



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ERIK JONNE VIEIRA DE MELO

**BIODIVERSIDADE BACTERIANA EM ÁGUA DO MAR: ISOLAMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE ÁGUAS
CONTAMINADAS PELO ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

RECIFE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**BIODIVERSIDADE BACTERIANA EM ÁGUA DO MAR: ISOLAMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE ÁGUAS
CONTAMINADAS PELO ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

NOME: ERIK JONNE VIEIRA DE MELO

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Norma Buarque de Gusmão

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Melo, Erik Jonne Vieira de

Biodiversidade bacteriana em água do mar: isolamento, caracterização e aplicação no tratamento de águas contaminadas pelo óleo combustível marítimo MF-380/ Erik Jonne Vieira de Melo– Recife: O Autor, 2015.

122 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos-Takaki

Coorientadora: Norma Buarque de Gusmão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2015.

Inclui referência e anexo

1. Biodegradação 2. Bactérias 3. Hidrocarbonetos I. Campos-Takaki, Galba Maria de (orientadora) II. Gusmão, Norma Buarque de (coorientadora) III. Título

620.11223

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-060

ERIK JONNE VIEIRA DE MELO

**BIODIVERSIDADE BACTERIANA EM ÁGUA DO MAR: ISOLAMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE ÁGUAS
CONTAMINADAS PELO ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF-380**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data de Aprovação: 26/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª Dra. Galba Maria de Campos-Takaki/UNICAP

Prof^ª Dra. Celuta Sales Alviano/UFRJ

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa Lima/UFRPE

Prof^ª Dra. Kaoru Okada/UNICAP

Prof^ª Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto/UFRPE

O Senhor é o meu pastor e nada me faltará. Ele me faz descansar em pastos verdes e me leva a águas tranquilas. O Eterno me dá novas forças e me guia no caminho certo, como ele mesmo prometeu. Ainda que eu ande por um vale escuro como a morte, não temerei mal algum. Pois tu, ó Deus estás comigo tu me proteges e me guia.

Salmo 23

Agradecimentos

Seria impossível listar todos os nomes a quem devo minha gratidão. No entanto, não posso deixar de agradecer sinceramente...

... a Deus por ser uma luz que me conforta em seus braços em todos os momentos de minha vida.

... a minha avó Dolores pelo exemplo de ser humano, a quem sempre procuro seguir.

... a meus pais Juraci Vieira e João Galdino pelo amor, dedicação, apoio, educação e paciência mesmo nos momentos mais difíceis desde o início da minha vida e nunca me abandonaram.

... à minha esposa Atailha Melo por todo amor, paciência, carinho dedicado e pelo simples motivo de existir em minha vida dando um sentido todo especial, que me espirou na realização deste trabalho. Sempre me dando incentivo.

... ao meu irmão Klayton Jonne, a quem tributo grande respeito e afeto procurando seguir por sua idoneidade, aptidão e competência como exemplo de caráter.

... à Prof^a. Galba Campos-Takaki pela oportunidade de crescimento e aprendizado e principalmente paciência.

... à Prof^a. Norma Gusmão pela total credibilidade, orientação, incentivo e amizade.

... aos meus tios Luiz, Heleno, Jair e Janeide pelo imenso apoio e por sempre acreditarem no meu potencial.

... aos meus familiares pela constante torcida.

... a meu irmão de coração Anderson Pontes pelo exemplo de perseverança.

... à Rita Miranda e Edelvio Gomes pelo apoio, aprendizado e orientação sem a qual realizaria este e todos os meus trabalhos até aqui.

... aos amigos Persio Silva e Flávia Arruda, pela amizade quase de irmãos em todos os momentos de trabalho e descontração, este trabalho é tanto de vocês quanto meu.

... aos amigos Cynthia Souza, Aliny Almeida, Maira Callou, Nelânia Queiroz, Georgia Gomes, Jacilene Maciel, Luis Cláudio, Evelyne, Maria Claudia,

Rosilma, Raul Felipe, Robson, Patricia, Rafael e Camila pela amizade nestes anos de pesquisa.

... A professora Leonor pelas orientações e aprendizado e confiança desde o momento que me conheceu até hoje.

... aos professores pelos ensinamentos e pesquisa ampliando meus conhecimentos acadêmicos.

... aos técnicos de laboratório do Departamento de Antibiótico, pelos ensinamentos de extrema importância.

... aos amigos do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

... a Universidade Federal de Pernambuco por me acolher na realização desta e de outras pesquisas, especialmente aos Departamentos de Antibióticos e de Micologia.

... a todos os companheiros do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco.

... a empresa Termope do grupo Neoenergia.

... a CAPES pelo apoio financeiro.

... a todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

O combustível marinho ou “Marine Fuel-(MF)”, ou Bunker, conhecido também como Líquido de Fase Não Aquosa (LFNA), é obtido por destilação fracionada do petróleo bruto, constituído principalmente por hidrocarbonetos de cadeias longas (alcanos, cicloalcanos e aromáticos), possibilitando diferentes categorias químicas. O óleo MF-380 tem como propriedades elevada emulsificação, baixa evaporação e intemperização lenta, permanecendo assim por longos períodos nos sedimentos, sendo um xenobiótico de difícil degradação. Neste sentido, estudos iniciais foram realizados com a água do mar do Porto de Suape, PE, Brasil, avaliando os aspectos biológicos, particularmente a biota bacteriana local. A coleta da água do mar foi realizada em três pontos, sendo as bactérias isoladas em membrana filtrante (0,22 µm), utilizando meios de culturas seletivos, sendo isoladas um total de 602 bactérias, não sendo observado diferenças no número de bactérias isoladas para os diferentes pontos de amostragem. Observou-se ainda que, o gênero mais frequente foi *Bacillus* (98%), seguido de *Serratia* (2%). As bactérias isoladas foram avaliadas quanto ao potencial oxidativo, frente ao combustível MF-380 (cedido pela TRANSPETRO). Os ensaios de degradação foram realizados em Erlenmeyers (500 mL), no meio Bushnell Haas-BH, na presença de 1% a 5% do MF-380 como fonte de carbono, incubados em condições estáticas, temperatura de 30±1°C, por 10 dias. Excelentes resultados foram obtidos com 24h, onde 90 bactérias (15,2%) demonstraram habilidade oxidativa, e a partir dessas, observou-se que sete bactérias demonstraram atividade lipolítica (4,5 U/L a 77,2 U/L). A bactéria selecionada P11-A, com (77,2% de atividade lipolítica), demonstrou degradar 100% de Dodecano e 93,9% do Pentadecano, respectivamente, para a concentração de 3% do MF-380. Na concentração mais elevada do MF-380 (5%) observou-se uma maior degradação para hidrocarbonetos com cadeias menores pela mesma bactéria, como para Eicosano (91,6%) e Docosano (85,7%). A partir desses resultados foi realizado consorcio entre as sete bactérias selecionadas pela atividade lipolítica, empregando um planejamento Plackett & Burman, onde a variável dependente demonstrou que a bactéria P11-A (*Bacillus sp.*) apresentou maior potencial biotecnológico para degradação do óleo MF-380. Portanto, os estudos realizados sugerem que o *Bacillus sp.* (P11-A) pode ser aplicado nos processos de biorremediação pelo óleo combustível MF-380, possibilitando o interesse pelas indústrias petrolíferas.

Palavras chave: Bactérias marinhas. *Bacillus sp.* Óleo combustível. Enzimas. Hidrocarbonetos.

ABSTRACT

The marine fuel or "Marine Fuel- (MF)" or Bunker, also known as non-aqueous phase liquids (LFNA) is obtained by fractional distillation of crude oil, composed primarily of long chain hydrocarbons (alkanes, cycloalkanes and aromatics), enabling different chemical classes. The MF-380 oil has properties as high emulsification, low evaporation and slow weathering, remaining for long periods in sediments, with a xenobiotic difficult degradation. Initial studies were performed with seawater the Port of Suape, PE , Brazil, evaluating the biological, particularly bacterial biota site. The collection of sea water was performed at three points, and the bacteria isolated in membrane filter (0.22 microns) using means of selective cultures, and isolated a total of 602 bacteria, not observable differences in the number of bacteria to isolated the different sampling points. It was also observed that the most common genus *Bacillus* was (98%), followed by *Serratia* (2%). Bacterial isolates were evaluated for oxidative potential, compared to the MF-380 fuel (donated by TRANSPETRO). The degradation tests were performed in Erlenmeyer flasks (500 ml), the middle Bushnell-Haas BH, in the presence of 1% to 5% of MF-380 as the carbon source, incubated in static conditions, temperature 30 ± 1 ° C for 10 days. Excellent results were obtained with 24, 90 where bacteria (15.2%) showed oxidative ability, and from these, we found that 7 bacteria showed lipase activity (4,5U / L to 77,2U / L). The bacterium selected P11-A, (77.2% of lipase activity) showed 100% Dodecane degrade and 93.9% of pentadecane, respectively, to a concentration of 3% MF-380. At the higher concentration of MP-380 (5%) observed increased degradation to smaller hydrocarbon chains with the same bacteria, such as for eicosane (91.6%) and docosane (85.7%). From these results was carried out between 7 bacteria consortium selected by lipase activity, employing a Plackett & Burman planning, where the dependent variable showed that the P11-A bacterium (*Bacillus sp.*) showed higher biotechnological potential for MF-380 oil degradation. Therefore, studies have suggested that *Bacillus sp.* (P11-A) can be applied in bioremediation processes for fuel oil MF-380, allowing interest in the oil industry.

Keywords: Marine bacteria. *Bacillus sp.* Fuel oil. Enzymes. Hydrocarbons.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

- FIGURA 1 - Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, mostrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração..... 36
- FIGURA 2 - Reações catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos com baixo teor de água (esterificação, interesterificação, aminólise, lactonização)..... 52
- FIGURA 3 - Representação esquemática para a hidrólise de triacilglicerois catalisada por lipases..... 53
- FIGURA 4 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica..... 55

CAPITULO 2

- FIGURA 1 – Potencial de oxidação biológica das bactérias no teste qualitativo com MF-380 como fonte de carbono..... 69
- FIGURA 2 – Atividade lipolítica apresentada pelas bactérias isoladas da água do mar frente ao óleo combustível marinho MF-380..... 70
- FIGURA 3 - Dendograma das bactérias isoladas do ponto 1 da coleta da água do mar no complexo do porto de Suape- PE..... 72
- FIGURA 4 - Dendograma das bactérias isoladas do ponto 2 da coleta da água do mar no complexo do porto de Suape- PE..... 73
- FIGURA 5 - Dendograma das bactérias isoladas do ponto 3 da coleta da água do mar no complexo do porto de Suape- PE..... 74

CAPITULO 3

- FIGURA 1 – Perfis de pH (a) e biomassa (b) apresentado pelas bactérias testadas durante a degradação nas concentrações 1%, 3% e 5% de MF-380..... 88
- FIGURA 2 - Perfil de degradação de concentrações crescentes do MF-380 pela bactéria *Bacillus sp.* (P11A)..... 89
- FIGURA 3 - Perfil de produção enzimática apresentado pelas bactérias isoladas da água do mar durante a degradação do MF-380..... 90

CAPITULO 4

- FIGURA 1 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados das bactéria. Variável dependente: Degradação da fração alifática do MF-380..... 101
- FIGURA 2 - Gráfico de Superfície da degradação do óleo combustível marinho MF-380 (A bactéria P11A evidenciada como variável significante). a: Interação entre a bactéria P11A e P11B5; b: Interação entre as bactéria P11A e P11B1..... 103

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

TABELA 1 - Tipos de óleos combustíveis marítimos são comercializados na América do sul. (PETROBRAS DISTRIBUIDORA, 2012)	20
TABELA 2 - Características físico-químicas e toxicológicas dos poluentes ambientais e aplicabilidade da biorremediação	32

CAPITULO 2

TABELA 1 - Parâmetros físico-químicos da água do mar coletada próximo ao complexo portuário de pernambuco.....	68
TABELA 2 - Bactérias Gram positivas e Gram negativas isoladas da água do mar coletada no complexo portuário de Pernambuco.....	68

CAPITULO 3

TABELA 1 - Características físico-químicas do óleo combustível MF-380 cedido pela TRANSPETRO.....	82
TABELA 2 - Análise química elementar da amostra do combustível marinho MF-380.....	83
TABELA 3 - Degradação dos compostos alifáticos C-10 à C-14, pelas bactérias isoladas da água do mar.....	85
TABELA 4 - Degradação dos compostos alifáticos C-15 à C-18, pelas bactérias isoladas da água do mar.....	86
TABELA 5 - Degradação dos compostos alifáticos C-19 à C-22, pelas bactérias isoladas da água do mar.....	87

CAPITULO 4

TABELA 1 - Matriz experimental do planejamento de Plackett & Burman (PB-16). Utilizando os inóculos bacterianos padronizados como níveis mais baixos e mais altos (-1 e +1) e três pontos centrais.....	98
TABELA 2 - Efeitos padronizados estimados obtido do delineamento experimental de Plackett & Burman.....	100
TABELA 3 - Análise de Variância dos ensaios em frasco obtido através do delineamento experimental.....	101
TABELA 4 - Avaliação do efeito sinérgico dos consórcios bacterianos. Avaliando a degradação dos compostos alifáticos do MF-380 através da cromatografia gasosa e da atividade lipolítica.....	105

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Derivados de petróleo e seus hidrocarbonetos	17
3.2 Óleo Combustível	18
3.3 Combustível Marinho (MF)	19
3.4 Contaminações ambientais por petróleo e seus derivados	20
3.5 Diversidade marinha	21
3.6 Água do mar	23
3.7 Técnicas de biorremediação e suas respectivas aplicações	24
3.7.1 Atenuação natural ou Biorremediação intrínseca.....	25
3.7.2 Bioestimulação.....	26
3.7.3 Bioaugmentação.....	27
3.7.4 Biosparging ou biopulverização.....	27
3.7.5 Bioventing ou Bioventilação.....	28
3.7.6 Compostagem e <i>Landfarming</i>	28
3.7.7 Degradação em reatores biológicos.....	29
3.8 Biorremediação	30
3.9 Biodegradação de compostos do petróleo e seus derivados	33
3.10 Condições necessárias para ocorrer biodegradação	34
3.10.1 Aceptores de elétrons e nutrientes inorgânicos.....	35
3.10.2 Influência da temperatura e pressão na biodegradação do petróleo.....	37
3.10.3 Microrganismos envolvidos no processo de biodegradação do petróleo.....	38
3.11 Mudanças na composição química do petróleo	39
3.11.1 <i>n</i> -alcanos e compostos aromáticos.....	39
3.11.2 Compostos biomarcadores.....	41
3.12 Vantagens da biorremediação microbiana	42
3.13 Fatores relevantes na eficiência e na aplicabilidade da biorremediação	43
3.14 Aspectos biológicos relacionados à biodegradação de óleos combustíveis	46
3.14.1 Consórcios Microbianos.....	46
3.14.2 Cometa-bolismo.....	47
3.14.3 Aclimatação.....	48
3.14.4 Produção de Biossurfactante.....	49
3.14.5 Produção Enzimática.....	50
3.15 Atividade Lipolítica	51
3.16 Avaliação qualitativa da biodegradação e escalas de biodegradação	55
REFERÊNCIAS	57
4 RESULTADOS	63

4.1 Artigo submetido a revista revista: Journal of Marine Systems.....	63
4.2 Artigo submetido a revista: Science of the Total Environment.....	79
4.3 Artigo submetido a revista: International Biodeterioration & Biodegradation.....	95
5 CONCLUSÃO.....	109
ANEXO A - Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ. Oléo Combustível Marítimo MF-380.....	110

1 INTRODUÇÃO GERAL

Há muitas aplicações de hidrocarbonetos na indústria, com seu principal papel no abastecimento. Devido ao uso generalizado de hidrocarbonetos, derrames e contaminação do solo e das águas subterrâneas têm sido comum há anos. Petróleo pode ser classificado em seis principais grupos definidos operacionalmente de produtos químicos: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, componentes não hidrocarbonetos mais polares, resinas e asfaltenos. Os hidrocarbonetos podem ser removidos a partir de ambientes poluídos usando vários métodos "naturais", tais como a evaporação e dissolução dos componentes voláteis e solúveis, decomposição fotoquímica, e biodegradação microbiana (Ward, 2013).

Apesar dos inúmeros benefícios gerados pelo processo de industrialização e refinaria no setor petrolífero, ocorrem contaminações ambientais pelo descarte de grandes quantidades de substâncias químicas tóxicas em águas subterrâneas e superficiais, solos, sedimentos e ar constituindo uma problemática relativa ao desenvolvimento industrial (Pavic, 2015).

Neste sentido, diversas substâncias hoje presentes no ambiente, têm sido geradas pelo homem através da síntese química. Embora, muitas possam ser degradadas em poucos meses pela população microbológica do ambiente, contudo, outras persistem na natureza por um longo tempo. Assim as substâncias recalcitrantes, consideradas xenobióticas, não são biodegradadas ou, quando o são, o processo é muito lento. Como resultado das atividades humanas, aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de substâncias químicas perigosas são liberadas anualmente no meio ambiente. Em alguns casos, trata-se de emissões deliberadas e regulamentadas (resíduos industriais), em outros, de escapamentos acidentais, como por exemplo, as manchas de óleo ou de petróleo (CETESB, 2010).

Neste sentido, estratégias devem ser utilizadas para controlar a contaminação ambiental por petróleo e seus derivados as quais vêm sendo objeto de estudos nas últimas três décadas. Quando ocorre um derrame ambiental a primeira ação é remover a fase de óleo por ação mecânica ou por métodos físico-químicos através da aplicação de tensoativos para dispersar a camada de óleo, porém existe a necessidade de metabolização de compostos solúveis na água. Assim, a biorremediação abrange um conjunto de tecnologias que utilizam micro-organismos, ou produtos microbianos para degradar os poluentes ambientais, transformando-os em substâncias com baixa ou nenhuma toxicidade (MAIER, 2000).

Bactérias e fungos (leveduras e filamentosos) são considerados os principais agentes da biodegradabilidade de hidrocarbonetos. Sabe-se que a introdução de resíduos de óleo causa

sensíveis aumentos de ambos os grupos. Além disso, micro-organismos isolados de locais, que historicamente estão expostos à poluição de hidrocarbonetos, adquirem mais mecanismos de biodegradabilidade do que outros isolados de áreas sem nenhum histórico (SAADOON, et al, 2008).

O interesse no isolamento dos micro-organismos nativos está associado à busca por linhagens que possuam capacidade em degradar petróleo e derivados, procurando utilizar-se das habilidades microbianas em processos de biorremediação. Além disso, obter uma análise da composição da microbiota da localidade impactada, oferece dados mais atualizados para a implantação de um processo de restabelecimento ambiental na área.

A água do mar utilizada pela termoeletrica Termope S/A, é proveniente das adjacências do Porto de Suape e da área de movimentação de MF-380. Vários cenários de contaminação suscitam desenvolvimento de processos em que os micro-organismos possam ser empregados na degradação de diferentes concentrações de carga orgânica presentes na matriz aquosa. Micro-organismos isolados na área impactada por MF-380, próximo ao complexo de Suape-PE, bem como aqueles isolados de material contaminado por hidrocarbonetos, demonstram habilidade para degradar a mistura MF-380 no processo de biotratamento.

O Complexo Portuário de Suape-PE desponta desde a última década como um dos portos com um maior volume de movimentação de carga no país. O Porto movimenta mais de 5 milhões de toneladas de carga por ano, destacando-se, os granéis líquidos (derivados de petróleo) e a refinaria prevê, um aumento de produção para 200.000 barris de derivados de petróleo por dia.

O interesse no isolamento dos microrganismos nativos está atrelado à busca por linhagens que possuam capacidade em degradar petróleo e derivados, procurando utilizar-se das habilidades microbianas em processos de biorremediação. Além disso, obter uma análise da composição da microbiota da localidade impactada, oferecendo dados mais atualizados para a implementação de um processo de restabelecimento ambiental na área.

Desta forma a utilização dos microrganismos autóctones no biotratamento de água do mar com diferentes concentrações de MF-380, a fim desenvolver bioprocessos que possa dar resposta aos diferentes níveis de contaminação. Tal desenvolvimento contribuirá para a melhoria da qualidade da água na região, além de contribuir com a elaboração de planos de contingência que visem ao tratamento ambientalmente amigável da água quando houver ocorrência de descargas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Isolar e caracterizar a microbiota das áreas impactadas com MF-380 na região do porto de Suape-PE, bem como avaliar o potencial biotecnológico das bactérias selvagem e aclimatados com MF-380 (1%, 3% e 5%) para o tratamento da água do mar contaminada através de consórcios.

2.2 Específicos

- Avaliar os parâmetros físico-químicos da água do mar;
- Realizar a caracterização química elementar do combustível marítimo (*bunker MF – 380*);
- Isolar e selecionar bactérias com capacidade de degradar diferentes concentrações do MF-380;
- Avaliar o potencial enzimático das bactérias selecionadas;
- Avaliar a degradação do óleo combustível marinho MF-380 pelas bactérias selecionadas;
- Estudar consórcios bacterianos degradadores de MF-380 e avaliar a eficiência da degradação;
- Avaliar a viabilidade dos micro-organismos utilizados no consorcio visando o biotratamento;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Derivados de petróleo e seus hidrocarbonetos

O petróleo foi originado a partir de organismos presentes em mares rasos durante o período permiano que data de 245 a 280 milhões de anos, sendo, portanto, de origem biogênica. É constituído por uma complexa mistura de compostos orgânicos que podem ser divididos em hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos e cíclicos), hidrocarbonetos aromáticos (mono e polinucleares), asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetanos e ésteres) e compostos polares que incluem as resinas (PEREIRA et. al., 2009).

Centenas de compostos geralmente agrupados são encontrados em quatro frações do petróleo, de acordo com a solubilidade dos compostos saturados (n-alcanos, alcanos de cadeias ramificadas e cicloalcanos); compostos aromáticos (aromáticos mono-, di- e polinucleares contendo grupos alquilos e/ou anéis de cicloparafinas), resinas (agregadas com piridinas, quinolinas, carbasois, sulfóxidos, amidas) e asfaltenos (agregados com poliaromáticos extensos, ácidos naftênicos, sulfides, fenóis polihídricos, ácidos graxos e metaloporfirinas) (CAPPELLI et. al., 2001).

Estes compostos podem ter diferentes classificações, sendo uma delas de acordo com o peso molecular. Compostos com até 10 átomos de carbono são formados por moléculas pequenas, são extremamente voláteis, evaporando e dissolvendo sem deixar resíduos. São ainda mais biodisponíveis, sendo assim absorvidos mais facilmente pelos seres vivos, além de serem potencialmente inflamáveis. Os compostos de médio peso molecular (C11 a C22) apresentam-se como moléculas mais complexas, com evaporação e dissolução mais lenta e formando alguns resíduos remanescentes. São menos biodisponíveis que os de baixo peso molecular. Por fim, os compostos de alto peso molecular apresentam cadeias com mais de 23 átomos de carbono, constituindo moléculas grandes, com baixa capacidade de evaporação e dissolução, alto tempo de resistência no ambiente, sendo assim considerados persistentes. Os compostos médio e pesados, acima classificados, apresentam maior atividade carcinogênica e mutagênica em seres vivos (COTTA, 2008).

O petróleo, para que tenha seu potencial energético efetivamente aproveitado, deve ser desdobrado em cortes de faixas de ebulição características, denominadas frações. Esse desdobramento poderá ser alcançado pela destilação do óleo bruto. A separação das frações existentes no petróleo é feita através da destilação. A partir do conhecimento dos dados de

distribuição dos intervalos de ebulição característicos de cada corte, que vão compor e definir a curva de destilação de um determinado petróleo, é possível prever o percentual (rendimento) dos diferentes cortes ou frações, tais como gasolina e querosene, óleo diesel e outros, o que é fundamental para o controle do processo de refino e para a garantia da qualidade dos produtos (VALLE, 2007).

A destilação é um processo de operação unitária baseado na diferença de temperaturas de faixas de ebulição entre os compostos existentes em uma mistura líquida. No caso dos hidrocarbonetos, quanto maior a fórmula molecular maior será o ponto de ebulição. Assim, é possível separar, por meio da destilação, os compostos leves, médios e pesados que compõem o petróleo (CORRÊA, 2009).

3.2 Óleo Combustível

O óleo combustível derivado de petróleo, também chamado óleo combustível pesado ou óleo combustível residual, é a parte remanescente da destilação das frações do petróleo, designadas de modo geral como frações pesadas, obtidas em vários processos de refino. A composição complexa dos óleos combustíveis depende não só da origem do petróleo, como também do tipo de processo e misturas que sofreram nas refinarias, de modo que se pode atender as várias exigências do mercado consumidor numa ampla faixa de viscosidade. Largamente utilizados na indústria moderna para aquecimento de fornos e caldeiras, ou em motores de combustão interna para geração de calor, os óleos combustíveis subdividem-se em diversos tipos, de acordo com sua origem e características (<http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/home>, 2012).

No Brasil, a produção de petróleo na Bacia de Campos, região norte do estado do Rio de Janeiro, é estratégica, representando mais de 80% da extração nacional. Uma das características é ser executada totalmente em “offshore”, através de 40 sistemas de produção distribuídos entre plataformas fixas, flutuantes e navios adaptados. O escoamento da produção da Bacia de Campos, 1,5 milhões de barris/dia, é realizado por oleodutos (20%) e o restante por navios. Essas atividades expõem a região a um risco potencial de acidentes, com vazamentos de óleo, possibilitando a contaminação de ambiente costeiros como praias e manguezais. Esse tipo de catástrofe, além do dano ao meio ambiente, pode vir a causar graves impactos na imagem das companhias produtoras de petróleo (SOUZA & TRIGÜIS, 2006).

3.3 Combustível Marinho (MF)

O “marine fuel” é um tipo de combustível líquido que é destilado de forma fracionada a partir de petróleo bruto. Também conhecido como óleo combustível Marinho ou Bunker, este material pode ser dividido em diferentes categorias com base na sua composição química, a sua finalidade, e a temperatura de ebulição (Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico do MF-380 em anexo). Em comparação com outros produtos de petróleo, óleo combustível para navios é extremamente denso e altamente poluente (WISEGEEK, 2012).

Após o óleo cru é extraído a partir do solo e levada a uma refinaria, passa por um processo chamado de destilação fracionada. Durante a destilação fracionada, o óleo é aquecido, fazendo com que os diferentes tipos de óleo se separem por ter pontos de ebulição diferentes. Classicamente, a destilação fracionada é realizada numa coluna de destilação, a qual desvia várias frações em que se precipitou. Durante a destilação fracionada, refinarias de petróleo também podem utilizar catalisadores para "quebrar" as cadeias de hidrocarboneto do petróleo bruto para criar frações de óleo específicos. Produtos mais pesados de petróleo como diesel e óleo lubrificante precipitam mais lentamente, e óleo bunker é, literalmente, o fundo do poço, a única coisa mais densa do que bunker é o resíduo que é misturado com alcatrão para pavimentação de estradas e telhados de vedação (WISEGEEK, 2012).

O óleo combustível marinho é normalmente conhecido como Líquido de fase não aquosa (LFNA) classe essa que inclui muitos produtos líquidos que derivam do petróleo, esses combustíveis são queimados em fornos ou caldeiras para geração de calor ou utilizados em motores de grande porte para geração de energia. O LFNA contém principalmente hidrocarbonetos de cadeia longa, em particular alcanos, cicloalcanos e aromáticos. Os óleos combustíveis podem ser classificados de acordo com seu ponto de ebulição em seis classes numeradas de nº 1 a nº 6, ou podem ser ainda classificados pela composição e finalidade (LEE et. al., 2011).

Existem vários tipos de combustíveis utilizados em embarcações, também conhecidos por *bunker*. De acordo com a PETROBRAS DISTRIBUIDORA (2012), 12 tipos de óleos combustíveis marítimos são comercializados na América do Sul (Tabela 1). A base terminal de Recife (BAREC), que desempenha a atividade de armazenagem e distribuição de derivados de petróleo e alcoóis, tem uma capacidade operacional de armazenamento de 4.279 m³ de MF-380 e 2.492 m³ de Óleo diesel marítimo. Estes combustíveis podem ser recebidos ou carregados em Navio-Tanque ou Balsa-Tanque.

Tabela 1 - Tipos de óleos combustíveis marítimos são comercializados na América do sul. (PETROBRAS DISTRIBUIDORA, 2012). Fonte: <http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/home>

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

A grande densidade do óleo bunker lhe confere as propriedades de alta emulsificação, baixa evaporação e intemperização lenta, que fazem com que permaneça por longos períodos no sedimento e que seus componentes fiquem disponíveis para bioacumulação e biomagnificação (efeitos crônicos) (NUDI et. al., 2007).

3.4 Contaminações ambientais por petróleo e seus derivados

A poluição por hidrocarbonetos provenientes de fontes naturais e antropogênicas pode ter efeitos prejudiciais dramáticas para o meio ambiente. Grande quantidade de petróleo bruto marinho entrar, águas subterrâneas, do solo e outro ambiente pode causar danos significativos para os organismos residentes. Recentes vazamentos de petróleo desastrosas, por exemplo, Vazamento de petróleo Deepwater Horizon no Golfo do México em 2010 e Penglai, derrames de petróleo na baía de Bohai (China, 2011), se tornou uma das principais fontes de poluição por óleo no oceano. Estratégias ambientalmente benignas custo-benefício e são urgentemente exigidos de limpeza do petróleo derramado. Muitas técnicas são utilizadas para mitigar e limpar a poluição do petróleo bruto no ambiente (Obuekwe and AleMuttawa, 2001;

Devido aos derramamentos acidentais de óleo cru e petroderivados, grande quantidade de material recalcitrante se acumula em ambientes aquáticos, em zonas costeiras e em regiões próximas a terminais de transporte e distribuição de combustíveis (SOUZA, 2003).

O excesso de poluentes no ambiente têm sido um dos principais motivos de preocupação por parte da sociedade contemporânea. Os solventes aromáticos, os combustíveis

líquidos e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem os principais grupos contaminantes no Brasil (CETESB, 2008).

A contaminação por petróleo e seus derivados pode ocorrer de forma diferente durante a etapa de produção, transporte e refino. Os campos de extração do petróleo e gás natural do Brasil estendem-se desde o litoral do Rio Grande do Norte até o Paraná (ALMEIDA, 2006).

No Nordeste, o complexo portuário de Suape em Pernambuco, movimenta cerca de 5 milhões de toneladas de carga por ano, destacando-se entre elas os derivados de petróleo, produtos químicos como alcoóis e óleos vegetais. A Petrobras espera iniciar a refinaria Abreu e Lima com capacidade operacional de 230.000 barris / dia (b/d), em Pernambuco, em 2014. Este será o primeiro de quatro novas refinarias em construção pela Petrobras no Brasil para adicionar uma capacidade combinada de 1,46 milhões de b/d em 2020, em uma tentativa de atender à crescente demanda do país por destilados médios. Até 2016, a Petrobras planeja colocar online a primeira das duas fases no Comperj, a refinaria no Rio de Janeiro, com uma capacidade de 165 mil b/d. A empresa planeja processar nas duas instalações. Em seu plano de investimentos 2012-2016, o maior foco foi a modernização e expansão suas instalações de refino (ONIP, 2012).

