

Avaliação do potencial de biorremediação de diesel S10 e de espuma para controle de incêndio (AFFF) por bactérias heterotróficas isoladas de sedimentos do Estuário de Santos - SP

Roberta Alves Merguizo Chinellato

São Vicente - SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

Avaliação do potencial de biorremediação de diesel S10 e de espuma para controle de incêndio (AFFF) por bactérias heterotróficas isoladas de sedimentos do Estuário de Santos - SP

Roberta Alves Merguizo Chinellato

Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira

Programa de Biodiversidade de Ambientes Costeiros IB-CLP

Dejanira de Franceschi de Angelis

Programa de IB-RC

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

São Vicente - SP
2023

C539a

Chinellato, Roberta Alves Merguizo

Avaliação do potencial de biorremediação de diesel S10 e de espuma para controle de incêndio (AFFF) por bactérias heterotróficas isoladas de sedimentos do Estuário de Santos - SP / Roberta Alves Merguizo Chinellato.

-- São Vicente, 2023

153 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientadora: Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira

Coorientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Biodegradação. 2. Bacillus subtilis. 3. Bacillus licheniformis. 4. BTEX. I.

Título

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho ao meu marido, filho
e amigos que sempre me apoiaram.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de forma direta ou indireta foram presentes e/ou contribuíram de alguma maneira para realização desta tese. Este trabalho foi realizado com importantes contribuições, por pessoas que foram surgindo no seu decorrer e se fizeram presentes. Obrigada por suas contribuições e ensinamentos.

Primeiramente gostaria de agradecer à “família” MICROMAR, sempre fui acolhida e amparada profissionalmente e pessoalmente por este grupo de pesquisa maravilhoso. Vanessa, Bruna, Raphaela, Aline, Mirella, Matheus, Augusto (todos aqueles que passaram pelo laboratório). Nesses 10 anos de MICROMAR, tivemos muitas coletas, muito trabalho de laboratório, congressos, risadas e conversas. Fazer ciência no Brasil não é nada fácil, mas vocês fizeram o peso dos percalços serem superados e mais leve. Tenho a amizade de todos como algo muito precioso e que irei carregar pra vida.

À Profa. Dra. Ana Julia Fernandes, tenho MUITO a agradecer! Me recebeu neste grupo de pesquisa incrível, sob sua orientação e incentivo, fiz Pós de Lato Sensu, Mestrado e agora me tornando Doutora. Nossa relação passou de orientada-orientadora, para amigas, você esteve presente nos principais momentos da minha vida, me ouviu, me incentivou e ficou feliz em todos momentos por mim. Ser conhecida como “as meninas da Ana Julia” me enche de orgulho, pois sei que isso representa ser competente, determinada, forte. Obrigada AJ, por toda oportunidade, conhecimento, conselho e por essa orientadora-amiga.

Gostaria de agradecer a Profa. Dra Dejanira de Franceschi de Angelis do departamento de Microbiologia Aplicada - Rio Claro, por ser minha coorientadora e me acolher em no laboratório de Microbiologia Industrial - RC, a realização deste trabalho só pode ser concretizada com seu conhecimento e auxílio. A Dilza obrigada pelas conversas e sugestões no projeto. Meu muito obrigada ao técnico Marcio, por me passar seu conhecimento técnico nos experimentos, ao técnico Adriano e Zito pelo empréstimo de equipamentos e materiais.

Gostaria de agradecer a Tatiane, Lorena e Boriquinho por me abrigarem durante meus experimentos em Rio Claro, pela companhia, parceria pra tomar café, ir a feirinha de Rio Claro ou na noite das meninas de muitas risadas, obrigada pela amizade de vocês, saudades demais de nós juntas.

À Dra. Elis Marina Turini, muito obrigada por seu conhecimento, auxílio e paciência nos experimentos com o CG/MS no departamento de Microbiologia Aplicada da Unesp -RC, a realização destes experimentos foram cruciais para a complementação desta tese. Ao Dr. Renato Montagnolli obrigada pelo esclarecimento de dúvidas sobre o projeto.

Ao Prof. Dr. Rubens Figueira e a Dra. Keila, pela parceria com o grupo LaQIMAR (IO-USP), obrigada por me auxiliar nos experimentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao pessoal da pós-graduação de São Vicente, meu muito obrigada, especialmente aos amigos que fiz e certamente carregarei pra vida, Mayana, Bruno, Caio, Karla, Guacira, Fernanda, Carol, Gabi, Andressa, obrigada pela companhia durante as disciplinas, na organização dos eventos e no dia-dia de perrengues na UNESP-CLP.

Aos funcionários da Unesp -CLP, por todo auxílio para a realização deste trabalho.

À Jessica Fey dizer muito obrigada parece pouco por toda sua participação em minha vida. Por ser presente em minha vida acadêmica, dando conselhos, sugestões, obrigada. Por estar presente em minha vida pessoal, nos cafés, nos desabafos, no auxílio com a maternidade, com o Caio. Amizade que a pós da UNESP-CLP me trouxe, obrigada por toda sua parceria.

À minha amiga Iara Chalela, por sempre ter acredita em mim, na minha capacidade, no meu profissionalismo. Por ter me incentivado mesmo nos momentos mais difíceis. Por seu meu suporte emocional.

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu marido, Erik. Obrigada por ser meu companheiro, por acreditar na minha capacidade em dar conta do doutorado. Mesmo não sendo da área acadêmica, sempre soube da importância da pesquisa em minha vida. Obrigada por me incentivar e apoiar, principalmente quando fui fazer experimentos em Rio Claro por meses, nas idas para congressos, em abrigar o pessoal da pós em nossa casa, para coletas, congressos e disciplinas. Obrigada por ter me tranquilizado, apoiado e me dedicado seu amor, quando tive medo e insegurança se daria conta de terminar o doutorado, ao descobrir da chegada do Caio.

Ao meu filho Caio, gostaria de deixar aqui registrado que o caminho do conhecimento, nem sempre é respeitado ou valorizado, mas que o conhecimento/educação é libertador! Antes mesmo de você chegar a este mundo, você já fazia parte de congressos, de experimentos e de organização de eventos, espero que todo esse esforço e dedicação sirvam de exemplo pra você! A você meu filho, gostaria de agradecer por me tornar uma pessoa melhor a cada dia, por você. Mas também gostaria de me desculpar, por algumas ausências por trabalho, hoje tão pequenininho

sei que não compreende, mas espero que isso seja motivo de orgulho para você futuramente.
Te Amo muito meu filho!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“A natureza não faz nada em vão.”

Aristóteles

RESUMO

A utilização de petróleo como principal recurso energético é um dos fatores que contribuem para o aumento de acidentes com produtos petroquímicos, incluindo incêndios de grandes proporções, causando graves danos ambientais. A dificuldade no combate a incêndios envolvendo hidrocarbonetos com compostos comuns levou ao uso de espumas especiais para o controle de incêndio, as AFFF (*Aqueous Film-Forming Foam*), sendo entretanto, também prejudiciais ao ambiente e seus organismos. A biorremediação emerge como um processo simples e de baixo custo quando comparado a outras alternativas, além de ser menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de cepas ambientais das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* em biodegradar diesel S10 e substâncias presentes na espuma para combate a incêndios (AFFF), em sedimento de áreas costeiras. A avaliação de biodegradação dos contaminantes, foi realizada por meio de teste com 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP), respirometria de Bartha e Pramer e da análise química do contaminante por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS). Os resultados obtidos mostraram a capacidade das cepas bacterianas em biodegradar substâncias presentes no diesel e na AFFF, tanto de forma isolada quanto em consórcio bacteriano. A concentração de carbonos (C) biodegradados (μmol) de AFFF (6%) com o consórcio foi de $7,32\text{E}\pm 03$, enquanto que, para o diesel S10 (2,5%) a concentração de C biodegradados (μmol) foi de $1,55\text{E}\pm 04$. Após a biodegradação de Bartha e Pramer, os resultados apresentam uma degradação de até 6x da concentração inicial, a análise de CG/MS apresentou mudanças no perfil cromatográfico do diesel, demonstrando uma degradação dos compostos, principalmente do perfil cromatográficos dos BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e O-Xileno), na [2,5%] nota-se que o benzeno foi totalmente degradado. Os resultados destacaram a importância da utilização de cepas ambientais na biorremediação, propiciando a diminuição do período adaptativo e uma rápida ação de biorremediação dos ambientes contaminados. O presente trabalho demonstrou que as cepas selecionadas são eficientes em remediar a contaminação por estes tipos de compostos, tendo grande potencial para estudos futuros que permitam sua utilização em outros compostos comerciais.

Palavras chaves: Biodegradação, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, BTEX.

ABSTRACT

The use of oil as the main energy resource is one of the factors that contribute to the increase of accidents with petrochemical products, including large fires, causing serious environmental damage. The difficulty in fighting fires involving hydrocarbons with common compounds led to the use of special foams for fire control, the AFFF (Aqueous Film-Forming Foam), being, however, also harmful to the environment and its organisms. Bioremediation emerges as a simple and low cost process when compared to other alternatives, besides being less aggressive and the most appropriate for maintaining ecological balance. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of environmental strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* species in biodegrade diesel S10 and substances present in foam for fire fighting (AFFF), in sediment of coastal areas. The biodegradation of contaminants was evaluated by means of a 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP), Bartha and Pramer respirometry and chemical analysis of the contaminant by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC/MS). The results showed the ability of bacterial strains to biodegrade substances present in diesel and AFFF, both in isolation and in bacterial intercropping. The concentration of biodegraded carbons (C) (μmol) of AFFF (6%) with the intercropping was 7.32×10^3 , while for diesel S10 (2.5%) the concentration of biodegraded C (μmol) was 1.55×10^4 . After the biodegradation of Bartha and Pramer, the results show a degradation of up to 6x of the initial concentration, the GC/MS analysis showed changes in the chromatographic profile of diesel, demonstrating a degradation of the compounds, mainly the chromatographic profile of BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene and O-Xylene), in the [2.5%] it is noted that benzene was totally degraded. The results highlighted the importance of the use of environmental strains in bioremediation, providing a reduction in the adaptive period and a quick action of bioremediation of contaminated environments. The present work demonstrated that the selected strains are efficient in remedying contamination by these types of compounds, having great potential for future studies that could allow their use in other commercial compounds

