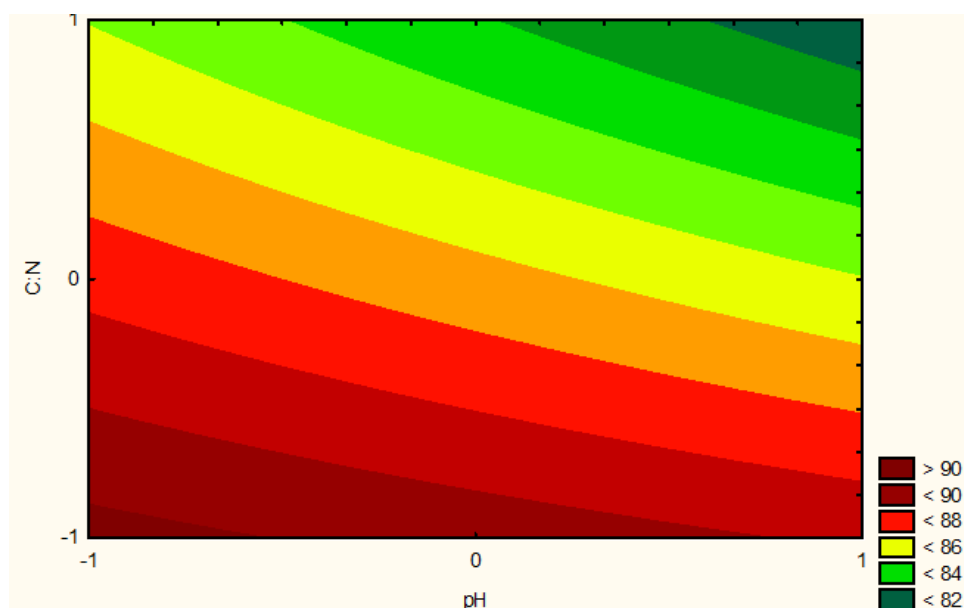


Figura 17 – Curvas de contorno para o efeito da relação C:N e do pH sobre a degradação do *bunker*.



Pode-se observar pelas curvas de contorno que, de um modo geral, a variável resposta (% degradação) obteve os melhores resultados quando as interações, entre as variáveis pH e temperatura; relação C:N e temperatura; e relação C:N e pH foram estabelecidas nos seus níveis inferiores, corroborando com os resultados obtidos no diagrama de Pareto.

Em diversos trabalhos, a relação C:N foi encontrada como um dos fatores que mais favoreceu o processo de degradação de hidrocarbonetos (MOLINA-BARAHONA et al., 2004; SASAKI et al., 2003; SILVA, 2012). No entanto, a suplementação de N para compor esta relação deve ser a mais apropriada para a concentração de óleo utilizada, pois um fornecimento excessivo pode ser desfavorável ao processo de degradação (MARTINS et al., 2012; TRINDADE et al., 2002; WALWORTH et al., 2007). Ururahy (1998), testando o efeito de duas relações C:N (50:1 e 100:1) sobre a degradação de diferentes concentrações de borra oleosa (5% e 10%) proveniente de refinaria, obteve, como resultado, que a maior relação C:N foi a que mais favoreceu a degradação dessa fonte oleosa. Trindade et al (2002) obtiveram o mesmo resultado quando testaram diferentes relações C:N (100:1,25 e 100:5) sobre a eficiência de remoção de hidrocarbonetos de um solo contaminado, e a menor relação provocou um efeito inibitório sobre o processo. No

presente estudo, é bem provável que os compostos recalcitrantes presentes no óleo combustível marítimo tenham mascarado a quantidade de C realmente assimilável, tornando a quantidade de N excessiva na relação C:N, alterando o “balanço” nutricional, o que explica a relação de 150:1 ter favorecido mais a degradação dos constituintes do *bunker*.

A temperatura do meio varia em função do ambiente e da sazonalidade, e afeta tanto a solubilidade quanto as propriedades do óleo derramado, refletindo, por sua vez, na resposta fisiológica dos micro-organismos envolvidos (DAS e CHANDRAN, 2011; GOMES, 2004; LEAHY e COLWELL, 1990). No caso da região portuária de Suape – PE, mais especificamente na área de estuário do rio Ipojuca cujas as linhagens deste trabalho foram isoladas, a temperatura média anual é em torno de 24 °C (KOENING et al., 2002), coincidindo com o valor apontado como o mais favorável pelo planejamento experimental (25 °C) para a degradação do *bunker*. SIVA (2012), também utilizando micro-organismos isolados da região de Suape – PE, investigou, como uma das variáveis de um planejamento fatorial 2³, a influência da temperatura (25 °C; 30 °C; e 35 °C; níveis inferior, ponto central e superior, respectivamente) sobre a degradação de óleo Diesel, obtendo também o nível inferior como o mais promissor para o processo.

Segundo Leahy e Colwell (1990), valores de pH entre 6,0 e 8,0 são os mais favoráveis para a ação de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo, embora os fungos sejam os mais tolerantes a condições ácidas. Pelas curvas de contorno mostradas nas Figuras 15 e 17, pode-se observar que os melhores resultados para a variável resposta, com relação ao pH, estão distribuídos, na sua maior parte, entre os níveis inferior (-1) e central (0), mostrando que embora esta variável tenha sido estatisticamente significativa, os valores para degradação estão melhor distribuídos entre seus níveis (principalmente entre pH 6,0 e 7,0, respectivamente), diferente do que se observa para as outras variáveis estudadas, sugerindo que esta variável oferece uma flexibilidade maior com relação à ação microbiana.

Com base nos efeitos significativos apresentados pelo Diagrama de Pareto, foi proposto um modelo parametrizado pelo método de regressão múltipla para descrever os dados experimentais, obtendo-se a seguinte equação:

$$Y = 86,34727 - 2,53125X_1 - 1,30875X_2 - 3,25625X_3 \quad (4)$$

Onde Y é a variável resposta (% degradação) e X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis independentes codificadas (relação C:N, temperatura e pH, respectivamente). A análise de variância (Tabela 18) traz os dados a respeito da significância estatística para este modelo. Na Tabela 19 podem ser visualizados os coeficientes de regressão que representam os valores das constantes relacionadas com os termos lineares do modelo, os quais foram considerados baseando-se nos testes t e p . Pode-se observar que somente os valores em vermelho para os coeficientes de regressão foram considerados no modelo proposto, uma vez que somente estes valores é que foram estatisticamente significativos a um nível de confiança $\alpha = 95\%$.

Tabela 18 – Teste ANOVA para os parâmetros estimados.

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Temperatura	51,2578	1	51,25781	37,19224	0,003657
pH	13,7026	1	13,70261	9,94250	0,034409
C:N	84,8253	1	84,82531	61,54853	0,001426
Temperatura x pH	0,2145	1	0,21451	0,15565	0,713326
Temperatura x C:N	0,8515	1	0,85151	0,61785	0,475798
pH x C:N	2,3871	1	2,38711	1,73207	0,258500
Erro	5,5127	4	1,37819		
Soma quadrática total	158,7516	10			

Valores em vermelho foram estatisticamente significativos para um nível de confiança $\alpha = 95\%$.