No Brasil as regiões costeiras então mais suscetíveis a derramamentos de petróleo e seus derivados, já que os maiores índices de acidentes têm sido registrados nas operações realizadas nos portos e terminais, cerca de 90,8% do total. Além da contaminação que ocorre durante o processo de refino, nas operações de lavagem dos tanques de petroleiros em pleno oceano, são derramadas grandes quantidades de combustíveis. Apesar de ser proibida, essa pratica ainda persiste em decorrência da dificuldade de fiscalização pela extensão da costa brasileira (MACIEL, 2010).

3.5 Diversidade marinha

Setenta por cento da terra é ocupada por oceanos e, assim, faz a terra conhecida como "planeta azul" (BOWLER et. al., 2009; GLÖCKNER, 2010). Desta forma, o oceano, foi considerado a mãe de todas as formas de vida (BHATNAGAR e KIM, 2010). Quarenta por cento dos habitantes do mundo vivem ao longo da costa dos oceanos. Microrganismos marinhos têm sido associados a vários processos no mar com 50% da produção mundial primária ocorrendo no oceano e sendo realizada por micro-organismos marinhos metabolizando elementos químicos. Um mililitro de água do mar contém mais do que 105

células microbianas, daí os oceanos globais invariavelmente contém $3,6 \times 10^{29}$ células tornando um vasto recurso biogeográfico (SOGIN et. al., 2006). Micro-organismos marinhos são promotores da maioria dos ciclos biogeoquímicos que ocorrem no mar. Uma questão importante a fazer é que, com a biodiversidade marinha, há alguma possibilidade de explorar tanto as potencialidades sociais e econômicas dessas formas oceânicas de vida para os benefícios da humanidade? Absolutamente sim, a microbiologia marinha e a biotecnologia proferem respostas para essa pergunta. As últimas décadas têm vindo a explosão global por vários pesquisadores do mundo em isolamentos compreensão, funções e utilização de bactérias, fungos, protozoários e vírus do oceano (ODEYEMI, 2013).

A biotecnologia marinha (ou biotecnologia azul) é considerada uma área de grande interesse e potencial devido à contribuição para a construção de uma sociedade eco-sustentável e altamente eficiente. Os ambientes aquáticos ainda não são totalmente explorados e seus recursos podem desempenhar um importante papel para diversas atividades industriais. Diferentes prioridades de investigação poderia ser identificada no campo da biotecnologia marinha para mostrar a visão dos desenvolvimentos e as perspectivas para os próximos anos. Os aspectos fundamentais estão relacionado à aquicultura: novas metodologias vai ajudar na reprodução seletiva de espécies, em aumentar a sustentabilidade da produção e no bem-estar animal reforço, incluindo mudanças na oferta de alimentos, medidas terapêuticas preventivas e uso de desperdício zero-recirculação sistemas (MELAMED, 2002; ADAMS, 2006; TAL, 2009).

A biotecnologia azul poderia ser ainda mais envolvida em pontos chave de questões ambientais, como em tecnologias de bio-sensores para permitir um monitorização in situ do meio marinho, tecnologias de biorremediação e no desenvolvimento rentável de tecnologias anti-incrustante (DE CARVALHO et. al., 2010; CAMPAS et. al., 2012).

Os ambientes marinhos assim como os manguezais são especialmente suscetíveis à poluição por hidrocarbonetos, devido à sua localização em baías abrigadas por onda de baixa energia inundada pelas marés (GETTER et. al., 1984; LEWIS et. al., 2011). Métodos de limpeza, tais como em biorremediação in situ para promover a degradação do óleo, bactérias são utilizadas para oferecer uma tecnologia de limpeza ambiental menos invasiva (SANTOS et. al., 2010). Biofilmes bacterianos prometem melhorar o crescimento das plantas e recuperação de áreas impactadas e pode ajudar a substituir maquinário pesado usado atualmente em operações de limpeza. Além disso, cada vez mais provas de que a presença de um consórcio microbiano na rizosfera tende não só a regenerar e recuperar ambientes

marinhos como aumenta o crescimento e sobrevivência das plantas em mangues com poluição por óleo (SANTOS et. al., 2011).

As bactérias com potencial degradador de hidrocarbonetos são encontrado em diversos ambientes aquáticos, e que tenham um histórico de contaminação ou não. Um consórcio de bactérias foi isolado a partir de sedimento de manguezais e rizosfera de *Avicennia sp.*, *Laguncularia sp.* e *Rhizophora sp.* Os isolados foram obtidos após enriquecimento com 5% de óleo como fonte de carbono exclusiva (CARMO et. al., 2011).

3.6 Água do mar

Os estudos sobre o mar são indispensáveis para conhecer a estrutura e o comportamento físico-químico da água do mar bem como das soluções eletrolíticas aquosas. Muito embora seja fundamental se conhecer a estrutura da água pura e os efeitos dos diferentes parâmetros ambientais, a água do mar está longe de ser uma substância pura. Entender que a água do mar depende da adição de eletrólitos, a qual altera a estrutura da água (ALVES, 2006).

A composição química da água do mar é única, se comparada com outros sistemas aquosos naturais, e os principais fatores de diferenciação são: a alta concentração de solutos e a baixa flutuação geográfica da concentração. Embora os mares e oceanos estejam sujeitos aos movimentos oriundos dos ciclos hidrológicos, que promovem precipitações ou dissoluções de diferentes solutos, em diferentes tempos, a água do mar apresenta características de concentração aproximadamente constante tanto para sua profundidade quanto em sua extensão (SOUZA, et. al., 2005)

A constância relativa das concentrações dos íons é conhecida como Princípio de Marcet ou Regra das Proporções Constantes. Formalmente isso quer dizer que embora a salinidade possa variar de um lugar para o outro, as relações entre as quantidades dos íons majoritariamente presentes nas águas do mar ou oceano aberto são aproximadamente constantes (ALVES, 2006).

O oceano corresponde a 71% da superfície da terra. A água do mar é uma solução contendo 70 elementos químicos, constituída por solvente (água) e por soluto (sais). Na química, um sal é um composto neutro (Ex.: NaCl, KCl, CaSO₄) de um cátion (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺) ligado a um ânion (Cl⁻, SO₄⁻). Eles são tipicamente o produto de uma reação química (GOMES, 2005).

A água dos oceanos é salgada porque contém sais dissolvidos (com concentrações entre cerca de 33 e 37 g por cada quilograma de água do mar) que têm várias origens:

1. Rochas da crosta vão-se desgastando por erosão e há uma parte dissolvida desse material que é transportada para o oceano pelos rios.
2. Erupções vulcânicas libertam substâncias voláteis (tais como dióxido de carbono, cloro e sulfato) para a atmosfera, uma parte das quais é transportada por precipitação diretamente para o oceano ou indiretamente por meio dos rios. As erupções vulcânicas submarinas contribuem fortemente para os íons no oceano (GOMES, 2005).

Para todos os oceanos, embora a quantidade total de sais dissolvidos seja variável, as proporções relativas dos principais elementos (Sódio - Na⁺, Cloro - Cl⁻, Magnésio - Mg⁺⁺, Cálcio - Ca⁺⁺, Potássio - K⁺, Sulfato - SO₄⁻⁻) são constantes. Esses elementos correspondem a 99% do total de elementos na água do mar. Somente o sal NaCl (Cloreto de Sódio) é responsável por 86% da composição da água marinha. • Em uma salinidade de 35, 1kg de água do mar contém em média 35 gramas de sais inorgânicos dissolvidos. A água do mar é constituída de 96,5% de água pura e 3,5% de sais. Apresenta também uma pequena quantidade de organismos vivos e material inorgânico particulado e orgânico dissolvido (BAPTISTA NETO, 2004).

A água dos oceanos é um bem mineral e uma fonte sustentável de elementos economicamente importantes, como por exemplo: Cl, Na, Mg, K, Br, Sr e B. Em muitos países, a água do mar constitui a principal fonte de sal para consumo humano, como é o caso do Brasil, que extrai todo seu sal de cozinha (NaCl) a partir da evaporação da água marinha proveniente das salinas do Nordeste e do Rio de Janeiro (ALVES, 2006).

3.7 Técnicas de biorremediação e suas respectivas aplicações

A biodegradação é um dos principais processos de atenuação natural para a maioria dos produtos químicos orgânicos no ambiente aquático. Os compostos químicos que são caracterizadas como sendo biodegradáveis são quebradas em compostos menores por bactérias ou fungos durante o seu crescimento, no melhor caso, eles são completamente mineralizados (isto é, transformados em compostos inorgânicos ou utilizado para a produção de biomassa). A biodegradabilidade e a taxa de biodegradação dos produtos químicos são importantes para a estimativa de parâmetros, tais como a exposição a organismos aquáticos, persistência, toxicidade e bioacumulação. Biodegradação é um dos processos mais desejadas

do meio ambiente, especialmente desde que os produtos lançados durante estas bioreações, pode ser mais uma vez assimilados os ciclos de elementos naturais (Baginska, 2015).

Dentro da biorremediação existem alguns tipos de tratamento para degradação do poluente, podendo ser:

“*In situ*” (Latim = no seu lugar de origem) – o tratamento é realizado no seu próprio local de origem, não há necessidade de remoção do material. Isso evita custos e distúrbios ambientais associados ao movimento do material contaminado para o local de tratamento (JACQUES et al., 2006; MARIANO, 2006); “*ad situ*” – os resíduos, solo, são levados a um local próximo a área impactada; “*ex situ*” (Latim =fora do lugar de origem) – ocorre o transporte do resíduo até um local adequado para remediação, distante da fonte poluidora. (ZHANG et al., 2000; MENEGHETTI, 2007). É necessária para evitar o alastramento do contaminante e é muito utilizada em contaminações de cursos de água e lençóis freáticos (ALEXANDER, 1999 apud SANTOS et al., 2007). As técnicas de biorremediação “*ex situ*” produzem um resultado mais rápido, pois são mais fáceis de serem controladas e apresenta uma maior versatilidade para o tratamento de vários tipos de contaminantes (ABBAS, 2003).

As estratégias usadas para a biorremediação dos HAPs podem ser divididas entre as técnicas *in situ*, em que não há necessidade de remoção do substrato contaminado, realizando-se a biorremediação no próprio local poluído; e as técnicas *ex situ*, em que é necessário remover o substrato, procedendo-se a biorremediação em instalações apropriadas, fora do local contaminado (BOOPATHY 2000, RAMSAY et al. 2000).

3.7.1 Atenuação natural ou Biorremediação intrínseca

A técnica de biorremediação *in situ* de baixo custo, sem que haja acréscimo de nutrientes ou adequação de qualquer condição ambiental. Os micro-organismos presentes no local passam a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, reduzindo assim sua concentração com o tempo (MENEGHETTI, 2007). Depende de três eventos:

- ✓ Ocorrência de biotransformação dos contaminantes por populações indígenas;
- ✓ Sorção do contaminante com a matriz ou fases minerais que o tornam compostos menos biodisponíveis e menos tóxicos aos ecossistemas.
- ✓ Perda da toxicidade por volatilização ou diluição.

A remediação natural não se trata de uma alternativa sem nenhuma ação de tratamento, mas sim uma forma de minimizar os riscos para a saúde humana e para o meio ambiente Corseuil e Marins (1998) apud Mariano (2006).

A biorremediação passiva por ser uma técnica que depende exclusivamente dos processos naturais, é uma técnica muito lenta, o que exige o uso conjunto de outras técnicas e o monitoramento do local por um longo período de tempo (JACQUES et. al., 2006).

A biorremediação intrínseca é uma técnica realizada *in situ*, sendo conhecida, também, como atenuação natural ou biorremediação passiva. Nesta técnica, o contaminante permanece no local e a descontaminação ocorre através de processos físicos, químicos e biológicos naturais, como volatilização, diluição, sorção e biodegradação. Normalmente, ocorre de maneira muito lenta, exigindo o monitoramento do local em longo prazo, visando a proteção da saúde humana e ambiental (BOOPATHY, 2000; DÍAZ, 2004; JACQUES, et. al., 2007; FOGH, 2008).

3.7.2 Bioestimulação

Esta técnica de bioestimulação é semelhante à atenuação natural, a diferença é que são adicionados ao sistema nutrientes orgânicos e inorgânicos que visam estimular a atividade microbiana como Nitrogênio e Fosforo, para estabelecer relações de C:N:P eficientes para o aumento das populações microbianas, aumentando significativamente as taxas de degradação dos contaminantes orgânico do ambiente (EVANS et. al., 2004; TRINDADE e.t al., 2005; JACQUES, et. al., 2006).

Este método que pode ser realizado tanto *in situ* quanto *ex situ*. Entretanto, este só é eficaz quando há populações microbianas degradadoras no substrato (YAKUBU, 2007). A técnica é realizada estimulando-se a microbiota endógena, otimizando suas condições de crescimento por meio da adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos, regulação de pH, temperatura e aeração (JORGENSEN et. al., 2000; RAMSAY et. al., 2000; EBUEHI et. al., 2005; JACQUES et. al., 2007; MANDRI & LIN, 2007; MARIANO et. al., 2007; YAKUBU, 2007; FOGHT, 2008).

3.7.3 Bioaugmentação

A técnica de bioaugmentação consiste na adição de culturas bacterianas com comprovada atividade degradadora dos poluentes a um local, garantindo que o consórcio adequado de microrganismos estará presente em suficientes tipos, número e compatibilidade a fim de metabolizar o poluente de forma eficaz. Esta técnica pode ser utilizada tanto *in situ* quanto *ex situ*, sendo particularmente importante para tratamentos *in situ*, quando não há populações microbianas indígenas capazes de degradar o contaminante (JORGENSEN et. al., 2000; JACQUES et. al., 2007; MARIANO et. al., 2007; YAKUBU, 2007; FOGHT, 2008).

Esta é uma estratégia que ajuda a melhorar a capacidade de uma matriz contaminada removendo os contaminantes por meio de adição de uma linhagem isolada ou de consórcios microbianos. O inóculo utilizado pode ser do próprio local contaminado (autóctone) ou de outros ambientes impactados (exógeno) (FANTROUSSI & AGATHOS, 2005). O bioaumento é um processo de importante utilização em locais contaminados, principalmente naqueles que não possuem ou possuem em pequenas quantidades as populações de micro-organismos necessários para que o processo de biodegradação ocorra (MARIANO, 2006).

Sendo assim todos os fatores bióticos e abióticos do sistema são responsáveis pelo sucesso da biodegradação, podendo reduzir a mobilidade, a massa, os riscos do contaminante no ambiente impactado (FRANKENBERGER & KARLSON, 1991; HINCHEE et. al., 1995).

Para que o processo de biorremediação ocorra de forma eficiente, os micro-organismos devem estar ativos e saudáveis. Para isso algumas medidas biocorretivas devem ser adotadas; estas medidas visam aumentar a população microbiana proporcionando uma condição ambiental ótima para o seu desenvolvimento. As medidas biocorretivas podem ser aplicadas em condições aeróbias (na presença de oxigênio) ou anaeróbias (na ausência de oxigênio) (ABBAS, 2003).

Os poluentes orgânicos possuem uma estrutura química que influencia diretamente na habilidade dos micro-organismos metabolizarem estas moléculas, principalmente na biodegradação (MARIANO, 2006).

3.7.4 Biosparging ou biopulverização

É uma técnica de biorremediação *in situ*, muito utilizada em solos contaminados, onde ocorre a injeção de ar na zona não saturada, proporcionando o fornecimento de oxigênio aos

micro-organismos aeróbios para degradar os compostos orgânicos. Esta é uma tecnologia considerada promissora, pois a disponibilidade de oxigênio molecular tem um grande efeito na biodegradação de vários compostos (MENEGETTI, 2007; MARIANO, 2006).

Este processo tem como vantagem a minimização da extração de vapores, a utilização de equipamentos de fácil instalação e aquisição, a atuação em locais de difícil acesso e o pequeno impacto na área contaminada (CETESB, 2012).

3.7.5 Bioventing ou Bioventilação

Semelhante ao Biosparging é uma técnica onde também se utiliza o oxigênio para ativar a microbiota aeróbia presente em regiões subterrâneas para degradar compostos orgânicos absorvidos no solo e em zonas não saturadas, diferenciando da técnica de Biospargin, pois o fluxo de ar é fornecido em baixas taxas para impedir a volatilização de alguns contaminantes (KIRTLAND & AELION, 2000).

A técnica de *bioventing* ou bioventilação é normalmente utilizada para o tratamento de solos contaminados e baseia-se na introdução de oxigênio no substrato para estimular a atividade dos microrganismos aeróbios, podendo ser aplicada *in situ* ou *ex situ*, de acordo com o local a ser tratado (BOOPATHY, 2000).

3.7.6 Compostagem e *Landfarming*

O sistema de *landfarming* é aplicado para o tratamento da fase sólida de solos contaminados e pode ser realizado *in situ* ou *ex situ* (BOOPATHY, 2000). Nesta técnica, os microrganismos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os poluentes transformando-os em substâncias inertes como CO₂ e água, por meio do revolvimento do solo e uso de aração, além da adição de nutrientes e, se necessário, de irrigação, bioaugmentação e surfactantes (JORGENSEN et. al., 2000; JACQUES et. al., 2007).

A compostagem é outro processo de descontaminação de solos, realizado por microrganismos aeróbios *ex situ*. No emprego desta técnica, o substrato contaminado é removido do local de origem e colocado em pilhas, com ou sem aeração, controlando-se a lixiviação e o escoamento superficial dos líquidos provenientes dessas pilhas (JORGENSEN et. al., 2000; JACQUES et. al., 2007).

Segundo Fernandes e Silva (1999), “a compostagem pode ser definida como uma biooxidação aeróbia exotérmica de um substrato orgânico heterogêneo, no estado sólido, caracterizado pela produção de gás carbônico, água, liberação de substâncias minerais e formação de matéria orgânica estável”.

3.7.7 Degradação em reatores biológicos

É uma estratégia *ex situ* em que necessita da remoção e transporte do material contaminado para um local adequado, por ser tratar de um sistema fechado apresenta um maior controle das condições abióticas e bióticas, podendo ser melhorado com a adição de nutrientes, de micro-organismos, oxigênio e umidade adequados (KHAN et. al., 2004).

Utilizado para o tratamento de líquidos ou suspensões *ex situ*. Neste método, a biodegradação ocorre em um recipiente ou reator (BOOPATHY, 2000), onde o material contaminado é misturado com água formando uma suspensão, com 5 a 50% de sólidos, que é agitada mecanicamente, aumentando a aeração, a homogeneidade dos poluentes e sua disponibilidade aos microrganismos.

Parâmetros físicos e químicos, como pH, disponibilidade de nutrientes, aeração e temperatura são ajustados para a máxima produção de biomassa, sendo possível, ainda, bioaumentar o substrato. Após a redução dos contaminantes aos níveis desejados, a suspensão é desidratada e a água pode ser reutilizada no biorreator (DOELMAN & BREEDVELK, 1999 *apud* JACQUES et. al., 2007; WOO & PARK, 1999; VAN HAMME et. al., 2003). A técnica possui a vantagem de degradar poluentes de maneira muito rápida. Deve-se, entretanto, considerar que quantidade de substrato tratado é limitada pelo tamanho dos biorreatores; em alguns casos, é necessário o pré-tratamento do substrato para remoção de compostos tóxicos aos microrganismos; além do custo elevado, devido à alta tecnologia empregada. Estes fatores restringem sua aplicação aos casos em que outras técnicas provavelmente não trariam resultados satisfatórios (WOO & PARK, 1999; DOELMAN & BREEDVELK, 1999 citado em JACQUES et. al., 2007, VAN HAMME et. al., 2003).

É possível utilizar biofiltros para realizar o tratamento de poluentes voláteis por meio da utilização de colunas de captação microbiana, evitando que os contaminantes sejam emitidos na atmosfera (BOOPATHY, 2000).

O método conhecido como *pump and treat* é utilizado para o tratamento de águas subterrâneas, consistindo no seu bombeamento para a superfície, procedendo-se a

descontaminação *ex situ* e posteriormente, pela reinjeção da água tratada (BOOPATHY, 2000).

Segundo MULLIGAN et al. (2001), a utilização de biossurfactantes em diversos tipos de substrato contaminados proporciona altas taxas de remoção de poluentes. A adição destas substâncias a culturas puras ou em solo tem demonstrado aumentar a biodegradação de vários hidrocarbonetos, acelerando o processo de reparação (GANESHLINGAM et al., 1994; CAMEOTRA & SINGH, 2009). Assim, existe uma clara correlação entre produção de biossurfactante e utilização de hidrocarbonetos por microrganismos (CAMEOTRA & SINGH, 2009). Estes compostos têm demonstrado maior versatilidade do que muitos surfactantes sintéticos, auxiliando na remediação da poluição ambiental por petróleo tanto *in situ* quanto *ex situ* (MULLIGAN et al., 2001; YAKUBU, 2007).

3.8 Biorremediação

A biorremediação é um conjunto de técnicas biotecnológicas onde são empregados micro-organismos ou produtos e processos microbianos para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes (ATLAS, 1995). Estas técnicas permitem a remoção de poluentes orgânicos, tais como componentes do petróleo e combustíveis, através da ação dos processos naturais de biodegradação por microrganismos. Esta atividade de degradação é potencializada pela adição de substratos, melhoramento das condições do meio e, em certos casos, através da introdução de micro-organismos específicos, em particular, bactérias e fungos (KORDA et al., 1997). Este processo é conseguido por intermédio de microrganismos que possuem o potencial enzimático de degradação ou transformação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo (HEAD et al., 1999 e KORDA et al., 1997), utilizando-os como fonte de energia e carbono (RON et al., 2002).

Biorremediação é o principal mecanismo para limpar poluentes de petróleo em condição de atenuação natural (KRISTENSEN et al., 2010). A Biorremediação da poluição causado por óleo é uma forma eficiente de resolver o problema. O petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos contendo n-alcanos, ramificado alcanos, cicloalcanos, compostos aromáticos, isoprenóides, asfalteno e muitos outros. Diversos micro-organismos têm o potencial de usar diferentes hidrocarbonetos como fonte de energia. Verificou-se que de 70 géneros, existem mais do que 200 tipos de micro-organismos, que pode oxidar um ou mais hidrocarbonetos derivados do petróleo (BAO et al., 2012).

As medidas biocorretivas visam aumentar a população microbiana, criando condições ambientais propícias para o desenvolvimento. Tais medidas dependerão de fatores biológicos, como tipos de micro-organismos presentes; e físico-químico: pH, água no solo, quantidade de nitrogênio, potássio, fosfato e a toxicidade dos poluentes. Dentre as novas estratégias, a biorremediação surge como a menos agressiva ao ambiente e a mais adequada para a manutenção do equilíbrio ecológico. Esta tecnologia tornou-se bastante empregada na recuperação de áreas poluídas por substâncias xenobióticas e tem boa aceitação pela opinião pública, tendo sido aprovada por órgãos regulamentadores de meio ambiente, como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental do Canadá e de outros países. A técnica *in situ* geralmente, é economicamente viável, devido aos baixos custos energéticos necessários para as transformações bioquímicas, conduzidas por diversas espécies microbianas capazes de minimizar ou eliminar o impacto dos poluentes no ambiente (ECKENFELDER, 1989; LIN et. al., 1996; SEMPLE et. al., 2001).

A biodegradação de hidrocarbonetos é um processo de grande complexidade que depende da natureza e quantidade dos hidrocarbonetos presentes no ambiente poluído (Musat and Widdel, 2008). A escolha do processo mais adequado e eficiente dependerá do tipo e das características físico-químicas e toxicológicas dos poluentes (Tabela 2); dos microrganismos que existem no local; o volume do material que será tratado; tempo e custo para a utilização da tecnologia (LIN et. al., 1996; WALTER & CRAWFORK, 1997).

A biorremediação pode ser classificada quanto ao local, como: *in-situ* e *ex-situ*. Nas duas formas, a contribuição do micro-organismo varia de acordo com o tipo de substrato, do equipamento utilizado e do contaminante. A biorremediação *in situ* é realizada para remediar o local onde ocorreu o derrame, utilizando os micro-organismos presentes no local ou adicionado ao processo de degradação. A biorremediação *ex situ* envolve a remoção do material contaminado para outro local, a fim de tratá-lo (ALEXANDER, 1994).

Tabela 2 – Características físico-químicas e toxicológicas dos poluentes ambientais e aplicabilidade da biorremediação.

Classe do Contaminante	Frequência	Evidência de sucesso	Limitações
1. Hidrocarbonetos e derivados			
Gasolina e óleos combustíveis	Muito frequente	Fácil, biorremediação aeróbia e anaeróbia.	Formação de fase livre e leve (LNAPL).
Poliaromáticos (naftaleno e antraceno)	Comum	Biorremediação aeróbia sob condições específicas.	Forte absorção em superfície.
Álcool, acetona e éster	Comum	Fácil remediação aeróbia e anaeróbia.	
Éter	Comum	Biorremediação aeróbia e anaeróbia sob condições específicas.	
2. Halogenados alifáticos			
Altamente clorados – PCE, TCE	Muito frequente	Cometabolizado em condições anaeróbias e aeróbias em casos específicos	Forma fase livre densa (DNAPL).
Fracamente clorados – VC	Muito frequente	Biorremediação aeróbia em condições específicas e cometabolizado em condições anaeróbias.	Forma fase livre densa (DNAPL).
3. Halogenados aromáticos			
Altamente clorados (hexaclorobenzeno e Pentaclorofenol)	comum	Biorremediação aeróbia sob condições específicas e cometabolizado em condições anaeróbias.	Absorve em superfície. Forma fase líquida (NAPL) e sólida (NASP).
Fracamente clorados – cloro e diclobenzeno	Comum	Fácil biorremediação aeróbia.	Forma fase líquida (NAPL).
4. Bifenilas Policloradas			
Altamente clorados	Pouco frequente	Cometabolizado em condições anaeróbias.	Absorve fortemente em superfície.
Fracamente clorados	Pouco frequente	Biorremediação aeróbias sob condições específicas.	Absorve fortemente em superfície.
Nitroaromáticos	Comum	Biorremediação aeróbia e anaeróbia.	
5. Metais			
Cr, Cu, Ni, Pb, Hg, Cd, Zn etc	Comum	Processos microbianos afetam sua solubilidade e reatividade.	Disponibilidade altamente variável, controlada pelas condições químicas.

Fonte: Adaptado de CETESB – GTZ

3.9 Biodegradação de compostos do petróleo e seus derivados

A maior parte dos componentes do petróleo (de 60% a 90%) é biodegradável. Entretanto, o restante (de 10% a 40%), em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. Mesmo tratando-se de uma porção menor, deve-se ressaltar que isto representa toneladas de poluentes impactando ecossistemas e sendo bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O destino destes compostos após um derrame irá depender da interação entre vários fatores, podendo-se destacar a degradação microbiana (CRAPEZ *et. al.*, 2002).

A presença de hidrocarbonetos em toda a biosfera pode explicar a capacidade de muitas espécies microbianas em utilizar estes compostos como substrato de crescimento, degradando poluentes do petróleo e utilizando-os como fonte de carbono e energia (BOOPATHY, 2000; RAMSAY *et. al.*, 2000; WIDDEL & RABUS, 2001; DÍAZ, 2004; MANDRI & LIN, 2007). Para tal, é necessário quebrar ao menos parte da molécula, em um composto mais simples, intermediário na via metabólica (BOOPATHY, 2000; RAMSAY *et. al.*, 2000; WIDDEL & RABUS, 2001; DÍAZ, 2004; MANDRI & LIN, 2007).

Algumas características das bactérias propiciam sua adaptação a várias condições ambientais, como seu crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética e rápida adaptação a variações do meio. Para sua sobrevivência e crescimento, bactérias necessitam basicamente de energia, carbono e nutrientes (N, P, S, K, Ca, Mg, etc.) (Martins 2004). Várias vias metabólicas de degradação dos HAPs foram identificadas em diferentes bactérias. A quebra de compostos aromáticos pode ser feita aerobicamente ou anaerobicamente, conforme demonstrado na Figura 1 (DAGLEY, 1975; BUGG & WINFIELD, 1998; BOOPATHY, 2000; WIDDEL & RABUS, 2001; DÍAZ, 2004; JACQUES *et. al.*, 2007).

Nos ambientes naturais, a maior parte da matéria orgânica é mineralizada aerobicamente, mas este processo pode ocorrer também na ausência de oxigênio (SMITH, 1990; HOPPER, 1991). Entretanto, de acordo com Díaz (2004), a degradação microbiana do petróleo e seus produtos refinados é muito mais rápida em condições aeróbicas do que em condições anaeróbicas.

A susceptibilidade dos componentes do petróleo à biodegradação varia de acordo com a concentração do poluente e com o tamanho da molécula do hidrocarboneto (CHOSSON *et. al.*, 1991). Geralmente, um aumento no número de anéis aumenta a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula de HAP, tornando-o menos susceptível à biodegradação

(KANALY et. al., 2000; YU et. al., 2005). A solubilidade dos HAPs em água é, geralmente, baixa e decresce quando o peso molecular aumenta. Compostos de alto peso molecular são, então, considerados recalcitrantes (SEO et. al., 2009; ZHOU et. al., 2009).

A característica comum de todas as frações do petróleo é a sua baixa solubilidade em água, dificultando a ação microbiana em degradá-los (KANALY et. al., 2000; YU et. al., 2005; CAMEOTRA & SINGH, 2009; SEO et. al., 2009). O primeiro passo da degradação microbiana consiste em obter melhor contato da superfície celular com o óleo e então, o transporte através da membrana celular. Apesar das muitas pesquisas nesta área, o mecanismo de transporte e assimilação do óleo dentro das células bacterianas ainda não é totalmente conhecido (CAMEOTRA & SINGH, 2009).

A aplicação de surfactantes pode aumentar a disponibilidade dos HAPs aos microrganismos degradadores, auxiliando na solubilização do poluente (GANESHLINGAM et. al., 1994; RON e ROSENBERG, 2001; MARIANO et. al., 2007; CAMEOTRA & SINGH 2009; SEO et. al., 2009).

3.10 Condições necessárias para ocorrer biodegradação

A maior parte do petróleo do mundo é total ou parcialmente biodegradado em reservatórios e este processo pode levar milhões de anos para ocorrer (HEAD, 2003). Para ter um melhor entendimento dos mecanismos de biodegradação do óleo é necessário utilizar condições ideais para que o processo ocorra em curtos intervalos de tempo, quando comparado ao tempo geológico (CONNAN, 1984; PALMER, 1993 e BLANC, 1994).