Keywords: Biodegradation, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, BTEX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:Fonte: ANP/SIGEP – Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural no Brasil 12-2021.....	25
Figura 2: Imagem de satélite da região afetada pelo derramamento de petróleo pela plataforma Deepwater Horizon.	26
Figura 3:Incêndio no terminal da ULTRACARGO – Santos 2015. Fonte: Google - Foto: Delamonica/Futura Press.	27
Figura 4: Utilização de AFFF para apagar o incêndio do terminal da ULTRACARGO – Santos 2015. Fonte: Google - Foto: Diego Lameiro/ Corpo de Bombeiros.	27
Figura 5:Praia de Lagoa do Pau, município de Coruripe, em Alagoas, foi uma das atingidas pelo petróleo vindo do mar- Carlos Ezequiel Vannoni / Agência Pixel Press / Folhapress - Revista Fapesp Edição 286, dezembro 2019.	28
Figura 6: Coleta de óleo nas praias da costa do Brasil no acidente de 2019. Valores em toneladas por região. Fonte: IBAMA.....	29
Figura 7: Classes de hidrocarbonetos encontrados no petróleo.....	30
Figura 8: Estruturas químicas do BTEX. Fonte: Adaptado de EL -NAAS et al. (2014). ...	32
Figura 9:Estrutura química de PFOS e PFOA. Fonte OECD, 2007.....	34
Figura 10: Esquema de Funcionamento da espuma (AFFF) na extinção de incêndio. Fonte: Técnica Segurança em Risco.	34
Figura 11: Fluxograma das etapas que compuseram a realização e execução do trabalho..	43
Figura 12: Curva típica de crescimento bacteriano em cultura estanque, adaptado ALTERTHUM, 2008.	45
Figura 13: Localização dos pontos de coleta das amostras microbiológicas das de sedimento das quais foram isoladas as espécies <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> , na região Portuária de Santos após o incêndio no Terminal da ULTRACARGO (ponto 4) em abril de 2015.....	48
Figura 14: Microcosmos com sedimentos a partir dos quais foram obtidas as cepas bacterianas.....	49
Figura 15: Fluxograma do experimento para obtenção de curva de crescimento. Adaptado de ASSIS et al. (2011) pelo autor.	51
Figura 16: Frasco de Erlenmeyer com <i>Bacillus subtilis</i> , após incubados em uma plataforma agitadora sob agitação contínua de 180 rpm, a 35°C, overnight (18h), para reativação..	53
Figura 17: (A) colônia de <i>Bacillus subtilis</i> e (B) coloração de Gram de <i>Bacillus subtilis</i> ..	54
Figura 18: (A) colônia de <i>Bacillus licheniformis</i> e (B) coloração de Gram de <i>Bacillus licheniformis</i>	54
Figura 19: Curva de crescimento para <i>Bacillus subtilis</i> . UFC: Unidade Formadora de Colônia (Densidade bacteriana); DO: Densidade Ótica.	55
Figura 20: Curva de crescimento de <i>Bacillus licheniformis</i> . UFC: Unidade Formadora de Colônia (Densidade bacteriana); DO: Densidade Ótica.	57

Figura 21: Comparação entre as curvas de crescimento por Densidade ótica de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i>	58
Figura 22: Reação do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol com aceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre nitrogênio e carbono no centro da molécula é o aceptor de elétrons, tornando-se uma ligação simples, modificando a estrutura da molécula (BIODOIA et. al., 2010).	61
Figura 23: Embalagem da espuma de controle de incêndio – AFFF (LGE Kidde Sintex AFF/ARC 3% e 6% fornecido pela empresa Kidde Brasil Ltda).	63
Figura 24: Espectrofotômetro Bel spectrophotometer sp 2000 UV/Vis, utilizado para as leituras do ensaio de colorimetria.	65
Figura 25: Mapa do Brasil, mostrando, em azul o Estado de São Paulo e a localização do município de Bertioga - SP.	67
Figura 26: Imagem mostrando a área do ponto de coleta (A) de sedimento no estuário de Itaguapé município de Bertioga –SP.	67
Figura 27: Esquema representativo da montagem utilizada para realizar os experimentos de respirometria.	72
Figura 28: Curva de calibração de CO ₂ em função da condutividade em solução 0,2M de KOH. Fonte: Uemura et al. (2013).	72
Figura 29: Sistema de renovação do ar através da utilização de um compressor de ar e um filtro de cal sodada (Vetec PA).	73
Figura 30: Garrafa de respirometria de Bartha, montada com 50 gramas de Sedimento + Contaminante + 10% de Inóculo.....	74
Figura 31: Composição do teste de biodegradação – Respirometria de Bartha para a espuma de controle de incêndio – AFFF.....	75
Figura 32: Composição do teste de biodegradação – Respirometria de Bartha para diesel S10. Elaborado pelo autor.	76
Figura 33: Composição do teste de biodegradação – Respirometria de Bartha para os controles.	77
Figura 34: Teste de capacidade de biodegradação das cepas em meio com DCPIP e glicose.	79
Figura 35: Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com glicose como fonte de carbono, por 24 horas.	79
Figura 36: Resultado do teste de capacidade de biodegradação de <i>B. subtilis</i> utilizando AFFF ou diesel S10 como fonte de carbono.	80
Figura 37: Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com a cepa <i>Bacillus subtilis</i> e os contaminantes após 48 horas.....	81
Figura 38: Resultado do teste de capacidade de biodegradação de <i>B. licheniformis</i> utilizando AFFF ou diesel S10 como fonte de carbono.....	82
Figura 39: Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com a cepa <i>Bacillus licheniformis</i> e os contaminantes após 48 horas.	83
Figura 40: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com [AFFF 1,5%] como contaminante, durante 120 dias.	88

Figura 41: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com [AFFF 3%](concentração comercial) como contaminante, durante 120 dias.....	89
Figura 42: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com [AFFF 4,5%] como contaminante, durante 120 dias.....	90
Figura 43: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com [AFFF 6%](concentração comercial) como contaminante, durante 120 dias.....	91
Figura 44: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa <i>B. subtilis</i> com AFFF nas concentrações 1,5%, 3% 4,5% e 6% como contaminante , durante 120 dias.	92
Figura 45: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa <i>B. licheniformis</i> com AFFF nas concentrações 1,5%, 3% 4,5% e 6% como contaminante, durante 120 dias.....	92
Figura 46: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com consórcio das cepas <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> com AFFF nas concentrações 1,5%, 3% 4,5% e 6% como contaminante , durante 120 dias.	93
Figura 47: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com Diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante, durante 120 dias.	94
Figura 48: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa <i>B. subtilis</i> com Diesel S10 nas concentrações 2,5%,5% e 7,5% como contaminante , durante 120 dias.....	95
Figura 49: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa <i>B. licheniformis</i> com Diesel S10 nas concentrações 2,5%,5% e 7,5% como contaminante, durante 120 dias.....	96
Figura 50: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com consórcio das cepas <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> com Diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante , durante 120 dias.	96
Figura 51: Comparação do total de C degradado naturalmente no sedimento, utilizando AFFF e Diesel S10 em diferentes concentrações como fonte C, em contraste do total de C degradado na amostra de sedimento sem outra fonte de carbono (sedimento puro – controle).	97
Figura 52: Comparação entre as curvas de C total biodegradado pelo consórcio e a degradação natural dos contaminantes nas diferentes concentrações utilizadas (AFFF: [1,5%], [3%], [4,5%], [6%]; Diesel S10: [2,5%], [5%], [7,5])nos sedimentos.....	98
Figura 53: Esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG/MS).....	104
Figura 54: Frascos de 20mL utilizados nos ensaios de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS), com amostras de sedimentos contaminadas..	108
Figura 55: A: Coleta da fase de vapor (headspace) da amostra de diesel S10 volatilizado; B: Injeção da amostra de gás recolhida com uma seringa gastight) no CG/MS; C: Pré-concentração dos compostos presentes no headspace por 10 minutos.	108
Figura 56: Equipamento CG/MS Shimadzu QP2010 ULTRA, com espectrômetro de massas com detector com fonte ionizada (EI -70 eV) e analisador de massas quadrupolo..	109

Figura 57: Curva de Calibração em CG/MS para compostos BTE(o)X. Fonte: Claro et al. (2018).	111
Figura 58: Perfil cromatográfico do padrão de BTEX, os picos indicam respectivamente as substâncias benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno. Fonte: Claro et al. (2018).. ..	111
Figura 59: Perfil cromatográfico do diesel S10 puro, extraído por headspace para análise em CG/MS. Legenda: 1 : Benzeno; 2 : Tolueno; 3 : Etilbenzeno e 4 : o-Xileno..	112
Figura 60: Comparação ente o perfil do diesel puro e as diferentes concentrações (2,5%, 5% e 7,5%) de diesel misturado no sedimento ao início do teste de biodegradação.	113
Figura 61: Perfis cromatográficos do diesel S10 [2,5%] ao início dos testes de respirometria e degradado (após 120 dias de teste em presença do sedimento), extraído por headspace para análise em CG/MS.	114
Figura 62: Perfil cromatográfico do diesel S10 [2,5%] sem inóculo, e com inóculos de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> e consórcio (<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus licheniformis</i>), extraído por headspace para análise em CG/MS. Legenda: UCM: – mistura complexa não resolvida.	115
Figura 63: Perfis cromatográficos do diesel S10 [5%] ao início dos testes de respirometria e degradado (após 120 dias de teste em presença do sedimento), extraído por headspace para análise em CG/MS.	116
Figura 64: Perfil cromatográfico do diesel S10 [5%] sem inóculo, e com inóculos de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> e consórcio (<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus licheniformis</i>), extraído por headspace para análise em CG/MS. Legenda: UCM: – mistura complexa não resolvida.	117
Figura 65: Perfil cromatográfico do diesel S10 [7,5%] início e degradado, extraído por headspace para análise em CG/MS.	118
Figura 66: Perfil cromatográfico do diesel S10 [7,5%] com inóculo de <i>Bacillus subtilis</i> (A), <i>Bacillus licheniformis</i> (B) e consórcio (<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus licheniformis</i>) (C), extraído por headspace para análise em CG/MS. Legenda: UCM: – mistura complexa não resolvida.	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Gêneros biodegradadores de hidrocarbonetos.....	42
Quadro 2: Identificação molecular das espécies selecionadas para o presente trabalho.	48
<i>Quadro 3: Propriedades do indicador redox 2,6- diclorofenol indofenol (DCPIP).....</i>	<i>61</i>
Quadro 4: Composição do meio Bushnell-Hass no preparo de 1,0L	64
Quadro 5: Classificação de balneabilidade de acordo com a CONAMA 274/00	87
Quadro 6: Porcentagem de ocorrência em cada categoria e qualificação anual, segundo Relatório Qualidade das Praias Litorâneas no Estado de São Paulo. 2018.....	87
Quadro 7: Composição dos ensaios de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) para o diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% com sedimentos antes e após teste de biodegradação por respirometria de Bartha, com os diferentes inóculos.	107
Quadro 8: Condições utilizadas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa nos ensaios para verificar as concentrações dos compostos do óleo diesel S10 antes e após a biodegradação. Legenda: Programa de temperatura, tem se: Taxa de aquecimento (°C/min); Temperatura (°C) e tempo de permanência na temperatura (min).	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de Absorbância (DO) e da Densidade de bactérias (UFC/ml) durante o experimento do crescimento de <i>Bacillus subtilis</i>	55
Tabela 2: Valores de Absorbância (DO) e da Densidade de bactérias (UFC/ml) durante o experimento do crescimento de <i>Bacillus licheniformis</i>	56
Tabela 3: Composição dos tubos dos testes colorimétricos (BH: meio de cultura Bushnell-Hass; DCPIP: Indicador 2,6-diclorofenol-indofenol; E: Espuma de controle de incêndio – AFFF; D: Diesel S10).	66
Tabela 4: Classificação textural do sedimento coletado em Itaguapé.....	84
Tabela 5: Fatores abióticos do Sedimento de Itaguapé.	85
Tabela 6: Densidade microbiológica do Sedimento de Itaguapé.	86
Tabela 7: Densidade em UFC/ml de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> adicionadas nos ensaios de respirometria.	100
Tabela 8: Densidades de bactérias (UFC/ml) pós testes de biodegradação para espuma de controle de incêndio (AFFF) e diesel S10, nas diferentes concentrações e respectivos controles, após 120 dias do início dos experimentos de respirometria.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFFF: *Aqueous Film-Forming Foam* - espumas formadoras de filme aquoso

ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

BTEX: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos

Cextrato: concentração de fósforo total [mg/L]

CG/MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CO: Carbono orgânico

COV: composto orgânico volátil

DCPIP: 2,6-diclorofenol-indofenol

DO: densidade ótica

LGE: Líquido Gerador de Espuma

mb/d: *Millions of Barrels per Day* – Milhões de barris por dia

MO: Matéria orgânica

msolo: massa de solo [g]

NHCI: normalidade do HCl = 0,02

NO: Nitrogênio orgânico

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*

p: peso da amostra

P: teor de fósforo no solo [g/kg]

PAH: Hidrocarbonetos Poliaromáticos

PERB: Parque Estadual Restinga de Bertioxa

PETROBRAS: Petróleo Brasileiro S.A.

PFAS: substâncias per e polifluoralquiladas sulfonadas

PFCAs: perfluorocarboxilatos Ácidos Carboxílicos Perfluorados

PFCs: *Perfluorinated compounds* - Compostos poli- ou per- fluorados

PFOA: ácido perfluorooctanóico

PFOS: Ácido Perfluorooctano Sulfônico

PFSA: Ácido Sulfônico perfluorado

PIB: Produto Interno Bruto

POP: Poluentes Orgânicos Persistentes

ppm: Partes por milhão

Reduc: Refinaria Duque de Caxias

TIC: *Total Ion Current*

TPH: *Total Petroleum Hydrocarbons* – Total de hidrocarbomentos do petróleo

TRH: *Total Resolvable Hydrocarbons* – Total de hidrocarbonetos resolvidos

UC: Unidade de Conservação

UFC: unidades formadoras de colônias

UCM: *Unresolved Complex Mixture* – mistura complexa não resolvida

USEPA: *United States Environmental Protection Agency*

Vextratora: volume utilizado da solução extratora [ml]

VHCl: volume (ml) de HCl 0,02N gasto na titulação

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS	15
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVO	23
CAPÍTULO 1	24
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1.1 Indústria do Petróleo.....	24
1.2 Acidentes de grande impacto da indústria do petróleo.....	25
1.3 Características dos Contaminantes	30
1.3.1 Petróleo.....	30
1.3.2 Óleo Diesel	31
1.3.3 Espuma de Controle de Incêndio – AFFF	33
1.4 Impactos Ambientais	35
1.5 Biorremediação.....	38
1.6 Microrganismos potencial degradadores	40
FLUXOGRAMA DA TESE.....	43
CAPÍTULO 2	44
ATIVAÇÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CEPAS DE BACILLUS PARA UTILIZAÇÃO EM TESTES DE BIODEGRADAÇÃO.....	44
2.1 Introdução.....	44
2.2 Materiais e Métodos	48
2.2.1. Amostras Microbiológicas.....	48
2.2.2 Curva de crescimento	50
2.3 Resultados e Discussão.....	53
2.3.1 Amostras microbiológicas – Inóculos	53
2.3.2 Curva de crescimento	54
2.4 Conclusão	59
CAPÍTULO 3	60
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL S10 E AFFF POR BACTÉRIAS AMBIENTAIS	60

3.1	Introdução.....	60
3.1.1	Colorimetria – Indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol.....	61
3.1.2	Teste de Biodegradação – Respirimetria.....	61
3.2	Materiais e Métodos.....	63
3.2.1	Contaminantes.....	63
3.2.2	Teste de capacidade de biodegradação pelas cepas – Método Colorimétrico - DCPIP.....	64
3.2.3	Teste de Biodegradação – Respirimetria de Bartha.....	66
3.2.4	Densidades Bacterianas.....	78
3.3	Resultados e Discussão.....	79
3.3.1	Teste de capacidade de biodegradação das cepas – Método Colorimétrico – DCPIP.....	79
3.3.2	Teste de Biodegradação – Respirimetria de Bartha.....	84
3.3.4	Densidade Bacteriana.....	100
3.4	Conclusão.....	103
CAPÍTULO 4.....		104
4.1	Introdução.....	104
4.2	Materiais e Métodos.....	107
4.2.1	Ensaio Cromatográfico.....	107
4.2.2	Montagem dos ensaios.....	107
4.2.2	Preparo de <i>headspace</i>	107
4.2.3	Análises cromatográficas.....	108
4.3	Resultados e Discussão.....	112
4.3.1	Diesel S10 puro e no sedimento ao início dos testes.....	112
4.3.2	Diesel [2,5%].....	114
4.3.3	Diesel [5%].....	116
4.3.4	Diesel [7,5%].....	118
4.4	Conclusão.....	122
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....		123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		125
ANEXO 1.....		145
ANEXO 2.....		147
ANEXO 3.....		151

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e econômico mundial, intensificou a expansão da indústria petrolífera, principalmente após a invenção de motores a gasolina e óleo diesel. No entanto, a utilização em grande escala de combustíveis fósseis trouxe também o aumento de danos ao meio ambiente, resultantes das atividades da indústria petrolífera, considerada um dos principais problemas ambientais (NOEL et al., 2016; MNIF et al., 2017).

Acidentes envolvendo hidrocarbonetos derivados do petróleo, ocorrem com bastante frequência, principalmente em função da exploração, refino, transporte e armazenamento (FARHADIAN et al., 2008). A maior parte dos acidentes ocorre provavelmente por vazamentos, incêndios e/ou explosões no ambiente costeiro, que corresponde a grandes perdas de petróleo e derivados (ISSAKOV, 2013)

O meio ambiente tem capacidade limitada para absorver esses impactos, o que resulta em uma degradação ambiental considerável, gerando grande preocupação (TURNER e RENEGAR, 2017). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para diminuir os impactos ambientais causados por derramamentos de petróleo e seus derivados, dentre elas destaca-se a biorremediação (MILLIOLI et al., 2008).

A biodegradação por meio da atividade microbiana, vem ganhando espaço por ser uma técnica bastante eficaz, relativamente de baixo custo, não invasiva e que pode ser associada às tecnologias convencionais (BENTO et al., 2005; EL-NAAS et al., 2014), tendo como meta principal atingir a mineralização completa do contaminante (ANDRADE *et al.*, 2010).

Considerando que as regiões costeiras e os ambientes marinhos são bastante suscetíveis à contaminação por hidrocarbonetos de petróleo por sua estreita relação com a indústria petrolífera (DASTGHEIB et al., 2011), microrganismos isolados de tais ambientes possuem grande potencial para processos de biorremediação, uma vez que, estão adaptados aos contaminantes e às condições ambientais (BUGNI & IRELAND, 2004).

O petróleo e seus derivados são a principal fonte de energia atual, mas seus processos de biodegradação são complexos e dependem da natureza e quantidade de hidrocarbonetos presentes (DAS & CHANDRAN, 2010; RAHMAN et al., 2002), bem como de vários outros fatores.

Dessa forma é evidente que o desenvolvimento de pesquisas e tecnologias de biorremediação de baixo custo e alta eficiência, se fazem necessários, para minimizar os danos ambientais, humanos e aumentar o conhecimento estes processos.

Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de cepas isoladas de ambientes altamente contaminados, ou seja, adaptadas a estas condições, em processos de biorremediação de espuma de controle de incêndio (AFFF) e diesel S10 em sedimento de ambientes costeiros.

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, isoladas de ambientes contaminados por hidrocarbonetos, em biodegradar diesel S10 e substâncias presentes na espuma para combate a incêndios (AFFF), em sedimento de áreas costeiras.

Objetivos Específicos

- Determinar a taxa de crescimento das espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis* por meio da curva de crescimento;
- Verificar a utilização de sedimento de ambientes costeiros em processos de biorremediação;
- Avaliar a capacidade de biodegradação de AFFF e diesel S10 pelas espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis* por técnica de colorimetria;
- Verificar por meio de teste de biodegradação – Respirimetria de Bartha, o potencial das espécies *B. subtilis*, *B. licheniformis* e do consórcio entre ambas as cepas em biodegradar diesel S10 e substâncias presentes na espuma para combate a incêndios (AFFF);
- Verificar por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/MS) a biodegradação do diesel S10.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Indústria do Petróleo

Um dos registros mais antigos da utilização do petróleo é de 1271, no qual Marco Polo relatou a utilização da substância como combustível para lamparinas. O óleo cru era obtido por meio de liberações naturais na superfície da terra (TESTA e WINEGARDNER, 2000).

A produção comercial de petróleo nos Estados Unidos começou em 1859, com a produção de querosene a ser utilizado em lâmpadas. No século XIX a indústria petrolífera teve forte impulso com o surgimento do motor à combustão interna. Com isso o petróleo se tornou a principal fonte de energia até a atualidade, sendo responsável pelo desenvolvimento econômico de diversos países (THOMAS et al., 2001). Com a popularização dos automóveis, o enfoque principal da indústria passou a ser os combustíveis, sendo que só em 1930 passou a desenvolver o óleo para fins de aquecimento.

Com a utilização de combustíveis fósseis como fonte de energia, o aumento populacional e a industrialização nos países em desenvolvimento, a demanda mundial de petróleo foi crescente, chegando a um aumento de 76% entre a décadas de 70 e final dos anos 90.

Estima-se que até 2026, o consumo mundial de petróleo deverá atingir 104,1 mb/d¹. Isso representaria um aumento de 4,4 mb/d em relação aos níveis de 2019 (IEA, 2022).

O Brasil é responsável por aproximadamente 2,8% da produção de petróleo mundial, com produção média anual de 2,905 mb/dia, em 2021. Havendo uma tendência ao aumento da produção de petróleo nos últimos 5 anos, conforme Figura 1 (ANP, 2022).

¹ 1 barril de petróleo corresponde a 159 litros.