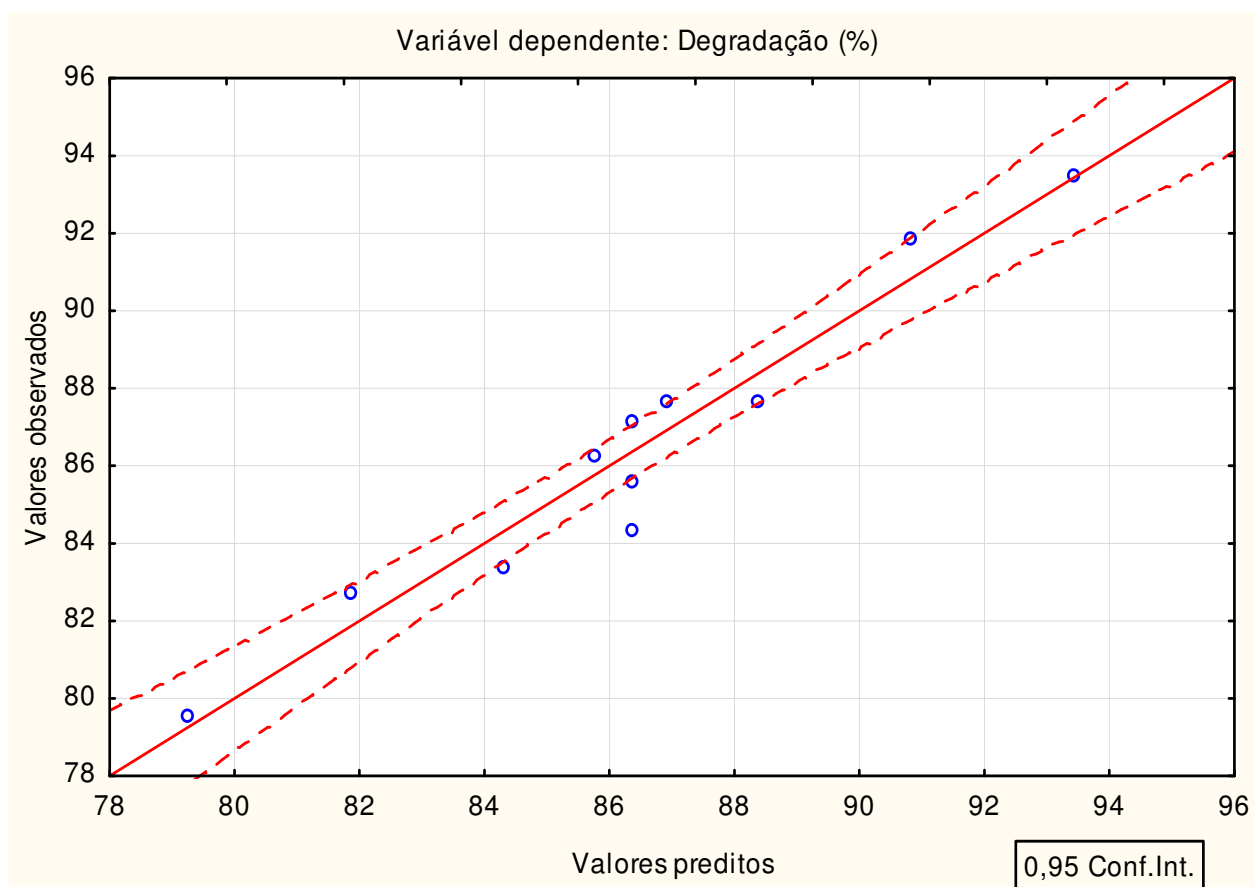
Tabela 19 – Coeficientes de regressão para o modelo proposto.

Fator	Coeficientes de regressão	Desvio padrão	Teste t	p
Média	86,34727	0,353963	243,9445	0,000000
Temperatura	-2,53125	0,415058	-6,0985	0,003657
pH	-1,30875	0,415058	-3,1532	0,034409
C:N	-3,25625	0,415058	-7,8453	0,001426
Temperatura x pH	0,16375	0,415058	0,3945	0,713326
Temperatura x C:N	0,32625	0,415058	0,7860	0,475798
pH x C:N	-0,54625	0,415058	-1,3161	0,258500

Valores em vermelho foram estatisticamente significativos para um nível de confiança $\alpha = 95\%$.

O modelo também foi examinado pelo coeficiente de determinação ajustado, $R^2 = 0,9193$, o qual sugere que 91,93% por cento das variações observadas são atribuídas às variáveis estudadas. Por outro lado, 8,07% das variações observadas não puderam ser explicadas pelo mesmo modelo, sugerindo que outras variáveis também poderiam ser investigadas com relação à influência na degradação dos constituintes do *bunker* analisados. A Figura 18 está mostrando os dados conflitados entre os valores da variável resposta preditos pelo modelo e os valores observados no planejamento experimental. Pôde-se observar que houve um bom nível de correlação entre os valores observados e previstos, indicando um bom ajuste do modelo proposto.

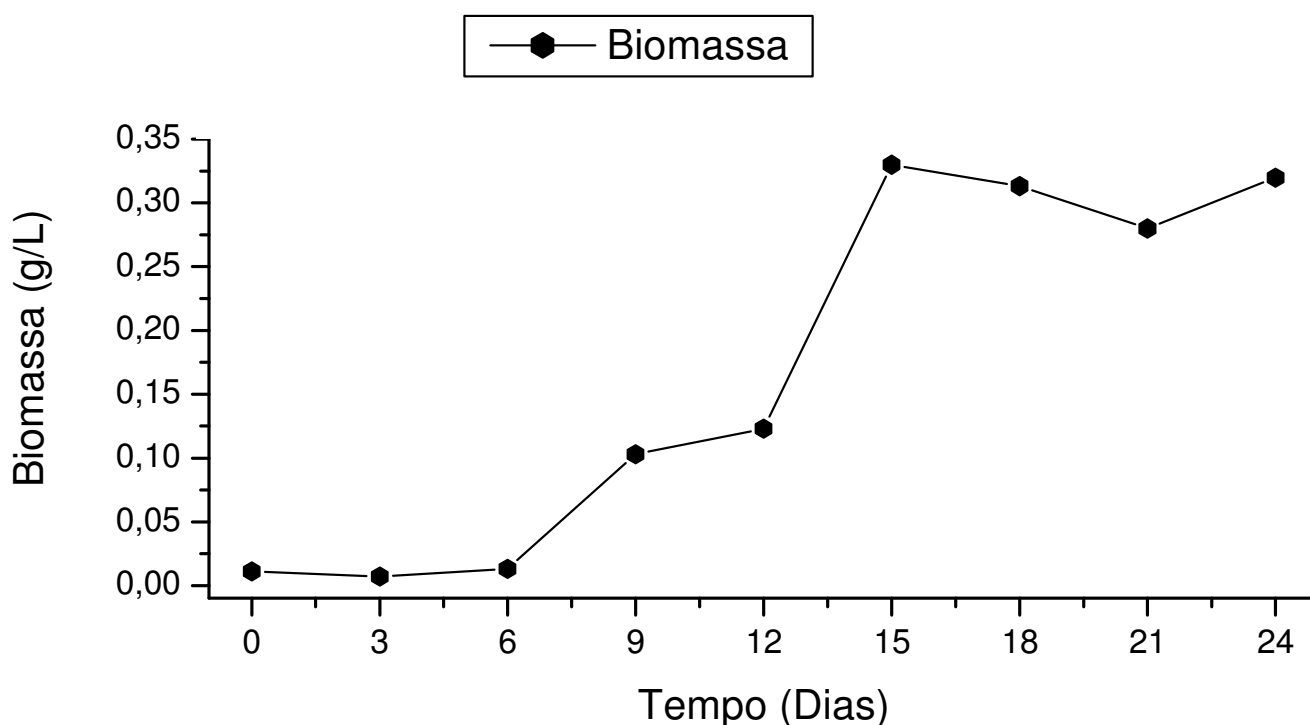
Figura 18 – Valores preditos pelo modelo proposto x valores observados.



5.9. Experimento em Biorreator

A Figura 19 mostra o perfil de crescimento do consórcio C5 durante o ensaio em biorreator.

Figura 19 – Perfil de crescimento do consórcio C5 no ensaio em biorreator contendo 3% (v/v) de *bunker* e 3% (p/v) de NaCl.



O perfil de biomassa para o consórcio C5 no ensaio em biorreator apresentou inicialmente uma fase *lag* durando pelo menos 6 dias, após esse período exibiu o que novamente sugere ser um crescimento diáuxico: passou de 0,013g/L para 0,103g/L no 9º dia, ou seja, um crescimento de quase 10 vezes, em seguida, uma fase lenta de crescimento até o 12º dia (0,123g/L), e outra vez um crescimento rápido até o 15º dia (0,33g/L). Posteriormente sofreu um pequeno declínio até o 21º dia (0,28g/L), e depois ascendeu novamente, alcançando o valor de 0,32g/L ao final de 24 dias de experimento.