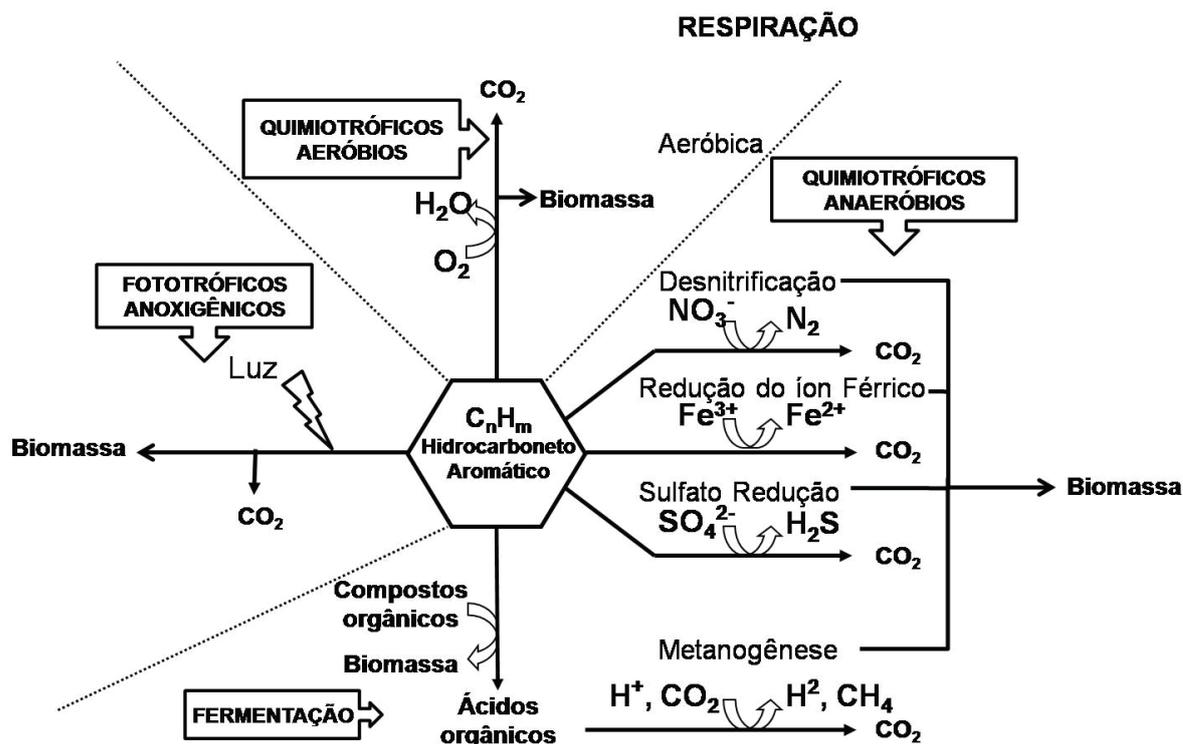
Em geral, para que ocorra biodegradação de petróleo é necessário (PETERS et. al., 2005): i) a presença de aceptores de elétrons (ex., oxigênio molecular, nitratos, sulfatos, íons férricos) e nutrientes inorgânicos (ex., fósforo, traço de metais), necessários no início do processo e para manutenção dos microrganismos, respectivamente; ii) a rocha geradora deve ter porosidade e permeabilidade suficientes para permitir a difusão de nutrientes e mobilidade de microrganismos. Rochas com baixa porosidade e permeabilidade, com grãos pequenos e sem fraturas, dificultam a difusão de nutrientes e mobilidade microbiana, conseqüentemente, possuem óleos menos biodegradados; iii) a temperatura do reservatório não deve ultrapassar 80 °C. Considerando o gradiente geotérmico típico (25-30 °C/km), essa temperatura é atingida em aproximadamente 2-3 km de profundidade (ROUVEN, 2008); iv) a salinidade da água de formação deve estar na faixa de 100-150 ‰ (HEAD, 2003). Óleos em reservatórios de

petróleo com maior salinidade são tipicamente não biodegradáveis; v) a presença de microrganismos capazes de degradar componentes do petróleo; vi) a ausência de “venenos naturais”, isto é, de microrganismos não biodegradadores de hidrocarbonetos, que são tolerantes às condições dos reservatórios e que inibem e/ou limitam o crescimento e atividade enzimática de microrganismos degradadores de petróleo (DA CRUZ, 2009). Se todas estas condições estão presentes, o petróleo é alterado pelos microrganismos levando a uma diminuição da sua qualidade (DA CRUZ, 2012).

3.10.1 Aceptores de elétrons e nutrientes inorgânicos

Um dos fatores primordiais para ocorrer biodegradação é a presença de aceptores de elétrons e nutrientes adequados para manter ativos microrganismos de diferentes espécies (Figura 1). Os microrganismos aeróbios necessitam da presença de oxigênio molecular (condições óxicas) para seu crescimento e para converter os hidrocarbonetos em CO_2 , H_2O e biomassa. Já os microrganismos facultativos podem crescer na presença (aerobiose) ou ausência (anaerobiose, fermentação) de oxigênio (condições anóxicas) (PETERS, 2005; DA CRUZ, et. al., 2011 e BERTHE-CORTI, 2002). Os micro-organismos anaeróbios estritos utilizam diferentes aceptores, como nitratos (NO_3^-), sulfatos (SO_4^{2-}) e íons férricos (Fe^{3+}) para metabolizar.

Figura 1 - Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, mostrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração. Figura adaptada de Díaz (2004).



Outros anaeróbios (aerotolerantes) crescem na presença de concentrações-traços de oxigênio dissolvido, porém não utilizam este gás metabolicamente (BERTHE-CORTI, 2002 e MADIGAN, 1997). Além disso, existem aqueles microrganismos que requerem aceptores de elétrons específicos, como os fermentadores ou acetogênicos que utilizam acetatos (CH_3COO^-) para converter os hidrocarbonetos em CH_4 e CO_2 (Berthe-Corti, 2002). Na ausência de aceptores de elétrons, tais como sulfato e nitrato, os hidrocarbonetos são transformados em produtos finais (CH_4 e CO_2) através da interação de vários grupos de microrganismos como, por exemplo, bactérias fermentativas, acetogênicas produtoras de hidrogênio, metanogênicas, hidrogenotróficas e acetoclásticas (COLLERAN, 1995 e OUDE-ELFERINK, et. al., 1997)

Nutrientes inorgânicos, tais como nitrogênio (N) e fósforo (P), são essenciais na biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios e traços de metais, como molibdênio (Mo), cobalto (Co) e cobre (Cu), são importantes em reações enzimáticas. Alguns desses nutrientes são incorporados na matriz da rocha geradora de petróleo durante a diagênese (degradação bioquímica ou térmica da matéria orgânica para gerar petróleo) ou através de alteração secundária (*water washing* ou biodegradação) e migram para a rocha reservatório

tornando-se um dos seus componentes (HOLLOWAY, et. al., 2001 e DA SILVA, et. al., 2006).

Tanto os nutrientes inorgânicos, quanto alguns metais podem limitar o processo de biodegradação do petróleo (DA CRUZ, et. al., 2012)

3.10.2 Influência da temperatura e pressão na biodegradação do petróleo

A temperatura ótima para ocorrer biodegradação de petróleo no reservatório é aproximadamente 60-80 °C (PETERS, 2005 e WILHELMS, et. al., 2001), entretanto, simulações laboratoriais indicam que a biodegradação de hidrocarbonetos ocorre pela ação de microrganismos que crescem a diferentes temperaturas, tais como, psicofílicos (0-25 °C), mesofílicos (30-40 °C) e termofílicos (50-60 °C). WALKER e COLWELL (1976) demonstraram a biodegradação de alcanos por microrganismos obtidos a partir de água de formação e sedimentos, na faixa de temperatura entre 0-10 °C, enquanto Rueter et al. (1994) isolaram uma bactéria redutoras de sulfato (BRS) termofílica que biodegrada alcano em temperaturas acima de 60 °C. A influência da temperatura na biodegradação de hidrocarbonetos depende, portanto, do tipo de microrganismo e das condições utilizadas no processo (DA CRUZ, et. al., 2012).

Vale ressaltar que nem todas as acumulações de óleo em temperaturas inferiores a 80 °C são biodegradadas. WILHELMS, et. al., 2001) sugeriram que, se um reservatório de óleo foi aquecido a mais de 80 °C em qualquer momento desde sua deposição, ocorrerá a “paleopasteurização” ou “esterilização” do óleo, provocando a mortandade dos microrganismos biodegradadores, conseqüentemente, mesmo que a temperatura seja novamente inferior a 80 °C, o petróleo não será biodegradado. Portanto, reservatórios de óleo que sofreram elevação significativa da temperatura podem conter petróleo não biodegradado, mesmo possuindo baixas profundidade e temperatura, visto que a “recolonização” por bactérias do óleo “esterilizado” no reservatório é tipicamente incapaz de ocorrer.

Ao contrário da temperatura, a pressão do reservatório não é um fator limitante para o crescimento microbiano (PETERS, 2005). MOLDOWAN et. al., (1992) analisaram óleos biodegradados em reservatórios a 2500 m na Bacia Adriática Central (Itália e Iugoslávia), enquanto WALTERS (1999), relataram estudos com óleos altamente biodegradados em reservatórios de águas profundas a 4000 m no Sul da Bacia do Mar Cáspio (Azerbaijão). Em

ambos os casos, a biodegradação ocorreu com geopressões diferentes e temperaturas inferiores a 80 °C.

3.10.3 Microrganismos envolvidos no processo de biodegradação do petróleo

Desde o início da produção comercial de petróleo, os geoquímicos têm se deparado com problemas relacionados à presença de microrganismos nos reservatórios (MAGOT, et. al., 2000). Os microrganismos, além de consumirem os hidrocarbonetos, são também citados como os grandes responsáveis pela corrosão de equipamentos e tanques de estocagem, devido aos subprodutos originados da biodegradação (DA CRUZ et. al., 2012).

Os microrganismos envolvidos no processo de biodegradação ainda são objetos de discussões conflitantes, uma vez que se atribui a degradação tanto aos aeróbios, quanto aos anaeróbios (BORZENKOV et. al., 2006). Aqueles que defendem a ação dos microrganismos aeróbios (condições óxicas) assumem que a temperatura durante o processo está entre 60-80 °C e envolve a incursão de águas meteóricas que carrega oxigênio e nutrientes necessários à manutenção destes microrganismos dentro do reservatório, enquanto aqueles favoráveis à degradação anaeróbia (condições anóxicas) indicam que a demanda de oxigênio no reservatório é insuficiente para manter os aeróbios ativos e, portanto, os microrganismos que degradam o petróleo são estritamente anaeróbios, degradando os componentes do petróleo mais lentamente (DA CRUZ et. al., 2012).

Rastreio de bactérias, leveduras e fungos capazes de degradar hidrocarbonetos alifáticos-aromáticos sob temperaturas mesófilas mostraram que um número de micro-organismos de solo pode degradar estes compostos, entre outros gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* e leveduras lipolíticas produtoras de lipase extracelular ou atividades de esterase (Tan et al., 2008; Novotný, 2015).

No entanto, existem evidências científicas que indicam que estes dois grupos de microrganismos biodegradam o petróleo através de ação sinérgica em tempos geológicos diferentes, onde um complementa o outro sem sobreposição. Os componentes do petróleo e outros metabólitos que são recalcitrantes para os aeróbios presentes no reservatório são facilmente biodegradados pelos anaeróbios e, por outro lado, aqueles que são de difícil degradação pelos anaeróbios podem ser completamente biodegradados pelos aeróbios (DA CRUZ, 2009; DA CRUZ, et. al., 2011 e DA CRUZ, et. al., 2008).

3.11 Mudanças na composição química do petróleo

3.11.1 *n*-alcanos e compostos aromáticos

A biodegradação microbiana afeta significativamente a composição molecular e as propriedades físicas do petróleo bruto, levando a uma diminuição dos compostos de baixo peso molecular, presentes nas frações saturada e aromática, e a um aumento da fração polar (fração asfáltica) (PETERS, et al., 2005). Essas mudanças ocorrem devido à remoção quase sequencial e sistemática dos compostos presentes no petróleo, iniciando pelos hidrocarbonetos mais leves (C6 a C15) até aqueles mais resistentes ao ataque microbiano (ex.: diasteranos, dia-hopanos) (DA CRUZ, et. al., 2011).

Os hidrocarbonetos são preferencialmente removidos durante a biodegradação inicial, mas compostos contendo enxofre (tióis, dissulfetos, tioalcanos), nitrogênio (carbazóis) e oxigênio (furanos) também podem ser biodegradados, gerando novos compostos como ácidos saturados, aromáticos, cíclicos e acíclicos e fenóis (HEAD, et al., 2003).

A microbiota presente nos reservatórios de petróleo possui capacidade enzimática e preferências metabólicas diferenciadas para degradar esses componentes. Uns degradam preferencialmente alcanos normais, ramificados ou cíclicos, outros preferem mono ou poliaromáticos e existem ainda aqueles que degradam tanto alcanos quanto aromáticos (LARTER, et. al., 2006).

A principal via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos por microrganismos aeróbios já está bem estabelecida na literatura e pode ocorrer na porção terminal e/ou subterminal da cadeia carbônica (AZEVEDO, et. al., 2009 e LIAO, et. al., 2009). Os *n*-Alcanos de cadeias longas (C10-C24) são mais rapidamente degradados a partir da porção terminal, enquanto os *n*-alcanos de cadeias menores que C10 são tóxicos para a maioria dos microrganismos e sua oxidação é iniciada pela porção subterminal da cadeia (DA CRUZ, et. al., 2012)

A etapa inicial do processo de biodegradação é a oxidação do substrato por oxigenases, com a utilização de oxigênio molecular como acceptor de elétrons. A oxidação terminal inicia-se com a formação de um álcool primário. Após a etapa inicial, o álcool é oxidado, por ação das enzimas álcool e aldeído desidrogenases, aos correspondentes aldeído e ácido carboxílico, respectivamente. O ácido carboxílico, por sua vez, é utilizado como substrato para acil-CoA sintetase e é posteriormente biodegradado pelo processo de b-

oxidação. Os *n*-alcanos de cadeias menores são oxidados subterminalmente (1° carbono secundário da cadeia do *n*-alcano), formando álcool secundário, cetona, éster e ácidos carboxílicos, que são posteriormente biodegradados pelo processo de β -oxidação

A biodegradação de compostos aromáticos por microrganismos aeróbios também é iniciada pela ação de oxigenases (mono- ou dioxigenases) que promovem a oxidação do substrato formando dióis, seguida de clivagem do anel e formação de catecol que, posteriormente, é degradado formando diferentes intermediários, como acetaldeído, piruvato e succinato (WENTZEL, et. al., 2007)

O conhecimento das rotas de biodegradação para anaeróbios, no entanto, é limitado. Sob condições anóxicas, os compostos orgânicos são sucessivamente oxidados, ou seja, os produtos de cada etapa de oxidação atuam como substratos nas etapas seguintes, até que a matéria orgânica seja completamente degradada a biogás (EVANS, et. al., 1992).

Existem vários relatos sobre a oxidação de hidrocarbonetos com culturas puras de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em condições estritamente anaeróbias (BERTHECORTI, 2005), denitrificantes e metanogênicas (SO, et. al., 2005). As BRS e denitrificantes utilizam sulfatos e nitratos, respectivamente, como aceptores de elétrons para biodegradar hidrocarbonetos, análogo ao oxigênio molecular na biodegradação aeróbia. Já as bactérias metanogênicas metabolizam hidrocarbonetos ou na ausência de oxigenio (LIAO, et. al., 2009).

Os mecanismos de biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos utilizando consórcios de microrganismos e bactérias isoladas são bastante estudados, porém pouco entendidos. Em geral, dois mecanismos de ativação, tanto para alcanos quanto para aromáticos, têm sido propostos: o primeiro envolve a ativação do carbono subterminal do hidrocarboneto e adição de fumarato, enquanto que o segundo envolve a carboxilação do hidrocarboneto na posição C-3 (PETERS, et. al., 2005; KORDA, et. al., 1997; LIAO, et. al., 2009; FRITSCH, 2000; EHRENREICH, et. al., 2000 e ZENGLER, et. al., 1999). Ambos os caminhos podem ocorrer simultaneamente em consórcios de BRS.

Quando a biodegradação ocorre através do primeiro mecanismo de ativação, o hidrocarboneto é adicionado à dupla ligação do fumarato via átomo de carbono subterminal, gerando ácidos graxos lineares e ramificados e succinatos substituídos. Os ácidos graxos lineares gerados com números pares de carbono provêm de *n*-alcanos também com números pares de carbono e os ácidos graxos com números de carbono ímpares são gerados a partir de *n*-alcanos com números ímpares de carbono. No segundo mecanismo ocorre formação apenas

de ácidos graxos lineares, porém os *n*-alcanos pares geram os ácidos graxos ímpares e vice-versa (DA CRUZ, et. al., 2012).

3.11.2 Compostos biomarcadores

Os biomarcadores mais comumente analisados no petróleo pertencem às classes dos terpanos tricíclicos, pentacíclicos (hopanos) e dos esteranos.

Em reservatórios, os terpanos tricíclicos (TT) C19-C45 são altamente resistentes à biodegradação, removidos após os hopanos⁶⁶ e ao mesmo tempo em que os diasteranos, porém, algumas exceções foram observadas utilizando experimentos em laboratório com culturas aeróbias. Estudos recentes reportaram a remoção de TT antes de hopanos, com degradação preferencial de ambos os epímeros *R* e *S* para TT C28 em relação ao TT C29 (BOST, et. al., 2001; DA CRUZ, et. al., 2008; GROSSI, et. al., 2008 e DA CRUZ, et. al., 2011).

O mecanismo de degradação de hopanos, 25-nor-hopanos e esteranos, tanto em reservatórios quanto em escala laboratorial, envolve muitas discussões. Alguns estudos com óleos severamente biodegradados no reservatório mostram que os hopanos são removidos antes dos esteranos, com formação de 25-nor-hopanos. Por outro lado, existem alguns relatos, também com óleos severamente biodegradados no reservatório, indicando que os hopanos são removidos após a quase total degradação dos esteranos, sem formação de 25-nor-hopanos. Como exemplos, óleos do oeste da Sibéria, severamente biodegradados, mostraram degradação de 17a(H)-hopanos com enriquecimento de 25-nor-hopanos e sem degradação de esteranos. Existem, também, exemplos de petróleos onde a degradação de hopanos e esteranos ocorreu simultaneamente, como é o caso das amostras de asfaltos de Malagasy que apresentaram 17a(H)-hopanos, 25-nor-hopanos e esteranos parcialmente degradados. Em escala laboratorial, a suscetibilidade de biodegradação destes biomarcadores depende das condições do experimento e, também, da população microbiana utilizada (DA CRUZ, et. al., 2011 e DA CRUZ, 2009). Por exemplo, sob condições aeróbias, BOST et. al., (2001) mostrou que os hopanos são degradados sem produção de 2,5-nor-hopanos ou degradação de esteranos.

Existe uma grande quantidade de microrganismos descritos na literatura que possuem capacidade enzimática para biodegradar biomarcadores do petróleo (DE VASCONCELLOS, et. al., 2009). Dentre estes, citam-se, como exemplos, os aeróbios pertencentes aos gêneros

Achromobacter, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Mezorhizobium* e *Bordetella*, descritos na literatura como degradadores de hidrocarbonetos e/ou associados a ambientes contaminados com óleo e alguns anaeróbios facultativos pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Acinetobacter*, dentre outros, conhecidos pela capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono diretamente ou por utilizarem os metabólitos produzidos por outras bactérias, quando estão em consórcios (TOLEDO, et. al., 2006 e DE VASCONCELLOS, et. al., 2009).

Um dos principais produtos gerados a partir da biodegradação dos terpanos tricíclicos, hopanos e esteranos são seus correspondentes ácidos terpanoicos tricíclicos, hopanoicos e esteranoicos (DA SILVA, 2008). Esses ácidos são comumente derivatizados aos correspondentes ésteres metílicos e reduzidos a hidrocarbonetos, para serem analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Os estudos dos componentes ácidos correlacionados com os da fração neutra em amostras de óleos e sedimentos é um campo vasto não totalmente explorado e pode ser utilizado para um melhor entendimento dos processos que envolvem geração, migração e biodegradação dessas amostras (DE LIMA, et. al., 2010). Óleos crus imaturos, óleos biodegradados, frações e óleos pesados, assim como águas geradas na extração do óleo cru e betume, provenientes de várias partes do mundo, frequentemente apresentam ácidos orgânicos de ocorrência natural em sua constituição (KOIKE, et. al., 1992 e YEN, et. al., 2004).

No Brasil, o aparecimento de petróleos ácidos está relacionado com a produção de Cherne e Pampo, na Bacia de Campos. Este surgimento mantém uma estreita relação com a evolução das descobertas e produção de óleo no país (SCOTT, et. al., 2008).

3.12 Vantagens da biorremediação microbiana

Biodegradação é um dos processos mais desejadas do meio ambiente, especialmente já que os produtos liberados durante esta bioreações, pode ser mais uma vez assimilados os ciclos de elementos naturais (Cowan et al.,1996;).

O termo biorremediação pode ser definido como um processo que utiliza a biotecnologia na aceleração da transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos. Normalmente utiliza-se o metabolismo de microrganismos para eliminação rápida de poluentes, para reduzir sua concentração para níveis aceitáveis, transformá-los em compostos de baixa toxicidade, ou mesmo mineralizá-los completamente (TORSVIK et. al., 1990; COLLA & COSTA 2003; MANDRI & LIN 2007; YAKUBU, 2007). Os processos de

biorremediação baseiam-se nas atividades aeróbicas ou anaeróbicas de microrganismos denominados “petrófilos” (BOOPATHY, 2000; MANDRI & LIN, 2007). Assim, vários tipos de microrganismos utilizam vias bioquímicas complexas para transformar os hidrocarbonetos em intermediários comuns do seu catabolismo e, a partir daí, em fonte de carbono e energia para seu crescimento (DÍAZ 2004; JACQUES et. al., 2007; MANDRI & LIN 2007; SEO et. al., 2009).

Vários aspectos da biorremediação a tornam uma opção atraente na degradação de petróleo, demonstrando vantagens sobre outros métodos de tratamento, pois consiste em um processo natural; algumas técnicas podem ser aplicadas *in situ* com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras. Além disso, muitos microrganismos degradam vários poluentes permanentemente, podendo, ainda, ser associados a métodos de tratamento físicos ou químicos (BOOPATHY, 2000; MANDRI & LIN, 2007; YAKUBU, 2007). Nos últimos anos, diversas pesquisas têm indicado que a biorremediação é uma alternativa segura e eficaz de remoção de petróleo do ambiente (DÍAZ, 2004; YAKUBU, 2007).

Os microrganismos desempenham um papel fundamental na degradação no solo. A degradação microbiana é um importante mecanismo envolvido na dissipação desses produtos químicos, bem como a descontaminação do local contaminado (Juhasz, 2000). Numerosos microrganismos foram encontrados para metabolizar HAP sob várias condições (Hilyard, 2008). Ainda mais, muitos estudos têm sido realizados para caracterizar bactérias degradadoras de PAH recuperados a partir de vários ambientes como sedimentos, sedimentos lacustres, marinhos, estuarinas e manguezais (Chung, 2001, Debruyne, 2009 e Zhou, 2009).

3.13 Fatores relevantes na eficiência e na aplicabilidade da biorremediação

A eficiência de cada processo de degradação depende de fatores físicos, químicos e biológicos como a biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, estrutura molecular do poluente e sua concentração. Diversos fatores ambientais que abrangem pH, temperatura, umidade, atividade de água, oxigênio dissolvido, nutrientes, fontes de carbono e energia a disponibilidade de receptores de elétrons, e a presença de co-metabólitos influenciam a utilização de poluentes pelos microrganismos (BOOPATHY, 2000; VAN HAMME et al., 2003; JACQUES et. al., 2007, SEO et. al., 2009).

A umidade é considerada por Haider (1999), o fator ambiental mais crítico na biodegradação, uma vez que uma atividade microbiana elevada ocorre apenas com disponibilidade de água adequada. Entretanto, o teor de água no substrato tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio, ou seja, um alto teor de água, resulta em baixa concentração de O₂, causando prejuízos diretos à atividade dos microrganismos aeróbios, que são importantes agentes na degradação dos HAPs, (LEAHY e COLWELL, 1990; JACQUES et. al., 2007). No entanto, em condições de hipóxia ou anoxia, as bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativas se tornam dominantes na comunidade microbiana devido à sua capacidade de usar aceptores de elétrons alternativos em substituição ao oxigênio (JOHNSEN et al., 2005, CAMEOTRA & SINGH 2009).

A temperatura é um fator físico que influencia o consumo de substrato pela microbiota, sua atividade metabólica, e por consequência, a biodegradação dos HAPs (HAIDER 1999). De acordo com LEAHY & COLWELL (1990), baixas temperaturas limitam a degradação destes poluentes, uma vez que o metabolismo microbiano diminui e a viscosidade dos HAPs aumenta nestas condições. Em contrapartida, em altas temperaturas, a toxicidade destes compostos aumenta. Assim, a degradação dos HAPs é melhorada na faixa de temperatura entre 30°C e 40°C, diminuindo a viscosidade dos compostos e aumentando o metabolismo microbiano.

O pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos (JACQUES et. al., 2007).

A presença e o teor de nutrientes inorgânicos exercem influência na atividade da microbiana. Os efeitos da adição de N e P demonstram resultados conflitantes, provavelmente devido às características de cada ambiente em relação aos teores de nutrientes, tipo de contaminante e população microbiana endógena (LEYS et. al., 2005). O ferro e o enxofre são outros nutrientes que podem influenciar na biodegradação de HAPs, pois desempenham funções celulares relacionadas ao seu metabolismo, como a participação na estrutura das enzimas que realizam sua degradação nas células microbianas (JACQUES, 2005).

A matéria orgânica consiste na fonte de carbono e energia para os microrganismos, ou seja, um alto teor de matéria orgânica está associado a uma maior abundância e diversidade microbiana. Níveis mais baixos de matéria orgânica, normalmente, relacionam-se com uma menor abundância bacteriana (BOOPATHY, 2000). Em contrapartida, uma grande

quantidade de matéria orgânica, está normalmente relacionada a substratos de partículas finas, que propiciam a sorção dos HAPs. Em virtude da baixa solubilidade em água e da forte tendência de sorção dos HAPs às partículas sólidas, sua biodisponibilidade aos microrganismos degradadores é reduzida (JOHNSEN et. al., 2005; CAMEOTRA & SINGH 2009).

A biodegradação pode ainda, ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar os poluentes ou por condições ambientais desfavoráveis à sobrevivência e atividade dos microrganismos degradadores (JOHNSEN et. al., 2005, JACQUES et. al., 2007). A produção de metabólitos tóxicos, repressão de enzimas, presença de substratos preferenciais, e a falta de substratos indutores podem, também, ser considerados como fatores limitantes (BOOPATHY 2000; VAN HAMME et. al., 2003, JACQUES et. al., 2007).

A biorremediação deve ser adaptada às condições locais específicas, havendo necessidade caracterizar o ambiente a ser tratado e de fazer estudos prévios em pequena escala antes da limpeza do local contaminado (BOOPATHY, 2000; MARIANO et. al., 2007), com a finalidade de esclarecer alguns fatores a se considerar antes de escolher e aplicar uma técnica de biorremediação, dentre os quais, podemos citar: (i) se o contaminante é biodegradável; (ii) se a biodegradação está ocorrendo naturalmente no local contaminado; (iii) se as condições ambientais são adequadas para a biodegradação; (iv) se o poluente não for completamente degradado, qual será o comportamento do material residual (BOOPATHY, 2000).

Alguns dos critérios não-técnicos que afetam a aplicabilidade das técnicas de biorremediação também devem ser considerados, pois a técnica escolhida deve ser capaz de alcançar a limpeza necessária; possuir custo vantajoso em relação a outras opções de remediação; possibilidade de contaminantes residuais após a biorremediação em níveis aceitáveis; percepção pública e regulatória favorável; capacidade de cumprir as limitações de tempo e espaço (BOOPATHY, 2000).

Outros fatores constituem limitações ao uso da biorremediação, como a questão econômica e a responsabilidade ambiental. Clientes e agências reguladoras, normalmente, avaliam a biorremediação de forma rigorosa, uma vez que se trata da aplicação de técnicas inovadoras, há imposição de normas rígidas e exigência de maior desempenho do que para tecnologias convencionais. Assim, o investimento em biorremediação tem sido lento e, por

consequente, esta atividade em escala comercial ainda fica aquém de outros setores industriais (BOOPATHY, 2000).

3.14 Aspectos biológicos relacionados à biodegradação de óleos combustíveis

3.14.1 Consórcios Microbianos

Segundo Leahy & Colwell (1990), organismos individuais metabolizam somente frações restritas dos substratos, enquanto populações mistas incrementam a capacidade enzimática requerida para atacar misturas complexas de hidrocarbonetos. Limbert & Betts (1996) ampliaram esta idéia ao afirmarem que além da complementariedade de funções metabólicas, a troca de material genético também pode explicar o aumento da capacidade de uma população mista em biodegradar poluentes.

Ururahy (1998), afirma que vários tipos de microrganismos individualmente, metabolizam um limitado número de hidrocarbonetos, e que na biodegradação de hidrocarbonetos complexos, é necessária a cooperação entre espécies distintas de microrganismos para a completa mineralização dos compostos do petróleo em gás carbônico e água ou gás metano e água.

Uyttebroek et al. (2007) afirmam que a ação combinada de microrganismos podem degradar em grau maior do que qualquer um deles sozinho. Fungos e bactérias são capazes de degradar parcialmente ou completamente hidrocarbonetos por cometabolismo, ou quando os produtos de sua degradação estão presentes, como mostrado com microrganismos isolados individuais ou por consórcios microbianos.

Os microrganismos quando consorciados apresentam maior assimilação de misturas complexas de hidrocarbonetos, como ocorre no petróleo bruto. Isso ocorre pela ampliação de aparatos enzimáticos específicos necessários na degradação desses compostos, bem como pelo fenômeno de cometabolismo, já que o cometabólito transformado por uma determinada espécie pode resultar em uma substância útil para outra, podendo ser assimilado em uma via metabólica comum (RICHARD & VOGEL, 1999).

Apesar do enorme potencial de alguns microrganismos em degradar compostos orgânicos em condições favoráveis, nenhuma espécie de microrganismo conhecida, natural ou geneticamente modificada, consegue degradar a totalidade dos compostos presentes no petróleo. Deste modo, para conseguir uma bioremediação efetiva dos contaminantes torna-se,

em certos casos, necessário optar por uma população mista, composta por vários gêneros bacterianos, cada um capaz de metabolizar determinados compostos (KORDA et al., 1997).

Na última década as atenções têm sido voltadas para a utilização de consórcios microbianos degradadores de hidrocarbonetos consistindo de bactérias e fungos. Em comparação com culturas puras, esses consórcios têm sido mais eficazes na degradação destes compostos, devido à capacidade de uma maior degradação e mineralização (BOONCHAN et al., 2000; KOHLMEIER et. al., 2005; WICK et. al., 2007).

Kataoka (2001) afirma que em uma cultura mista o produto metabólico pode ser degradado só por uma única espécie, sendo que o ataque de outros microrganismos leva a uma completa degradação do composto, mesmo que dentro da comunidade não exista um microrganismo capaz de degradar a substância completamente.

A interação entre diferentes microrganismos, em condições de consórcio, como o cometabolismo ou antagonismo pode ser importante, e a biodegradação de compostos orgânicos tóxicos como hidrocarbonetos pelo consórcio poderiam ser diferentes das de uma única cultura (FERNANDEZ-SANCHEZ, 2001).