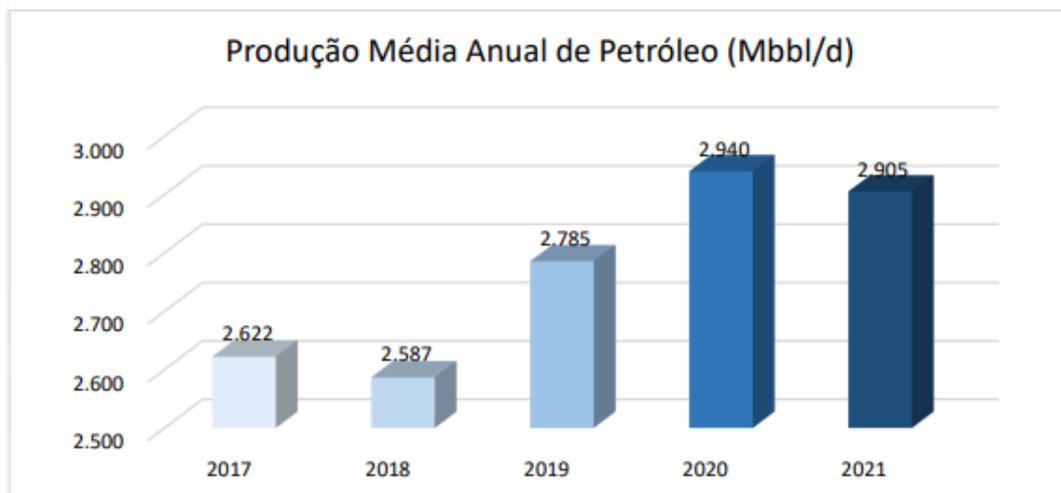


Figura 1: Fonte: ANP/SIGEP – Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural no Brasil 12-2021.

O petróleo é uma das principais fontes de matérias primas para produzir gás, óleos lubrificantes, produtos asfálticos, plásticos, além dos seus derivados serem uma das principais fontes de energia para o transporte. Em 2019, a movimentação econômica do setor de petróleo foi de 3,8% do PIB mundial, equivalente a US\$3,26 trilhões (IEA, 2022).

1.2 Acidentes de grande impacto da indústria do petróleo

Apesar de sua grande importância, as atividades relacionadas ao petróleo e seus derivados têm sido responsáveis por diversos acidentes e danos causados ao meio ambiente e seus organismos.

No ano de 2000, um duto da Petrobrás que ligava a Refinaria Duque de Caxias (Reduc) ao terminal Ilha d'Água, na ilha de Governador, no Rio de Janeiro, rompeu-se provocando o derramamento de 8,2 mil barris de óleo combustível e graxas nas águas da baía de Guanabara, formando uma mancha de mais de 40 km². O derramamento ocasionou a contaminação das águas da baía, areias, costões rochosos, muros de contenção e pedras das ilhas de Governador e de Paquetá. Este foi considerado uns dos mais graves acidentes ambientais na América do Sul, segundo relatório do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL 2001).

O maior acidente marinho da indústria do petróleo ocorreu no Golfo do México em 2010 e provocado pela explosão da plataforma *Deepwater Horizon da British Petróleo*. Entre 20 de abril a 15 de julho de 2010 foram derramados 4,9 milhões de barris no oceano (Figura 2), se espalhando por 1500 km no litoral norte americano (ROBERTSON e KRAUSS, 2010).



Figura 2: Imagem de satélite da região afetada pelo derramamento de petróleo pela plataforma *Deepwater Horizon*.

O acidente contaminou e matou milhares de animais. Foram contabilizados aproximadamente 6814 animais afetados diretamente, em sua maioria aves e tartarugas marinhas (GREENPEACE, 2015). Além dos danos ambientais, a região enfrentou consequências socioeconômicas: a pesca precisou ser interrompida e o turismo na costa sul dos Estados Unidos foi afetado (TANGLEY, 2010).

De acordo com o relatório da ANP (2012), em novembro de 2011, durante a perfuração de um poço de petróleo em Campo do Frade, na Bacia de Campos, Macaé, RJ, ocorreu o vazamento de 3.700 barris de petróleo, o equivalente a 588 mil litros de óleo no mar, da plataforma Sedco 706. O vazamento na plataforma operada pela empresa Chevron produziu uma mancha de óleo de 18 km de extensão. O acidente foi similar, mas em proporções bem menores ao ocorrido em abril de 2010, na plataforma *Deepwater Horizon*, da petrolífera *British Petroleum*. A empresa que operava a plataforma era a mesma que operava a *British Petroleum* no Golfo do México (THOMÉ, 2011).

Em 2 de abril de 2015 o Porto de Santos, especificamente no Terminal da Ultracargo (Figura 3), protagonizou o maior incêndio em área industrial do Brasil. Ao todo, 6 tanques de graneis líquidos foram queimados pelas fortes chamas que duraram 9 dias. Foram atingidos ao longo do incêndio 5 tanques de gasolina e 1 de etanol com capacidade de 6 mil m³ cada. O incêndio não teve vítimas fatais, mas deixou graves danos ambientais (ULTRACARGO, 2015).



Figura 3: Incêndio no terminal da ULTRACARGO – Santos 2015. Fonte: Google - Foto: Delamonica/Futura Press.

De acordo aos valores apresentados pela Polícia Militar do Estado de São Paulo, para extinguir o incêndio foram necessários 300 m^3 de espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) (Figura 4), disponibilizados por diversas empresas brasileiras (FONTES, 2016). A AFFF foi vertida no estuário sem nenhum tratamento prévio, causando de imediato a mortalidade de peixes e organismos aquáticos e a contaminação ao longo do estuário, pois os surfactantes presentes na espuma, compostos por compostos poli- ou per- fluorado (PFCs), são persistentes, tóxicos e bioacumulam (KISSA, 1994).



Figura 4: Utilização de AFFF para apagar o incêndio do terminal da ULTRACARGO – Santos 2015. Fonte: Google - Foto: Diego Lameiro/ Corpo de Bombeiros.

Apesar dos avanços recentes, incêndios envolvendo hidrocarbonetos provenientes de petróleo são difíceis de extinguir, devido à quantidade de combustíveis de alto poder calorífico disponível para consumo do fogo (HUSAIN, 1995). Desta forma o uso de compostos especiais as AFFFs para o controle de incêndio são extremamente necessárias, possuem comprovada pois as mesmas se mostraram eficiência em extinguir chamas (SARDQVIST, 2002).

O derramamento de óleo bruto na costa do Brasil, que atingiu especialmente o Nordeste, no ano de 2019, ficou conhecido como o maior desastre dessa natureza na história do país e um dos mais extensos registrados no mundo. O óleo atingiu 4.334 km da faixa litorânea, 11 estados da República Federativa do Brasil, sendo as regiões afetadas o Nordeste e o Sudeste do Brasil (Figura 5).



Figura 5: Praia de Lagoa do Pau, município de Coruripe, em Alagoas, foi uma das atingidas pelo petróleo vindo do mar- Carlos Ezequiel Vannoni / Agência Pixel Press / Folhapress - Revista Fapesp Edição 286, dezembro 2019.

O óleo atingiu 4.334 km da faixa litorânea de 11 estados da República Federativa do Brasil. As manchas se estenderam entre a costa do Maranhão e a costa do estado do Rio de Janeiro, atingindo 120 municípios e 724 localidades até 22 de novembro de 2019. O total de óleo recolhido nas praias foi de 5379,76 toneladas ao total (Figura 6) (LOURENÇO et al. 2020).

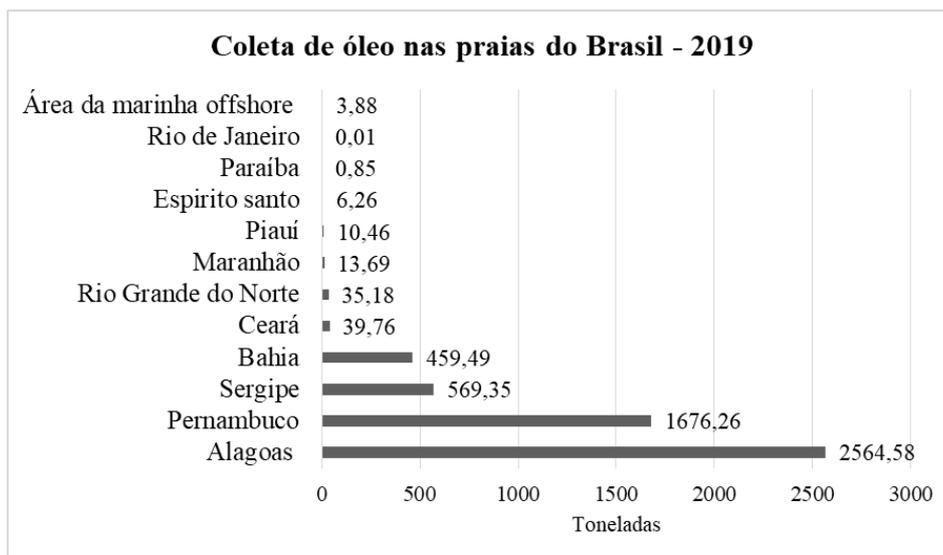


Figura 6: Coleta de óleo nas praias da costa do Brasil no acidente de 2019. Valores em toneladas por região. Fonte: IBAMA.

Considerando a extensão desse desastre ambiental, associado às peculiaridades da biodiversidade brasileira, o inestimável prejuízo à fauna e às áreas de proteção ambiental foi inevitável. As áreas de proteção ambiental a Costa dos Corais e o Parque Nacional de Abrolhos foram as mais afetadas por serem mais sensíveis a exposição. (MAGRIS et al., 2020).

O derramamento de óleo neste evento, contaminou e causou mortalidade de tartarugas, peixes, aves, algas marinhas e animais filtradores, como mexilhões. Espécies comerciais tiveram sua pesca e captura proibidas momentaneamente para evitar que as substâncias tóxicas presentes nos seus tecidos, provenientes do petróleo, causassem danos à saúde das pessoas que iriam consumir o pescado (CARMO & TEIXEIRA 2020).

Segundo Reddy et al. (2022), as amostras coletadas nas diferentes regiões na época do aparecimento misterioso de óleos em 2019, foram provenientes da mesma fonte de origem e, ainda em outubro de 2022, embora em menor volume e de forma esporádica, surgiram, na costa brasileira, porções de óleo de mesma origem sendo que o volume total já soma mais de sete toneladas.

Conforme Lei Federal 9.605/98, a contaminação ambiental é considerada crime ambiental em todo território brasileiro. A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) N° 273 de 2000, dispõe que na ocorrência de passivos acidentes ambientais, os proprietários, arrendatários ou responsáveis pelo estabelecimento, equipamentos e sistemas além dos fornecedores de combustíveis, responderão solidariamente pela situação, contribuindo para o saneamento das áreas impactadas.

O mais recente acidente envolvendo instalações petrolíferas ocorreu em agosto de 2022 em Matanzas, maior porto de Cuba. Um raio atingiu um tanque de armazenamento de combustível, que deu início ao incêndio que durou cerca de 5 dias. As chamas atingiram 4 tanques ao total, cada um com capacidade de 50 mil m³. O uso de espumas de controle de incêndio (AFFF) foi feito apenas no quinto dia do incêndio, devido à indisponibilidade e dificuldade de acesso. Não se tem informações oficiais da quantidade de espuma foi utilizada e nem da quantidade de material que possa ter sido descarregado no mar (EURONEWS, 2022).