Possivelmente a fase *lag* observada no início do crescimento esteve mais relacionada ao aumento de escala, proporcionado pelo experimento em biorreator,

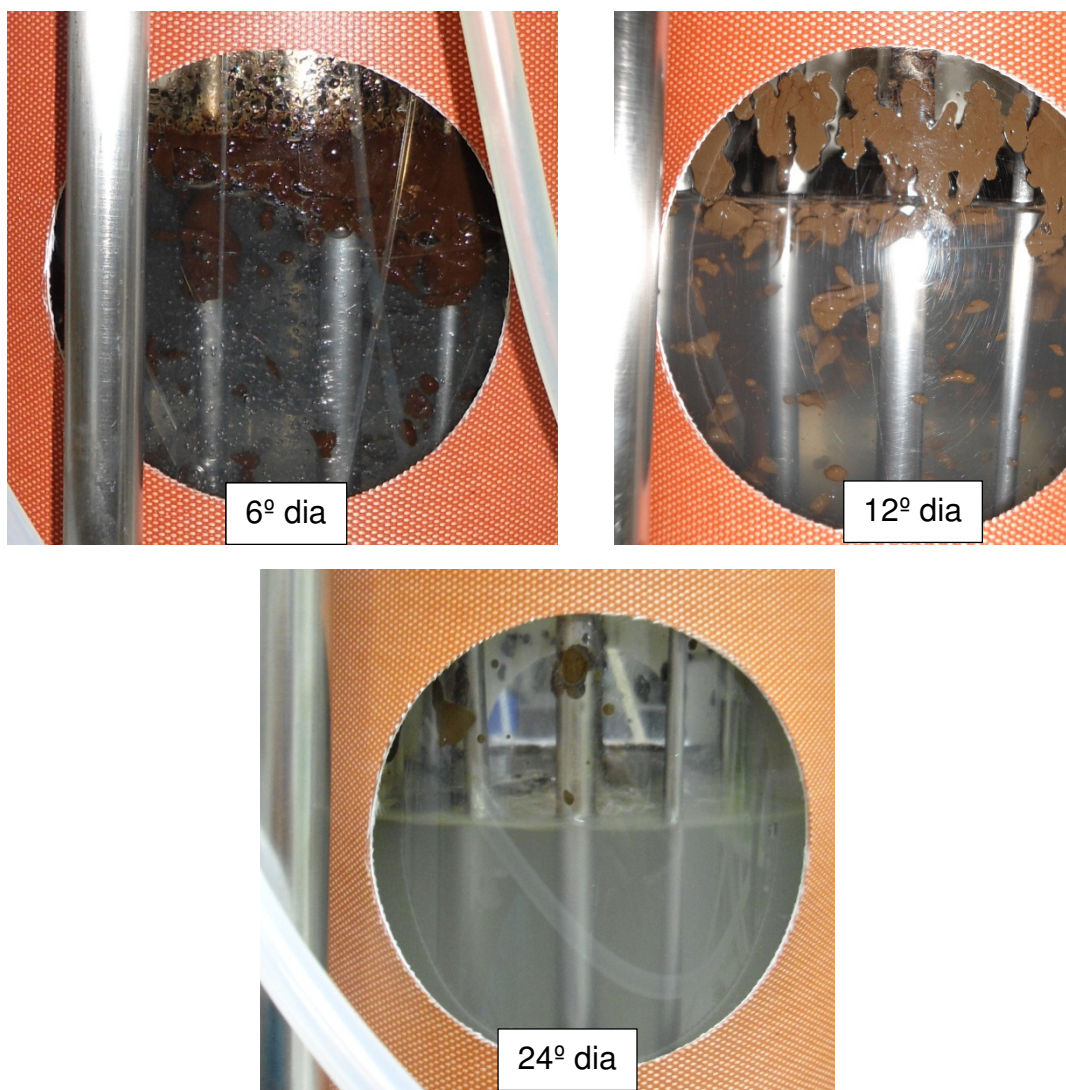
visto que o consórcio C5 já havia sido aclimatado ao *bunker* e mostrou-se bem adaptado no ensaio prévio de degradação, sem evidência de uma fase *lag* aparente. Isto pode estar relacionado com os efeitos de heterogeneidade e de limite de difusão intrínsecos de um aumento de escala (KRISTENSEN et al, 2010), além do fato de o consórcio C5 não ter sido gradualmente submetido a um aumento de escala. Mahanty et al (2008), avaliando a degradação de pireno pela linhagem *Mycobacterium frederiksbergense* em biorreator de sistema bifásico, também atribuiu a fase *lag* de 7 dias ao sistema utilizado, uma vez que a bactéria já havia sido avaliada quanto à degradação do pireno, apresentando excelente desempenho.

O pequeno declínio da população microbiana, observado a partir do 15º dia, está muito provavelmente relacionado ao aparecimento de moléculas biotransformadas nas fases anteriores, resultantes do metabolismo microbiano, possivelmente com acentuada toxicidade (MELO, 2004).

No experimento prévio de degradação de *bunker* em frascos (Figura 11), o consórcio C5 alcançou crescimento máximo de 0,21g/L no 35º dia de ensaio enquanto que em biorreator (Figura 19), o mesmo consórcio já havia alcançado 0,33g/L somente no 15º dia. Como pode ser observado, o consórcio C5 teve seu crescimento otimizado no sistema em biorreator em comparação ao ensaio prévio de degradação em frascos, além de haver uma redução no tempo de biotratamento. Isto demonstra a vantagem de se empregar sistemas de biorreator, os quais assumem as configurações desejadas e, assim, permitem um maior controle das condições otimizadas que mais favorecem ao bioprocessamento (SILVA, 2012).

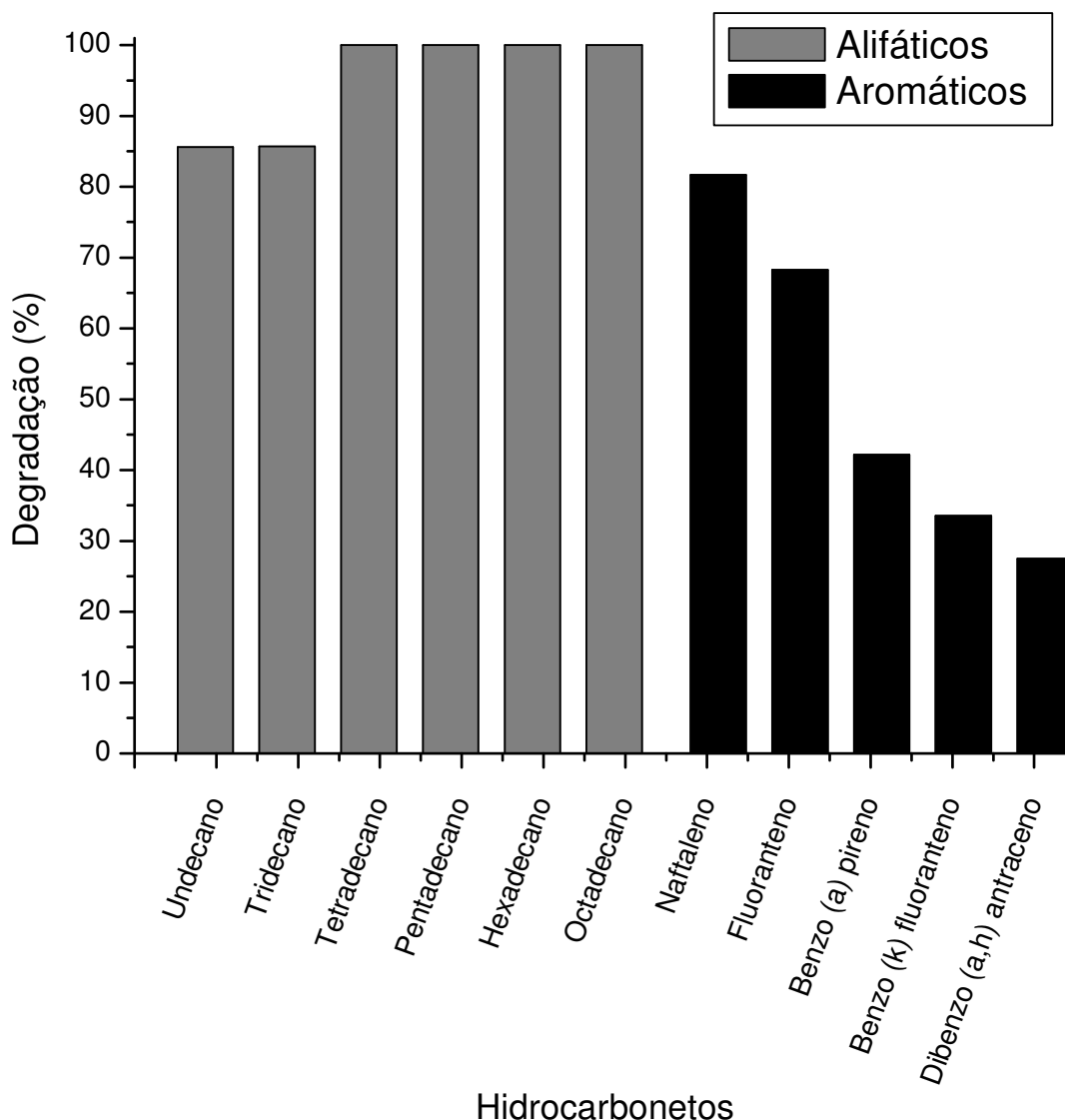
A figura 20 mostra o aspecto do *bunker* ao longo do ensaio em biorreator. Pôde-se observar que houve uma mudança de coloração gradativa do *bunker* para marrom, além de uma diminuição notável deste óleo no meio. Melo (2004), realizando o biotratamento de borra oleosa em biorreator, também observou uma modificação do meio, para marrom escuro após o 5º dia de ensaio. Segundo o autor, essa mudança foi um forte indicativo de intenso crescimento microbiano.