3.14.2 Cometabolismo

A superioridade dos consórcios com relação às culturas puras é acentuada pelo fenômeno do cometabolismo. Uma única espécie de microrganismo dificilmente será capaz de mineralizar misturas complexas de hidrocarbonetos; portanto, consórcios microbianos permitem a atuação de enzimas distintas, com a finalidade de degradar completamente o poluente (KOBAYASHI & RITTMANN, 1982).

Bactérias aeróbias, bactérias anaeróbias e fungos são os principais microrganismos envolvidos na degradação do fluido, cada um é primariamente responsável pela deterioração de um tipo único. No longo prazo, o crescimento aeróbico bacteriano precede tanto o crescimento anaeróbio bacteriano e crescimento de fungos. População de microrganismos composto de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp., e *Micrococcus* revelaram-se particularmente eficaz em degradar hidrocarbonetos. A biodegradabilidade de óleo combustível, em culturas mistas é aplicada via efeitos sinérgico. Enquanto as culturas puras, de longe, não são tão ativas como culturas mistas (HUA, 2012) A suscetibilidade de uma substância química orgânica a destruição microbiana na natureza é afetada por fatores ambientais e a estrutura do produto químico (SCHLEICHER et. al., 2009).

RICHARD & VOGEL (1999), estudando um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel em amostras de solo, verificaram que, dos sete membros deste consórcio, quatro não utilizavam diretamente o óleo como fonte de carbono e energia; no entanto, a presença destes aumentava a produção de CO₂ pelo consumo de intermediários produzidos pelos demais membros.

Segundo Alexander (1999), esses consórcios microbianos representam tipos de sinergismo que envolve vários mecanismos: a) Uma ou mais espécies fornecem vitaminas do complexo B, aminoácidos ou outros fatores de crescimento para um ou mais microrganismos consorciados; b) Uma espécie cresce sobre o poluente e realiza uma degradação incompleta para produzir um ou vários produtos orgânicos, que por sua vez se torna disponível para a mineralização por uma segunda espécie; c) A primeira espécie converte o substrato em um metabólito tóxico que pode reduzir a transformação, mas a reação procede rapidamente se o segundo membro da associação destrói o inibidor, ou seja, é capaz de usá-lo como uma fonte de carbono para crescimento.

Bactérias, leveduras e fungos que produzem esterases e lipases extracelulares não foram eficientes na biodegradação de hidrocarbonetos alifático. Surpreendentemente, os sobrenadantes da cultura de biodegradação que continham produtos de degradação de polímero exibiu uma toxicidade biológica significativa. São necessários mais estudos para caracterizar a natureza dos produtos de biodegradação tóxicos. Evidentemente, os processos de biodegradação desenvolvidos para o tratamento de resíduos de polímero plástico devem ser monitorizadas no que diz respeito não apenas à metabolização do substrato macromolecular, mas também no que diz respeito à toxicidade de produtos finais de degradação (Novotny, 2015).

3.14.3 Aclimação

Em muitos estudos foi possível observar que a exposição prévia de microrganismos aos compostos orgânicos atua como importante fator de favorecimento e agilização do consumo de tais poluentes por via microbiana, gerando um aumento nas taxas de biodegradação (URURAHY, 1998; GOMES, 2004).

Alguns fatores, como características culturais dos microrganismos, aclimação, suplementação de nutrientes essenciais, disponibilidade de água e de oxigênio, pH, temperatura e estrutura química dos compostos orgânicos, entre outros, são fundamentais na

efetividade do processo de biodegradação de hidrocarbonetos, por isso devem ser analisados e/ ou ajustados antes do início da implantação de uma tecnologia biorremediadora (LEAHY & COLWELL, 1990; YU et al.,2005).

Os microrganismos podem desenvolver a habilidade de degradar certos poluentes. Porém, estes compostos podem ser degradados por microrganismos que tenham sido expostos ao poluente por períodos prolongados, e não por aqueles provenientes de sítios não poluídos (ZAGATO e BERTOLETTI, 2006).

3.14.4 Produção de Biossurfactante

Outra alternativa para resolver o problema da permanência dos poluentes é a utilização de surfactantes para aumentar a dessorção e a disponibilidade dos compostos, o que muitas vezes leva a sua degradação e remoção do ambiente. Entretanto, os surfactantes sintéticos podem diminuir a degradação por microrganismos devido a alta toxicidade. Dessa forma, o uso de biossurfactantes no controle da biodisponibilidade de poluentes presentes no ambiente é uma opção atrativa devido a sua biodegradabilidade e baixa toxicidade (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Os surfactantes são agentes ativos de superfície com propriedades que variam largamente, incluindo redução de tensões superficial e interfacial dos líquidos. A tensão superficial está definida como a entalpia de superfície livre por unidades de área (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Os biossurfactantes são compostos de origem biológica, que possuem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas comuns as moléculas anfifílicas, e por esta propriedade, reduzem a tensão superficial formando agregados chamados micélios (KOSARICA, 2001).

Biossurfactantes são moléculas produzidas por bactérias, fungos filamentosos ou leveduras, que apresentam propriedades biológicas aplicáveis a varias indústrias, tais como a indústria de petróleo. Estes compostos, nos últimos anos, têm recebido atenção especial devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e aceitabilidade ecológica (DESAI & BANAT, 1997).

O uso de biossurfactante tem ajudado na degradação de compostos. Estes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos. Alternativamente, podem ser utilizados produtos ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos capazes de produzir estes compostos (BANAT et al., 2000). Alguns estudos

confirmam o aumento da biodisponibilidade de compostos de hidrocarbonetos pouco solúveis, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ZHANG et al., 1997).

3.14.5 Produção Enzimática

Existe uma procura crescente de enzimas que podem ser usadas em muitos processos de remediação, como o tratamento de poluentes. O potencial de aplicação de enzimas ligninolíticas tem sido alvo de grande interesse acadêmico e industrial, devido à sua capacidade de biodegradar uma série de poluentes tóxicos e recalcitrantes (DURAN e ESPOSITO, 2000).

Silva et al. (2008), descreve que alguns grupos de microrganismos têm atraído a atenção como um potencial de fonte de geração de produtos naturais e nos processos de biodegradação. De forma que, o estudo da produção de enzimas extracelulares por microrganismos é muito importante. Entre as enzimas produzidas, o sistema ligninolítico é de grande importância na recuperação ambiental, processo no qual os sistemas biológicos são utilizados para diminuir ou neutralizar poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que representam risco à saúde por causa de seus efeitos biológicos prejudiciais (ARUN et. al., 2008).

A presença de hidrocarbonetos no ambiente por tanto tempo resulta numa pressão seletiva sobre microrganismos e sistemas enzimáticos degradadores desses compostos. Entretanto, os hidrocarbonetos não são igualmente degradados. A capacidade dos fungos se adaptarem rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia é um fator essencial para sua sobrevivência. Essa flexibilidade metabólica se deve à produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, não específicas, capazes de degradar uma série de compostos, inclusive polímeros complexos. Graças a essas enzimas com grande capacidade catalítica e o fato de possuírem hifas que penetram no substrato, alcançando mais facilmente os poluentes, os fungos se apresentam como agentes eficientes na biorremediação (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2010)

A produção dessas enzimas é frequentemente sintetizada durante o metabolismo secundário dos fungos, porém em diferentes meios de cultivo os fungos podem produzir diferentes enzimas (NYANHONGO et. al., 2002).

3.15 Atividade Lipolítica

As lipases são biocatalisadores versáteis e muito eficientes que, ao lado das esterases e proteases, tem destaque devido a gama de reações catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos com baixo teor de água (esterificação, interesterificação, aminólise, lactonização) (Figura 2), (Yin et al., 2006; Kim et al., 2006), a estabilidade em ambientes com teor baixo de água e a possibilidade de utilização de condições reacionais brandas (Bouaid et al. 2007).

As lipases (glicerol ester hidrolases) pertencem a um grupo especial de esterases, cuja definição clássica descreve estas enzimas como glicerol ester hidrolases que atuam sobre ligações ester presentes em acilglicerois, liberando di- ou monoacilglicerois, ácidos graxos e glicerol (Figura 3). São constituídas pela tríade catalítica G-X1-S-X2-G, onde G= glicina; S= Serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico (Jaeger e Reetz, 1998).

Atuam sobre substratos pouco solúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando, por exemplo, acilglicerois de cadeia longa (acima de oito átomos de carbono), seus substratos naturais, além de serem capazes de catalisarem reações de síntese, em ambientes aquos-restritos (Cote e Shareck, 2008; Ericsson et al., 2008).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (Brady et al., 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag et al., 1997) e da lipase pancreática humana (Winkler et al., 1990) por difração de raio X, propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas é recoberto por uma camada hidrofóbica, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da camada na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases.

Figura 2 - Reações catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos com baixo teor de água (esterificação, interesterificação, aminólise, lactonização). Adaptado de Paques e Macedo (2006).

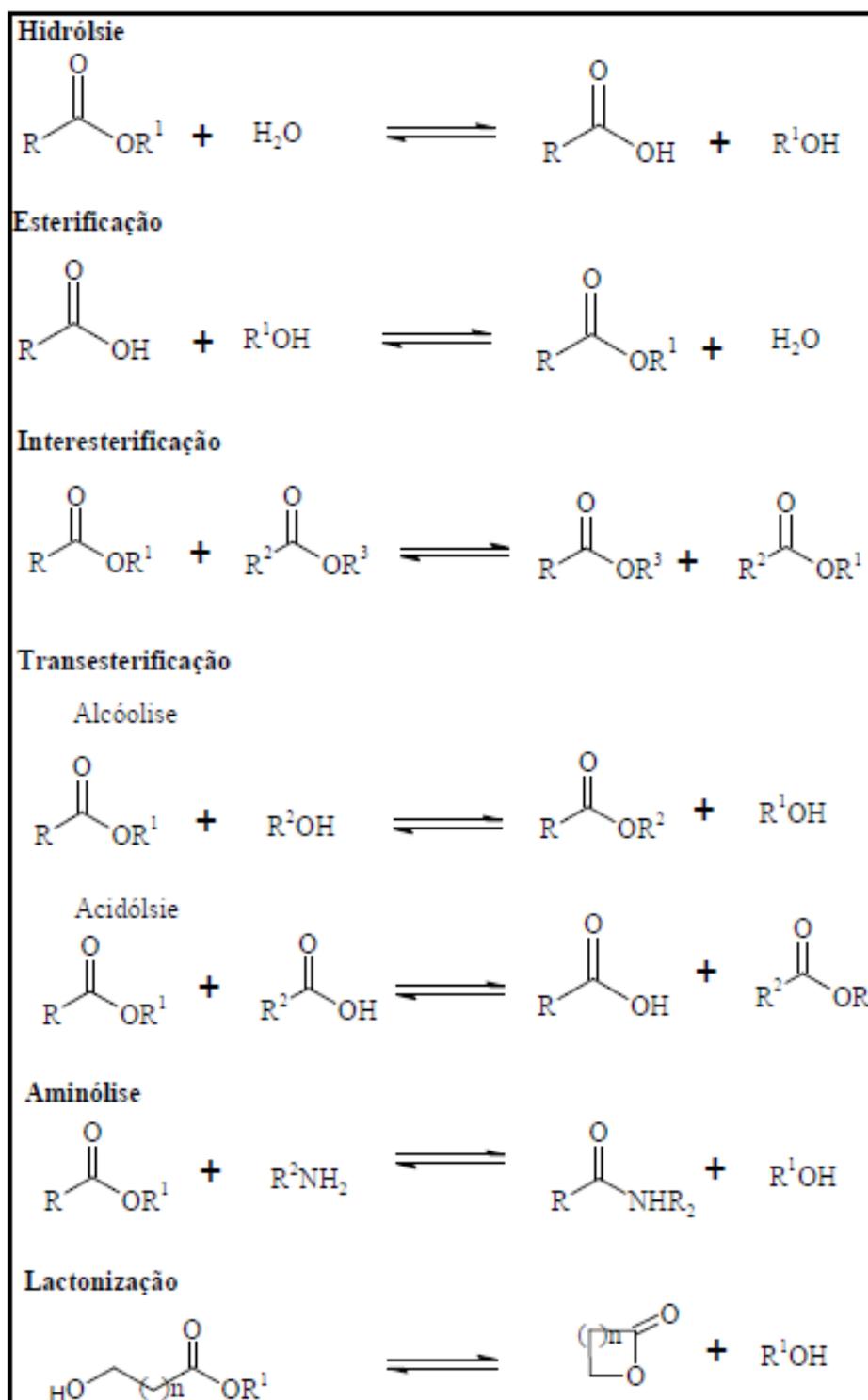
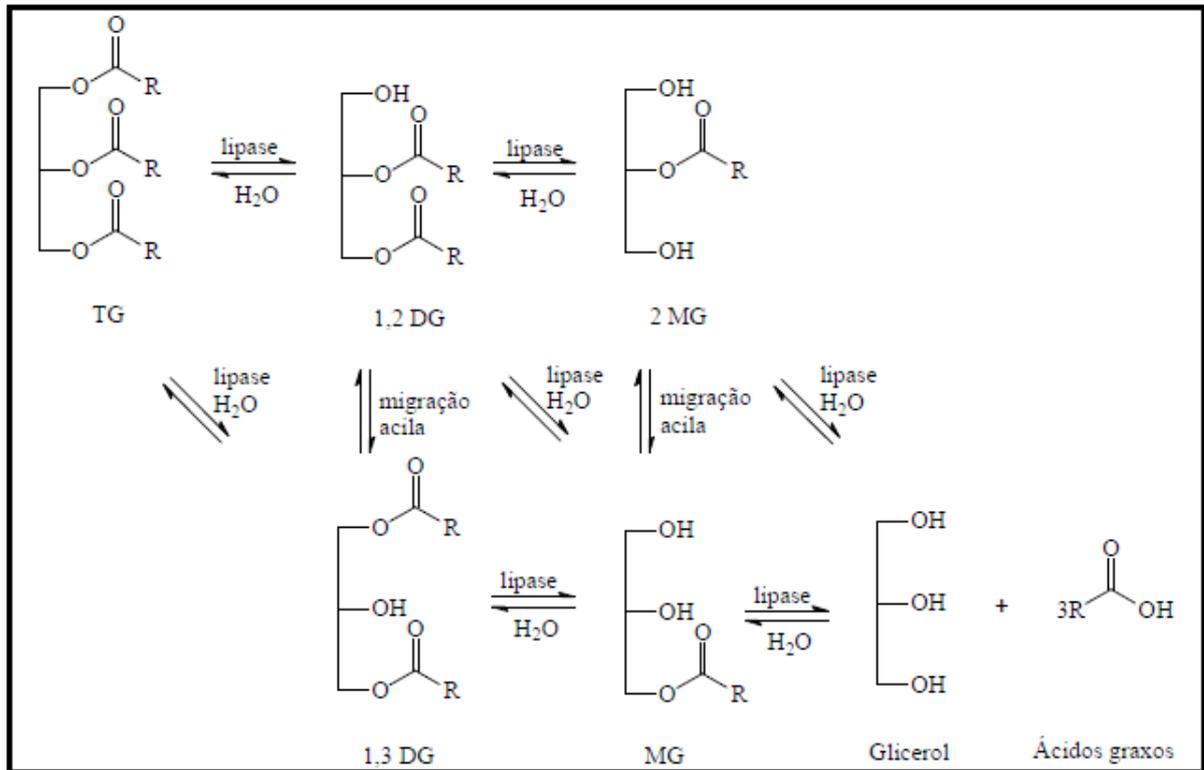


Figura 3 - Representação esquemática para a hidrólise de triacilglicerois catalisada por lipases. Fonte: Fureby et al. (1997).



Entretanto, para algumas lipases observou-se que a presença da camada não esta necessariamente correlacionada com a ativação interfacial (Thomas et al., 2005), tendo sido descritas lipases como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica*, que apresentam a camada em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (Jaeger e Reetz, 1998). Por outro lado, algumas lipases são consideradas como, pois embora atuem em reações contendo substratos de cadeia longa possuem uma camada incompleta ou não apresentam e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica. São exemplos deste comportamento particular a cutinase de *Fusarium solani* e as lipases de *C. antarctica*, *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, (Ali et al., 2004; Nini et al., 2001; Cygler e Schrag, 1997). Além disso, a literatura relata ainda a habilidade de acilcoenzimas (acil-CoA) ativar lipases em soluções aquosas na ausencia de uma interface lipídeo-água (Bano et al., 2003).

As lipases tem sido definidas, nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilglicerois de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilglicerois de cadeias menores são tidas genericamente como esterases (Jaeger et al., 1999);

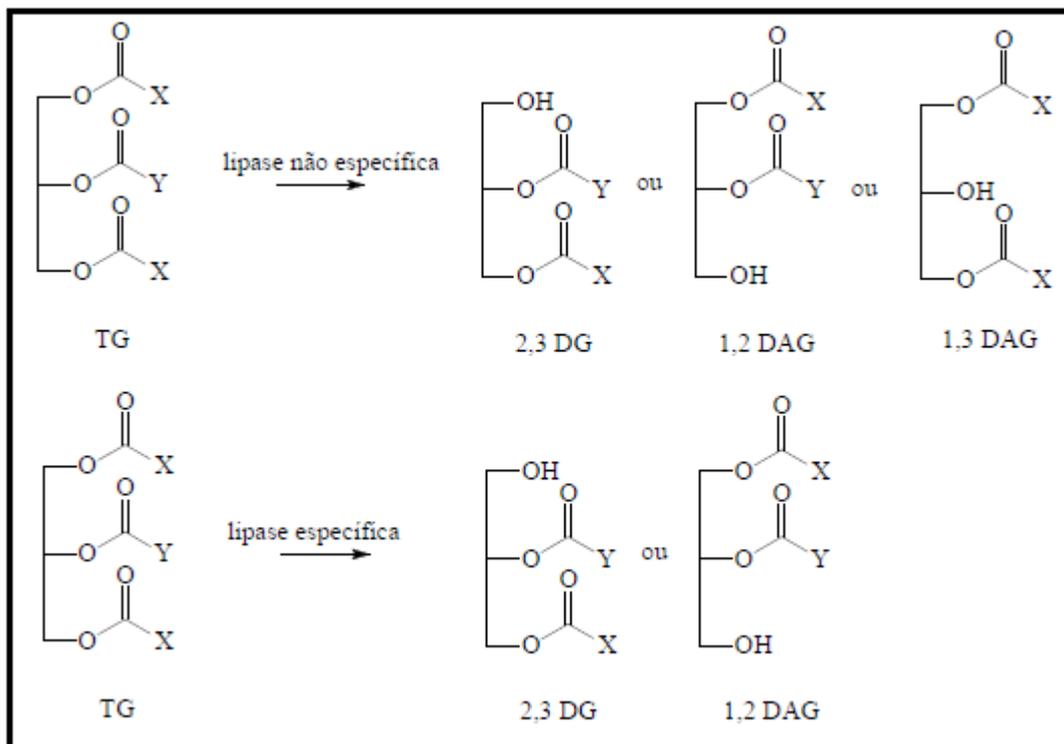
entretanto, mais recentemente tem sido aceita a definição que considera como uma lipase verdadeira a enzima que hidrolisa acilglicerois acima de 8 carbonos (Cote e Shareck, 2008; Rhee, et al., 2005).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilglicerois constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (Salameh e Wiegel, 2007; Brockman, 1984). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger et al., 1999).

Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação, de substrato ou por fatores que afetam a ligação enzima-substrato. Há vários tipos de especificidade encontrados: a) quanto ao substrato: diferentes velocidades de hidrólise entre triacilglicerois, diacilglicerois ou monoacilglicerois catalisadas por uma mesma enzima ou enzimas purificadas de uma mesma fonte; b) posicional ou regioselectividade: hidrólise preferencial de ésteres primários, secundários, terciários ou hidrólise não específica, liberando ácidos graxos das três posições (Figura 4); c) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato ou tiposelectividade: preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações; d) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros, no caso de substratos racêmicos. Pode-se observar também a combinação dos tipos citados ou a ausência de especificidade (Paques e Macedo, 2006; Castro et. al, 2004).

As lipases diferem grandemente com respeito a origem (bacteriana, fungica, vegetal, animal) e propriedades cinéticas. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de microrganismos, obtidas por meio de fermentação, são preferíveis as de fontes animais e plantas por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. Vários gêneros de microrganismos podem ser empregados para produção de lipases, tais como os fungos dos gêneros *Trichosporon*, *Botrytis*, *Pichia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, leveduras como gêneros *Tulopsis*, e *Candida*, e bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (Hasan et al., 2006; Faber, 2004).

Figura 4. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica. Adaptado de Paques e Macedo (2006).



3.16 Avaliação qualitativa da biodegradação e escalas de biodegradação

Através da análise por cromatografia gasosa é possível acompanhar as mudanças composicionais que ocorrem com as diferentes frações do petróleo. Para isso, realiza-se uma varredura de todos os íons presentes na amostra (*Total Ion Chromatogram* - TIC) e monitoram-se seletivamente alguns íons característicos das principais classes de biomarcadores (*Reconstructed Ion Chromatogram* - RIC e *Single Ion Monitoring* - SIM). (WANG et. al., 2012).

O perfil cromatográfico de uma amostra de petróleo constitui sua impressão digital e é uma das primeiras indicações qualitativas da ocorrência de biodegradação, visto que os compostos lineares são os mais abundantes em óleos não biodegradados e, por isso, os primeiros a serem consumidos pelos microrganismos. Desta forma, quando o perfil da amostra revela diminuição da concentração destes compostos, diz-se que o petróleo sofreu biodegradação tornando-se gradativamente mais pesado e mais ácido. (TAL, et al., 2009).

A extensão do nível de biodegradação em uma amostra de petróleo é medida utilizando-se parâmetros baseados na abundância relativa de várias classes de compostos (*n*-

alcanos, hidrocarbonetos aromáticos, biomarcadores), através da utilização de escalas de biodegradação. Estas escalas mostram o efeito da remoção seletiva dos compostos e classificam o petróleo em níveis que variam de 0 (óleo não biodegradado) a 10 (óleo severamente biodegradado). (TAL, et al., 2009).

Os compostos encontrados no petróleo são removidos preferencialmente na sequência: *n*-alcanos, alquilcicloexanos, isoprenoides acíclicos, alcanos bicíclicos, esteranos e hopanos, com produção de novos compostos como produtos de biodegradação, tais como 17 α ,25-norhopanos a partir da desmetilação de hopanos em níveis severos de degradação. (KENNEDY, et. al., 2011)

Em geral, hidrocarbonetos saturados de petróleo bruto são mais facilmente a ser degradada, enquanto os alcanos ramificados, pristano (Pr) e fitano (Ph) são mais resistentes à biodegradação do que os hidrocarbonetos saturados, os quais atributo para os alcanos ramificados são menos vulneráveis ao ataque microbiano (Röling et al., 2003; Lin 2014).

REFERÊNCIAS

ADAMS A., THOMPSON K.D. Biotechnology offers revolution to fish health management. **Trends Biotechnology**. 24: 201-205. 2006.

ALVES, T. L. 2006. Estudo da formação de incrustações inorgânicas em membranas de nanofiltração utilizadas em processos de dessulfatação. Pontifca Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Tese (doutorado), 210p., 2006.

BAGINSKA, E., HAIß, A., KÜMMERER, K. Biodegradation screening of chemicals in an artificial matrix simulating the water–sediment interface. **Chemosphere**. v. 119, p. 1240–1246, 2015.

CAMPAS M, GARIBO D, PRIETO-SIMON B. Novel nanobiotechnological concepts in electrochemical biosensors for the analysis of toxins. **Analyst**. 137: 1055-1067. 2012.

CARMO, F.L., SANTOS, H.F., FERREIRA, E.M., ELSAS, J.D.V., Rosado, A.S., Peixoto, R.S. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. **Journal of Microbiology**. (Seoul. Print) 49, 535-543. 2011.

CHUNG, W.K., KING, G.M. Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov., sp nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. **Applied.Environment.Microbiology**. v. 67, p. 5585–5592, 2001.

COTTA, J.A.O. Aplicação de vermicompostagem para biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromático. Instituto de química de São Carlos, São Paulo, Tese (doutorado), 199p., 2008.

CORRÊA J. S. Parque industrial de refino no brasil – características atuais e perspectivas futuras. Universidade federal do Rio de Janeiro, Escola de química, Rio de Janeiro, Dissertação (mestrado), 179p. 2009.

COWAN, C.E., FEDERLE, T.W., LARSON, R.J., FEIJTEL, T.C.J. Impact of biodegradation test methods on the development and applicability of biodegradation Qsars. **SAR and QSAR in Environmental Research**. v. 5 (1), p. 37–49, 1996.

DE SOUZA, W. Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica. Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 2000.

DE CARVALHO CC, FERNANDES P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Mar Drugs**. 8: 705-727. 2010.

DEBRUYN, J.M., SAYLER, G.S. Microbial community structure and biodegradation activity of particle associated bacteria in a coal tar contaminated creek, **Environment Science Technology**. v. 43, p. 3047–3053, 2009.

DEBRUYN, J.M., MEAD, T.J., Wilhelm, S.W. PAH biodegradative genotypes in Lake Erie sediments: evidence for broad geographical distribution of pyrene degrading Mycobacteria. **Environment Science Technology**. v. 43, p. 3467–3473 2009.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International Microbiology**. 7: 173-180. 2004.

FARWELL, C., REDDY, C.M., PEACOCK, E., NELSON, R.K., WASHBURN, L., VALENTINE, D.L. Weathering and the fallout plume of heavy oil from strong petroleum seeps near Coal Oil Point, CA. **Environ. Sci. Technol.** 43, 3542–3548. 2009.

GARRETT, R.M., Biodegradation of Fuel Oil Under Laboratory and Arctic Marine Conditions. **Spill Science & Technology Bulletin**. Vol. 8, No. 3, pp. 297–302, 2003.

GETTER, C.D., CINTRON, G., DICKS, B., LEWIS, R.R., Seneca, E.D. The recovery and restoration of salt marshes and mangroves following oil spill. In: Cairns Jr., J., Buikema Jr., A. (Eds.), Restoration of Habitats Impacted by Oil Spills. **Butterworth publishers**. Boston. 65-113. 1984.

GOMES, A. S. & GLAVICO, E. Propriedades Físico-Químicas da Água. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Apostila didática do curso de Biologia marinha, 15p. 2005.

GOMES, E. B.; SILVA, R. F.; ROSADO, A. S.; PEREIRA JR. N. Biotreatment of diesel waste by sequencing batch bioreactor operation mode (SBR). **International Biodeterioration & Biodegradation**. p. 1-5. 2010.

GRIFFITHS, R.I., WHITELEY, A.S., O'DONNELL, A.G., BAILEY, M.J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and RNA-Based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**. 66, p. 5488-5491, 2000.

HANSON, K. G.; DESAI, D.; DESAI, A. J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**. v7. n10. p. 745-748.

HILYARD, E.J., JONES-MEEHAN, J.M., SPARGO, B.J., HILL, R.T. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclicaromatic hydrocarbon degrading bacteria from Elizabeth river sediments. **Applied Environment Microbiology**. v. 74, p. 1176–1182, 2008.

HUA J., Heating with energy saving alternatives to prevent biodeterioration of marine fuel oil. **Fuel**. 93: 130-135. 2012.

JUHASZ, A.L., NAIDU, R., Bioremediation of high molecular weight polycyclicaromatic hydrocarbons: areview of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 45, p. 57–88, 2000.

KENNEDY J, O'LEARY ND, KIRAN GS, MORRISSEY GP, O'GARA F, Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J Appl Microbiol* 111: 787-799. 2011.

KOBAYASHI, H.; RITTMANN, B. E. Microbial Removal of Hazardous Organic Compounds. **Environmental Science Technology**. v. 16, p. 170A-183A. 1982.

KRISTENSEN, A.H., POULSEN, T.G., MORTENSEN, L. AND MOLDRUP, P. Variability of soil potential for biodegradation of petroleum hydrocarbons in a heterogeneous subsurface. **Hazard Mater** 179, 573–580. 2010.

LEWIS, M., PRYOR, R., WILKING, L. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: a review. **Environmental Pollution**. 159, 2328-2346. 2011.

LIN, G. H. ; SAUER, N. E., CUTRIGHT, T. J. Environmental regulations: A brief overview of their applications to bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p.1-8, 1996.

LIN, M., LIU, Y., CHEN, W., WANG H., HU, X. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 88, p. 8-12, 2014.

MAIER, R. M. Microorganisms and organics pollutants. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C.P. IN: **Environmental Microbiology**. New York: Academic Press, Cap. 16, pp. 363-402. 2000.

MELAMED P, GONG Z, FLETCHER G, CHOY L, HEW CL. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. **Aquaculture** 204: 255-269. 2002.

MALAJOVICH M. A. *Biocologia 2011*. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MUSAT, F. AND WIDDEL, F. Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype. **Environmental Microbiology**. 10: 10–19. 2008.

NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (NOAA). An introduction to coastal habitats and biological resources for oil spill responses. Seattle, Washington: U.S. Department of commerce. 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Oil in the Sea III. Inputs, Fates, and Effects. **National Academies Press**, Washington, DC. 2003.

NETO, B. J. A.; PONZI, V. R. A.; SICHEL, S. E. (orgs.). *Introdução à Geologia Marinha*. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 279 p. 2004.

NOVOTNÝ, C., ERBANOVA, P., SEZIMOVA, H., MALACHOVA, K., RYBKOVA, Z., MALINOVA, L., PROKOPOVA, I., BROZEK, J. Biodegradation of aromatic-aliphatic copolyesters and polyesteramides by esterase activity-producing microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 97, p. 25-30, 2015.

NUDI, A. H., WAGENER, A. L. R., FRANCONI, E., SCOFIELD, A.L., SETTE, C.B. & VEIGA, A. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environment International** 33: 315-327. 2007.

OBUEKWE, C.O., ALEMUTTAWA, E.M., Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotechnology Letters*. v. 23, p. 1025-1032, 2001.

ODEYEMI, O. A. Exploring Potentials of Marine Microbiology and biotechnology in developing countries. **International Journal of Scientific and Research Publications**. National University of Malaysia, UKM Bangi, Malaysia. Volume 3, 1-7. 2013.

ONIP. 2012. Organização Nacional da Indústria do Petróleo. Disponível em <www.onip.org.br> acesso em 19 de Outubro de 2012.

PEIXOTO, R; CHAER, G. M; CARMO, F. L; ARAUJO, F. V; PAES, J. E; VOLPON, A; SANTIAGO, G. A; ROSADO, A. S. 2001. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 99, p. 341-354.

PEREIRA Jr., NEI; GOMES, E. B.; SORIANO, A. U. 2009. Séries em Biotecnologia "Biodegradação de Hidrocarbonetos". Escola de Química/UFRJ. Rio de Janeiro. Cap. 6. P. 23.

PETROBRAS, 2010. Bunker. Produtos e Serviços. Disponível em: http://www2.petrobras.com.br/produtos_servicos/port/Produtos/Bunker/Bunker.asp?mn=prod#. Acesso em: 30 de Setembro de 2010.

PETROBRAS MARINE. 2012. Marine Fuel. Disponível em <<http://www.petrobras.com.br/minisite/marine/port/index.html>> acesso em 18 de Outubro de 2012.

PETROBRAS DISTRIBUIDORA. 2012. Disponível em <<http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/home>> acesso em 18 de Outubro de 2012.