1.3 Características dos Contaminantes

1.3.1 Petróleo

O óleo cru presente na crosta terrestre é uma mistura complexa de compostos naturais. Cerca de 200 a 300 componentes químicos são registrados em sua composição, sendo o grupo principal (50 a 98% do total) o dos hidrocarbonetos, compostos por cadeias de carbono e hidrogênio (GERLACH, 1976; BICEGO, 1988). Essa mistura complexa de diferentes componentes, divide-se em quatro grupos principais ou classes: alcanos (de cadeia simples e ramificados), aromáticos, resinas e naftenos (Figura 7) (WRENN & VENOSA, 1996).

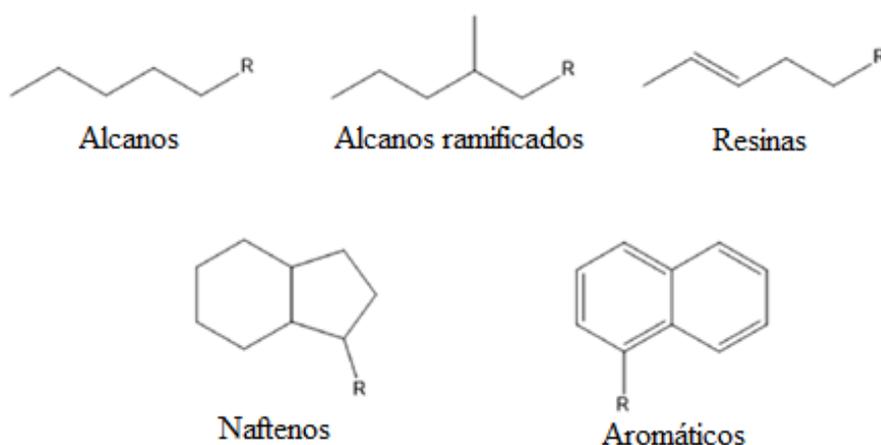


Figura 7: Classes de hidrocarbonetos encontrados no petróleo Fonte: Elaborado pelo autor.

A composição do petróleo varia de acordo com a sua procedência, dependendo tanto da região/local onde é encontrado, como da profundidade do poço. Diante da complexidade da sua composição não existem duas misturas de petróleo idênticas (SPEIGHT, 2002), variando aspectos, como cor, viscosidade, odor, densidade, acidez e outros (NASCIMENTO, 2016; GLASBY, 2006).

O petróleo apresenta também outros compostos químicos, além dos hidrocarbonetos, na sua composição. Segundo BICEGO (1988) um dos principais compostos é o enxofre (até 10% do petróleo), seguido por ácidos graxos (gorduras) (até 5% do total) e compostos nitrogenados (01- 2,0%), além de diversos elementos como níquel, vanádio, ferro e cobre, presentes em partes por milhão.

Mesmo com toda complexidade da composição, a essência do petróleo é vista em sua maioria de átomos de carbono e hidrogênio. O teor do carbono é relativamente constante (83,0-87,0% *m/m*) sendo os teores de hidrogênio e heteroátomos os que conferem distinção entre óleos (SPEIGHT, 2006).

1.3.2 Óleo Diesel

O óleo diesel comercial é derivado do refino do petróleo bruto, constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos de cadeias com 6 a 30 átomos de carbono e em menor proporção átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio (KNOTHE et. al., 2006; SOUZA et al., 2016). A composição específica do diesel, depende da origem do óleo cru utilizado na destilação. O diesel apresenta cerca de 64% de hidrocarbonetos (componentes saturados, incluindo cicloalcanos e cadeias ramificadas) (PENET et al., 2004), além de compostos polares e aromáticos (BENTO et al., 2005).

A propensão dos constituintes do petróleo para serem biodegradados se modifica de acordo com o tamanho da molécula do hidrocarboneto e sua concentração (SOUZA et al., 2016). De acordo com Yu et al. (2005), o aumento de anéis aromáticos eleva a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula, tornando menos disponíveis à biodegradação.

Por se tratar de um produto intermediário do processo de destilação, a biodegradação do óleo diesel é bastante estudada (GEERDINK et al., 1996). Existem estudos que associam a baixa biodegradabilidade do diesel a limitações na transferência de hidrocarbonetos ou a quantidades insuficientes de oxigênio do meio. (SONG et al, 1990).

Hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) presentes no diesel estão entre os menos degradados, são considerados compostos semi-voláteis com baixa solubilidade e característica recalcitrante e persistem por um longo período tempo no ambiente (KAPLAN et al., 1997).

Na composição do diesel estão presentes os Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno (BTEX) (Figura 8) sendo bastante utilizados como indicadores do processo de degradação, devido a capacidade de evaporação e solubilização. O benzeno e o tolueno são mais solúveis

em água quando comparados ao etilbenzeno e xilenos, que possuem menor solubilidade e são mais resistentes à biodegradação (KAPLAN et al., 1997).

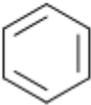
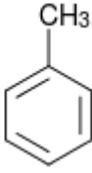
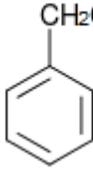
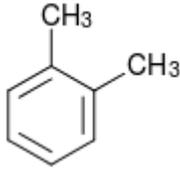
	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	o-Xileno
Estrutura química				
Fórmula	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀
Características	Carcinogênico Inflamável Tóxico	Inflamável Nocivo	Inflamável Nocivo	Inflamável Nocivo Irritante

Figura 8: Estruturas químicas do BTEX. Fonte: Adaptado de EL -NAAS et al. (2014).

Estes compostos estão entre os principais contaminantes de preocupação (XIE et al., 2016), sendo os principais componentes aromáticos encontrados nos produtos derivados de petróleo. São listados como poluentes prioritários pela USEPA (QU et al., 2015), pois são bastante tóxicos e nocivos à saúde humana, podendo atingir o sistema nervoso, causar câncer, entre outros problemas de saúde (XIE et al., 2016).

Atualmente, o óleo diesel no Brasil é apresentado em duas versões, o diesel S500 e o S10. O diesel S10 é um combustível mais refinado que os seus antecessores: enquanto o diesel S500 possui 500ppm, o S10 apresenta apenas 10ppm de enxofre em sua composição, reduzindo a emissão de poluentes e diminuindo o impacto ambiental (ANP 2019).

O diesel S10 foi introduzido e regulamentado no mercado nacional por meio do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores – PROCONVE descrita na Resolução n° 415/2009 e da Resolução ANP n° 46/2012. Este fato foi motivado pela implementação de limites cada vez mais restritivos para as emissões de poluentes dos veículos em circulação no mundo.

O biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira por meio do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) conforme Lei n° 11.097 de 13 de janeiro de 2005 que estabeleceu um cronograma de implementação e aumento gradual de concentração do biocombustível no óleo diesel, que se apresenta em 10%, de teor de biodiesel (v/v).

Segundo a Resolução ANP n° 50/2013 (BRASIL, 2013) os óleos diesel de uso rodoviário se classificam em:

- Óleo diesel A: combustível produzido por processos de refino do petróleo, centrais de matérias-primas petroquímicas ou autorizadas, sem a adição de biodiesel;
- Óleo diesel B: óleo diesel A com adição de biodiesel na concentração estabelecida pela legislação.

Os tipos de diesel descritos acima são divididos de acordo com o nível máximo de enxofre que possuem, conforme nomenclatura estabelecida no Artigo 3° da Resolução ANP n° 65/2011 (BRASIL, 2011):

- Óleo diesel A S10 e B S10: teor máximo de enxofre de 10 mg/kg;
- Óleo diesel A S500 e B S500: teor máximo de enxofre de 500 mg/kg.

1.3.3 Espuma de Controle de Incêndio – AFFF

A espuma formadora de filme aquoso (*Aqueous Film-Forming Foam*), devido à sua estrutura particular, melhora a eficiência no combate a incêndios garantindo uma vasta aplicação. A espuma foi desenvolvida a fim de contornar algumas limitações do uso da água no combate a incêndios (ISENBERG, 1992). Entre outras limitações, a água apresenta baixa viscosidade, provocando escoamento rápido, além de que seu próprio jato pode causar o transbordamento de líquidos em chamas (BHAKTA & RUCKENSTEIN, 1995).

As AFFFs, são compostas por diferentes substâncias, entre elas os perfluoroados, PFCs (da sigla em inglês *perfluorinated compounds*). O seu principal agente é o Ácido Perfluorooctano Sulfônico – PFOS (DALVIN, 2012), que pertence à família das substâncias per e polifluoralquiladas sulfonadas (PFAS). PFAS são utilizadas como principais agentes, pois apresentam alta estabilidade térmica e física (XIAO et al., 2020; BEANS, 2021). As PFAS incluem também compostos como perfluoroalquilsulfonatos e perfluorocarboxilatos (PFCAs).

A forte ligação carbono-flúor com substituição completa de hidrogênio por fluoreto torna os PFCs quimicamente estáveis e persistentes no meio ambiente (BUTENHOFF, 2002). Os PFCs, passando por biotransformação, têm como produto da degradação final os compostos PFOSe o PFOA (ácido perfluorooctanóico) (Figura 9) (MONTAGNOLLI, 2015).



1- Ácido Perfluorooctanossulfônico (PFOS) 2- Ácido Perfluorooctanóico (PFOA)

Figura 9: Estrutura química de PFOS e PFOA. Fonte OECD, 2007.

Segundo Manahan (2013), os compostos orgânicos perfluorados compreendem uma classe especial de Poluentes Orgânicos Persistentes (POP) que têm baixa biodegradabilidade. Ocorrem como derivados fluorados de hidrocarbonetos, que são muito persistentes na atmosfera.

A utilização dessas espumas é indicada em incêndios de hidrocarbonetos e derivados de petróleo, devido à sua formulação pois as substâncias flúor-carbonadas da sua composição, apresentam fortes interações moleculares das ligações C-F e do grupo sulfonato e, portanto, apresentam alta estabilidade térmica e química a surfactantes (KISSA, 1994).

Muitas marcas de espumas contêm em sua composição dietilenoglicol-butil-éter conhecido como butil-carbitol. Segundo Montagnolli (2015), o butil-carbitol representa cerca de 12% a 15% da formulação da AFFF, de acordo com os testes com LC-MS/MS. Esse composto serve como substrato e fonte de carbono para comunidades microbianas, sendo assim a porção mais biodegradável das espumas (CLARKE et al., 2010).

Em adição, a espuma apresenta boa aderência ao material em chamas, produzindo um revestimento contínuo sobre ele e, como possui menor densidade que os hidrocarbonetos e derivados de petróleo, espalha-se sobre a superfície do material em combustão, abafando e isolando-o do contato com o oxigênio atmosférico. Além disto, o líquido presente na espuma ajuda a resfriar e a prevenir a re-ignição (Figura 10) (FIGUEREDO, 1999).