Figura 20 – Aspecto do *bunker* submetido ao biotratamento em biorreator no 6º, 12º e 24º dia de experimento. Notar a mudança de coloração do *bunker* ao longo do ensaio.



A Figura 21 mostra perfil de degradação de constituintes alifáticos e aromáticos ao final do ensaio em biorreator.

Figura 21 – Perfil de degradação de constituintes alifáticos e aromáticos do ensaio em biorreator.



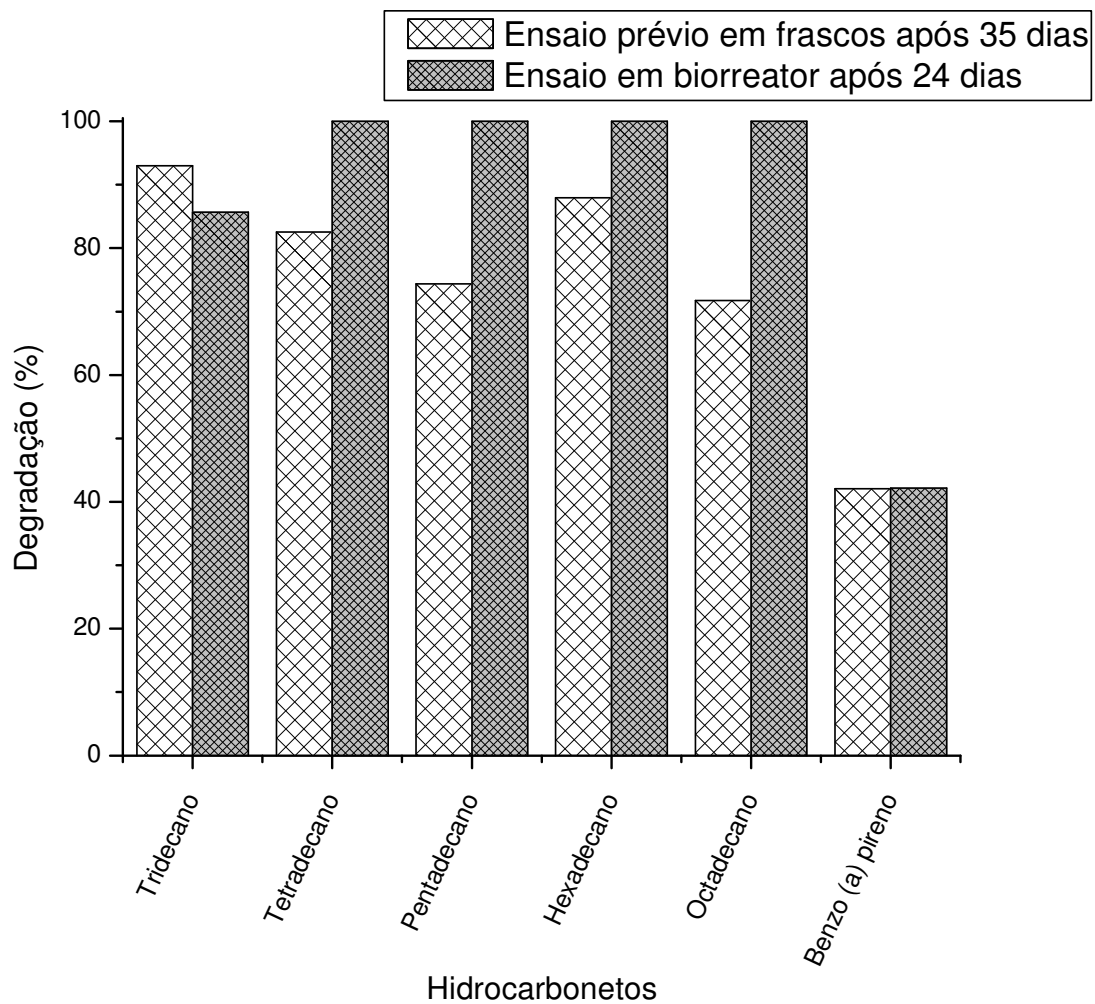
Pôde-se observar que o consórcio C5 priorizou a degradação dos constituintes alifáticos do que os aromáticos, apresentando mesmo comportamento que no ensaio prévio. Para os constituintes alifáticos: tetradecano, pentadecano, hexadecano e octadecano, a degradação obtida foi de 100% ao final do experimento, enquanto que para undecano e tridecano a degradação foi de 85,60% e 85,69%, respectivamente. Para os constituintes aromáticos, a degradação foi de 81,66% para naftaleno, 68,27% para o fluoranteno, 42,15% para o benzo (a) pireno, 33,51% para o benzo (k) fluoranteno e de 27,47% para o dibenzo (a,h) antraceno. Para estes últimos, houve uma sucessão aparente na degradação desses HPAs em

função do número de anéis na seguinte ordem: Naftaleno (2 anéis) > Fluoranteno (4 anéis) > Benzo (a) pireno (5 anéis) > Benzo (k) fluoranteno (5 anéis) > Dibenzo (a,h) antraceno (5 anéis). Como constatado, a biodegradação dos HPAs está inversamente relacionada ao número de anéis fusionados, o que por sua vez está relacionado ao peso molecular destes compostos (ARULAZHAGAN et al., 2010; SALLEH et al., 2003).

Analisando a Figura 22, que compara o desempenho do consórcio C5 no ensaio prévio de degradação em frascos e em biorreator, é possível observar uma degradação mais expressiva dos constituintes do *bunker* no ensaio em biorreator, apontando para uma otimização do processo.

Thorpe e Hellenbrand (1987) avaliaram a biodegradação de *bunker* C em reator de sedimento marinho por micro-organismos da água do mar durante 11 meses de experimento, à temperatura de 15°C. No estudo, foi incorporado, previamente, concentrações de 1 a 3% de *bunker* ao sedimento, o qual foi submetido ao biotratamento. Como resultado, obteve-se uma redução de apenas 5% do conteúdo total de *bunker*, com taxa diária de degradação de 12mg/m², atribuída, em parte, tanto à baixa temperatura, quanto aos próprios hidrocarbonetos, alguns dos quais reportados como tóxicos para alguns tipos de bactérias, segundo os próprios autores, demonstrando a importância de uma aclimação prévia das linhagens para este tipo de abordagem.

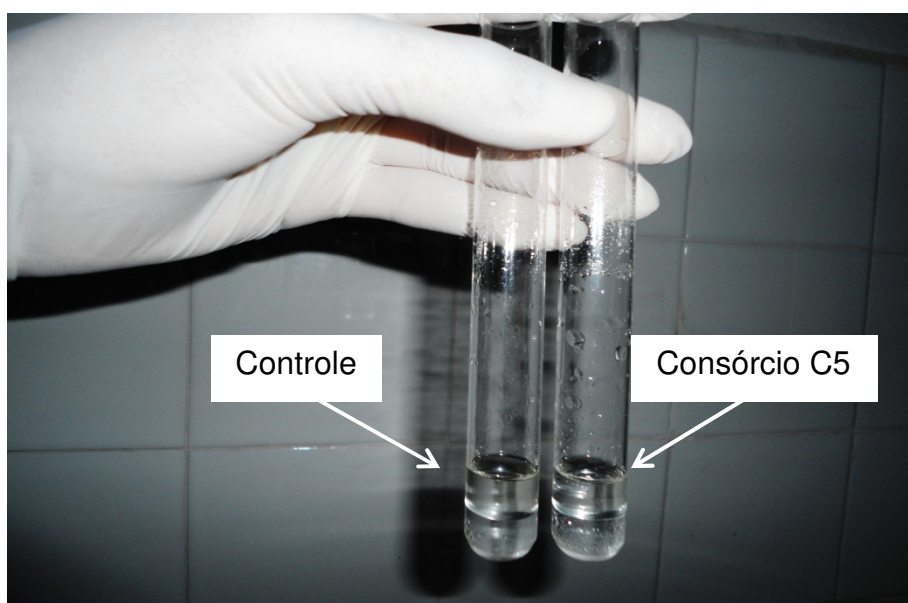
Figura 22 – Comparação da degradação de hidrocarbonetos constituintes do bunker no ensaio prévio em frascos e no experimento em biorreator.