PRINCE, M., SAMBASIVAM, Y. 1993. Bioremediation of petroleum wastes from the refining of lubricant oils. **Environmental Progress**. 12, 5-11.

PRINCE, R.C., GRAMAIN, A., MCGENITY, T.J. Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. **Springer-Verlag**. Berlin, Heidelberg. 1672–1692. 2010.

PRINCE, R.C. Eukaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. **Springer-Verlag**. Berlin. Heidelberg. 2066–2078. 2010.

PRINCE, R.C., BRAGG, J.R. Shoreline bioremediation following the Exxon Valdez oil spill in Alaska. **Bioremediation**. J. 1, 97–104. 1997.

PRINCE, R.C., MCFARLIN K. M., BUTLER, J. D., FEBBO, E. J., WANG, F. C.Y., NEDWED, T. J. The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea. **Chemosphere**. 90: 521-526. 2013.

RECUPETRO. 2004. Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas. Disponível em: http://www.recupetro.ufba.br/rec_001.htm. Acesso em: 16 de Maio de 2009.

SEABRA, P. N. Uso da Biorremediação em Áreas Impactadas pela Indústria do Petróleo. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Eds.) Biodegradação. Jaguariúna: EMBRAPA **Meio Ambiente**. p.41-60. 2008.

SANTAELLA, S.T. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger* In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, CBESA, Campo Grande: **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES**, 2009. CD-ROM.

SAAUDON I. Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia region). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, pp. 453-456. 2008.

SOUZA, C. R. G.; SUGUIO, K.; OLIVEIRA, A. M. S. & OLIVEIRA, P. E. Quaternário do Brasil. Ed. Holos, Ribeirão Preto, 378 p. 2005.

SILVA, C. A. R. Análises físico-químicas de sistemas marginais marinhos. 2ª edição. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 118 p. 2004.

SOUZA, E. S. Desenvolvimento de Métodos de Biorremediação Aplicados a Derrames de Petróleo em Água do Mar – Testes Laboratoriais. Tese de Doutorado em Engenharia de Reservatório e de Exploração de Petróleo. Centro de Ciências e Tecnologia, UFNF. Macaé.170p. 2003.

SOUZA, E. S. & TRIGÜIS, J. A. Avaliação da degradação de um óleo leve em ambiente marinho costeiro - simulação em mesoescala. **Geochemica Brasiliensis**. nº 20(1) pag. 026-037. 2006.

SANTOS, H.F., CARMO, F.L., PAES, J.E.S., ROSADO, A.S., PEIXOTO, R.S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air, and Soil Pollution**. 216, 329-350. 2010

SANTOS, H.F., CURY, J., CARMO, F.L., SANTOS, A.L., TIEDJE, J., ELSAS, J.D.V., ROSADO, A.S., PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: **Bacterial proxies for oil pollution**. 6, 16938-16943. 2011.

SCHLEICHER T, WERKMEISTER R, RUSS W, MEYER-PITTROFF R. Microbiological stability of biodiesel–diesel-mixtures. **Biores Tech**. 100(2):724–30. 2009.

TAL Y, SCHREIER H, SOWERS K, STUBBLEFIELD J. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. **Aquaculture** 286: 28-35. 2009.

TRINDADE, P. V. O. “Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo”. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p. 2002.

VALLE, M. L. M. Produtos do setor de combustíveis e de lubrificantes. Rio de Janeiro : **Publit Soluções Editoriais Brasil**, 2007.

WALTER, M. V.; CRAWFORD, R. L. Overview: Biotransformation and Biodegradation. In: HURST, C.J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology; cap.76, p.707-708, 1997.

WISEGEEK. Clear answers for common questions. Disponível em <<http://www.wisegeek.com/what-is-bunker-fuel.htm>> acesso em 21 de Outubro de 2012. 2012.

WANG X., SCHRODER H.C., WIENS M., SCHLOMABCHER U, MULLER W.E. Biosilica: Molecular Biology, Biochemistry and Function in Demosponges as well as its Applied Aspects for Tissue Engineering. *Adv Mar Biol* 62: 231-271. 2012.

ZHOU, H.W., WONG, A.H.Y., YU, R.M.K., Y.D. PARK, Y.S. WONG, TAM, N.F.Y. Polycyclic aromatic hydrocarbon induced structural shift of bacterial communities in mangrove sediment. **Microbial Ecology**. V. 58, p. 153–160, 2009.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo submetido a revista revista: *Journal of Marine Systems*

Potencial oxidativo e lipolítico de bactérias isoladas da água do mar na degradação do óleo combustível marinho MF-380

Melo, E. J. V.^{a*}; Arruda, F. V. F.^a; Silva, P. A.^a; Rosilma, N. S.^a; Gusmão, N. B.^a; Campos-Takaki, G. M.^b

^a Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

^b Departamento de Química, Centro de Ciências e Tecnologia da UNICAP

RESUMO

Estudos realizados em ambiente hipersalinos (água do mar) que permitiram o isolamento e a caracterização taxonômica de um grande número de micro-organismos, como bactérias moderadamente halofílicas, Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas de grande interesse para tratamento de efluentes principalmente de ambientes marinhos poluídos petroderivados como exemplo do óleo combustível MF-380. Contudo o objetivo deste trabalho foi o isolamento e seleção de micro-organismos provenientes de amostras da água do mar coletadas em proximidades à Termoelétrica de Pernambuco, que tenham potencialidade de degradar o óleo combustível marinho. A coleta da água do mar foi realizada em três pontos próximos ao complexo portuário de Suape. As amostras foram filtradas em papel filtro de 0,22 µm, em seguida as membranas foram incubadas em diferentes meios de culturas específicos para crescimento bacterianos. Os micro-organismos isolados foram submetidos a um teste de seleção qualitativo quanto ao potencial oxidativo e lipolítico frente ao combustível marinho. Foram isolados 602 bactérias dos três pontos de coleta. Os ensaios obtidos indicaram que 15,22% das bactérias demonstraram habilidade oxidativa com até 24 horas de incubação, e desses selecionados, sete apresentaram atividades lipolíticas. Através de testes bioquímicos e morfológicos observou-se que o maior percentual de bactérias isoladas pertencem ao gênero *Bacillus*.

Palavras chave: Potencial oxidativo, Potencial Lipolítico, Combustível marinho, Bactérias.

Introdução

As atividades ligadas à cadeia produtiva do petróleo trazem riscos potenciais ao meio ambiente, desde a sua extração até o armazenamento dos produtos derivados. Derramamento de óleo de não-petroleiros, especialmente a partir de navios de carga de grandes dimensões que comumente armazenam mais de mil toneladas de óleo combustível marítimo (Bunker), é um dos cada vez mais notado problemas de poluição do oceano. O graneleiro grego Amorgos, encalhou em 14 de janeiro de 2001, no sul de Taiwan, causando um derrame de mais de 1000 toneladas de Bunker, contaminando a costa, que constitui parte de Kending National Park, o que atraiu a atenção pública enormemente. Para o caso Amorgos bem como em muitos outros casos internacionais, biorremediação tem sido o principal mecanismo para a remoção de hidrocarbonetos de petróleo derramado a partir do ambiente marinho (HUA, 2006).

Os animais expostos ao petróleo e seus derivados podem apresentar alterações cardíacas, respiratórias, hepatomegalia, redução no crescimento, além de diversas alterações bioquímicas, celulares, reprodutivas e comportamentais. A exposição crônica a alguns componentes do petróleo pode provocar, ainda, anomalias genéticas e carcinoma em espécies sensíveis. Já na flora, os efeitos da exposição ao óleo variam desde a redução da transpiração e fixação de carbono à morte do organismo (VIEIRA, 2004; PEDROZO et al., 2002).

Os sérios danos gerados pelos lançamentos de petróleo e derivados ao meio ambiente forçam a busca de tecnologias de recuperação de áreas contaminadas. Nas duas últimas décadas os processos biológicos têm se apresentado como alternativas poderosas aos métodos convencionais de remediação de ambientes impactados (URURAHY, 1998).

O interesse no isolamento dos microrganismos nativos está atrelado à busca por linhagens que possuam capacidade em degradar petróleo e derivados, procurando utilizar-se das habilidades microbianas em processos de biorremediação. Além disso, obter uma análise da composição da microbiota da localidade impactada, oferecendo dados mais atualizados para a implementação de um processo de restabelecimento ambiental na área.

Contudo o objetivo deste trabalho foi o isolamento e seleção quanto o potencial oxidativo e Lipolítico de bactérias provenientes de amostras da água do mar coletadas nas proximidades da região portuária de Pernambuco, que tenham potencialidade de degradar o óleo combustível marinho.

Materiais e métodos

Coleta da água do mar

A coleta de 60 litros de água foi realizada em três pontos aleatórios, dois pontos no dique de contenção para captação da água do mar da empresa Termope S.A (Ponto 1: 8°24'22.5"S 34°57'57.0"W / Ponto 2: 8°24'23.4"S 34°57'54.6"W). E um ponto no rio Ipojuca (bacia hidrográfica próxima ao ponto de coleta / Ponto 3: 8°24'24.2"S 34°57'57.6"W), no Complexo Portuário de Suape - Pernambuco, o índice pluviométrico no local segundo APAC (Agência Pernambucana de Águas e Chuvas) foi de 14,00mm para o dia da coleta, que aconteceu no mês de janeiro de 2012.

As amostras foram mantidas em câmara fria à -4 °C no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Caracterização físico-química da água do mar

O material coletado foi caracterizado de acordo com a salinidade, oxigênio, temperatura, pH, nitrato, fosfato, enxofre e elementos traços (Zn, Cu, Mn, Fe, Mg) através da metodologia do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th edition, 1998. A análise microbiológica também foi realizada para acompanhamento da microbiota endógena.

Isolamento das Bactérias

As amostras da água do mar foram processadas através da filtração em membranas filtro de nitrocelulose com porosidade de 0,22 µm. Essas membranas foram transferidas para placas de petri com três diferentes meios de cultura. Para bactérias foram utilizados os meios Mueller-Hinton (5g de extrato de carne, 1,75g de caseína, 1,5g de amido e 15g de agar), BDA (200g de extrato de batata, 20g de glicose e 15g de agar) e Tryptic Soy Agar – TSA (15g de Trypticase, 5g de Peptona, 5g de Cloreto de sódio e 15g de Agar para 1L de água). Além do isolamento por filtração das membranas foram realizados concomitantemente um isolamento por incorporação de um derivado de petróleo com meio mineral Bashnel Hass. A

identificação das linhagens bacterianas selecionada foi realizada pelo Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Avaliação do potencial oxidativo

Os isolados foram submetidos a uma seleção inicial para avaliar a potencialidade de degradar o combustível marinho (MF-380), utilizando a técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em placas multiposos ou em frascos de Erlenmeyer, preconizada por Hanson et. al., (1993) e modificada por Gomes (2004). O indicador redox DCPIP atua comoceptor final de elétrons no processo de oxidação biológica. Se o isolado (bactérias ou fungos) testado for capaz de oxidar o petróleo, é observada a mudança de coloração do meio de cultura de azul para incolor. Esta técnica emprega para cada cultura: o teste com o poluente, um controle negativo (abiótico) e um controle positivo (biótico). As microplacas e os frascos foram submetidos a uma incubação em condições estáticas a $30\pm 1^\circ\text{C}$.

Atividade Lipolítica

Este método espectrofotométrico foi utilizado ao longo de todo o trabalho para determinar a atividade lipolítica durante a fermentação, para estudar a cinética da lipase. Foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger (2004). Baseia-se na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica (Sigma) e o Triton X-100 (Sigma). A liberação do p-nitrofenol, de coloração amarela e seguida a 410 nm.

Foram misturados 1 mL da solução de palmitato de p-nitrofenila (Sigma) em isopropanol, em uma concentração de $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, com 9 mL da solução de 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato $0,05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7,0), lentamente e sob contínua agitação. A mistura foi feita imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é instável quando em meio aquoso. Desta solução foram colocados 0,9 mL em cubeta. Estabilizada a temperatura a 37°C , foi adicionada a solução de enzima (0,1 mL) ou de tampão, quando se preparou o branco. A reação foi feita em cubeta de 1,0 mL e a leitura foi feita sempre contra um branco contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a 37°C e pH 7,0. A solução de enzimas foi obtida através da filtração do material residual

proveniente da fermentação do MF-380 durante cinco dias pelas bactérias em condições estáticas a temperatura de 30° C. A reação foi acompanhada pela leitura da absorbância.

Para o calculo da atividade foi utilizado a Equação abaixo, sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a liberação de 1 µmol de pNP (p-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de extinção molar do pNPP, em pH 7,0, (9,78.103 L.mol⁻¹.cm⁻¹) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura.

$$A = \frac{C_{ang} \cdot 60 \cdot ND}{\epsilon \cdot X_{enz}}$$

Sendo:

C_{ang} : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em segundos);

60: transformação de segundos para minuto;

ND: numero de diluições;

ϵ : coeficiente de extinção molar do pNPP a pH 7,0;

X_{enz} : volume (em mL) ou massa da enzima imobilizada (em mg).

Resultados e discussão

Caracterização da água do mar

A coleta da água foi realizada na temporada de estiagem (janeiro de 2012), porém houve uma condição atípica no dia anterior a coleta com o índice pluviométrico de 14mm. Com isso houve uma diminuição de temperatura das amostras coletadas, já que a média semestral em Suape-PE, é 40 °C (APAC). Desta forma a temperatura média dos três pontos foi de 34,36 °C. Também pode ser observada a oxigenação nas três amostras coletadas (Tabela 1), no qual o ponto três apresentou a menor oxigenação de 3,99, possivelmente atribuída a eutrofização da água do rio Ipojuca. Em relação ao pH, os valores obtidos ficaram em uma faixa levemente básica entre 7,78 e 8,19. O pH da água é determinado pela quantidade de hidretos (H⁺) ou hidroxilas (OH⁻). Quanto mais hidretos mais a solução é ácida e quanto mais hidroxilas mais a solução é básica.

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos da água do mar coletada próximo ao complexo portuário de Pernambuco.

PARÂMETRO	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Ph	8,19 ± 0,59	8,13 ± 0,35	7,78 ± 0,30
Oxigênio (mg/L)	4,82 ± 0,43	4,17 ± 0,20	2,98 ± 0,15
Temperatura (°C)	34,3 ± 0,27	35,2 ± 0,25	33,6 ± 0,30

Isolamento de micro-organismos

As amostras coletadas da água do mar no complexo portuário de Suape-PE foram submetidas a filtração e inoculadas em meios específicos para bactérias (Agar Tryptic Soy-TSA; Glicose, extrato de levedura e ágar-GL e Ágar Mueller-Hinton-MH, além do meio mineral Bashnel Hass (BH). Em seguida realizou-se o isolamento a cada 5 dias para bactérias. Foram isolados 602 linhagens bacterianas da água do mar divididos entre os grupos Gram positivos e Gram negativos (Tabela 2), não sendo observado diferenças no número de bactérias isoladas para os diferentes pontos de amostragem. A coloração de Gram foi realizada a fim de confirmar a que grupamento Gram as bactérias em estudo pertenciam e assim junto aos testes bioquímicos obter uma identificação. Observou-se ainda que, o gênero mais frequente foi *Bacillus* (98%), seguido de *Serratia* (2%).

Tabela 2 – Bactérias Gram positivas e Gram negativas isoladas da água do mar coletada no complexo portuário de Pernambuco.

Pontos de Coleta	Bactérias		Total de Isolados
	Gram +	Gram -	
1 (8°24'22.5"S 34°57'57.0"W)	93	74	167
2 (8°24'23.4"S 34°57'54.6"W)	177	82	259
3 (8°24'24.2"S 34°57'57.6"W)	118	58	176
Total	388	214	602

Avaliação do potencial oxidativo

Os testes qualitativos utilizando o indicador DCPIP mostram que 15,22% dos isolados bacterianos apresentaram uma oxidação biológica com 24 horas, o que pode ser evidenciado pela mudança da coloração do meio de azul para incolor (Figura 1).

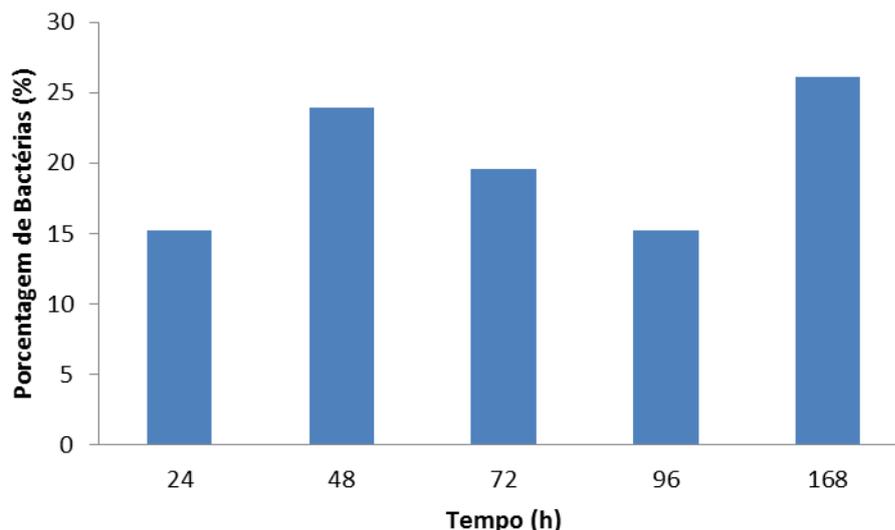


Figura 1 – Potencial de oxidação biológica das bactérias no teste qualitativo com MF-380 como fonte de carbono.

O resultado obtido neste trabalho corrobora com o de outros autores como Hanson et al. (1993), utilizando o potencial degradador de cinco isolados bacterianos com relação ao óleo cru, verificaram que dois isolados foram selecionados porque ocasionaram a mudança na coloração do meio de cultivo, contendo o indicador DCPIP, após 12 horas de incubação a 35°C. Enquanto que os demais isolados responderam com menor rapidez ao processo de oxidação biológica apresentando a viragem da coloração do indicador após 24 horas de incubação na mesma temperatura.

De acordo com Mariano (2009), os resultados obtidos com o teste de biodegradabilidade utilizando o indicador redox DCPIP mostraram que os inóculos de microrganismos nativos utilizados nos experimentos de biodegradação foram capazes de degradar a fonte oleosa. Pirollo, (2008) testou a capacidade de degradação de vários óleos combustíveis pelos consórcios bacterianos que apresentaram oxidação do indicador DCPIP com 4 dias, resultado superior as linhagens isoladamente.

Todos os isolados foram capazes de crescer em meio de cultura sólido e líquido, suplementado com naftaleno, fenantreno e pireno. No entanto, a degradação de pireno não foi detectada em culturas líquidas depois de 48 ou 120 horas de incubação, mesmo quando os isolados foram capazes de crescer em meio contendo pireno (Isaac, 2013).

Atividade Lipolítica das Bactérias

Foram testado quanto a atividade lipolítica, as bactérias previamente selecionadas que demonstraram capacidade oxidativa frente ao óleo combustível marinho. Das 91 bactérias testadas apenas sete apresentaram atividade lipolítica (Figura 2).

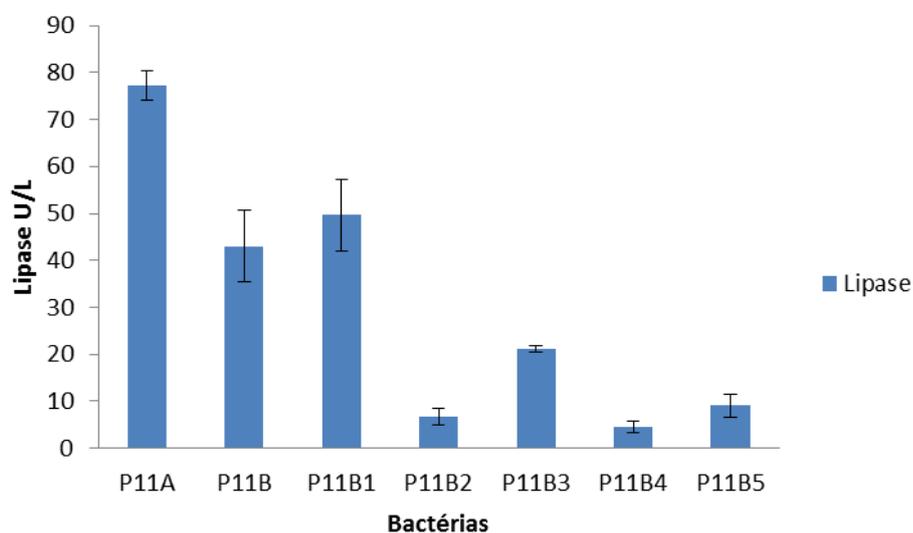


Figura 2 – Atividade lipolítica apresentada pelas bactérias isoladas da água do mar frente ao óleo combustível marinho MF-380.

Os valores de atividade lipolítica descritos neste trabalho são da mesma ordem de grandeza dos descritos na literatura para bactérias lipolíticas. Oliveira (2014), relataram o isolamento e caracterização 23 microrganismos potencialmente produtores de lipase, sendo a maioria das bactérias Gram Positivas, porém as Gram Negativas apresentaram as maiores atividades enzimáticas (entre 56.72 U/L e 81.99 U/L).

A atividade específica de lipases de bactérias, isoladas de esgoto sanitário, de diversos gêneros, está na faixa de 44 a 198,2 U/L de proteína (HABA et al., 2000). A atividade lipolítica de bactérias do gênero *Bacillus* também isolada de esgoto sanitário foi de 27 U/L de proteína (ZHANG et al., 2002).

KANWAR et al (2002), relataram que a cepa isolada de águas residuárias apresentou atividade lipolítica máxima, em pH 7.0 e temperatura de 30°C, de 39 U/L. Nas mesmas condições de temperatura e pH, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* utilizada como teste controle apresentou a mesma faixa de valores.

Identificação das Bactérias Isoladas

Das bactérias selecionadas em teste qualitativo oxidativo, com potencial de degradação frente ao poluente testado, 98% delas foram identificadas como pertencentes ao grupo do gênero *Bacillus sp.* A identificação das linhagens bacterianas isoladas foi realizada através de uma série de testes bioquímicos com os isolados, as bactérias foram submetidos ao teste bioquímicos com o objetivo de confirmar e diferenciar a qual gênero os isolados pertenciam. Os testes bioquímicos foram realizados pelo Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos do Departamento de Antibióticos da UFPE, os testes que foram realizados foram: TSI, citrato, ureia, SIM e fenilalanina. Na figura 3, observa-se a similaridade entre as bactérias isoladas do ponto 1, em relação aos testes bioquímicos. Onde observa-se que a bactéria P11A apresentou alta similaridade com outras bactérias, cuja as células foram descritas como Gram-negativas, moveis e formato de cocobacilo.

A análise de agrupamento mostrou que as comunidades microbianas estudadas no isolamento de águas marinhas termais a temperaturas entre 30 e 40°C foram mais semelhantes entre si, que a 50° C, enquanto que as comunidades microbianas em solos eram diferentes nos três temperaturas testadas. A percentagem de espécie de compartilhadas entre todos os solos foram de 30%. As classes bacterianas mais comuns foram *Gammaproteobacteria* e *Bacilli* mas também foram encontrados representantes das espécies *Gracilibacillus halotolerans*, *Amphibacillus diazotrophicus* e *Bacillus tryoxylicola* (Raeid, 2015).

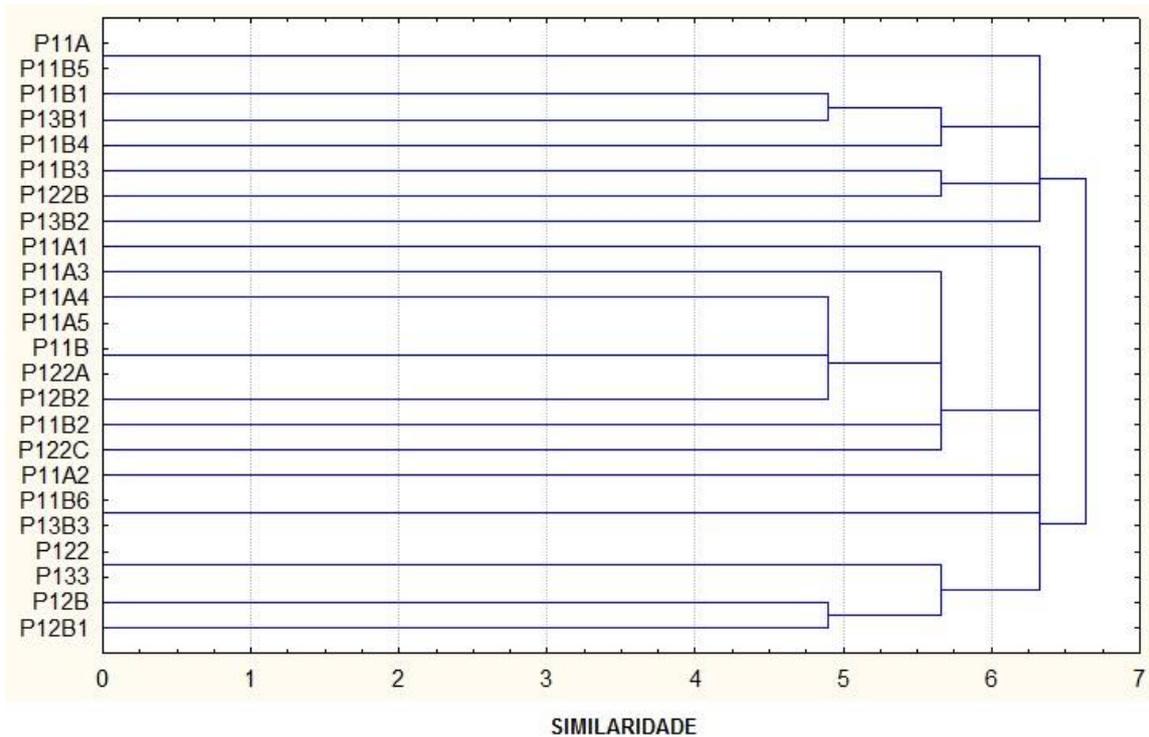


Figura 3 - Dendrograma das bactérias isoladas do ponto 1 da coleta da água do mar no complexo do porto de Suape- PE.

As bactérias isoladas no ponto 2 apresentou quatro grande grupos com similaridade. Onde linhagens como a P211 e P22B1 foram descritas como colônias mucoides creme e morfologia de bacilos curtos Gram negativos e Gram positivos (Figura 4).

Utilizando petróleo bruto como fonte de carbono, foram isoladas 36 cepas microbianas isoladas de 14 amostras provenientes de diferentes locais contaminados por petróleo (AFUWALE, 2012).

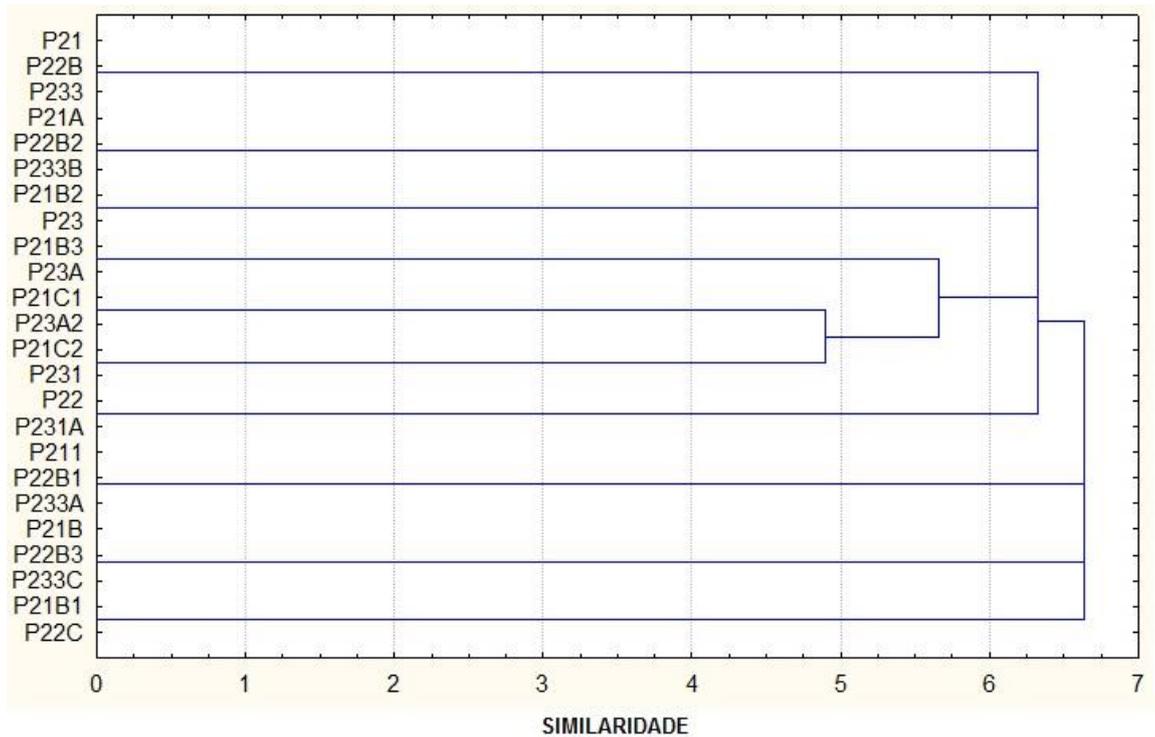


Figura 4 - Dendrograma das bactérias isoladas do ponto 2 da coleta da água do mar no complexo do porto de Suape- PE.

No terceiro ponto de isolamento as bactérias testadas apresentaram quatro grupos de similaridade. E linhagens como a P33 com colônias creme com bordas irregulares e morfologia de bacilos curtos Gram negativos, mostrou alta similaridade de acordo com a bioquímica com a linhagem P32 e a P313 que foram descritas com colônias creme com bordas rizóides com morfologia de bacilos longos Gram positivos (Figura 5).