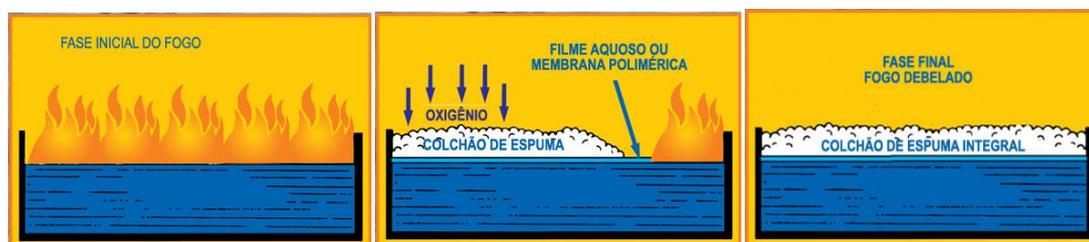


Figura 10: Esquema de Funcionamento da espuma (AFFF) na extinção de incêndio. Fonte: Técnica Segurança em Risco.

A comercialização das espumas no Brasil é liberada como Líquido Gerador de Espuma (LGE), não tóxico e biodegradável para uso nas concentrações de 3% e 6% (massa de LGE/volume de água disponível (preferencialmente doce). Conforme disposto na norma

ABNT NBR 11830 (ABNT, 1993), devem ser aplicados 3% de LGE para 97% de água para incêndios em hidrocarbonetos, e 6% de LGE para 94% de água para incêndios de solventes polares.

A comercialização das espumas é liberada para aeroportos, bases militares e para a empresa Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS) (MULLIGAN, 1990), uma vez que os compostos perfluorados da sua composição integram uma classe de substâncias com propriedades químicas que apresentam bastante preocupação, devido aos seus efeitos ao meio ambiente. Apesar disto, as empresas que produzem e comercializam as espumas, retêm informações em segredo comercial, declarando apenas a presença de tensoativos fluorados, solventes e água na fórmula, quando em verdade há um vasto número de componentes potencialmente poluentes em sua formulação.

Além de poucas informações disponíveis sobre os compostos presentes, não são apresentados os verdadeiros fatores de toxicidade e de biodegradabilidade, pois pouco se sabe sobre as AFFFs em relação ao seu comportamento e ao seu potencial de degradação por ação de microrganismos.

Estima-se que a produção histórica global de sulfonato de perfluorooctano, (PFOS) um dos PFCs mais fabricados seja de 10.000 t (AWAD et al., 2011). O descarte direto das indústrias e da aplicação de espumas no combate a incêndios foi considerada como principal fonte de PFCs no meio aquático (SAITO et al., 2004).

1.4 Impactos Ambientais

A instalação industrial, incluindo a da indústria do petróleo, ocorre em sua grande maioria em regiões costeiras e estuarinas, dada a proximidade delas dos mercados de consumo e produtores, e à facilidade de escoamento da sua produção (ZAGATTO, 2006).

Regiões estuarinas estão em constante processo de expansão, destacando-se o aumento do turismo, o desenvolvimento da aquicultura e a implantação de parques eólicos e grandes estruturas industriais, portuárias e logísticas, ligadas, sobretudo, à exploração petrolífera *offshore*, e seus efeitos multiplicadores, como os produzidos pela descoberta e exploração da Formação Pré-Sal (MMA, 2021).

A exploração, transporte e consumo do petróleo e seus derivados em regiões costeiras e estuarinas, entre outras, causa a liberação dos hidrocarbonetos no ambiente. Essa liberação pode ocorrer em menores quantidades pelo descarte inadequado ou infiltrações nos sistemas de armazenamento, ou em grande escala por derramamentos acidentais causados por navios petroleiros, plataformas de petróleo e dutos (PALA et al., 2006).

Uma das principais preocupações de pesquisadores e da sociedade como um todo é a contaminação do ambiente por compostos orgânicos tais como os hidrocarbonetos (COLEDAM et al., 2017) do quais os derramamentos mais catastróficos ocorrem, geralmente, em áreas costeiras, afetando o ecossistema marinho e litorâneo (MELO; AZEVEDO, 1998; MILLE et al., 2006).

A contaminação causada por hidrocarbonetos, vem sendo considerada um dos principais problemas ambientais (NOEL et al., 2016; DONG et al., 2017), devido à capacidade limitada dos ecossistemas em absorverem o impacto causado pelos contaminantes (FARHADIAN et al., 2008; TURNER e RENEGAR, 2017) e pelo fato do petróleo poder persistir no ambiente por anos, tornando as técnicas de limpeza ou remoção limitadas e ineficientes (CANTAGALLO et al., 2007).

O petróleo derramado, em contato com a água, forma uma fina camada na superfície que impede a troca de gases entre a atmosfera e água, dificultando os processos de respiração. Os derramamentos podem formar extensas manchas negras de efeitos altamente destruidores (FREITAS et al., 2016), uma vez que também dificultam a passagem de luz solar. Essas “marés negras”, ao atingirem as zonas costeiras, causam grandes prejuízos econômicos e sociais, além do impacto ambiental, uma vez que atividades turísticas e pesqueiras também são gravemente afetadas (JIANG et al., 2010).

Os poluentes contaminam não só água, mas também organismos marinhos e sedimentos, os quais são capazes de concentrar inúmeros poluentes. Os sedimentos atuam como reservatório para diversos contaminantes, ao mesmo tempo que processos de bioacumulação e biomagnificação ocorrem ao longo da cadeia trófica (BURTON & LANDRUM, 2003). Muitos contaminantes são relativamente insolúveis em água, sendo adsorvidos por partículas de matéria orgânica em suspensão que eventualmente se depositam no sedimento (DEL VALLS & CONRADI, 2000), provocando a troca de contaminantes entre as partículas de sedimento.

A contaminação de organismos vivos por óleo pode ocorrer de forma imediata ou em longo prazo. A contaminação imediata pode causar tanto morte por asfixia, como um efeito tóxico que pode levar à morte direta ou a efeitos subletais. Em longo prazo a bioacumulação por meio da alimentação, poderá atingir diversos níveis da cadeia trófica (CARDOSO 2006; MILANELLI & LOPES, 2002).

Em relação aos riscos à saúde humana, os mesmos estão relacionados com as propriedades físico-químicas dos compostos do petróleo, os quais podem ser absorvidos pela pele, ingeridos ou inalados, espalhando-se rapidamente por todo o organismo (COSTA et

al., 2012). Além da irritação das mucosas, alguns hidrocarbonetos podem causar anomalias transitórias nas atividades do fígado e problemas renais, e/ou comprometer o sistema nervoso central, causando excitação ou depressão, seguidas de desorientação, tremores, desânimo, alucinações, convulsões e até coma (ASIMIEA e SAM-WOBO, 2011; ZHANG et al., 2013).

Registros históricos mostram que incêndios de hidrocarbonetos eram bastante comuns nos primeiros campos de petróleo e ocorriam a partir de falhas humanas, desastres naturais, ou de queima deliberada e extensa de gás natural, até então não utilizado pela indústria (MACDONALD, 1990). Os recursos para segurança em caso de incêndio ou proteção contra explosão eram limitados no início das operações da indústria petrolífera. A indústria ficou conhecida como uma operação de risco em várias áreas, principalmente em relação a seus impactos ambientais (EMMONS, 1985). Infelizmente, a quantidade de acidentes com danos ambientais causados pela indústria do petróleo cresceu juntamente com o desenvolvimento do setor (WILLIAMS & OLANIRAN, 1994).

Apesar do aumento dos acidentes e dos danos por eles causados, foi somente nas últimas décadas que a indústria petrolífera investiu em medidas de proteção contra incêndios e explosões, que foram analisadas e aceitas, pela maioria das indústrias, como medidas de melhoramento operacional, simplesmente pelo fato de proteger as instalações contra a destruição (PASMAN & SUTER, 2005).

Uma das medidas adotadas tem sido o uso das espumas para combate a incêndios, as quais são utilizadas em diferentes sistemas industriais e situações. Entretanto, apesar da eficácia em combater as chamas, as espumas causam a contaminação do ambiente (estuário, praias, campos, entre outros) por uma mistura de compostos e espuma, os quais podem causar danos aos organismos, aos sedimentos, ao solo e a água causando efeitos catastróficos (RUPPERT et. al., 2005), sendo, em alguns casos, impossível evitar que atinjam o meio ambiente (KLEIN, 2004).

A contaminação por substâncias como PFASs por uso das AFFFs, começou a ser relatada no início da década de 2000. De fato, estas substâncias foram detectadas em diversas amostras ambientais (GIESY; KNNAN, 2002) de solo (HIGGINS et. al., 2005), água superficial (PLUMLEE et. al., 2008) e também acumuladas na biota como peixes (HUANG et al., 2010), tartarugas (SOLLA et al., 2012) e mamíferos (GIESY; KANNAN, 2002)), em alimentos (CLARKE; SMITH, 2011) e em seres humanos (ROTANDER et al., 2015). Vários agentes presentes na AFFF foram considerados ligeiramente tóxicos para a vida marinha em concentrações próximas de $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ (SALAZAR, 1985).

As propriedades físicas da AFFF também têm potencial de causar danos à biota. A AFFF lançada em um rio da Florida, em 1993, foi objeto de investigação como uma possível causa de doenças e mortes em aves marinhas na região (KINNER, 1998). Por analogia, à semelhança dos surfactantes de hidrocarbonetos, os surfactantes perfluorados da AFFF transportados nas águas residuais podem, potencialmente, fazer com que a plumagem das aves perca seus óleos protetores naturais, causando posteriormente a morte das mesmas por hipotermia (STICKLEY et al., 1986).

Em relação à saúde humana, alguns estudos associaram as concentrações de PFCs ao transtorno de déficit de atenção/hiperatividade infantil (HOFFMAN et al., 2010), a baixa a resposta imune à vacinação (GRANDJEAN et al., 2012), e a problemas relacionados à tireoide na população geral adulta dos EUA (MELZER et al., 2010).

Não só os PFCs têm sido encontrados em amostras ambientais. Diversas outras substâncias presentes nas espumas, como PFCAs (Ácidos Carboxílicos Perfluorados) e PFSAAs (Ácidos Sulfônicos perfluorados) de cadeia longa, também foram detectadas e descritas como muito problemáticas por serem altamente persistentes (KNEPPER, 2010) necessitando de uma rápida remoção do ambiente.

1.5 Biorremediação

Os hidrocarbonetos apresentam baixa biodegradabilidade e alta persistência no ambiente, ocasionando impactos ambientais expressivos. Tecnologias inovadoras, econômicas e ecológicas são necessárias para minimizar os impactos causados por eles (SANDU et al., 2017).