5.8. Índice de emulsificação

Nenhuma atividade emulsificante das linhagens isoladas ou do consórcio C5 foi detectada em qualquer dos ensaios realizados neste trabalho, conforme é observado na Figura 23.

Figura 23 – Resultado do teste de emulsificação. Nenhuma formação de emulsão aparente.



Zajic et al (1974) estudaram o efeito da salinidade simulada da água do mar (NaCl 3%) sobre a emulsificação de *bunker* C. Após 24h de teste, com o sobrenadante livre de células da bactéria B2 previamente cultivada por 7 dias, observaram que a dispersão do *bunker* tornou-se mais difícil nessa concentração salina. Segundo os mesmo autores, níveis elevados de sal tendem a inibir o processo de emulsificação, embora mesmo que nessas concentrações ela possa ocorrer. Desse modo, os resultados obtidos neste trabalho não permitem afirmar com segurança que as linhagens do consórcio C5 não produzem nenhum tipo de emulsificante, pois, é possível que, mesmo que haja produção, esta pode está sendo menos visível por influência da salinidade do meio de cultivo.

6. CONCLUSÕES

- Os testes de antibiose permitiram compor oito diferentes consórcios microbianos mistos, constituídos por bactérias e fungos sem interação antagônica;
- Os testes com os indicadores redox DCPIP e TTC mostraram-se eficiente na seleção de um consórcio microbiano misto promissor quanto à biodegradabilidade de *bunker*;
- Os valores de biomassa e de pH obtidos nos ensaios de aclimação sugerem que as linhagens que compõem o consórcio C5 adaptaram-se bem às concentrações de 3% da fonte oleosa e de 3% de NaCl;
- O consórcio C5 selecionado mostrou um comportamento diáuxico para o crescimento na condição de 3% de *bunker* e 3% de salinidade, apresentando uma biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos analisados superior a 70% e a 30%, respectivamente;
- Com o planejamento fatorial 2^3 foi possível selecionar as melhores condições experimentais de temperatura, pH e relação C:N, resultando na maior degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio C5;
- Nas condições do experimento em biorreator, verificou-se também um comportamento diáuxico para o crescimento do consórcio C5 em 3% de *bunker* e 3% de NaCl, obtendo-se uma ótima degradação de hidrocarbonetos alifáticos e expressiva degradação dos hidrocarbonetos aromáticos;
- Não foi detectada nenhuma atividade emulsificante das linhagens ou do consórcio C5 em qualquer dos ensaios realizados;
- O consórcio C5 tem potencialidade para degradar o óleo combustível marítimo *bunker MF-380*, e pode ser empregado como agente biorremediador de ambientes poluídos por este combustível.

REFERÊNCIAS

AAMAND, J.; JORGENSEN, C.; ARVIN, E.; JENSEN, B. K. Microbial adaptation to degradation of hydrocarbons in polluted and unpolluted groundwater. **Journal of Contaminant Hydrology**. v. 4, p. 299 – 312, 1989.

ALVAREZ, V. M. **Bioprospecção da população bacteriana halotolerante e biodegradadora de óleo presente em solo impactado na região de Panelas, SE**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2007.

ARA, K.; NOJIMA, K.; HIROMI, J. Acute Toxicity of Bunker A and C Refined Oils to the Marine Harpacticoid Copepod *Tigriopus japonicus* Mori. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 69, p. 104 – 110, 2002.

ARULAZHAGAN, P.; VASUDEVAN, N.; YEOM, I. T. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. **International Journal of Environmental Science and Technology**. v.4, n.7, p. 639 – 652, 2010.

ATLAS, R. M. **Handbook of media for environmental microbiology**. New York: CRC Press, p.81,489,491, 1995.

ATLAS, R. M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. **Microbial Reviews**. v. 45, p. 180 – 209, 1981.

BAKER, K. H.; HERSON, D. S. **Bioremediation**. McGraw-Hill, Inc. p. 374, 1994.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, p. 493-496. 1966.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R.; BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 1203 – 1222, 2012.

CHEN, L. I.; CHEN, Y.; CHEN, L.; CHEN, W. Study on fungi-bacteria augmented remediation of petroleum contaminated soil from Northwest of China. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. v. 7, p. 750 – 753, 2009.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface –active gents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, p. 224 – 229, 1987.

COULON, F.; AWADI, M. A.; COWIE, W.; MARDLIN, D.; POLLARD, S.; CUNNINGHAM, C.; RISDON, G.; ARTHUR, P.; SEMPLE, K. T.; PATON, G. I. When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial. **Environmental Pollution**. v.158, p. 3032 – 3040, 2010.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**. v. 2011, p. 1 – 13, 2011.

DIAZ, M. P.; GRIGSON, S. J. W.; PEPPIATT, C. J.; GRANT BURGESS, J. Isolation and characterization of novel hydrocarbondegrading Euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. **Marine Biotechnology**. v.2, p.522 – 532, 2000.

FARIAS, C. O. **Avaliação da degradação de óleo em sedimentos de manguezal: Estudo de caso, Baía de Guanabara, RJ**. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC –Rio). Rio de Janeiro. 2006.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 11, p. 271 – 279, 2000.

GERTLER, C.; NÄTHER, D. J.; GERDTS, G.; MALPASS, M. C.; GOLYSHIN, P. N. A. Mesocosm Study of the Changes in Marine Flagellate and Ciliate Communities in a Crude Oil Bioremediation Trial. **Microbial Ecology**. v.60, p.180 – 191, 2010.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 54, p. 61 – 67. 2004.

GOMES, E. B. **Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário e Suape – PE**. 109 p. Dissertação - Programa de Biotecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

GOMES, E; B.; SORIANO, A. U.; MIRANDA, R. C. M.; SOUSA, M. F. V. Q.; PEREIRA JR, N. Biodegradation of Stored jet Fuel by a *Nocardia* sp. Isolated from Contaminated Soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 52, n. 5, p.1279 – 1284, 2009.

HADIBARATA, T.; TACHIBANA, S. Microbial Degradation of Crude Oil by Fungi Pre-Grown on Wood Meal. **Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Environmental Research in Asia**. p. 317–322, 2009.

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

HARAYAMA, S.; KASAI, Y.; HARA, A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 15, p. 205 – 214, 2004.

HUA, J. Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy. **Ocean Engineering**. v. 33, p. 152–167, 2006.

KIM, G. H.; PARK, G. T.; SON, H. J.; CHA, M. S.; LEE, K. H.; LEE, S. J. Biodegradation of Bunker – A oil by *Acinetobacter sp.* EL – 081K. **Proceedings of the Korean Enviromental Sciences Society Conference.** p. 143 – 146, 2000.

KOENING, M. L.; ESKINAZI-LEÇA, E.; NEUMANN-LEITÃO, S.; MACÊDO, S. J. Impactos da construção do Porto de Suape sobre a comunidade fitoplanctônica no estuário do rio Ipojuca (Pernambuco – Brasil). **Acta Botanica Brasilica.** v. 16, n. 4, p. 407 – 420, 2002.

KRISTENSEN, A. H.; HENRIKSEN, K.; MORTENSEN, L.; SCOW, K. M.; MOLDRUP, P. Soil Physical Constraints on Intrinsic Biodegradation of Petroleum Vapors in a Layered Subsurface. **Vadose Zone Journal February.** v. 9, n.1, p. 137–147, 2010.

LALY, C.M. & PARSONS, T. R. **Biological Oceanography – An introduction.** Eds. Butterworth Heinemann. University of British Columbia, Vancouver, Canada. 1993.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environmental. **Microbial Reviews.** p. 305 – 315, 1990.

LEE, M.; KIM, J.; KIM, I. In-situ biosurfactant flushing, coupled with a highly pressurized air injection, to remediate the bunker oil contaminated site. **Geosciences Journal.** v. 15, n. 3, p. 313 – 321, 2011.

MAHANTY, B.; PAKSHIRAJAN, K.; DASU, V. V. Biodegradation of pyrene by *Mycobacterium frederiksbergense* in a two-phase partitioning bioreactor system. **Bioresource Technology.** v. 99, p. 2694 – 2698, 2008.

MARTINS, F. F.; FERREIRA, T. F.; AZEVEDO, D. A.; COELHO, M. A. Z. Evaluation of Crude Oil Degradation by *Yarrowia lipolytica*. **Chemical Engineering Transactions.** v. 27, p. 223 – 228, 2012.