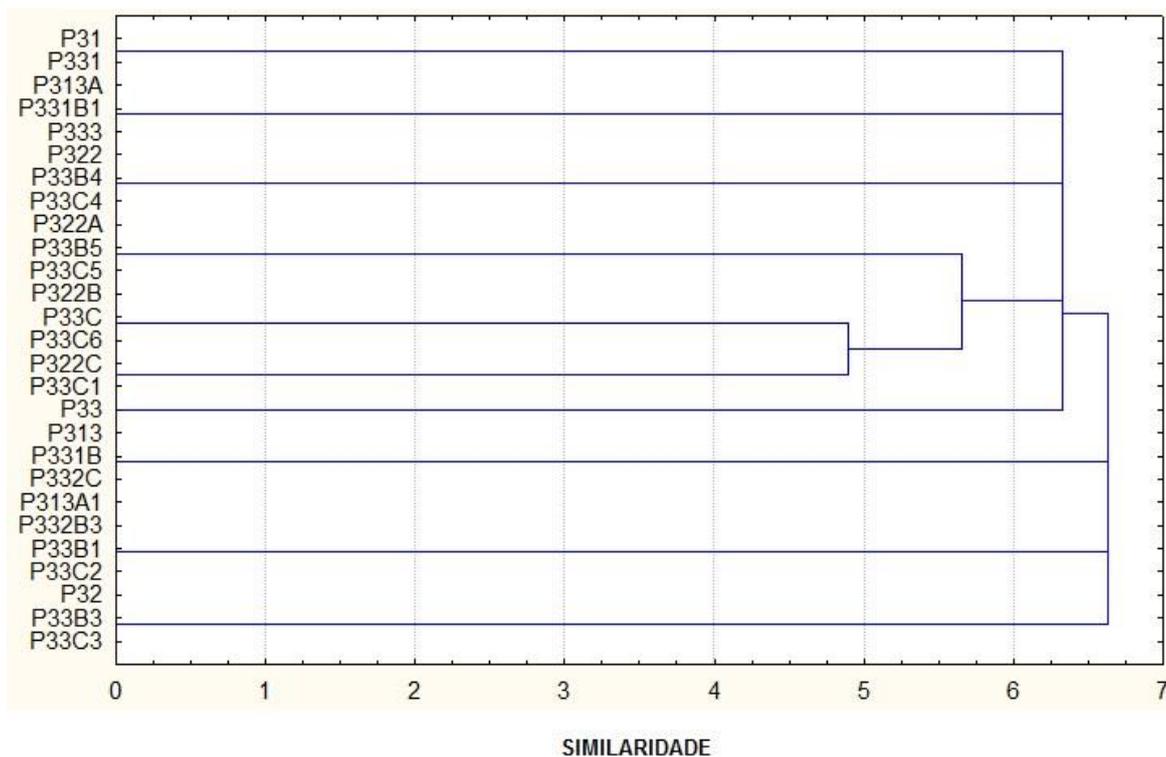


Figura 5 - Dendrograma das bactérias isoladas do ponto 3 da coleta da água do mar no complexo do porto de Suape- PE.

De forma semelhante, estudos obtiveram isolados bacterianos marinhos degradadores de óleos de amostras de água do mar coletadas da área superficial ao longo da região mediana do Oceano Atlântico, em que se verificou a densidade e presença de genes *alkB*. O gênero *Alcanivorax* foi o grupo dominante dentro dos isolados identificados pela análise do gene rRNA 16S. Além disso, a presença do mesmo gene *alkB* foi detectada, pela primeira vez, nas bactérias representantes dos gêneros: *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Kordiimonas*, *Gaetbulibacter*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Solimonas* e *Tetrathiobacter* (Wang et al.,2010).

Carmo *et al* (2011), isolaram 39 bactérias a partir de óleo, água do mar e areia de três locais diferentes na costa do mar no Japão, as linhagens foram isoladas em meio mineral Bushnell Haas acrescido com cloreto de sódio.

Chaillan *et al* (2004), isolaram 61 linhagens, sendo 12 bactérias heterotróficas, 19 bactérias hidrocarbonoclásticas, 12 fungos filamentosos totais, 14 fungos filamentosos hidrocarbonoclásticos e 4 leveduras hidrocarbonoclásticas de solos poluídos por petróleo na Indonésia, utilizando meios de cultivo distintos em que o óleo denominado BAL 150 como fonte de carbono.

Em áreas de manguezais foi observado um total de 47 microrganismos na área referência, sendo bactérias (58%), leveduras (38%) e fungos filamentosos (4%). Nas áreas pertencentes à BTS foram isolados 306 microrganismos, dentre eles bactérias (67%), leveduras (29%) fungos filamentosos (4%). Grupos de bactérias isoladas de sedimentos de manguezais contaminados da Baía de Todos os Santos crescem preferencialmente quando expostos a determinados compostos do petróleo (PEIXOTO et. al., 2011).

Muitas espécies de bactérias foram relatadas como tendo a capacidade de degradar derivados de petróleo em condições aeróbias ou anaeróbias. Yuan et al. (2010) relataram que o *Bacillus* sp. foi a bactéria dominante no processo de degradação aeróbia nos sedimentos de mangue. Dos micro-organismos isolados de sedimentos de mangue, três estirpes expressaram a melhor capacidade biodegradação, foram todos identificadas como *Bacillus* sp. Sun e Shan (2007) isolaram um *Bacillus* sp. a partir da lama ativada que foi capaz de degradar hidrocarbonetos Poli aromáticos. Foi também relatado que alguns *Bacillus* sp. poderia degradar diversos hidrocarbonetos como di-isodecilo fitalato (DIDP) (Park et al., 2009), di-2-fitalato de etil-hexilo (DEHP) (Quan et al., 2005), fitalato de dimetilo (DMP) (Niazi et al., 2001).

A biodegradação de hidrocarbonetos em águas subterrâneas por *Bacillus* sp. sob condições simuladas do aquífero foi mais rápida no início do período da experiência, enquanto que menos de 5% dos hidrocarbonetos foram degradados no controle (Qiong, 2013).

Conclusões

Das amostras coletadas na água do mar (Suape-PE), foram isolados 797 microrganismos, compreendendo 602 bactérias foram testadas quanto à potencialidade de degradar os derivados de petróleo (bunker), movimentados pelo terminal portuário de Suape-PE. No teste de seleção, verificou-se a ocorrência de oxidação biológica de 15,22% das bactérias com 24 horas de incubação do meio de cultivo a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sinalizada pelo indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP). Das 91 bactérias testadas apenas sete apresentaram atividade lipolítica. A maior porcentagem das bactérias foram identificado como pertencentes do gênero *Bacillus* (98%) e apresentaram similaridades quanto a bioquímica e morfologia.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela empresa Termope do grupo Neoenergia e pela fundação de fomento CAPES.

Referências

AFUWALE, C.; MODI, H. A. Study of bacterial diversity of crude oil degrading bacteria isolated from crude oil contaminated sites. **Life sciences leaflets**, v. 6, p.13-23, 2012.

CARMO, F.L., SANTOS, H.F., FERREIRA, E.M., ELSAS, J.D.V., ROSADO, A.S., PEIXOTO, R.S. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. **Journal of Microbiology**. (Seoul. Print) 49, 535-543. 2011.

CENEK, N.; PAVLA, E.; HANA, S. KATERINA, M.; ZUZANA, R.; LENKA, M.; IRENA, P. JIRÍ, B. Biodegradation of aromatic-aliphatic copolyesters and polyesteramides by esterase activity-producing microorganisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 97, p. 25-30, 2015

ER, J. E.; MINAKO, K.; KENJI, T.; SHUICHI, Y.; TATSUKI, T. Biodegradation of bisphenol A by bacterial consortia. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 96, p. 166-173,2014.

HANSON, K. G.; DESAI, D.; DESAI, A. J. 1993.A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**. v7. n10. p. 745-748.

HABA, E., BRESCO, O.; FERRER, C.; MARQUES, A.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and microbial technology**, n° 26, p. 40-44. 2000.

ISAAC, P.; SÁNCHEZ, L. A.; BOURGUIGNON, N.; CABRAL, M. E.; FERRERO, M. A. Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 82. P. 207-214. 2013.

KANWAR, L.; GOSWAMI, P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its applications in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilized lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 31, p. 727–735, 2002.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D.A. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology Biotechnology**. v. 42, n. 4, p. 279-286, 2004.

MARIANO, A. P.; ANGELIS D. F. PIROLLO, M. P. S.; CONTIERO, J.; BONOTTO, D. M. Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soils. **Braz. arch. biol. technol.** [online]. 2009, vol.52, n.5, pp. 1297-1312. 2009.

MENG, L.; YUHUA, L.; WEIWEI, C.; HUI, W.; XIAOKE, H. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 88, p.8-12, 2014.

NIAZI, J.H.; PRASAD, D.T.; KAREGOUDAR, T.B. Initial degradation of dimethylphthalate by esterases from Bacillus species. **FEMS Microbiology Letters**. V. 196, p. 201-205. 2001.

OLIVEIRA, T. F.; HIDÁLGO, M. R.; SOARES, M. S. Produção de lipase extraída de resíduos aquosos: cinética da atividade enzimática. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 38, n. 6, 2014.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo. Salvador: CRA, 2002.

PETROBRAS, 2010. Bunker. Produtos e Serviços. Disponível em: http://www2.petrobras.com.br/produtos_servicos/port/Produtos/Bunker/Bunker.asp?mn=prod#. Acesso em: 30 de Setembro de 2010.

PEIXOTO, R; CHAER, G. M; CARMO, F. L; ARAUJO, F. V; PAES, J. E; VOLPON, A; SANTIAGO, G. A; ROSADO, A. S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediments. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 341-354. 2011.

PIROLLO, M P. S. Estudo da Produção de Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos. Dissertação apresentada ao Instituto da Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – São Paulo, 2008.

PARK, J.M.; KIM, M.; YOON, J.; KOBAYASHI, F.; IWASAKA, Y.; HONG, C.S.; MIN, J.; KIM, Y.H. Biodegradation of diisodecyl phthalate (DIDP) by Bacillus sp. SB-007. **Journal of Basic Microbiology**. V. 49, p. 31-35. 2009.

QIONG, W.; HUI, L.; LI-SHENG, Y.; PING, L.; YAN-HONG, W. Biodegradation of Di-n-butyl phthalate esters by Bacillus sp. SASHJ under simulated shallow aquifer condition. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 76, p.102-107. 2013.

QUAN, C.S.; LIU, Q.; TIAN, W.J.; KIKUCHI, J.; FAN, S.D. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by Bacillus subtilis No. 66. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 66, p. 702-710. 2005.

RAEID, M. M.; A.; SAMIHA, AL-KHARUSI; MANAL, AL-HINAI. Effect of biostimulation, temperature and salinity on respiration activities and bacterial community composition in an oil polluted desert soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 98. P.43-52. 2015.

SHU, C.; TIANMING, C.; SHIYANG, L.; QIAN, Y.; JIAN, H.; LIWEI, C.; JIANG, H. Biodegradation of N-Methylpyrrolidone by *Paracoccus* sp. NMD-4 and its degradation pathway. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 93, p. 70-77, 2014.

SUN, X.R.; SHAN, Z.J. Removal of di-n-butyl phthalate using immobilized microbial cells. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. V. 15, p. 167-171. 2007

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.

VIEIRA, F. C. S. 2004. Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea). Dissertação de mestrado em Engenharia ambiental. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFSC. Santa Catarina.

WANG, L.; WANG, W.; LAI, Q.; SHAO, Z. Gene diversity of CYP153A and AlkB hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 15, p. 1230-1242, 2010.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M., Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*, **Journal Bacteriology**, vol. 138, p. 663-670, 1979.

YUAN, S.Y.; HUANG, I.C.; CHANG, B.V. Biodegradation of dibutyl phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate and microbial community changes in mangrove sediment. **Journal of Hazardous Materials**. V. 184, p. 826-831. 2010.

ZHANG, J.; HOU, Z.; YAO, C.; YU, Y. Purification and properties of a lipase from a *Bacillus* strain for catalytic resolution of (R)-Naproxen. **Journal of Molecular Catalysis: Biology Enzymatic**, vol. 18, p. 205-214, 2002.

4.2 Artigo submetido a revista: Science of the Total Environment

Biodegradação do óleo combustível marinho (MF-380) por Bactérias isoladas da água do mar no complexo portuário de Suape-PE

Melo, E. J. V.^{a*}; Arruda, F. V. F.^a; Silva, P. A.^a; Callou, M. J. A.; Baptista, N. Q.; Gusmão, N. B.^a; Campos-Takaki, G. M.^b

^a Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

^b Departamento de Química, Centro de Ciências e Tecnologia da UNICAP

Resumo

O “marine fuel” é um combustível que é destilado a partir de petróleo bruto. Também conhecido como óleo combustível Marinho ou Bunker, este material pode ser dividido em diferentes categorias com base na sua composição química, a sua finalidade, e a temperatura de ebulição. Em comparação com outros produtos de petróleo, óleo combustível para navios é extremamente denso e altamente poluente. No Brasil as regiões costeiras então mais suscetíveis a derramamentos de petróleo e seus derivados, já que os maiores índices de acidentes têm sido registrados nas operações realizadas nos portos e terminais. O objetivo deste trabalho é avaliar a degradação do MF-380 pelas bactérias. Foram utilizadas sete linhagens de bactérias isolados de áreas impactadas e previamente selecionados quanto a potencialidade oxidativa e lipolítica. A amostra de MF-380, foi cedida pela empresa Petrobras Transporte S.A., posteriormente foi realizado uma análise química elementar do combustível. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer (500 mL), contendo o meio mineral Bushnell Haas-BH, o inóculo padronizado com dois blocos de gelose de 8mm de diâmetro e concentrações crescentes de 1% a 5% do MF-380 como fonte de carbono. Os frascos foram incubados em condições estáticas, a $30\pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias. Os resultados da análise elementar mostraram que o MF-380 não possui nenhuma fonte de Enxofre (S). A bactéria P11A apresentou uma degradação de 100% do Dodecano e 93,93% do Pentadecano quando submetidos a uma concentração de 3% do MF-380, na concentração de 5% os melhores resultados para a bactéria P11A, foram de 91,66% de degradação do Eicosano e 85,71% do Docosano.

Palavras chave: Degradação, Óleo combustível, Bactérias, Hidrocarbonetos Alifáticos.

Introdução

Um derramamento de óleo no ambiente marinho quer seja a partir de escoamento ou fontes antropogênicas, está sujeito a uma variedade de processos naturais. A maior parte destes, tais como a dispersão, evaporação, dissolução e percolamento, mudança do estado físico ou a localização do petróleo, mas não o remove completamente a partir do ambiente. Apenas combustão, foto-oxidação, e biodegradação para converter hidrocarbonetos dióxido de carbono e água. (GARRET, et. al., 2003).

Grandes quantidades de petróleo bruto foram entrando no mundo do oceanos há milhões de anos, e um grupo diversificado de micro-organismos evoluiu para tirar proveito desta rica fonte de carbono reduzida (PRINCE, 2010;. PRINCE et. al, 2010). Grande parte do petróleo vem de escoamento natural, e enquanto alguns adere às partículas de sedimentos e é degradada no fundo do mar, outras sobe para a superfície do mar para formar manchas, e outra parte dispersa como pequenas gotas na coluna de água (FARWELL et. al., 2009).

A grande parte deste óleo vem de fontes antropogênicas, tanto como escoamento de terra e de acidentes de perfuração e de transporte (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003). O petróleo é um substrato incomum em dois aspectos principais. Em primeiro lugar, apenas algumas moléculas, tais como ácidos graxos saturados (por exemplo, metano, etano e propano) e de aromáticos (por exemplo, benzeno, tolueno, etilbenzeno e os xilenos) são significativamente solúvel. Em segundo lugar, enquanto o petróleo fornece uma rica fonte de carbono e energia, ele não contém quantidades significativas de nitrogênio ou de fósforo disponível biologicamente essencial para crescimento microbiano.

Juntos, estes significam que a biodegradação de quantidades significativas de óleo em meios aeróbicos é provável ser limitada pela área da superfície disponível do óleo, bem como a presença de nutrientes. A biodegradação do óleo em linhas costeiras foi melhorada pela aplicação criteriosa de fertilizantes para o óleo (PRINCE e BRAGG, 1997), mas a adição de nutrientes as áreas em mar aberto não é geralmente adequado tendo em conta a probabilidade competição para captação por planctônicos fotoautótrofos (PRINCE, et. al., 2013). Biorremediação é o principal mecanismo para limpar poluentes de petróleo sob condição de atenuação natural (KRISTENSEN *et al.*, 2010).

Existem vários métodos para retirada de substâncias recalcitrantes do meio ambiente. As opções vão desde a construção de barreiras físicas, lavagem ou ventilação do solo contaminado, e sua destruição por incineração ou por biorremediação. Esta última utiliza-se

agentes biológicos, operando com menos custo e mais rapidamente. Para que a biorremediação seja eficiente é necessário que o poluente seja transformado metabolicamente por algum microrganismo, os produtos finais sejam seguros e as condições ambientais favoreçam a atividade microbiana. O processo deve ter uma relação custo/benefício interessante (MALAJOVICH, 2011).

A biodegradação de hidrocarbonetos é um processo de grande complexidade que depende da natureza e quantidade dos hidrocarbonetos presentes no ambiente poluído (MUSAT e WIDDEL, 2008). A escolha do processo mais adequado e eficiente dependerá do tipo e das características físico-químicas e toxicológicas dos poluentes; dos microrganismos que existem no local; o volume do material que será tratado; tempo e custo para a utilização da tecnologia (LIN et. al., 1996; WALTER & CRAWFORK, 1997).

Este trabalho tem como objetivo selecionar bactérias isolados da água do mar que tenham a capacidade de degradar ou mitigar os componentes do combustível marinho (MF-380).

Materiais e métodos

Condições de cultivo

Foram utilizadas sete linhagens de bactérias isolados de água do mar e previamente selecionadas quanto ao potencial oxidativo e lipolítico. Estes micro-organismos estão depositados na coleção de culturas do Departamento de Antibióticos (UFPEDA). A manutenção dos isolados bacterianos foi feita por repiques sucessivos, a cada três meses, em placa de Petri, contendo o meio Tryptic Soy Agar – TSA (15g de Trypticase, 5g de Peptona, 5g de Cloreto de sódio e 15g de Agar para 1L de água).

Amostra do Óleo combustível MF-380

A amostra de MF-380, utilizada em todos os ensaios, foi cedida pela empresa Petrobras Transporte S.A. (TRANSPETRO). A caracterização físico-química do MF-380 está representada na tabela 1.

Tabela 1 – Características físico-químicas do óleo combustível MF-380 cedido pela TRANSPETRO.

Propriedades físico-químicas	
Aspecto	Líquido viscoso escuro
Odor	Característico de Hidrocarbonetos
Ponto de fulgor	60°C (Método: vaso fechado)
Taxa de evaporação	Muito Lenta
Inflamabilidade	Pouco inflamável
Densidade	0,9878
Viscosidade	380 Cst @ 50°C (Metodo: MB 293)

Fonte: (<http://www.br.com.br/>).

A análise química elementar do Óleo combustível MF-380 foi realizada pela central analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco. Essa análise foi realizada para determinar a massa do carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre presentes na amostra utilizada nos ensaios.

Ensaio de Degradação do MF-380 por microrganismos isoladamente

Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer, com as bactérias previamente selecionados, contendo o meio mineral Bushnell Haas-BH, 20% (v/v) do inóculo padronizado (dois blocos de gelose de 8mm de diâmetro) e concentrações crescentes de 1%, 3% e 5% de MF-380 como fonte de carbono, totalizando um volume final de 100 mL. Os frascos foram incubados em condições estáticas, a 30±1°C por 10 dias. Em cada uma dessas concentrações foram coletadas alíquotas, para avaliação do pH e a quantificação da degradação.

Avaliação do pH e Biomassa

Para avaliação do pH durante o processo, após o período de incubação foi realizado uma medição para cada alíquota, utilizando o potenciômetro da marca PHTEK modelo PHS-3B. A cada alíquota retirada, a amostra foi lavada com detergente e centrifugado até a retirada total do óleo, foi pesada a massa de células em membranas filtrantes de porosidade(Ø) de 0,22µm para avaliação do crescimento microbiológico por gravimetria (g/L).

Preparação da Amostra e análise do MF-380 residual

Para a determinação da degradação, as amostras (fases aquosas e oleosas) foram submetidas a uma etapa de preparação. Para a separação dos subprodutos da fase aquosa foi realizada uma extração com o solvente diclorometano em funis de separação e a fase oleosa foi filtrada em papel de filtro (faixa amarela). Após a separação da fase aquosa foi realizada a segunda etapa de preparação da amostra onde se separa as frações do MF-380. O “clean up” foi realizado em colunas empacotadas com sílica ativada a 800°C por 4 horas, e eluída com 60 mL de hexano. Em seguida é preparada uma massa com o 1,5 mL do material residual e sílica que é adicionada na parte superior da coluna, após a adição da massa, 20 mL de diclorometano foi eluído na coluna para remoção da fase de hidrocarbonetos alifáticos. Esta fase foi injetada no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM modelo SHIMADZU®) para quantificação da degradação. A biodegradação do petróleo foi avaliada, após a etapa de preparação da amostra, por cromatografia acoplada a espectrômetro de massa, através do decaimento dos picos de concentração dos constituintes do petróleo em função da degradação.

Resultados e Discussão

Caracterização química do óleo combustível MF-380

Os resultados da análise elementar do MF-380 estão representados na tabela 2. O resultado mostra que o óleo combustível MF-380 não possui nenhuma fonte de Enxofre (S), ou seja, não detectado nenhuma presença de compostos sulfurados polares. A análise ainda apresentou que o combustível possui baixas quantidades de Nitrogênio.

Tabela 2 – Análise química elementar da amostra do combustível marinho MF-380.

Elementos Analisados	Porcentagem em Massa (%)
C	87,0938
H	11,3164
N	0,2447
S	0,0000

A medida da quantidade total de enxofre nos combustíveis nada informa sobre sua reatividade; no entanto, os compostos sulfurados podem inibir, catalisar ou ser inertes à ação corrosiva naftênica do aço-carbono (Kane, 1999). A relação do conteúdo de enxofre e atividade corrosiva tem sido tema de algumas pesquisas (Slavcheva, 1999). A corrosão nas unidades de destilação da refinaria Salina Cruz (México), tanto à pressão atmosférica, quanto à pressão reduzida, foi estudada por Laredo e colaboradores (Laredo et al, 2004).

A presença de ácidos naftênicos de baixo peso molecular, associada ao reduzido conteúdo de enxofre, pode estar na origem dos processos de corrosão. Contudo, os autores ressaltam a necessidade da avaliação de outros fatores, como o conteúdo de sais e/ou a metalurgia do material do equipamento. O efeito dos compostos sulfurados na corrosão, relacionada com os ácidos naftênicos, envolve redução por prótons gerados no processo corrosivo. Quando o produto de redução é o H_2S , há formação de uma camada protetora de FeS , a qual previne do ataque naftênico. Porém, quando o produto de redução é a H_2O , a dissociação do ácido torna-se possível e intensifica a reação catódica, promovendo severa corrosão naftênica (Tomczyk, et al, 1998).

Degradação do MF-380

Todos os micro-organismos testados apresentaram degradação dos compostos alifáticos do MF-380 a 3% e 5%. Quando submetidos ao menor percentual da concentração do óleo contaminante (1%), houve total degradação efetiva dos compostos alifáticos estudados, o que pode ser atribuído a biodisponibilidade do poluente.

A análise cromatográfica da degradação pelas bactérias isoladas apresentou uma degradação mais acentuada para os compostos com menor quantidade carbonos da fração alifática na concentração de 3% do MF-380. Esta fração é representada pelo Decano (C-10), Undodecano (C-11), Dodecano (C-12), Tridecano (C-13) e Tetradecano (C-14). Varias bactérias apresentaram degradação total (100%) para o Decano, entretanto na concentração de 5% não houve degradação dos compostos menores (Tabela 3).

A degradação de naftaleno foi observado após 48 horas de incubação pelos isolados, em taxas de degradação próxima à 100%. Além disso, as linhagens bacterianas P26 e N12 também foram capazes de degradar 58 e 54% de fenantreno (Isaac, 2013).

Tabela 3 – Degradação dos compostos alifáticos C-10 à C-14, pelas bactérias isoladas da água do mar.

		Hidrocarbonetos alifáticos				
		Decano	Undecano	Dodecano	Tridecano	Tetradecano
P11A	1%	100	100	100	100	100
	3%	100	80	87,50	81,25	79,31
	5%	0	0	6,66	43,47	48,27
P11B	1%	100	100	100	100	100
	3%	100	67,03	75,70	72,98	70,45
	5%	0	0	3,87	33,33	47,29
P11B1	1%	100	100	100	100	100
	3%	100	63,31	71,73	68,78	65,65
	5%	0	2,98	4,39	45,18	30,97
P11B2	1%	100	100	100	100	100
	3%	100	79,80	89,25	79,50	68,31
	5%	0	0	0	20,97	43,33
P11B3	1%	100	100	100	100	100
	3%	100	66,25	85,11	70,62	68,33
	5%	0	0	3,61	35,95	27,50
P11B4	1%	100	100	100	100	100
	3%	100	65,03	75,98	69,95	81,35
	5%	0	0	0	25,10	35,01
P11B5	1%	100	100	100	100	100
	3%	100	75,38	63,89	70,55	80,11
	5%	0	0	2,27	30,25	28,45

Para os compostos alifáticos que tem 15 e 18 carbonos houve um equilíbrio na degradação das duas concentrações (3% e 5%), não havendo degradação total em nenhum composto, e mostrando os valores mais baixos que os compostos com menos carbonos (C-10 à C-14) ou com mais carbonos (C-19 à C-22). Porém a bactéria P11A apresentou uma degradação de 93,33% para os compostos pentadecano e fitano (Tabela 4).

Além disso, Morris et al. 2009, relataram mais de 82% de biodegradação de compostos orgânicos (C8-C25 n-alcenos) e 31% atenuação natural ao longo de 21 dias a 30 °C. Mais de 90% de remoção de hidrocarbonetos alifáticos normais através de biorremediação em sedimentos marinhos também tem sido relatada. Uma comparação da degradação de n-alcenos de cadeia média (C₁₂H₂₆-C₂₂H₄₆) e de cadeia longa n-alcenos (C₂₄H₅₀-C₃₄H₇₀), mostra claramente que a cadeia longa é degradada mais lentamente do que os de cadeia média (Mohammad A. Z., 2010). Resultados semelhantes foram relatados por outros pesquisadores (Silva, 2009; Mohajari et al, 2010; Bacosa, 2015).

Tabela 4 – Degradação dos compostos alifáticos C-15 à C-18, pelas bactérias isoladas da água do mar.

		Hidrocarbonetos Alifáticos					
		Pentadecano	Hexadecano	Heptadecano	Pristano	Octadecano	Fitano
P11A	1%	100	100	100	100	100	100
	3%	93,93	84,88	80,76	66,66	86,66	93,33
	5%	44,44	57,14	43,75	50	53,84	60
P11B	1%	100	100	100	100	100	100
	3%	88,20	75,88	86,11	68,33	91,26	94,66
	5%	42,25	50,11	45,00	48,15	50,33	58,10
P11B1	1%	100	100	100	100	100	100
	3%	80,52	55,66	68,16	58,98	87,56	84,36
	5%	48,55	43,91	43,33	51,35	54,03	57,24
P11B2	1%	100	100	100	100	100	100
	3%	46,60	76,38	79,76	61,86	69,79	87,45
	5%	39,05	47,62	40,65	41,10	41,23	51,19
P11B3	1%	100	100	100	100	100	100
	3%	59,03	67,45	68,33	61,07	78,20	65,66
	5%	50,88	65	55,49	57,25	48,55	52,33
P11B4	1%	100	100	100	100	100	100
	3%	75,35	65,24	67	81,66	89,97	68,50
	5%	40,25	38,94	52,39	50,65	49,12	50,25
P11B5	1%	100	100	100	100	100	100
	3%	61,66	67,45	87,05	78,12	75,10	70,45
	5%	41,38	45	52,43	54,78	55,50	51,42

A degradação dos compostos alifáticos com maior número de carbono, representado por nonadecano (C-19), eicosano (C-20), heneicosano (C-20) e docosano (C-22), demonstrou uma melhor degradação na concentração de 5% do MF-380 do que os compostos menores. No entanto a concentração de 3% ainda mostrou uma melhor degradação, onde a bactéria P11A obteve uma degradação de 87,50% do Docosano e a bactéria P11B3 mostrou uma degradação de 88% do Eicosano (Tabela 5).

A extensão da degradação de n-alcenos com mais do que C-36 nem sempre é definida por causa de sua concentração extremamente baixa em petróleo bruto (Mohammad, A. Z., 2010). Vieira, P. A., 2009 relataram que o n-alcenos na gama de C8-C11 foram completamente degradada após 56 dias de tratamento. Hidrocarbonetos com quantidades de carbonos C12-C21, C22-C31 e C32-C40 eram removidas nos níveis de 83-98%, 80-85% e 57-73%, respectivamente.

Covino et al, 2015 relataram que a degradação de petróleo procedeu para além dos limites biodisponíveis apenas para as frações C10-C14 e C21-C27. Não foi possível calcular a fracção de C28-C34, pois os dados de dessorção não se encaixava de forma confiável.

Tabela 5 – Degradação dos compostos alifáticos C-19 à C-22, pelas bactérias isoladas da água do mar.

		Hidrocarbonetos Alifáticos			
		Nonadecano	Eicosano	Heneicosano	Docosano
P11A	1%	100	100	100	100
	3%	75,00	66,66	84,61	87,50
	5%	60	66,66	62,50	71,42
P11B	1%	100	100	100	100
	3%	68,31	60,59	58,66	70,82
	5%	57,95	62,33	59,97	65,45
P11B1	1%	100	100	100	100
	3%	78,01	61,35	70,25	65,32
	5%	55,65	61,12	61,87	61,35
P11B2	1%	100	100	100	100
	3%	77,88	65,91	80,21	81,50
	5%	52,50	58,73	51,87	55,10
P11B3	1%	100	100	100	100
	3%	70,32	88,00	75,10	81,68
	5%	60,98	68,10	59,54	56,66
P11B4	1%	100	100	100	100
	3%	87,64	85,50	81,11	83,33
	5%	61,72	59,05	55,79	56,25
P11B5	1%	100	100	100	100
	3%	82,55	81,98	80,33	75,10
	5%	50,33	62,79	65	66,66

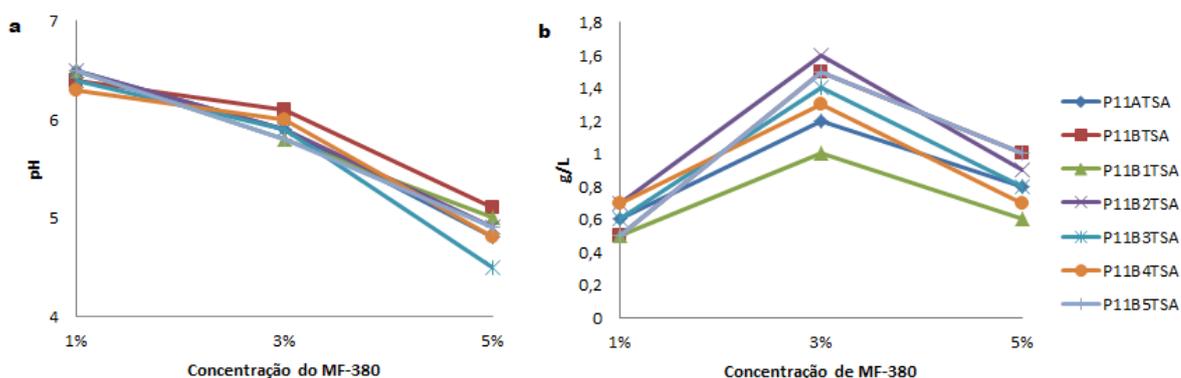
A estrutura dos compostos pode influenciar a velocidade de biodegradação por estar relacionada com a disponibilidade do composto à ação microbiana. Em alguns substratos, a taxa e a extensão da biodegradação de compostos orgânicos, principalmente para compostos hidrofóbicos, são afetadas pelas complexas interações entre as moléculas dos contaminantes, as partículas do solo, a água intersticial e os microrganismos degradadores (SEABRA, 2008).