O processo de biorremediação é definido como a utilização de microrganismos e suas diversidades metabólicas para reduzir ou transformar substâncias tóxicas em substâncias menos tóxicas ou não tóxicas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002; ALHO, 2008; KENSA, 2011; ADAMS et al., 2015). Os microrganismos são capazes de utilizar esses contaminantes como fonte de energia e geração de biomassa.

A biorremediação surgiu como uma tecnologia alternativa para remediar locais impactados com poluentes orgânicos (MONTAGNOLLI e BIDOIA, 2012; DAS e DASH, 2014). Para que o processo de biorremediação aconteça de forma satisfatória, é essencial a presença de microrganismos que sejam capazes de catabolizar as reações químicas necessárias para a degradação dos compostos. É necessário ainda, que os contaminantes estejam disponíveis para estes microrganismos ou para as enzimas produzidas por eles (MENEGETTI, 2007).

As técnicas de biorremediação podem ser realizadas no local do derrame (*in situ*) ou fora deste (*ex situ*), envolvendo inúmeros procedimentos tais como: biorremediação passiva, bioventilação, *landfarming*, compostagem, bioaugmentação e bioestimulação; (PEREIRA e LEMOS, 2004).

As técnicas de biorremediação *ex situ* envolvem remoção física do material contaminado (geralmente solos ou sedimentos), seguida por tratamentos sob condições controladas em biorreatores, biopilhas ou lagoas (COLLERAN, 1997) ou até mesmo tratamentos físico-químicos, como lavagem do solo, inativação química (uso de permanganato de potássio e/ou peróxido de hidrogênio como oxidante químico) e a incineração. Estas técnicas apresentam muitas limitações e alto custo (TRELLU et al., 2016).

Ao utilizar microrganismos na limpeza de compostos tóxicos através da diminuição da concentração de determinados poluentes, a biorremediação *in situ* é considerada uma alternativa mais promissora (ROSA e TRIGUIS, 2007). A técnica *in situ* ainda apresenta vantagens como o menor custo de operação, baixo consumo de energia e ausência de produtos residuais (SHIM et al., 2009).

A velocidade e eficiência do processo de biorremediação *in situ*, está relacionada com a comunidade de microrganismos degradadores. Quanto maior a comunidade de microrganismos degradadores, mais rápida e eficaz será a biorremediação.

De maneira mais detalhada, a biodegradação é o processo pelo qual as substâncias são quebradas por processos enzimáticos realizados por organismos vivos, sendo considerada eficaz, quando os produtos finais das reações são apenas dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O) (DIAZ, 2008). A taxa de biodegradação (tempo que leva para o contaminante biodegradar), é uma informação importante para as escolhas preliminares de microrganismos candidatos a biorremediadores e para o monitoramento de seus processos (BAKER et al., 1994).

Hidrocarbonetos (alcanos e resinas) são degradados mais facilmente pelos microrganismos, enquanto hidrocarbonetos ramificados e poliaromáticos são mais difíceis de degradar, sendo, portanto, menos biodegradáveis (VARJANI, 2017). Entre os hidrocarbonetos, a fração de n-alcanos de C₁₀-C₂₀ torna o óleo diesel mais suscetível à biodegradação por microrganismos que utilizam o carbono presente como fonte de energia para reações enzimáticas específicas (NWAOGU et al., 2008).

Embora a biorremediação de hidrocarbonetos seja uma estratégia frequentemente adotada devido ao seu baixo custo (DOBLER, SANER & BACHOFEN, 2000) e ao fato de que o potencial das bactérias heterotróficas aeróbias neste processo seja eficiente e bem

estabelecido na literatura, existem pouquíssimas informações sobre a eficiência da biorremediação com AFFFs como co-contaminantes (OLSEN *et. al.*, 2006).

A capacidade dos microrganismos de acumular, degradar ou transformar poluentes ambientais *in situ* desperta interesse em estudos que abordam a bioprospecção (DEMAIN *et al.*, 2007; van DOMMELEN *et al.*, 2016; LUNA *et al.*, 2007). Bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos foram isoladas em locais cronicamente contaminados, como é o caso Estuário de Santos, e utilizadas em compostos para biorremediação de áreas contaminadas.

A obtenção de cepas degradadoras a partir de locais contaminados resulta profícua, pois tais ambientes favorecem a ocorrência e a manutenção de espécies mais adaptadas aos contaminantes e, tanto as densidades quanto a diversidade bacteriana, estão relacionadas com a contaminação (CARMAN *et. al.*, 1995).

Tendo em vista que os microrganismos adaptados ao metabolismo de hidrocarbonetos expressam enzimas capazes de degradar moléculas complexas, é provável que possuam também, a capacidade para a degradação das AFFFs, apresentando potencial para aplicação biotecnológica em processos de biodegradação de resíduos e biorremediação.

Um estudo realizado no Estuário de Santos, SP, após o incêndio de 2015 no terminal da ULTRACARGO, evidenciou um aumento na densidade de bactérias heterotróficas após o despejo de efluentes sem nenhum tratamento prévio. Demonstrou-se que bactérias isoladas de ambiente marinho se adaptaram as condições das quais foram expostas, apresentando grande potencial para utilização em processos de biorremediação de ambientes contaminados (MERGUIZO, 2017).

Embora pouco descrita na literatura, a biorremediação bacteriana heterotrófica de substâncias existentes na AFFF, em áreas costeiras, necessita de muitos estudos pois, tornou-se evidente durante as últimas duas décadas que muitos destes compostos são suscetíveis a degradação microbiana. Sabe-se, que a degradação microbiana de tais substâncias, apesar de ser relativamente lenta, pode contribuir de forma significativa para minimizar o seu impacto ambiental em longo prazo (FETZNER, 1998; DOLFING, 2000; WHITACRE, 2008).

1.6 Microrganismos potencial degradadores

Como mencionado anteriormente, inúmeros estudos demonstram a capacidade de microrganismos em degradar substâncias orgânicas tóxicas (PRINCE *et al.*, 2016; VARJANI, 2017). Comunidades bacterianas foram detectadas em solos e águas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo, indicando que cada espécie ou gênero possui um determinado papel nos processos de degradação destes compostos (SORKHOH

et al., 1995). Em 1913, Sohnger demonstrou que alguns microrganismos, eram capazes de transformar gasolina, querosene, parafina e óleo de parafina em CO₂, água e traços de ácidos orgânicos (ZOBELL, 1946) mediante o processo de oxidação. Gray & Thornton (1928) isolaram vários microrganismos hidrocarbonoclasticos, pertencentes a diversos gêneros, dentre eles, *Bacillus*, *Bacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* e *Spirillum*, capazes de decompor compostos aromáticos.

A partir da década de 90, muitas espécies de microrganismos foram identificadas como degradadoras de hidrocarbonetos, a saber: *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio sp.*, entre outros (MARIANO et al., 2007).

No ambiente marinho estão presentes vários tipos de microrganismos tais como bactérias, fungos e leveduras, capazes de metabolizar compostos de petróleo utilizando o mesmo como fonte de carbono e energia. Embora estes microrganismos estejam amplamente distribuídos por todo o oceano, eles são encontrados em maior abundância em águas costeiras cronicamente poluídas (ITOPF, 2002).

A diversidade de microrganismos capazes de biodegradar óleo é grande, porém, pouco conhecida. Acredita-se que ao menos 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas existentes tenham sido descobertas e nomeadas. No entanto com o crescente interesse e avanço das pesquisas, o número cresce a cada ano (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003).

Dentre os microrganismos, as bactérias são as mais atuantes na biodegradação do petróleo em casos de derramamentos (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2014; NWANKWEGU e OWOSI, 2017). A eficiência de biodegradação varia entre 0,13% a 50% (HOLLAWAY et al., 1980) em solo/sedimento, entre 0,003% a 100% (MULKINS-PHILLIPS e STEWART, 1974) para bactérias na água do mar.

Diversas bactérias são conhecidas por metabolizarem substratos exclusivamente compostos apenas de hidrocarbonetos (YAKIMOV et al., 2007). De acordo com Wetler-Tonini, Rezende & Gravitol (2010), os principais gêneros são: *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* e *Vibrio*.

Bartha e Bosset (1984) indicaram 22 gêneros de bactérias capazes de biodegradar hidrocarbonetos (Quadro 1). Teixeira (2007) isolou e caracterizou 37 linhagens de bactérias com potencial de degradação de solo contaminado com gasolina.

Quadro 1: Gêneros de bactérias biodegradadores de hidrocarbonetos (Adaptado de Bartha e Bosset, 1984).

Bactérias	
<i>Achromobacter</i>	<i>Gluconobacterium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Pastelleura</i>
<i>Alcaligeles</i>	<i>Proteus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Xantomonas</i>

Os gêneros *Bacillus*, *Cunninghamella*, *Pseudomonas* e *Proteus*, são os mais utilizados em processos de biorremediação. *Pseudomonas* spp são utilizadas na descontaminação de ambientes poluídos por pesticidas ou petróleo uma vez que oxidam diversos compostos orgânicos nocivos, transformando-os em substâncias inócuas ao ambiente (AMABIS & MARTHO, 1990). *Bacillus* spp, por serem anaeróbicos facultativos (crescem na ausência de oxigênio, mas também podem adotar a via metabólica na presença do mesmo), possuem grande afinidade na degradação de material orgânico (MORIARTY, 1998, LALLO et al., 2007).

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho se propõe a verificar a capacidade das espécies ambientais *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, em biodegradar substâncias da espuma de controle de incêndio (AFFF) e do diesel S10 “*in situ*”.

FLUXOGRAMA DA TESE

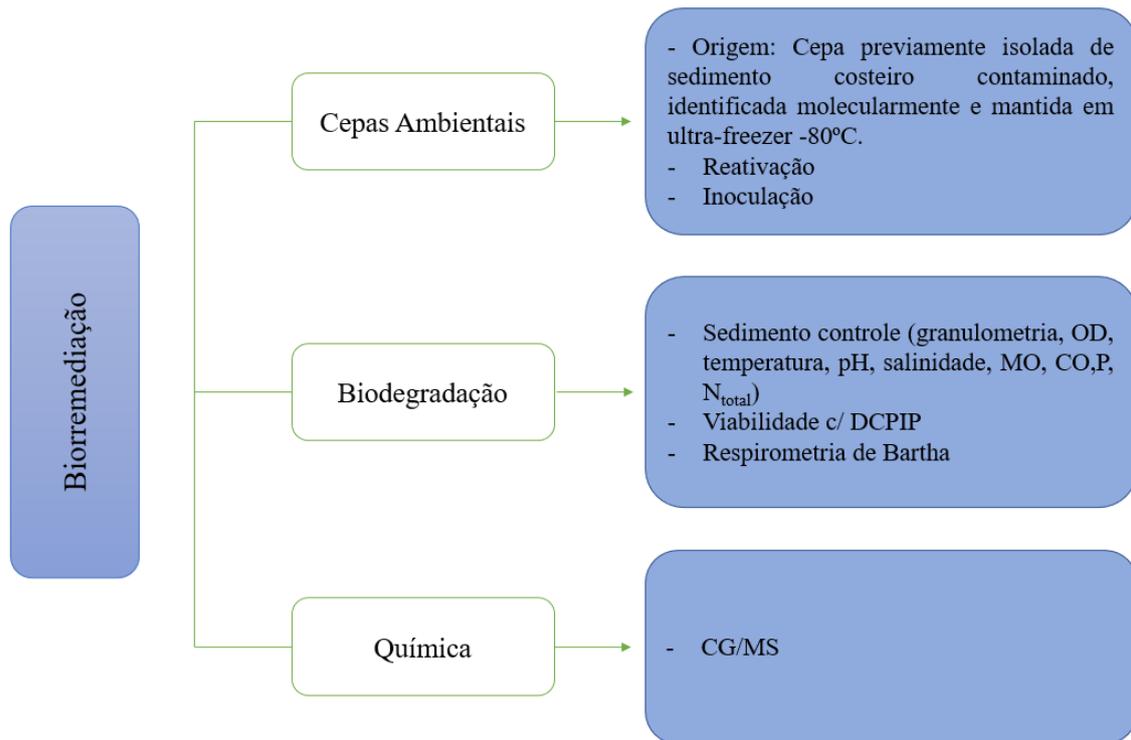


Figura 11: Fluxograma das etapas que compuseram a realização e execução do trabalho. Fonte: Elaborado pelo autor.