MELO, J. M. **Avaliação do impacto do aumento das concentrações celulares na biodegradação de resíduos oleosos de petróleo.** Dissertação de Mestrado.

Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. UFRJ. Rio de Janeiro. 2004.

MENICONI, M. F. G. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixes.** Tese de Doutorado. Pós-graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Rio Grande do Norte. 2007.

MIRANDA, R. C.; SOUZA, C. S.; GOMES, E. B.; LOVAGLIO, R. B.; LOPES, C. E.; SOUSA, M. F. V. Q. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco – Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v. 50, n. 1, p.147-152. 2007.

MOHR, F. C.; LASLEY, B.; BURSIAN, S. Chronic Oral Exposure to Bunker C Fuel Oil Causes Adrenal Insufficiency in Ranch Mink (*Mustela vison*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology.** v. 54, p. 337– 347, 2008.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology.** v. 27, p. 165 – 175, 2004.

MULKINS-PHILLIPS, G. J.; STEWART, J. E. Effect of Environmental Parameters on Bacterial Degradation of Bunker C Oil, Crude Oils, and Hydrocarbons. **Applied Microbiology.** p. 915 – 922, 1974.

NORMAN, R. S.; MOELLER, P.; MCDONALD, T. J.; MORRIS, Pamela J. Effect of Pyocyanin on a Crude-Oil-Degrading Microbial Community. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 9, p. 4004 – 4011, 2004.

PAIXÃO, S. M.; SÀÁGUA, M. C.; TENREIRO, R.; ANSELMO, A. M.; Biodegradability Testing Using Standardized Microbial Communities as Inoculum. **Environmental Toxicology.** v. 21, n. 2, p. 131 – 40, 2006.

PETROBRAS. **Lista de combustíveis marítimos.** Disponível em < <http://www.br.com.br/> > acesso em: 07 de abril de 2013.

RAIMUNDO, R. S. e RIZZO, A. C. L. “Utilização de Biorreatores no Tratamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo”. **X Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT.** p. 205 – 219, 2002.

RASHID, M. A. Degradation of Bunker C oil under different coastal environments of Chedabucto Bay, Nova Scotia. **Estuarine and Coastal Marine Science.** v. 2, p. 137 – 144, 1974.

RICHMOND, S. A.; LINDSTROM, J.E.; BRADDOCK, J. F. Effects of Chitin on Microbial Emulsification, Mineralization Potential, and Toxicity of Bunker C Fuel Oil. **Marine Pollution Bulletin.** v. 42, n9, p. 773 – 779, 2001.

SADABA, R. B.; SARINAS, B. G. S. Fungal communities in bunker C oil-impacted sites off southern Guimaras, Philippines: a post-spill assessment of Solar 1 oil spill. **Botanica Marina.** v. 53, p. 565 – 575, 2010.

SALLEH, A. B.; GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z.A.; BASRI, M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. **Indian Journal of Biotechnology.** v. 2, p. 411 – 425, 2003.

SARIASLANI, F. S.; HARPER, D. B.; HIGGINS, I. J. Microbial degradation of hydrocarbons. Catabolism of 1-phenylalkanes by *Nocardia salmonicolor*. **Biochemical Journal.** v. 140, p. 31 – 45, 1974.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminates Soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution.** v.136, p.187 – 195, 2005.

SASAKI, N.; SUEHARA, K.; KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANG, T. Effects of C/N ratio and pH of raw materials on oil degradation efficiency in a compost fermentation process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 96, n. 1, p. 47– 52, 2003.

SATHISHKUMAR, M.; BINUPRIYA, A. R.; BAIK, S.; YUN, S.; Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. **Clean**. v. 36, n.1, p. 92 – 96, 2008.

SCHWARTZ, J. A.; ALDRIDGE, B. M.; STOTT, J. L.; MOHR, F. C. Immunophenotypic and functional effects of bunker C fuel oil on the immune system of American mink (*Mustela vison*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 101, p. 179 – 190, 2004.

SILVA, D. S. P. **Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído por atividade petrolífera**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. UFPE. Recife. 2012.

SILVA, E. P. **Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guamaré-RN**. Dissertação de Mestrado. 119p. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. UFRN. Natal. 2004.

SOUZA, F. A. S. D. **Biodegradação de óleo Diesel por *Candida lipolytica* em água do mar**. Dissertacao de Mestrado. 175p. Programa de Pos-Graduacao em Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Catolica de Pernambuco. Recife. 2009.

STROBEL, C. J. & BRENOWITZ, A.H. Effects of Bunker C oil on juvenile horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*). **Estuaries**. v. 4, p. 157 – 159, 1981.

THORPE, J. W.; HELLENBRAND, K. E. **Macrobial degradation of hydrocarbon mixtures in a marine sediment under different temperature regimes**. Environmental Studies Research Funds Report 083. Ottawa. 76 p. 1987.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; LEMOS, J. L. S.; MILLIOLI, V. S.; SORIANO, A. U. **Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil.** In: 9th International Petroleum Environmental Conference, New Mexico, USA, 2002.

TROQUEST, J.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C.G. Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** v. 13, p. 103 – 112, 2003.

TYAGI, M.; FONSECA, M. M.; CARVALHO, C. C.; Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation.** v. 22, p. 231– 241, 2011.

URURAHY, A. F. P. **Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo.** Tese de doutorado em Ciências. Escola de Química, UFRJ. Rio de Janeiro. 1998.

WALWORTH, J.; POND, A.; SNAPE, I.; JOHN, R.; FERGUSON, S.; HARVEY, P.; Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. **Cold Regions Science and Technology.** v. 48, p. 84 – 91, 2007.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology.** v.6, n. 24, p. 2735 – 2739, 2007.

ZAJIC, J.E.; SUPPLISSON, B.; VOLESKY, B. Bacterial Degradation and Emulsification of No. 6 Fuel Oil. **Environmental Science & Technology.** v. 8, n7. p. 664 – 668, 1974.

ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; TAO, F.; XU, Ping. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. **Bioresource Technology.** v. 102, p. 4111 – 4116, 2011.

**ANEXO A – Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ
do ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

Página 1 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

1 - IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

Nome do produto: ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380
Código interno de identificação: BR0361
Nome da empresa: PETROBRAS DISTRIBUIDORA S.A.
Endereço: Rua General Canabarro 500
20271-900 - Maracanã - Rio de Janeiro (RJ).
Telefone: 0800 78 9001
Telefone para emergências: 08000 24 44 33

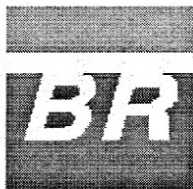
2 - IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

PERIGOS MAIS IMPORTANTES

Líquido e vapores inflamáveis. Causa irritação moderada à pele. Suspeito de causar câncer. Pode causar irritação respiratória (irritação da área respiratória). Pode causar sonolência e vertigem (efeitos narcóticos). Pode ser nocivo em caso de ingestão e por penetração das vias respiratórias. Este produto contém gás sulfídrico, extremamente inflamável e tóxico.

EFEITOS DO PRODUTO

- Efeitos adversos à saúde humana: Pode causar irritação do trato gastrointestinal. O produto pode irritar as vias aéreas superiores e causar efeitos narcóticos se inalado. Causa irritação à pele e pode causar leve irritação ocular. Pode causar câncer. Pode causar danos se aspirado aos pulmões.
- Efeitos ambientais: Este produto pode apresentar perigo para o meio ambiente em casos de grandes derramamentos.
- Perigos físicos e químicos: Líquido e vapores inflamáveis.
- Perigos específicos: Produto inflamável. Recipientes podem explodir quando aquecidos. Quando aquecido pode liberar vapores tóxicos e irritantes.
- Principais sintomas: Vermelhidão e lacrimejamento oculares. Vermelhidão e dor na pele. Tosse, dor de garganta e falta de ar. Dor de cabeça, tontura, sonolência, confusão mental e perda de consciência. Náuseas e vômitos.
- Classificação de perigo do produto: Líquidos inflamáveis – Categoria 3
Corrosivo/irritante à pele – Categoria 3
Carcinogenicidade – Categoria 2
Toxicidade sistêmica ao órgão-alvo após única exposição – Categoria 3
Perigo por aspiração – Categoria 2
- Sistema de classificação adotado: Norma ABNT-NBR 14725-Parte 2:2009.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

Página 2 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

Adoção do Sistema Globalmente Harmonizado para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, ONU.

- Visão geral das emergências:

LÍQUIDO INFLAMÁVEL E PERIGOSO PARA A SAÚDE HUMANA.