A natureza do contaminante presente no solo pode interferir na extensão da degradação microbiana, por ser esta uma função do peso molecular do composto orgânico e da razão de hidrocarbonetos saturados e aromáticos. Os microrganismos apresentam uma habilidade degradadora decrescente com o aumento da cadeia dos hidrocarbonetos, bem como

com o aumento da complexidade de suas estrutura ou quantidade (TRINDADE, 2002; ASANO, 2013).

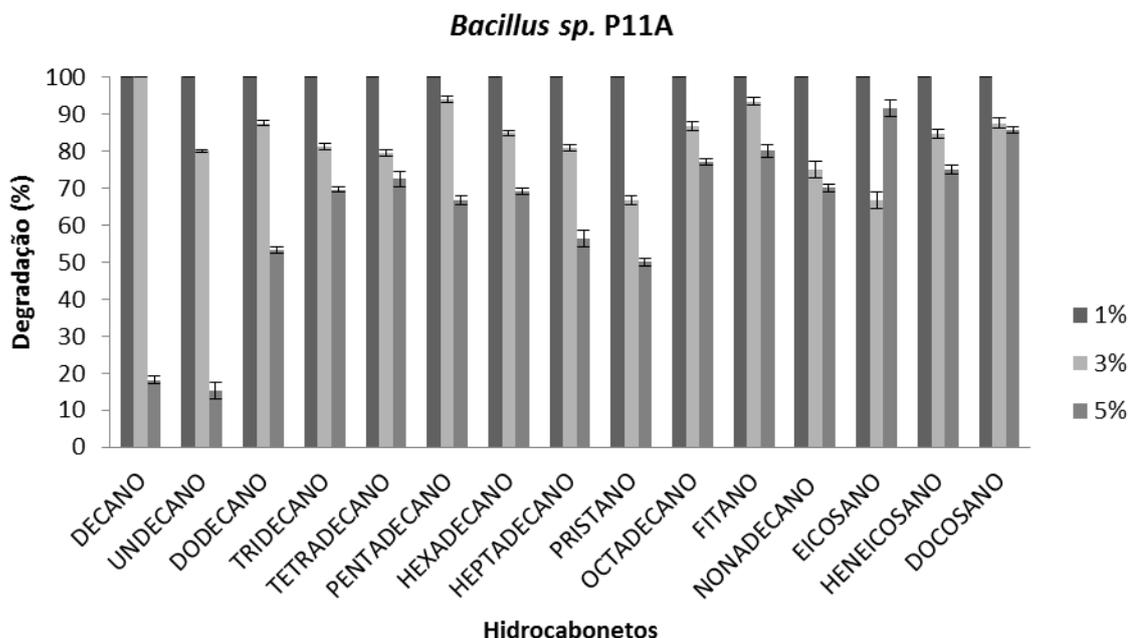
Ao final do ensaio foram retidas alíquotas para avaliação da biomassa, onde podemos acompanhar o perfil de crescimento da massa seca, e o pH para avaliar se houve produção de ácidos. Como pode ser observado na figura 1, houve uma similaridade entre os valores de massa seca apresentada pelas bactérias testadas. Onde há aumento na concentração de 3% em relação a de 1%, ocorrendo o inverso em relação a concentração de 5% que decresce comparado a concentração menor. Quanto ao pH observa-se que com o aumento das concentrações houve uma diminuição dos valores encontrados, o que pode ser evidenciado pela produção de ácidos pelas bactérias. Em um processo fermentativo de biorremediação, a produção de biomassa indica a adaptabilidade do microrganismo ao substrato e a transformação do composto original, enquanto que a acidificação é justificada geralmente pela produção de ácidos orgânicos, indicadores indiretos de biodegradação (Rao, 2005).

Figura 1 – Perfis de pH (a) e biomassa (b) apresentado pelas bactérias testadas durante a degradação nas concentrações 1%, 3% e 5% de MF-380.



A bactéria que apresentou melhor degradação dos compostos alifáticos do MF-380 foi a P11A (Figura 2). Chegando a uma Degradação efetiva de 100% do Dodecano e 93,93% do Pentadecano quando submetidos a uma concentração de 3% do MF-380, na concentração de 5% os melhores resultados para a bactéria P11A, foram de 91,66% de degradação efetiva do Eicosano e 85,71% do Docosano, que são compostos alifáticos maiores do Combustível marinho.

Figura 2 – Perfil de degradação de concentrações crescentes do MF-380 pela bactéria *Bacillus sp.* (P11A).



A temperatura e salinidade estão entre os fatores cruciais que limitam as atividades microbianas e composição da comunidade, e só as bem adaptadas bactérias podem degradar poluentes com sucesso em condições extremas. Experiências demonstram que as alterações de temperatura e salinidade não só afetou atividade bacteriana, mas também resultou em mudanças na composição da comunidade bacteriana. Assim, as flutuações nos dois parâmetros pode influenciar diretamente o sucesso e eficiência dos processos de biorremediação (Raeid, 2015).

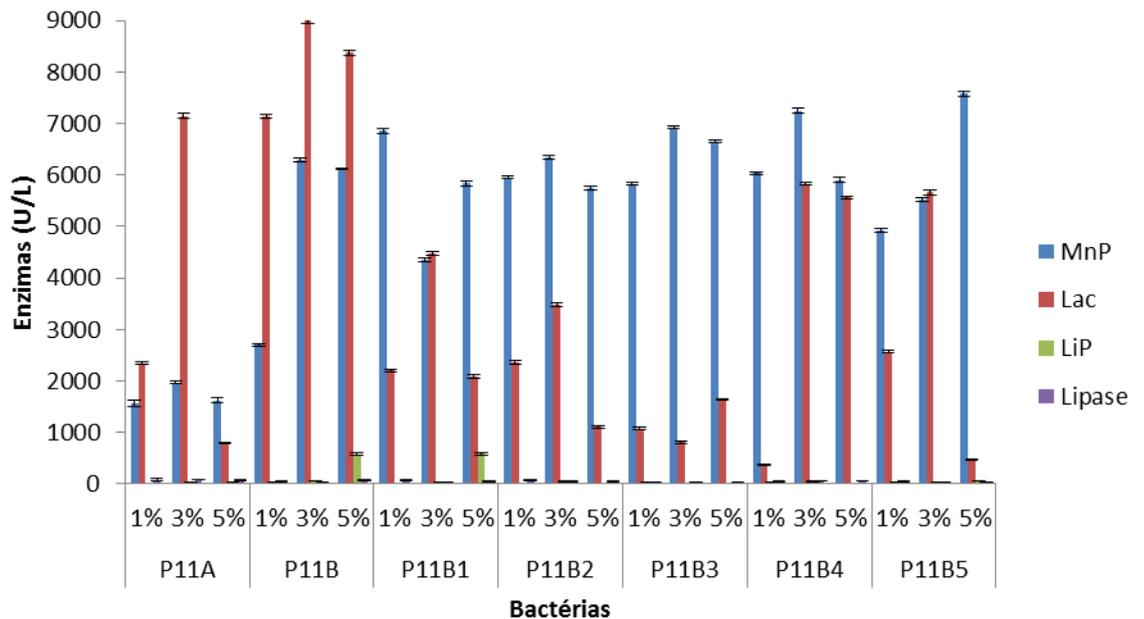
Entre os microrganismos que podem ser utilizados para o tratamento biológico de efluentes de petróleo, as bactérias e os fungos vêm se mostrando hábeis em degradar compostos xenobióticos e outros de grandes cadeias moleculares que, em geral, são de difícil degradação. Estes micro-organismos podem sobreviver e crescer em meios com concentrações elevadas de compostos recalcitrantes e são capazes de utilizá-los como fonte de energia (SANTAELLA et. at., 2009).

Covino, et al., 2015 relataram que ao avaliar a degradação da primeira fração obtida da destilação do petróleo, foi possível estimar a percentagem de biodisponibilidade total de hidrocarbonetos alifáticos (C10-C34) que foi considerado inicialmente de $72,4 \pm 3,4\%$, com referência à totalidade.

Produção enzimática

Concomitantemente com a avaliação da degradação pelas bactérias, foi observado a produção de enzimas do grupo fenoloxidasas e as lipases. Observa-se que as bactérias apresentaram atividade enzimática na degradação do óleo MF-380 tanto para o grupo das fenoloxidasas como para Lipase. As linhagens testadas mostraram uma produção de 1.626 à 7.574 U/L de Manganês Peroxidase, 370 à 9.000 U/L de Lacase e 12 à 584 U/L de Lignina Peroxidase. As bactérias produziram também enzimas lipase na faixa entre 29 à 86 U/L (Figura 3).

Figura 3 – Perfil de produção enzimática apresentado pelas bactérias isoladas da água do mar durante a degradação do MF-380.



Neves, F. A. et al (2013), relataram que ao trabalhar com degradação de efluentes industriais utilizando fungos, que são melhores produtores de enzimas do grupo fenoloxidasas, obtiveram produções entre 13 à 550 U/L de Lacase, 0 à 1295 U/L de lignina Peroxidase e 0 à 155 U/L de Manganês Peroxidases. A atividade específica de lipases de bactérias, isoladas de esgoto sanitário, de diversos gêneros, está na faixa de 0,044 a 1,982 U/mg de proteína (KANWAR et al., 2002).

Concluíões

O MF-380 apresentou baixos teores de Nitrogênio e nenhuma fonte de enxofre. Os micro-organismos isolados da água do mar do complexo portuario de Suape-PE mostraram-se capazes de degradar compostos alifáticos do oleo combustivel MF-380 com potencial oxidatívo e lipolítico, e podem assim vir a serem utilizados em processos de recuperação ambiental em areas impactadas por derivados de petróleo. A bactéria *Bacillus sp.* (P11A), mostrou uma melhor degradação da fração alifática do combustivel marinho nas concentrações de 3% e 5%.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi finaciada pela empresa Termope do grupo Neoenergia e pela fundação de fomento CAPES.

Referências

ASANO, R.; NAKAI, Y.; KAWADA, W.; SHIMURA, Y.; INAMOTO, T.; FUKUSHIMA, J. Seawater inundation from the 2011 Tohoku tsunami continues to strongly affect soil bacterial communities 1 year later, *Microbiology Ecology*. V. 66, p. 639–646, 2013.

BACOSA, H. P.; CHIHIRO, I. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. *Journal of Hazardous Materials*. V. 283, p. 689–697, 2015.

COVINO, S.; D'ANNIBALE, A.; STAZI, S. R.; CAJTHAML, T.; ČVANČAROVÁ, M.; STELLA, T.; PETRUCCIOLI, M. Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. *Science of the Total Environment*. V. 505, p. 545–554, 2015.

FARWELL, C., REDDY, C.M., PEACOCK, E., NELSON, R.K., WASHBURN, L., VALENTINE, D.L. Weathering and the fallout plume of heavy oil from strong petroleum seeps near Coal Oil Point, CA. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3542–3548. 2009.

GARRETT, R.M., Biodegradation of Fuel Oil Under Laboratory and Arctic Marine Conditions. *Spill Science & Technology Bulletin*. Vol. 8, No. 3, pp. 297–302, 2003.

HANSON, K. G.; DESAI, D.; DESAI, A. J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**. v7. n10. p. 745-748.

ISAAC, P.; SÁNCHEZ, L. A.; BOURGUIGNON, N.; CABRAL, M. E.; FERRERO, M. A. Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 82. P. 207-214. 2013.

KANWAR, L.; GOSWAMI, P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its applications in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilized lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 31, p. 727–735, 2002.

KANE, R.D.; CAYARD, M.S., Understanding critical factors that influence refinery crude corrosiveness, **Material Performance**., vol. 38, p.48-54, 1999.

KRISTENSEN, A.H., POULSEN, T.G., MORTENSEN, L. AND MOLDRUP, P. Variability of soil potential for biodegradation of petroleum hydrocarbons in a heterogeneous subsurface. **Hazard Mater** 179, 573–580. 2010.

LAREDO, G. C.; LÓPEZ, C. R.; ÁLVAREZ, R. E.; CANO, J. L.; Fuel, **Comprehensive Environmental Mass Spectrometry**, 16, 83-89. 2004.

LIN, G. H. ; SAUER, N. E., CUTRIGHT, T. J. Environmental regulations: A brief overview of their applications to bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p.1-8, 1996.

GRUBER, L. D. A.; FLAVIANA CARDOSO DAMASCENO, F. C.; ELINA BASTOS CARAMÃO, E. B. E JACQUES, R. A. Ácidos naftênicos no petróleo. *Quimica Nova*. Vol. 35, No. 7, 1423-1433, 2012.

MALAJOVICH M. A. *Biotecnologia 2011*. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MOHAJERI, L.; AZIZ, H. A.; ISA, M. H.; ZAHED, M. A. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments, *Bioresource Technology*. V. 101, p. 893–900, 2010.

MOHAMMAD A. Z., HAMIDI, A. A., LEILA, M., SORAYA, M., SHAMSUL, R., MOHAMED, K., MOHAMED, H. I. Application of statistical experimental methodology to

optimize bioremediation of n-alkanes in aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**. V. 184, p, 350–356, 2010.

MORRIS, J.M.; JIN, S.; CRIMI, B.; PRUDEN, A.; Microbial fuel cell in enhancing anaerobic biodegradation of diesel. **Chemical Engineering Journal**. V. 146, p. 161–167, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Oil in the Sea III. Inputs, Fates, and Effects. **National Academies Press**, Washington, DC. 2003.

NEVES, F. A.; LACERDA, M. F. A. R; SANTOS, L. A.; LOPES, F. M.; SANTIAGO, M. F. Application of white rot fungi on simulated industrial effluents for dye removal. **Revista de Biotecnologia e Ciência**. v. 2, p. 40-57, 2013.

PETROBRAS DISTRIBUIDORA. 2012. Disponível em <<http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/home>> acesso em 18 de Outubro de 2012.

PRINCE, R.C., GRAMAIN, A., MCGENITY, T.J. Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis, K.N. (Ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. **Springer-Verlag**. Berlin, Heidelberg. 1672–1692. 2010.

PRINCE, R.C. Eukaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis, K.N. (Ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. **Springer-Verlag**. Berlin. Heidelberg. 2066–2078. 2010.

PRINCE, R.C., BRAGG, J.R. Shoreline bioremediation following the Exxon Valdez oil spill in Alaska. **Bioremediation**. J. 1, 97–104. 1997.

PRINCE, R.C., MCFARLIN K. M., BUTLER, J. D., FEBBO, E. J., WANG, F. C.Y., NEDWED, T. J. The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea. **Chemosphere**. 90: 521-526. 2013.

RAEID, M. M.; A.; SAMIHA, AL-KHARUSI; MANAL, AL-HINAI. Effect of biostimulation, temperature and salinity on respiration activities and bacterial community composition in an oil polluted desert soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 98. P.43-52. 2015.

RAO, K. S.; RASHMI, K.; LATHA, J. N. L.; MOHAN, P. M. Biorremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waster. *Indical Journal of Biotechnology*, v. 3, p. 139-143. 2005.

SANTAELLA, S.T. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger* In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E

AMBIENTAL, CBESA, Campo Grande: **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES**, 2009. CD-ROM.

SEABRA, P. N. Uso da Biorremediação em Áreas Impactadas pela Indústria do Petróleo. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Eds.) Biodegradação. Jaguariúna: EMBRAPA **Meio Ambiente**. 2008. p.41-60.

SILVA, A. C.; OLIVEIRA, F. J. S.; BERNARDES, D. S.; FRANC, F. P. Bioremediation of marine sediments impacted by petroleum, *Applied Biochemical and Biotechnology*. V. 153, p. 58–66, 2009.

SLAVCHEVA, E.; SHONE, B.; TURNBULL, A.; Ácidos naftênicos no petróleo. *Brazilian of Corrosion Journal.*, 34, 125. 1999.

TOMCZYK, N. A.; WINANS, R. E.; SHINN, J. H.; ROBINSON, R. C.; On the Nature and Origin of Acidic Species in Petroleum. 1. Detailed Acid Type Distribution in a California Crude Oil. *Energy Fuels*, 15 (6), pp 1498–1504. 2001.

TRINDADE, P. V. O. “Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo”. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p. 2002.

VIEIRA, P.A.; FARIA, S.R.; VIEIRA, B.; DE FRANCA, F.P.; CARDOSO, V.L. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology, **World Journal Microbiology. Biotechnology**. V. 25, p. 427–438, 2009.

WALTER, M. V.; CRAWFORD, R. L. Overview: Biotransformation and Biodegradation. In: HURST, C.J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology; cap.76, p.707-708, 1997.

4.3 Artigo submetido a revista: **International Biodeterioration & Biodegradation**

Tratamento de Águas Contaminadas pelo Óleo Combustível Marítimo MF-380 por Consórcio Bacteriano.

Melo, E. J. V. ^{a*}; Arruda, F. V. F. ^a; Silva, P. A. ^a; Oliveira, R. L. ^b; Silva, L. A. O. ^a; Gusmão, N. B. ^a; Campos-Takaki, G. M. ^c

^a Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas da UFPE.

^b Centro de apoio multidisciplinar, UFAM.

^c Departamento de Química, Centro de Ciências e Tecnologia da UNICAP

Resumo

Biodegradação é um dos principais processos de atenuação para a maioria dos produtos químicos no meio aquático. Os compostos que são biodegradáveis são degradados em compostos menores por micro-organismos durante o seu crescimento, onde, eles são completamente mineralizados. A biodegradabilidade dos produtos químicos são importantes para a estimativa de parâmetros, tais como a exposição a organismos aquáticos, persistência, toxicidade e bioacumulação. A variedade de compostos poluentes que um sítio pode apresentar implica a presença de uma comunidade degradadora de ampla diversidade catabólica. Assim, a utilização de consórcios microbianos ao invés do uso de culturas puras é mais vantajosa, pois provê essa diversidade metabólica necessária para um tratamento efetivo. O objetivo deste trabalho é avaliar a degradação do MF-380 por consórcios bacterianos. Foram utilizadas sete linhagens de bactérias, que tem comprovadamente a capacidade oxidativa e lipolítica frente ao MF-380. Foi realizado um delineamento experimental utilizando um planejamento de Plackett & Burman-(PB) de 16 ensaios para compor o consórcio. As bactérias foram submetidas ao teste de antibiose em placas de Petri. Foram realizados testes de efeito sinérgico em frascos Erlenmeyer, onde foram avaliadas a degradação do MF-380 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e a atividade enzimática. A degradação do óleo combustível marinho tem efeito positivo quando é utilizado o *Bacillus sp.* (P11A). E segundo o resultado do delineamento experimental o consórcio mais promissor é composto pelas linhagens P11A e P11B1 com degradação de 89% dos compostos alifáticos do óleo combustível marinho. Ainda assim o

melhor consórcio apresentou um atividade de 110,2 U/L de lipase, quando comparado as linhagens separadamente mostrou uma melhora na produção de enzimas.

Palavras-chave: Degradação, Hidrocarbonetos, Bactéria, Planejamento Experimental.

Introdução

Há muitas aplicações de hidrocarbonetos na indústria, com seu principal papel no abastecimento. Devido ao uso generalizado de hidrocarbonetos, derrames e contaminação do solo e das águas subterrâneas tem sido comum há anos. Petróleo podem ser classificados em seis principal grupos definidos operacionalmente de produtos químicos: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos,, componentes não hidrocarbonetos mais polares, resinas e asfaltenos (Head et al., 2006; Ward et al., 2013; Drakou et al, 2015).

A avaliação da capacidade degradadora das culturas em consórcio visa à simulação de uma condição natural de ocorrência dos micro-organismos no meio. No entanto, o uso de um consórcio composto por micro-organismos com requerimentos desconhecidos de substrato pode comprometer os resultados do processo de bioaugmentação (Simon et al., 2004; Hesselsoe et al., 2008; Lebkowska et al, 2011). Em sítios degradados, os poluentes podem ser formados por moléculas complexas ou por uma mistura de compostos que poderão ser metabolizados somente por uma combinação muito específica de micro-organismos (El Fantroussi & Agathos, 2005).

Assim, além de comprovado potencial para degradar determinado composto orgânico poluente, os micro-organismos que fazem parte do consórcio precisam ainda apresentar propriedades metabólicas sinérgicas (Mukred et al., 2008).

Uma degradação com micro-organismos 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, 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.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a degradação da fração alifática do óleo combustível marinho MF-380 por consórcios formados por bactérias isoladas da água do mar do complexo portuário de Suape-PE.

Materiais e métodos

Micro-organismos e Condições de Cultivos

Foram utilizadas sete linhagens de bactérias isoladas de água do mar, que tem comprovadamente a capacidade oxidativa e lipolítica frente ao MF-380 e previamente depositados na coleção de culturas do Departamento de Antibióticos (UFPEDA). A manutenção dos isolados foi feita por repiques sucessivos, a cada três meses, em placa de Petri, contendo o meio Tryptic Soy Agar – TSA (15g de Trypticase, 5g de Peptona, 5g de Cloreto de sódio e 15g de Agar para 1L de água). Após a aclimação com o composto os microrganismos foram mantidos em placas de Petri, com meio Bushnell Haas-BH (1g de KH_2PO_4 , 1g de K_2HPO_4 , 1g de NH_4NO_3 , 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 de FeCl_3 e 0,02 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para 1L de água destilada), acrescido de Agar e 1% da fonte oleosa e a cada três meses foram realizados repiques de manutenção.

Delineamento experimental

Para definição do consorcio e qual a linhagem com mais efeito para degradação do MF-380, foi realizado um delineamento experimental utilizando um planejamento de Plackett & Burman-(PB) de 16 ensaios com três pontos centrais, totalizando 19 ensaios (Rodrigues, 2009). A variável independente foi a concentração dos inóculos (2, 3 e 4 blocos de gelose) das sete bactéria testadas e a variável dependente, foi o percentual de degradação. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica[®] 8,0. Para padronização do inóculo foram utilizados blocos de gelose de 8mm de diâmetro.

Ensaio de Degradação em Consórcio

Os ensaios de degradação foram conduzidos utilizando uma matriz experimental de PB-16 (Tabela 1) em frascos Erlenmeyer (capacidade de 500mL), contendo inóculo bacteriano padronizados utilizando níveis mais baixos e mais altos (-1 e +1), meio mineral de Bushnell Haas Modificado, que utiliza a água do mar ao invés de água destilada e o como fonte de carbono foi utilizado 3% do óleo combustível marinho MF-380, totalizando um volume final de 100mL, os quais foram submetidos à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ em condições estáticas durante 5 dias.

Tabela 1 - Matriz experimental do planejamento de Plackett & Burman (PB-16). Utilizando os inóculos bacterianos padronizados como níveis mais baixos e mais altos (-1 e +1) e três pontos centrais. (Fonte: Rodrigues, 2009).

	P11A	P11B	P11B1	P11B2	P11B3	P11B4	P11B5
Ensaio 1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
Ensaio 2	1	1	-1	-1	-1	1	-1
Ensaio 3	1	1	1	-1	-1	-1	1
Ensaio 4	1	1	1	1	-1	-1	-1
Ensaio 5	-1	1	1	1	1	-1	-1
Ensaio 6	1	-1	1	1	1	1	-1
Ensaio 7	-1	1	-1	1	1	1	1
Ensaio 8	1	-1	1	-1	1	1	1
Ensaio 9	1	1	-1	1	-1	1	1
Ensaio 10	-1	1	1	-1	1	-1	1
Ensaio 11	-1	-1	1	1	-1	1	-1
Ensaio 12	1	-1	-1	1	1	-1	1
Ensaio 13	-1	1	-1	-1	1	1	-1
Ensaio 14	-1	-1	1	-1	-1	1	1
Ensaio 15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
Ensaio 16	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1
Ensaio 17	0	0	0	0	0	0	0
Ensaio 18	0	0	0	0	0	0	0
Ensaio 19	0	0	0	0	0	0	0

O processo de degradação do MF-380, pelos consórcio, foi acompanhado através das determinações da análise cromatográfica em fase gasosa para avaliar a degradação efetiva do óleo pelas bactérias, através do decaimento do pico dos hidrocarbonetos em função da degradação. Além da análise cromatográfica foi realizado o acompanhamento da produção enzimática.

A atividade lipolítica utilizada foi descrita por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificada conforme Krieger (1995). Baseia-se na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica (Sigma) e o Triton X-100 (Sigma). A liberação do p-nitrofenol, de coloração amarela e seguida a 410 nm.

Foram misturados 1 mL da solução de palmitato de p-nitrofenila (Sigma) em isopropanol, em uma concentração de 3 mg.mL^{-1} , com 9 mL da solução de 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,0), lentamente e sob contínua agitação. Desta solução foram colocados 0,9 mL em cubeta, após estabilizada a temperatura a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, foi adicionada a solução de enzima (0,1 mL). A reação foi feita em cubeta de 1,0 mL e a leitura foi feita sempre contra um branco contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 7,0. A solução de enzimas foi obtida através da filtração do material residual proveniente da fermentação do MF-380 durante cinco dias pelas bactérias em condições estáticas a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. A reação foi acompanhada pela leitura da absorbância.

Para o cálculo da atividade foi utilizado a Equação: $A=(C_{\text{ang}}.60.ND)/\epsilon.X_{\text{enz}}$ onde C_{ang} é coeficiente angular obtido da cinética de reação; ND é número de diluições; ϵ é o coeficiente de extinção molar do pNPP a pH 7,0 e X_{enz} é volume (em mL) ou massa da enzima imobilizada (em mg). Sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a liberação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de pNP (p-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de extinção molar do pNPP, em pH 7,0, ($9,78.103 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura.

Avaliação de interações antagônicas entre as bactérias

As bactérias foram submetidas ao teste de antibiose, baseado no método de Bauer et al (1997), para verificar a ocorrência de interações antagônicas entre elas. Para isso, cada micro-organismo foi semeado em placas de Petri com o auxílio de *swabs*, contendo meios apropriados (TSA e BH acrescido de agar com 1% de MF-380). Em seguida, blocos de ágar ($\text{Ø} = 8 \text{ mm}$), contendo cada linhagem de bactéria já crescida a ser testada, foram transferidos para as placas dos micro-organismos teste e dispostos invertidos em posições equidistantes. As placas foram incubadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 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, é tido como inibição.

Avaliação do efeito sinérgico

Para testar se houve efeito sinérgico entre a melhor bactéria, escolhida pelo planejamento experimental de Plackett & Burman, com as demais bactérias. Foram realizados testes em frascos Erlenmeyer (capacidade de 500mL), contendo 2 blocos de ágar ($\varnothing = 8$ mm) de cada bactéria testada como inóculo bacteriano, meio mineral de Bushnell Haas Modificado, que utiliza a água do mar ao invés de água destilada e o como fonte de carbono foi utilizado 3% do óleo combustível marinho MF-380, totalizando um volume final de 100mL, os quais foram submetidos à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 dias. Para controle do experimento foram utilizados frascos com inóculos que continham uma única bactéria. Foram avaliadas a degradação do MF-380 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e a atividade enzimática.

Resultados e Discussão

Degradação do MF-380 por Consórcio Bacteriano

Após o período de incubação no processo de degradação do óleo combustível em frascos, pelos consórcios que pode ser observado na tabela 2, a única variável que se mostrou efeito significativo no processo de degradação do MF-380 e apresentou o efeito positivo, foi a bactéria P11A ($p= 0,000544$). Assim como na análise de variância, que mostrou o mesmo resultado (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeitos padronizados estimados obtido do delineamento experimental de Plackett & Burman.

Fatores	Efeito	Desvio Padrão	n(11)	P
Média	76,70425	0,892751	85,91896	0,000000
P11A	9,37240	1,948353	4,81042	0,000544
P11B	-0,59510	1,948353	-0,30544	0,765734
P11B1	1,19490	1,948353	0,61329	0,552157
P11B2	0,56740	1,948353	0,29122	0,776302
P11B3	-0,74083	2,043870	-0,36246	0,723873
P11B4	0,22490	1,948353	0,11543	0,910185
P11B5	-2,14260	1,948353	-1,09970	0,294948

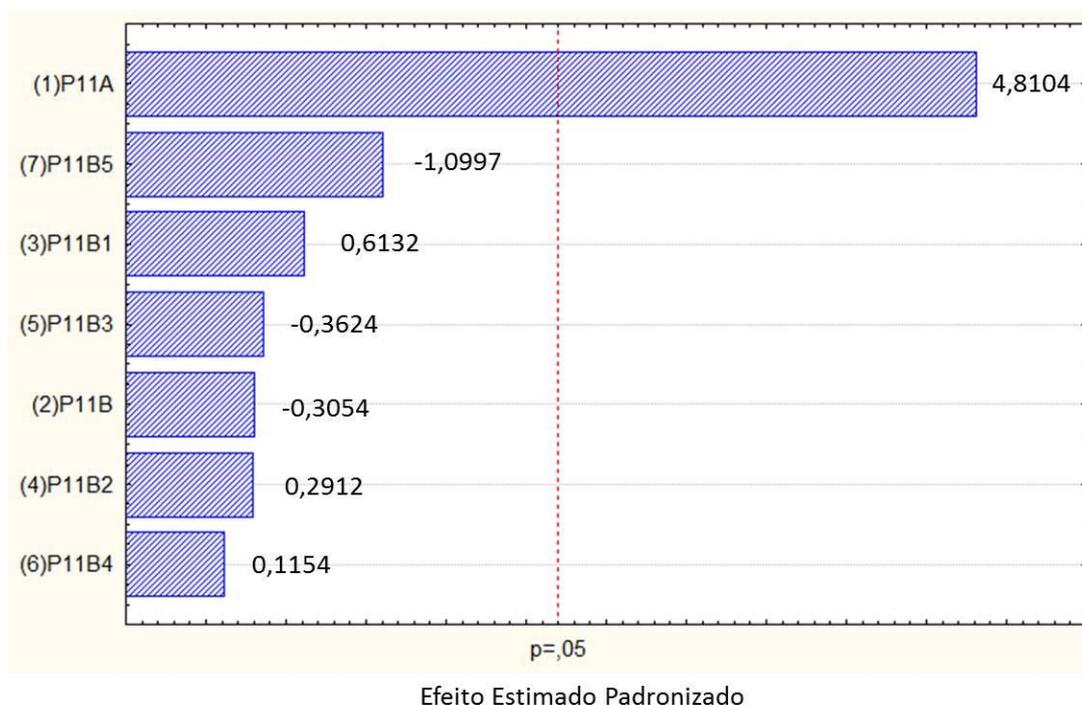
Tabela 3 – Análise de Variância dos ensaios em frasco obtido através do delineamento experimental.

Fatores	Soma de Quadr.	Quadr. Médios	F	P
P11A	345,3256	345,3256	23,14015	0,000544
P11B	1,3922	1,3922	0,09329	0,765734
P11B1	5,6129	5,6129	0,37612	0,552157
P11B2	1,2656	1,2656	0,08481	0,776302
P11B3	1,9606	1,9606	0,13138	0,723873
P11B4	0,1988	0,1988	0,01332	0,910185
P11B5	18,0473	18,0473	1,20934	0,294948

O gráfico de Pareto mostra quais variáveis apresentaram valores significantes de acordo com o efeito, e observou-se que a bactérias P11A apresentou melhores resultados quando comparada as outras linhagens testadas (Figura 1)

Para recuperar e regenerar áreas degradadas, métodos alternativos são necessários para monitorar e de compreender os danos a longo prazo. Há cada vez mais provas de que a presença de consórcio microbiano tende a aumentar o crescimento e sobrevivência de toda a cadeia trófica na área (Santos et al. 2011).