ELEMENTOS APROPRIADOS DA ROTULAGEM

- Pictogramas



- Palavra de advertência

CUIDADO

- Frases de perigo:

Líquido e vapores inflamáveis.

Causa irritação moderada à pele.

Suspeito de causar câncer.

Pode causar irritação respiratória (irritação da área respiratória).

Pode causar sonolência e vertigem (efeitos narcóticos).

Pode ser nocivo em caso de ingestão e por penetração das vias respiratórias.

- Frases de precaução:

Mantenha afastado de calor [faíscas] [e chama] [não fume].

Armazene em local fresco/baixa temperatura, em local bem ventilado [seco] [afastado de fontes de calor e de ignição].

Nunca aspire (poeira, vapor ou névoa).

Quando em uso não [fume] [coma] [ou beba].

Não use em local sem ventilação adequada.

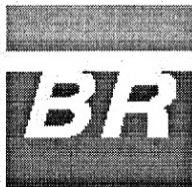
Evite contato com olhos e pele.

Use equipamento de proteção individual apropriado.

Se ingerido, lave a boca com água [somente se a vítima estiver consciente].

Em caso de indisposição, consulte um médico.

Use meios de contenção para evitar contaminação ambiental.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

Página 3 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

Não permita o contato do produto com corpos d'água.

3 - COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÃO SOBRE OS INGREDIENTES

>>>SUBSTÂNCIA

Nome químico ou comum:

Hidrocarbonetos.

Sinônimo:

Marine fuel 380, MF-380

Número de Registro CAS:

68476-33-5

Impurezas que contribuam para o perigo:

Ingredientes	Concentração (%)	CAS
Óleo combustível 1A	86,5 – 95,5 (v/v)	NA
Óleo diesel marítimo.	4,5 – 13,5 (v/v)	NA

4 - MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

Inalação:

Remova a vítima para local arejado e mantenha-a em repouso. Monitore a função respiratória. Se a vítima estiver respirando com dificuldade, forneça oxigênio. Se necessário aplique respiração artificial. Procure atenção médica. Leve esta FISPQ.

Contato com a pele:

Remova as roupas e sapatos contaminados. Lave a pele exposta com grande quantidade de água, por pelo menos 15 minutos. Procure atenção médica. Leve esta FISPQ.

Contato com os olhos:

Lave com água corrente por pelo menos 15 minutos, mantendo as pálpebras abertas. Retire lentes de contato quando for o caso. Procure atenção médica imediatamente. Leve esta FISPQ.

Ingestão:

Lave a boca da vítima com água em abundância. NÃO INDUZA O VÔMITO. Procure atenção médica. Leve esta FISPQ.

Proteção do prestador de socorros e/ou notas para médico:

Evite contato com o produto ao socorrer a vítima. Mantenha a vítima em repouso e aquecida. Não forneça nada pela boca a uma pessoa inconsciente. O tratamento sintomático deve compreender, sobretudo, medidas de suporte como correção de distúrbios hidroeletrólitos, metabólicos, além de assistência respiratória.

5 - MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO

Meios de extinção apropriados:

Produto inflamável. Compatível com pó químico, espuma resistente a álcool, dióxido de carbono (CO₂) e neblina de água.

Meios de extinção não recomendados:

Jatos d'água. Água diretamente sobre o líquido em chamas.

Perigos específicos no combate:

Recipientes podem explodir quando aquecidos. Vapores podem se dispersar e atingir fontes de ignição e provocar chamas de



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

Página 4 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

retrocesso. Risco de explosão em ambientes fechados. Este produto contém gás sulfídrico, extremamente inflamável.

Métodos especiais de combate:

Contêineres e tanques envolvidos no incêndio devem ser resfriados com jatos d'água.

Proteção de bombeiros/brigadistas:

Equipamento de proteção respiratória do tipo autônomo (SCBA) com pressão positiva e vestuário protetor completo. Em locais fechados, utilize equipamento de segurança com sistema de ar autônomo.

6 - MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO

Precauções pessoais

- Remoção de fontes de ignição:

Produto inflamável. Remova todas as fontes de ignição. Impeça faíscas ou chamas. Não fume.

- Prevenção da inalação e do contato com a pele, mucosas e olhos:

Não toque nos recipientes danificados ou no material derramado sem o uso de vestimentas adequadas. Evite inalação, contato com os olhos e com a pele. Utilize equipamento de proteção individual conforme descrito na Seção 8.

Precauções ao meio ambiente:

Evite que o produto derramado atinja cursos d'água e rede de esgotos.

Métodos para limpeza

- Procedimentos a serem adotados:

Colete o produto derramado e coloque em recipientes próprios. Adsorva o produto remanescente, com areia seca, terra, vermiculite, ou qualquer outro material inerte. Coloque o material adsorvido em recipientes apropriados e remova-os para local seguro.

- Prevenção de perigos secundários:

Não descarte diretamente no meio ambiente ou na rede de esgoto. A água de diluição proveniente do combate ao fogo pode causar poluição.

7 - MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

MEDIDAS TÉCNICAS APROPRIADAS PARA O MANUSEIO

- Precauções para o manuseio seguro:

Manuseie o produto em local ventilado ou com sistema geral de exaustão local. Evite contato com materiais incompatíveis. Não fume.

- Prevenção da exposição do trabalhador:

Evite inalação e o contato com a pele, olhos e roupas. Evite respirar vapores/névoas do produto. Utilize equipamento de proteção individual ao manusear o produto, descritos na Seção 8.

- Precauções e orientações para manuseio seguro:

Manuseie o produto somente em locais bem arejados ou com sistemas de ventilação geral/local adequado. Evite formação de vapores ou névoas.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

Página 5 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

- Medidas de higiene:

Não coma, beba ou fume durante o manuseio do produto. Lave bem as mãos antes de comer, beber, fumar ou ir ao banheiro. Roupas contaminadas devem ser trocadas e lavadas antes de sua reutilização.

MEDIDAS TÉCNICAS APROPRIADAS PARA O ARMAZENAMENTO

Apropriadas:

Mantenha o produto em local fresco, seco e bem ventilado, distante de fontes de calor e ignição. O local de armazenamento deve conter bacia de contenção para reter o produto, em caso de vazamento. Mantenha os recipientes bem fechados e devidamente identificados. O local de armazenamento deve ter piso impermeável, isento de materiais combustíveis e com dique de contenção para reter em caso de vazamento.

Inapropriadas:

Temperaturas elevadas. Fontes de ignição. Contato com materiais incompatíveis.

Materiais seguros para embalagens:

Recomendadas:

Não especificado.

8 - CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Parâmetros de controle específicos

Limite de exposição ocupacional:

Ingredientes	TLV – TWA (ACGIH)	TLV – STEL (ACGIH)
	0,2 mg/m ³ .	NA

Medidas de controle de engenharia:

Promova ventilação combinada com exaustão local, especialmente quando ocorrer formação de vapores/névoas do produto. É recomendado tornar disponíveis chuveiros de emergência e lava olhos na área de trabalho.

Equipamento de proteção individual apropriado:

- Proteção respiratória:

Recomenda-se a utilização de respirador com filtro para vapores orgânicos para exposições médias acima da metade do TLV-TWA. Nos casos em que a exposição exceda 3 vezes o valor TLV-TWA, utilize respirador do tipo autônomo (SCBA) com suprimento de ar, de peça facial inteira, operado em modo de pressão positiva. Siga orientação do Programa de Prevenção Respiratória (PPR), 3ª ed. São Paulo: Fundacentro, 2002.

- Proteção das mãos:

Luvas de proteção de PVC.

- Proteção dos olhos:

Óculos de proteção ou protetor facial contra respingos.

- Proteção da pele e corpo:

Vestuário protetor adequado.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380

Página 6 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

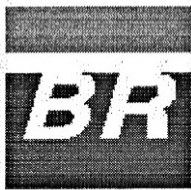
Anula e substitui versão: todas anteriores

Precauções especiais:

Evite usar lentes de contato enquanto manuseia este produto.