Figura 1 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados das bactéria. Variável dependente: Degradação da fração alifática do MF-380.

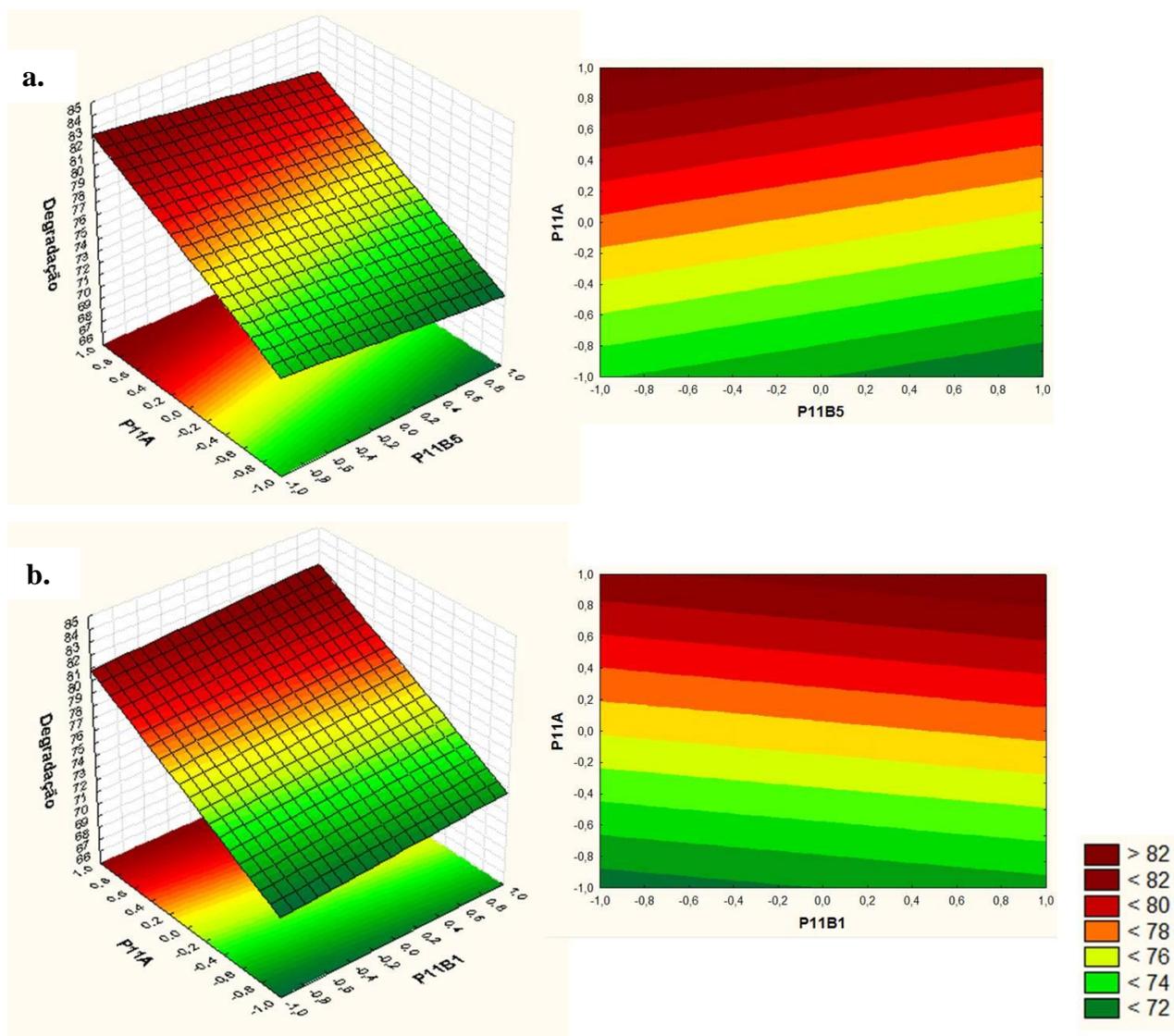


A degradação do óleo combustível marinho tem efeito positivo quando é utilizado o nível maior da variável P11A (Figura 2). Não foi observado também nenhuma interação entre as variáveis independentes testadas. Além disso as bactérias P11B5 e P11B1 mostraram efeitos próximo ao nível de significância desejado, porém a P11B5 apresentou um efeito negativo no processo (Figura 2a). O que significa que ao aumentar o inoculo a degradação do MF-380 diminuiu. Já a bactéria P11B1 apresentou um efeito positivo e quando há aumento do seu inoculo a degradação também aumenta (Figura 2b).

O conhecimento da estrutura da comunidade bacteriana, bem como a sua chave papel no ambiente contaminado com óleo fornece uma primeira vista de potencial metabólico e mecanismos fisiológicos que pode conduzir biodegradação de hidrocarbonetos (Kostka et al., 2011; Simarro et al., 2012).

Em geral, a maioria das micro-organismos em consórcios enriquecidos estudados eram capazes de degradar as misturas de hidrocarbonetos poliaromáticos ou pireno aplicado como o carbono e fonte energia. A capacidade da maioria dos consórcios para degradar fluorene e fenantreno na mistura dos hidrocarbonetos indicou que bactérias degradadoras podem estar presentes em sedimentos marinhos (Bacosa, 2015).

Figura 2 – Gráfico de Superfície da degradação do óleo combustível marinho MF-380 (A bactéria P11A evidenciada como variável significativa). a: Interação entre a bactéria P11A e P11B5; b: Interação entre as bactéria P11A e P11B1.



Interações Antagônicas

De acordo com os testes de antagonismo, nenhuma das sete bactérias testadas apresentaram qualquer halo de inibição entre elas. O que evidencia que não a interações antagonicas entre elas, podendo ser incluídas em um consórcio bacteriano.

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 (Sorokin, 2012; Prasad, 2015).

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; Zhang, 2013).

Efeito Sinérgico

De acordo com os resultados da avaliação do efeito causado por sinergismo entre as bactérias, pode-se observar que alguns consórcios apresentaram degradações melhores que as linhagens quando testadas separadamente.

O consórcio composto pela bactéria P11A e P11B1 mostrou uma degradação de 87% dos compostos alifáticos do MF-380, enquanto que as mesmas linhagens separadamente apresentaram uma degradação de 83% e 72%, respectivamente. Da mesma forma a atividade enzimática da lipase demonstrada pelo consórcio P11A e P11B1 foi de 110,2 U/L, que foi maior do que separadamente onde observa-se 77,26 e 49,62 U/L respectivamente (Tabela 4).

Assim, quando uma situação de contaminação é simulada em laboratório, a utilização de consórcios microbianos ao invés do uso de culturas puras é mais vantajosa, pois provê essa diversidade metabólica necessária para um tratamento efetivo (Tyagi et al., 2011). Essa perspectiva tem sido confirmada pelos bons resultados obtidos em diversos trabalhos, tanto em solo (Jacques et al., 2007) quanto em meio líquido (Cerqueira et al., 2011). O efeito de interações sinérgicas entre os membros da associação contribui para a completa mineralização dos contaminantes, em que determinado grupo de micro-organismos pode remover metabólitos que são tóxicos a outro grupo ou ainda utilizar produtos de degradação como seu substrato (Mukred et al., 2008; Covino et al., 2015).

Tabela 4 – Avaliação do efeito sinérgico dos consórcios bacterianos. Avaliando a degradação dos compostos alifáticos do MF-380 através da cromatografia gasosa e da atividade lipolítica.

	Degradação (%)	Atividade Enzimática (U/L)
P11A	83	77,26 ±3,18
P11B	77	43 ±7,58
P11B1	72	49,62 ±7,66
P11B2	76	6,72 ±1,7
P11B3	74	21,18 ±0,7
P11B4	79	4,5 ±1,22
P11B5	77	9,15 ±2,45
P11A+P11B	65	40,5 ±2,8
P11A+P11B1	89	110,2 ±2,5
P11A+P11B2	80	81,3 ±3,1
P11A+P11B3	63	56,5 ±3,5
P11A+P11B4	82	78 ±4,0
P11A+P11B5	72	74,7 ±3,2

Conclusões

As sete bactérias testadas em consórcio, empregando um planejamento Plackett & Burman, onde a degradação como variável dependente demonstrou que a bactéria *Bacillus sp.* (P11A) apresentou maior potencial biotecnológico para degradação do óleo MF-380. O consórcio, composto pela linhagem P11A e P11B1, mostrou-se melhor degradador da fração alifática do óleo combustível e melhor produtor de enzimas lipases. Portanto, os estudos realizados sugerem que o consórcio formado pelos *Bacillus sp.* (P11A e P11B1) pode ser aplicado nos processos de biorremediação pelo óleo combustível MF-380, possibilitando o interesse pelas indústrias petrolíferas.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela empresa Termope do grupo Neoenergia e pela fundação de fomento CAPES.

Referências

BACOSA, H. P.; CHIHIRO, I. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. **Journal of Hazardous Materials**. V. 283, p. 689–697, 2015.

BAUER, M.J., HERRMANN, R., Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from household wastes. *Science of Total Environment* v. 208, p, 49-57. 1997.

COVINO, S.; D'ANNIBALE, A.; STAZI, S. R.; CAJTHAML, T.; ČVANČAROVÁ, M.; STELLA, T.; PETRUCCIOLI, M. Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. **Science of the Total Environment**. V. 505, p. 545–554, 2015.

DRAKOU, E., KOUTINAS, M., PANTELIDES, I., TSOLAKIDOU, M., VYRIDES, I. Insights into the metabolic basis of the halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain LVD-10 during toluene biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 99, p.85-94, 2015.

FARWELL, C., REDDY, C.M., PEACOCK, E., NELSON, R.K., WASHBURN, L., VALENTINE, D.L. Weathering and the fallout plume of heavy oil from strong petroleum seeps near Coal Oil Point, CA. **Environment Science Technology**. V.43, p. 3542–3548. 2009.

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.

HEAD, I.M., JONES, D.M., RĚOLING, W.F.M., Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature reviews microbiology*. V. 4, p. 173-182. 2006.

KOSTKA, J.E., PRAKASH, O., OVERHOLT, W.A., GREEN, S.J., FREYER, G., CANION, A., DELGARDIO, J., NORTON, N., HAZEN, T.C., HUETEL, M., Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 77, p. 7962-7974. 2011.

KRISTENSEN, A.H., POULSEN, T.G., MORTENSEN, L. AND MOLDRUP, P. Variability of soil potential for biodegradation of petroleum hydrocarbons in a heterogeneous subsurface. **Hazard Mater** 179, 573–580. 2010.

LEBKOWSKA, M., ZBOROWSKA, E., KARWOWSKA, E., MIASKIEWICZ-PESKA, E., MUSZYNSKI, A., TABERNACKA, A., NAUMCZYK, J., JECZALIK, M., Bioremediation

of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: fieldscale processes in Poland. *Ecol. Eng.* 37, 1895–1900. 2011.

MALAJOVICH M. A. *Biotecnologia*. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MOHR, F. C.; LASLEY, B.; BURSIA, 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.

PRASAD, B., SURESH, S., Biodegradation of dimethyl phthalate, diethyl phthalate, dibutyl phthalate and their mixture by *Variovorax* sp. *International Journal Environment Science*. v. 3, p. 283-288. 2012.

PRINCE, R.C., GRAMAIN, A., MCGENITY, T.J. Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. **Springer-Verlag**. Berlin, Heidelberg. 1672–1692. 2010.

PRINCE, R.C., MCFARLIN K. M., BUTLER, J. D., FEBBO, E. J., WANG, F. C.Y., NEDWED, T. J. The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea. **Chemosphere**. 90: 521-526. 2013.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. *Planejamentos de Experimentos e Otimização de Processos*. Ed. 2ª. Campinas, SP: Casa do Espirito Amigo Fraternidade Fé e Amor. 2009.

SANTOS, H.F., CURY, J., CARMO, F.L., SANTOS, A.L., TIEDJE, J., ELSAS, J.D.V., ROSADO, A.S., PEIXOTO, R.S., Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **Plos One** v. 6, p. 16943. 2011.

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.

SIMARRO, R., GONZALEZ, N., BAUTISTA, L., MOLINA, C., SCHIAVI, E., Evaluation of the influence of multiple environmental factors on the biodegradation of dibenzofuran, phenanthrene, and pyrene by a bacterial consortium using a orthogonal experimental design. *Water, Air & Soil Pollution*, v. 223, p. 3437-3444. 2012.

SOROKIN, D.Y., JANSSEN, A.J.H., MUYZER, G., Biodegradation potential of Halo(alkali)philic Prokaryotes. *Reviews Environment Science Technology*. V. 42, p. 811-856. 2012.

WARD, D., ATLAS, R.M., BOEHM, P.D., CALDER, J.A., Microbial biodegradation and chemical evolution of oil from the Amoco Spill. *R.Swed.Acad.Sci.Ambio.* v. 9, p. 277-283. 2013.

ZHANG, L., ZHANG, C., CHENG, Z., YAO, Y., CHEN, J., Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. *Chemosphere.* v. 4, p. 1340-1347. 2013.

5 CONCLUSÃO

- Na caracterização da água do mar coletada foi observada uma faixa levemente básica entre 7,78 e 8,19. A temperatura média dos três pontos foi de 34,36 °C, ficando abaixo da temperatura semestral do local. Também pode ser observada que a oxigenação na amostra do Rio Ipojuca apresentou a menor oxigenação, possivelmente atribuída a eutrofização da água.
- No total foram isoladas 602 bactérias, a qual através do teste qualitativo verificou-se a ocorrência de oxidação biológica de 15,22% das bactérias com 24 horas de incubação.
- Das 91 bactérias testadas quanto ao potencial oxidativo, apenas sete apresentaram atividade lipolítica.
- A maior porcentagem das bactérias foram identificado como pertencentes do gênero *Bacillus* (98%) e apresentaram similaridades quanto a bioquímica e morfologia.
- Na caracterização química elementar do óleo combustível marítimo, O MF-380 apresentou baixos teores de Nitrogênio e nenhuma fonte de enxofre.
- Os micro-organismos isolados da água do mar do complexo portuario de Suape-PE mostraram-se capazes de degradar compostos alifáticos do oleo combustivel MF-380. Onde a bactéria *Bacillus sp.* (P11A), mostrou uma melhor degradação da fração alifática do combustível marinho nas concentrações de 3% e 5%.
- Das sete bactérias testadas em consórcio, a bactéria *Bacillus sp.* (P11A) se destacou com maior efeito no potencial biotecnológico para degradação do óleo MF-380.
- O consórcio, composto pela linhagem P11A e P11B1, mostrou-se melhor degradador da fração alifática do óleo combustível e melhor produtor de enzimas lipases.

Anexo A - Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ) do Óleo Combustível Marítimo MF-380.



Ficha de Informação de Segurança

de
ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF -380
BR0361

Uso como combustível marítimo.

PETROBRAS DISTRIBUIDORA S.A.

Rua Correa Vasques 250

20211-140 – Cidade Nova - Rio de Janeiro (RJ).

0800 78 9001 08000 24 44 33

Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: ÓLEO COMBUSTÍVEL MARÍTIMO MF - 380

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

1 - IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

Nome do produto

Código interno de identificação

Principais usos recomendados para a substância ou mistura:

Nome da empresa

Endereço

Telefone

Telefone para emergências

2 - IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

Classificação de perigo do produto:

Líquidos inflamáveis – Categoria 3

Corrosão/irritação à pele – Categoria 2

Lesões oculares graves/irritação ocular – Categoria

2B Carcinogenicidade – Categoria 2

Toxicidade para órgãos-alvo específicos – Exposição única –

Categoria 3

Perigo por aspiração – Categoria 2

- Sistema de classificação utilizado:

Norma ABNT-NBR 14725-2:2009 – versão corrigida 2:20 10.
Sistema Globalmente Harmonizado para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, ONU.

Outros perigos que não resultam em uma classificação:

O aquecimento ou queima do produto pode liberar hidrocarbonetos poliaromáticos, na forma de particulados ou vapores, e gases irritantes e tóxicos.

ELEMENTOS APROPRIADOS DA ROTULAGEM

- Pictogramas



- Palavra de advertência

PERIGO

- Frases de perigo:

Líquido e vapores altamente inflamáveis.
Provoca irritação à pele.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 2 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

- Provoca irritação ocular grave.
Suspeito de provocar câncer.
Pode provocar irritação respiratória.
Pode provocar sonolência e vertigem.
Pode ser fatal se ingerido e penetrar nas vias respiratórias.
- Frases de precaução:**
- Mantenha afastado de calor, faíscas, chama aberta e superfícies quentes. Não fume.
Use luvas de proteção, roupa de proteção, proteção ocular e proteção facial.
Lave cuidadosamente as mãos e o rosto após o manuseio.
Evite inalar vapores ou névoas.
Utilize apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.
EM CASO DE INGESTÃO: Contate imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ou um médico.

3 - COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÕES SOBRE OS INGREDIENTES

>>>MISTURA

Nome químico comum ou nome

técnico:

Hidrocarbonetos.

Natureza química:

Mistura de substâncias de petróleo

Ingredientes que contribuam para o perigo:

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



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 3 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

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.
Sintomas e efeitos mais importantes, agudos ou tardios:	Vermelhidão e dor na pele. Tosse, dor de garganta e falta de ar. Tontura, náusea, dor de cabeça, confusão mental, perda da consciência.
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 hidroeletrolíticos, metabólicos, além de assistência respiratória. Em caso de contato com a pele e/ou com os olhos não fricione as partes atingidas.

5 - MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO

Meios de extinção:	Apropriados: Compatível com espuma para hidrocarbonetos, neblina d'água, pó químico e dióxido de carbono (CO ₂). Não recomendados: Água diretamente sobre o líquido em chamas.
Perigos específicos da mistura ou substância:	Os vapores são mais densos que o ar e tendem a se acumular em áreas baixas ou confinadas, como bueiros, porões, etc. Podem deslocar-se por grandes distâncias provocando retrocesso da chama ou novos focos de incêndio tanto em ambientes abertos como confinados. Os contêineres podem explodir se aquecidos. Quando aquecido pode liberar sulfeto de hidrogênio.
Medidas de proteção da equipe de	Equipamento de proteção respiratória do tipo autônomo (SCBA) com pressão positiva e vestuário protetor completo. Contêineres



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 4 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

combate a incêndio e tanques envolvidos no incêndio devem ser resfriados com neblina d'água.

6 - MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO

Precauções pessoais

Para o pessoal que não faz parte dos serviços de emergência: Produto inflamável. Remova todas as fontes de ignição. Impeça faíscas ou chamas. Não fume. Não toque nos recipientes danificados ou no material derramado sem o uso de vestimentas adequadas. Evite inalação e contato com os olhos e com a pele. Utilize equipamento de proteção individual conforme descrito na seção 8

Para pessoal de serviço de emergência: Utilizar EPI completo, com luvas de proteção de PVC, calçado de segurança e vestimenta de segurança para proteção de todo o corpo contra respingos de produtos químicos. O material utilizado deve ser impermeável. Em caso de grandes vazamentos, onde a exposição é grande, recomenda-se o uso de máscara de proteção com filtro contra vapores ou névoas.

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

Métodos e materiais para contenção e limpeza: Colete o produto derramado e coloque em recipiente de emergência, devidamente etiquetado e bem fechado. 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. A água de diluição proveniente do combate ao fogo pode causar poluição. Não descarte diretamente no meio ambiente ou na rede de esgoto.

Diferenças na ação de grandes e pequenos vazamentos: Não há distinção entre as ações de grandes e pequenos vazamentos para este produto.

7 - MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

MEDIDAS TÉCNICAS APROPRIADAS PARA O MANUSEIO

Precauções para manuseio seguro: Manuseie em uma área ventilada ou com sistema geral de ventilação/exaustão local. Evite formação de vapores ou névoas. Evite exposição ao produto. Evite contato com materiais incompatíveis. Utilize equipamento de proteção individual conforme descrito na seção 8.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 5 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

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.

Condições para armazenamento seguro, incluindo qual quer incompatibilidade

Prevenção de incêndio e explosão:

Mantenha afastado do calor, faísca, chama aberta e superfícies quentes. — Não fume. Mantenha o recipiente hermeticamente fechado. Aterre o vaso contedor e o receptor do produto durante transferências. Utilize apenas ferramentas anti-faísca. Evite o acúmulo de cargas eletrostáticas. Utilize equipamento elétrico, de ventilação e de iluminação à prova de explosão.

Condições adequadas:

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. Especificações de engenharia devem atender regulamentações locais.

MATERIAIS PARA EMBALAGENS:

Não especificado.

8 - CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Parâmetros de controle:

- Limites de exposição ocupacional :

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

Não Estabelecidos.

Indicadores biológicos:

Medidas de controle de engenharia:

Promova ventilação mecânica e sistema de exaustão direta para o meio exterior. Estas medidas auxiliam na redução da exposição ao produto. Manter as concentrações atmosféricas, dos constituintes do produto, abaixo dos limites de exposição ocupacional indicados.

Medidas de proteção pessoal

- Proteção dos olhos:

Óculos de proteção ou protetor facial contra respingos.

- Proteção da pele e corpo:

Luvas de proteção de PVC. Vestimenta protetora adequada.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 6 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

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.

Perigos térmicos:

Não apresenta perigos térmicos.

9 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Aspecto (estado físico, forma e cor):

Líquido viscoso escuro.

Odor e limite de odor:

Característico de hidrocarbonetos.

pH:

Não aplicável

Ponto de fusão/ponto de congelamento:

Informação referente ao:

- Óleo combustível A1: < 30°C

- Óleo diesel marítimo: -40° a 6°C

Ponto de ebulição inicial e faixa de temperatura de ebulição:

Informação referente ao:

- Óleo combustível A1: 121 – 600°C

- Óleo diesel marítimo: 150 – 471°C

Ponto de fulgor:

60°C (Método: vaso fechado).

Taxa de evaporação:

Muito lenta.

Inflamabilidade (sólido, gás)::

Não aplicável

Limite inferior/superior de inflamabilidade ou explosividade:

Informação referente ao:

- Óleo combustível A1:

Superior: 6%

Inferior: 1%

Pressão de vapor:

Informação referente ao:

- Óleo combustível A1 :

0,02 – 0,791 kPa a 120°C

0,063 – 0,861 kPa a 150°C

- Óleo diesel marítimo:



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 7 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

	0,4 kPa a 40°C
Densidade de vapor:	Não disponível
Densidade relativa:	Não disponível
Solubilidade:	Insolúvel em água.
Coefficiente de partição – n-octanol/água:	Informação referente ao: - <u>Óleo combustível A1</u> : Log kow: 3,9 – 6,0 (valor estimado) - <u>Óleo diesel marítimo</u> : Log kow 7,22 (valor estimado)
Temperatura de auto-ignição:	Informação referente ao: - <u>Óleo combustível A1</u> : 250 – 537°C - <u>Óleo diesel marítimo</u> : ≥ 225°C
Temperatura de decomposição:	Não disponível.
Viscosidade:	380 Cst @ 50 °C, Método: MB 293
Outras informações:	Densidade: 0,991 máx. Parte volátil: Desprezível.

10- ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Estabilidade e reatividade:	Estável sob condições usuais de manuseio e armazenamento. Não sofre polimerização.
Possibilidade de reações perigosas:	Risco de incêndio em caso de aquecimento.
Condições a serem evitadas	Temperaturas elevadas. Fontes de ignição e contato com materiais incompatíveis.
Materiais incompatíveis:	Agentes oxidantes fortes e oxigênio concentrado.
Produtos perigosos da decomposição:	O aquecimento ou queima do produto pode liberar hidrocarbonetos poliaromáticos, na forma de vapores. Quando aquecido pode liberar sulfeto de hidrogênio.

11 - INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 8 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

Toxicidade aguda:	<p>Não é esperado que o produto apresente toxicidade aguda.</p> <p>Informação referente ao:</p> <ul style="list-style-type: none">- Óleo combustível tipo 1A: DL50 (oral, ratos): > 5000 mg/kg DL50 (dérmica, coelhos): > 3000 mg/kg
Corrosão/irritação à pele:	<p>Causa irritação à pele com vermelhidão e dor no local atingido.</p>
Lesões oculares graves/ irritação ocular:	<p>Pode causar irritação aos olhos com vermelhidão.</p>
Sensibilização respiratória ou à pele:	<p>Não é esperado que o produto provoque sensibilização respiratória ou à pele.</p>
Mutagenicidade em células germinativas:	<p>Não é esperado que o produto apresente mutagenicidade em células germinativas.</p>
Carcinogenicidade:	<p>Pode provocar câncer.</p>
Toxicidade à reprodução:	<p>Informações referentes ao:</p> <ul style="list-style-type: none">- Óleo combustível tipo 1A: Possível carcinógeno humano (Grupo 2B - IARC).- Óleo combustível marítimo: Suspeito carcinógeno humano.
Toxicidade para órgãos-alvo específicos – exposição única:	<p>Não é esperado que o produto apresente toxicidade à reprodução.</p>
Toxicidade para órgãos-alvo específicos – exposição repetida:	<p>O produto pode causar irritação das vias aéreas superiores se inalado causando tosse, dor de garganta e falta de ar. Como depressor do sistema nervoso central, pode causar efeitos narcóticos como dor de cabeça, tontura e sonolência. Pode causar confusão mental e perda da consciência na exposição a altas concentrações.</p>
Perigo por aspiração:	<p>Pode causar dermatite após contato repetido e prolongado com a pele.</p>



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 9 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

12 - INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Efeitos ambientais, comportamentos e impactos do produto

Não é esperado que o produto apresente ecotoxicidade e.

E esperada baixa degradação e alta persistência.

Ecotoxicidade:

E esperado potencial de bioacumulação em organismos

Persistência e degradabilidade:

aquáticos.

Potencial bioacumulativo:

Informação referente ao: -
Óleo combustível tipo 1A:

Log kow: 3,9 – 6,0 (dado estimado).

- Óleo combustível marítimo:
Log kow 7,22 (dado estimado).

Não determinada.

Mobilidade no solo:

Em caso de grandes derramamentos o produto pode ser perigoso para o meio ambiente devido à possível formação de uma película do produto na superfície da água diminuindo os níveis de oxigênio dissolvido.

Outros efeitos adversos:

13 - CONSIDERAÇÕES SOBRE

TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

Deve ser eliminado como resíduo perigoso de acordo com a avaliados especificamente para cada produto. Devem ser consultadas legislações federais, estaduais e municipais, dentre estas: Lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010 (Política Nacional de Resíduos Sólidos).

Métodos recomendados para

tratamento e disposição aplicados:

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.

- Produto:

**- Restos de produtos:
Embalagem usada:**

Nunca reutilize embalagens vazias, pois elas podem conter restos do produto e devem ser mantidas fechadas e



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 10 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

encaminhadas para serem destruídas em local apropriado. Neste caso, recomenda-se envio para rotas de recuperação dos tambores ou incineração.

14- INFORMAÇÕES SOBRE O TRANSPORTE

Regulamentações nacionais e internacionais

Terrestre Resolução nº 420 de 12 de Fevereiro de 2004 da Agência Nacional de Transportes Terrestres (ANTT), Aprova as Instruções Complementares ao Regulamento do Transporte Terrestre de Produtos Perigosos e suas modificações .

Nº ONU: 1268

Nome apropriado para o embarque: DESTILADOS DE PETRÓLEO, N.E.

Classe de risco/ subclasse de risco principal: 3

Classe de risco/ subclasse de risco subsidiário: NA

Número de risco 30

Grupo de embalagem: II

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).
1268

Número ONU

Nome apropriado para embarque: PETROLEUM DISTILLATES, N.O.S.

Classe de risco/ subclasse de risco principal: 3

Classe de risco/ subclasse de risco subsidiário: NA



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 11 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361

Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

Grupo de embalagem:	II
EmS:	F-E, S-E O produto não é considerado poluente marinho.
Perigo ao meio ambiente: Aéreo	ANAC - Agência Nacional de Aviação Civil – Resolução nº129 de 8 de dezembro de 2009. RBAC Nº175 – (REGULAMENTO BRASILEIRO DA AVIAÇÃO CIVIL) - TRANSPORTE DE ARTIGOS PERIGOSOS EM AERONAVES CIVIS. IS Nº 175-001 – INSTRUÇÃO SUPLEMENTAR - IS ICAO – —International Civil Aviation Organization (Organização da Aviação Civil Internacional) – Doc 9284-NA/905 IATA - —International Air Transport Association (Associação Internacional de Transporte Aéreo) Dangerous Goods Regulation (DGR).
Número ONU:	1268
Nome apropriado para embarque:	PETROLEUM DISTILLATES, N.O.S.
Classe de risco/ subclasse de risco principal:	3
Classe de risco/ subclasse de risco subsidiário:	NA
Grupo de embalagem:	II

15- REGULAMENTAÇÕES

Regulamentações:	Decreto Federal nº 2.657, de 3 de julho de 1998 Norma ABNT-NBR 14725:2012. Lei nº12.305, de 02 de agosto de 2010 (Política Nacional de Resíduos Sólidos). Decreto nº 7.404, de 23 de dezembro de 2010. Portaria nº 229, de 24 de maio de 2011 – Altera a Norma Regulamentadora nº 26.
-------------------------	---

16 - OUTRAS INFORMAÇÕES



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 12 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

Esta FISPQ foi elaborada com base nos atuais conhecimentos sobre o manuseio apropriado do produto sob as condições normais de uso, de acordo com a aplicação especificada na embalagem. Qualquer outra forma de utilização do produto que envolva a sua combinação com outros materiais, além de formas de uso diversas daquelas indicadas, são de responsabilidade do usuário.

Adverte-se que o manuseio de qualquer substância química requer o conhecimento prévio de seu perigos pelo usuário. No local de trabalho cabe à empresa usuária do produto promover o treinamento de seus empregados e contratados quanto aos possíveis riscos advindos da exposição ao produto químico.

Siglas:

ACGIH - *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*

BCF - *Bioconcentration Factor*

CAS - *Chemical Abstracts Service*

CL₅₀ - *Concentração letal 50%*

LEI - *Limite de explosividade inferior*

LES - *Limite de explosividade superior*

NIOSH - *National Institute for Occupational Safety and Health*

OSHA - *Occupational Safety & Health Administration*

PEL - *Permissible Exposure Limit*

REL - *Recommended Exposure Limit*

TLV - *Threshold Limit Value*

TWA - *Time Weighted Average*

Bibliografia:

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

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

[IPCS] INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - INCHEM. Disponível em: <http://www.inchem.org/>. Acesso em: outubro 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.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

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

Página 13 de 13

Data: 04/09/2014

Nº FISPQ: BR0361 Versão: 3

Anula e substitui versão: todas anteriores

Acesso em: outubro de 2010.

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

[PETROLEUM HPV] PETROLEUM HIGH PRODUCTION VOLUME. Disponível em: <http://www.petroleumhvp.org/pages/petroleumsubstances.html>. Acesso em: outubro, 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 RIS COS DE EXPOSIÇÃO QUÍMICA. Disponível em: <http://www.intertox.com.br>. Acesso em: outubro de 2010.

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