9 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Aspecto:	Líquido viscoso e escuro.
Odor:	Característico de hidrocarbonetos.
Ph:	Não aplicável.
Ponto de fusão/ponto de congelamento:	Não aplicável.
Ponto de ebulição inicial e faixa de temperatura de ebulição:	Não aplicável.
Ponto de fulgor:	60 °C; Método: vaso fechado.
Taxa de evaporação:	Muito lenta.
Inflamabilidade:	Produto inflamável.
Limite inferior/superior de inflamabilidade ou explosividade:	Não disponível.
Pressão de vapor:	Desprezível.
Densidade de vapor:	Não disponível.
Densidade:	0,9878.
Solubilidade:	Na água: desprezível. Em solventes orgânicos: Não disponível.
Coeficiente de partição – n-octanol/água:	Não disponível.
Temperatura de auto-ignição:	Não aplicável..
Temperatura de decomposição:	Não disponível.
Viscosidade:	380 Cst @ 50 °C, Método: MB 293
Faixa de destilação:	Não disponível.
Ponto de combustão:	Não disponível.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

Página 7 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

10 - ESTABILIDADE E REATIVIDADE

- Estabilidade química:** Estável sob condições usuais de manuseio e armazenamento. Não sofre polimerização.
- Materiais/substâncias incompatíveis:** Agentes oxidantes fortes, como peróxidos, cloratos e nitratos.
- Produtos perigosos da decomposição:** Em combustão libera hidrocarbonetos poli-aromáticos na forma de partículas e vapores.

11 - INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

- Toxicidade aguda:** Como possível depressor do sistema nervoso central pode causar efeitos narcóticos como dores de cabeça, tontura, náuseas e sonolência. Pode causar irritação das vias aéreas superiores com tosse, dor de garganta e falta de ar. Pode causar confusão mental e perda da consciência em casos de exposição à altas concentrações. Causa irritação moderada à pele com vermelhidão e dor no local atingido. Pode causar leve irritação ocular com vermelhidão e lacrimejamento. Pode causar pneumonia química se aspirado. Este produto contém gás sulfídrico, extremamente tóxico.
- Informações referentes ao:
- Óleo combustível:
- DL₅₀ (oral, ratos): > 5000 mg/kg
DL₅₀ (dérmica, ratos): > 3000 mg/kg
- Toxicidade crônica:** A exposição repetida e prolongada pode causar dermatite por ressecamento.
- Efeitos específicos:** Carcinogenicidade: Suspeito carcinógeno humano (GHS e Regulamento (CE) nº 1272/2008).
- Mutagenicidade: Resultado positivo para ensaio de troca de cromátides-irmãs. Resultado positivo em teste de Ames (*Salmonella typhimurium* – *in vitro*).

12 - INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Efeitos ambientais, comportamentos e impactos do produto

- Ecotoxicidade:** Em casos de grandes derramamentos o produto pode ser perigoso aos organismos aquáticos devido à possibilidade de formação de um filme do produto sob a superfície da água, o que pode reduzir os níveis de oxigênio dissolvido.
- Persistência e degradabilidade:** É esperada baixa degradação e alta persistência.
- Potencial bioacumulativo:** É esperado potencial de bioacumulação em organismos aquáticos.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380

Página 8 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

Log kow: 3,9 – 6,0 (dado estimado).

13 - CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

Métodos recomendados para tratamento e disposição aplicados ao:

- Produto:

Evite a exposição ocupacional ou a contaminação ambiental. Recicle qualquer parcela não utilizada do material para seu uso aprovado ou retorná-lo ao fabricante ou ao fornecedor. Outros métodos consultar legislação federal e estadual: Resolução CONAMA 005/1993, NBR 10.004/2004.

- Restos de produtos:

Manter restos do produto em suas embalagens originais, fechadas e dentro de tambores metálicos, devidamente fechados, de acordo com a legislação aplicável. O descarte deve ser realizado conforme o estabelecido para o produto, recomendando-se as rotas de processamento em cimenteiras e a incineração.

- Embalagem usada:

Nunca reutilize embalagens vazias, pois elas podem conter restos do produto e devem ser mantidas fechadas e encaminhadas para serem destruídas em local apropriado. Neste caso, recomenda-se envio para rotas de recuperação dos tambores ou incineração.

14 - INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE

Regulamentações nacionais e internacionais

Terrestre:

Decreto nº 96.044, de 18 de maio de 1988: Aprova o regulamento para o transporte rodoviário de produtos perigosos e dá outras providências.

Agência Nacional de transportes terrestres (ANTT): Resoluções Nº. 420/04, 701/04, 1644/06, 2657/08, 2975/08 e 3383/10.

Hidroviário:

DPC - Diretoria de Portos e Costas (Transporte em águas brasileiras)

Normas de Autoridade Marítima (NORMAM)

NORMAM 01/DPC: Embarcações Empregadas na Navegação em Mar Aberto

NORMAM 02/DPC: Embarcações Empregadas na Navegação Interior

IMO – “International Maritime Organization” (Organização Marítima Internacional)

International Maritime Dangerous Goods Code (IMDG Code) – Incorporating Amendment 34-08; 2008 Edition.

Aéreo:

DAC -Departamento de Aviação Civil: IAC 153-1001.

Instrução de Aviação Civil – Normas para o transporte de artigos



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380

Página 9 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

perigosos em aeronaves civis.
IATA – “ International Air Transport Association” (Associação
Nacional de Transporte Aéreo)
Dangerous Goods Regulation (DGR) - 51

Número ONU: 1268

Nome apropriado para embarque: DESTILADOS DE PETRÓLEO, N.E. (Óleos combustíveis pesados).

Classe e subclasse de risco principal e subsidiário: 3

Número de risco: 30

Grupo de embalagem: III

15 - REGULAMENTAÇÕES

Regulamentações:

Decreto Federal nº 2.657, de 3 de julho de 1998

Norma ABNT-NBR 14725-4:2009

Lei nº12.305, de 02 de agosto de 2010 (Política Nacional de Resíduos Sólidos).

Decreto nº7.404, de 23 de dezembro de 2010.

16 - OUTRAS INFORMAÇÕES

Esta FISPQ foi elaborada baseada nos conhecimentos atuais do produto químico e fornece informações quanto à proteção, à segurança, à saúde e ao meio ambiente.

Adverte-se que o manuseio de qualquer substância química requer o conhecimento prévio de seus perigos pelo usuário. Cabe à empresa usuária do produto promover o treinamento de seus empregados e contratados quanto aos possíveis riscos advindos do produto.

Siglas:

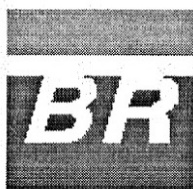
ACGIH - American Conference of Governmental Industrial Hygienists

CAS - Chemical Abstracts Service

DL₅₀ - Dose letal 50%

TLV - Threshold Limit Value

TWA - Time Weighted Average



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

Página 10 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 1

Anula e substitui versão: todas anteriores

Bibliografia:

[ACGIH] AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. Disponível em: <http://www.acgih.org/TLV/>. Acesso em: dezembro de 2010.

[ECB] EUROPEAN CHEMICALS BUREAU. Diretiva 67/548/EEC (substâncias) e Diretiva 1999/45/EC (preparações). Disponível em: <http://ecb.jrc.it/>. Acesso em: dezembro de 2010.

[EPI-USEPA] ESTIMATION PROGRAMS INTERFACE Suite - United States Environmental Protection Agency. Software.

[HSDB] HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>. Acesso em: dezembro de 2010.

[IARC] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Acesso em: dezembro de 2010.

[IPCS] INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – INCHEM. Disponível em: <http://www.inchem.org/>. Acesso em: dezembro de 2010.

[IPIECA] INTERNATIONAL PETROLEUM INDUSTRY ENVIRONMENTAL CONSERVATION ASSOCIATION. Guidance on the application of Globally Harmonized System (GHS) criteria to petroleum substances. Version 1. June 17th, 2010. Disponível em: http://www.ipieca.org/system/files/publications/ghs_guidance_17_june_2010.pdf. Acesso em: dezembro de 2010.

[NIOSH] NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL AND SAFETY. International Chemical Safety Cards. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/>. Acesso em: dezembro de 2010.

[NITE-GHS JAPAN] NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY AND EVALUATION. Disponível em: http://www.safe.nite.go.jp/english/ghs_index.html. Acesso em: dezembro de 2010.

[PETROLEUM HPV] PETROLEUM HIGH PRODUCTION VOLUME. Disponível em: <http://www.petroleumhvp.org/pages/petroleumsubstances.html>. Acesso em: dezembro de 2010.

[REACH] REGISTRATION, EVALUATION, AUTHORIZATION AND RESTRICTION OF CHEMICALS. Commission Regulation (EC) No 1272/2008 of 16 December 2008 amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals.

[SIRETOX/INTERTOX] SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE RISCOS DE EXPOSIÇÃO QUÍMICA. Disponível em: <http://www.intertox.com.br>. Acesso em: dezembro de 2010.

[TOXNET] TOXICOLOGY DATA NETWORKING. ChemIDplus Lite. Disponível em: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/>. Acesso em: dezembro de 2010.