CAPÍTULO 2

ATIVACÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CEPAS DE BACILLUS PARA UTILIZAÇÃO EM TESTES DE BIODEGRADAÇÃO

2.1 Introdução

Os microrganismos mais indicados para utilização em processos de biorremediação são bactérias e fungos com capacidade fisiológica e metabólica para degradar diversos contaminantes (BAKER e HERSON, 1994).

Bactérias heterotróficas são ubíquas na natureza e têm a capacidade de degradar diversos tipos de hidrocarbonetos de cadeia curta, cadeia longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo os Hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) (ROSENBERG, 1993). Esses organismos são os mais frequentemente utilizados na degradação de contaminantes orgânicos, pois são capazes de oxidar os hidrocarbonetos por meio de fermentação, respiração aeróbica ou anaeróbica, utilizando-os como fonte de carbono e energia (ALEXANDER, 1994).

Espécies bacterianas expostas previamente a hidrocarbonetos e que, se mostraram passíveis de utilizá-los como fonte de carbono, tendem a se tornar numericamente dominantes no ambiente relativamente àquelas que não apresentam tal habilidade. Deste modo, a contaminação do ambiente por este contaminante ocasiona alterações, através de um processo de sucessão ecológica microbiana, tanto na quantidade quanto na diversidade das bactérias autóctones, tudo relacionado fortemente à capacidade de degradação de hidrocarbonetos em um determinado ambiente (CERNIGLIA, 1992; ITOPF, 2010).

Bactérias que utilizam fonte de carbono para seu crescimento, realizam um somatório de processos metabólicos progressivos que, conduzem a duplicação celular (reprodução) e, quando cultivadas com aporte de nutrientes necessários e em temperatura adequada, apresentarão um crescimento padrão, representado por uma curva de crescimento típica (Figura 12) (ALTERTHUM, 2008).

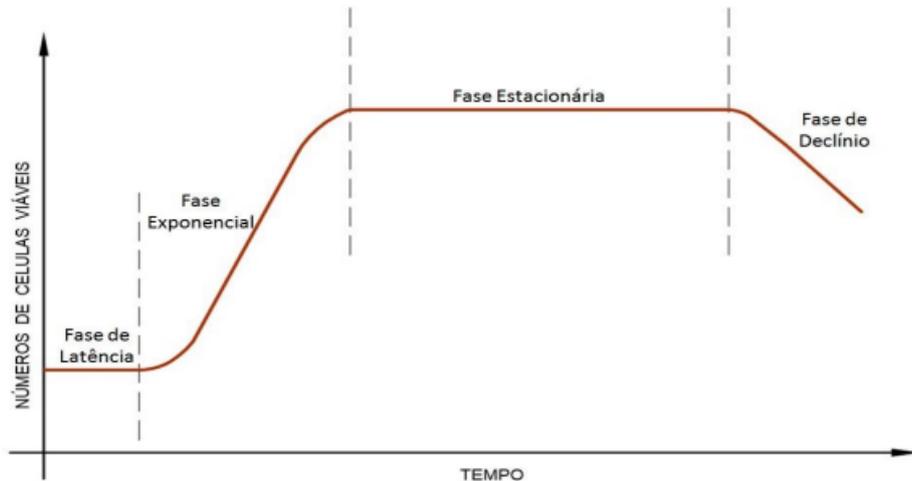


Figura 12: Curva típica de crescimento bacteriano em cultura estanca, adaptado ALTERTHUM, 2008.

A curva típica apresenta as seguintes fases:

- 1 – **Fase “lag”, de latência ou adaptação:** período de aclimação, no qual os microrganismos presentes sofrem o processo de adaptação enzimática e tornam-se capazes de degradar o substrato;
- 2 - **Fase “log” ou de crescimento exponencial:** o crescimento dos microrganismos ocorre de maneira rápida, pois o suprimento de substrato no meio é superior às necessidades dos organismos, o que possibilita o crescimento exponencial, sendo limitado apenas pela taxa de reprodução e capacidade apresentada pelos microrganismos de degradar o substrato;
- 3 - **Fase estacionária:** nessa fase o crescimento populacional cessa, pois o substrato se torna limitante, e o crescimento de novas células é compensado pela morte de outras, mantendo o número de células temporariamente constante;
- 4 – **Fase de declínio ou mortalidade:** a disponibilidade de substrato é reduzida e a taxa de mortalidade excede a produção de novos microrganismos. Em alguns casos, a curva pode ser inversa à de crescimento exponencial (METCALF e EDDY, 1991).

Embora as bactérias degradadoras possam apresentar um crescimento com todas as fases típicas, cada curva determinada, para cada espécie estudada em laboratório, é obtida para uma única espécie ou para 2 ou 3 espécies conhecidas. Entretanto, cabe ressaltar que,

em situações reais, existe no ambiente, uma comunidade composta por muitas espécies de microrganismos, diversos compostos e substâncias e vários processos de biodegradação de diferentes substratos (BERNARDES e SOARES, 2005). Isto mostra o quão complexos são os estudos sobre biodegradação e a obtenção de processos e produtos que sejam eficientes na remoção de contaminantes *in situ*.

Um dos passos para avaliar o potencial biodegradador de bactérias é saber se ela é capaz de utilizar determinado composto ou contaminante para seu crescimento. Deste modo, conhecendo-se a curva de crescimento de determinada bactéria é possível calcular se ela cresce e o quanto cresce pela taxa de crescimento (variação do número de células por intervalo de tempo) e com que velocidade ocorre este crescimento tempo de geração (intervalo de tempo necessário para que uma célula origine duas novas – nova geração) (TORTORA et al., 2005).

Um dos gêneros mais utilizados em processos de biorremediação é o *Bacillus*. Muitas espécies deste gênero têm importância econômica e ambiental, sendo utilizadas em diversos processos industriais e ambientais, como por exemplo: produção de biosurfactantes, antibióticos, enzimas, vitaminas, biorremediação e controle biológico, entre outros (SCHALLMEY et al., 2004).

As bactérias do gênero *Bacillus* são anaeróbicas facultativas, com forma de bastonete, e móveis (TURNBULL, 1996). São Gram-positivas (possuem camada espessa de peptidoglicano em sua parede celular) e produzem endósporos resistentes que garantem a sua sobrevivência em períodos com condições de estresse ambiental (HENRIQUE et al., 2000). Os endósporos podem permanecer inativos e intacto por anos (CANO et al., 1995). Quando uma célula bacteriana se desidrata, ocorre a esporulação. E em ambiente favorável, o esporo germina e a bactéria volta ao seu estado vegetativo, multiplicando-se normalmente (CANO et al., 1995).

Devido à sua capacidade de suportar variações das condições ambientais, adaptando-se facilmente a diversos habitats, encontram-se amplamente distribuídas em solos e sedimentos (BARROS, 2007). A capacidade fisiológica e de produção de esporos extremamente resistentes dos *Bacillus*, permite que bactérias deste gênero sejam amplamente encontradas em áreas contaminadas (KUTA, 2008).

A espécie *Bacillus subtilis*, é facilmente encontrada no sedimento/solo e têm eficiência comprovada na produção do biosurfactante surfactina, que é utilizado contribuindo na remoção de petróleo (AL-BAHRY *et. al.*, 2012). A surfactina, lipopeptídeo composto por sete aminoácidos e um ácido graxo, produzida por *B. subtilis* é considerada um dos mais

potentes biossurfactantes conhecidos, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72mN/m para 27mN/m (AL-BAHRY *et. al.*, 2012; DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2006). *B. subtilis* atua principalmente na interface óleo-água (AMUND; ADEBIYI, 1991), aumentando a permeabilidade dos hidrocarbonetos e acelerando a biodegradação.

Bacillus licheniformis também se encontra amplamente distribuído na natureza (VEITH *et al.*, 2004), presente principalmente no solo e na plumagem de aves. É utilizado em fermentações industriais, na produção antibióticos e produtos químicos variados como ácido acético e substituto de L – triptofano (GHERNA *et al.*, 1989). *B. licheniformis* produz a lichenisia, um biossurfactante, que possui ótima estabilidade a diferentes temperaturas, pHs e concentrações salinas, e tem capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72mN/m para 28mN/m (THAVASI *et. al.*, 2010).

O crescimento bacteriano é influenciado por fatores físicos, como pH, temperatura e químicos como oxigênio e nutrientes. *B. subtilis* e *B. licheniformis* são microrganismos aeróbicos facultativos e, quanto à tolerância a níveis de pH, são neutrofílicos, crescendo em pH entre 5,4 e 8,5, embora sejam frequentemente tolerantes a níveis mais altos de pH. De acordo com a classificação por faixa de temperatura, *B. subtilis* e *B. licheniformis* são mesofílicos, ou seja, o crescimento ótimo ocorre a temperaturas entre 25 e 40°C (CLEMENTS *et al.*, 2002; PUBLIC HEALTH ENGLAND 2018).

Ambas as espécies já foram testadas em processos de biorremediação na área da agronomia, apresentando excelentes resultados (ALEXOPOULUS *et al.*, 2004). De acordo com Malina e Zawierucha (2007) consórcios ou culturas puras de microrganismos capazes de degradar eficientemente hidrocarbonetos de petróleo *in vitro*, são isolados de áreas contaminadas e potencialmente utilizadas como inóculos em tratamentos biológicos (MALINA e ZAWIERUCHA, 2007).

O objetivo deste capítulo é verificar a viabilidade e a taxa de crescimento das *B. subtilis* e *B. licheniformis*, para possível utilização em escala industrial dessas cepas biorremediadoras ambientais.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1. Amostras Microbiológicas

No presente estudo foram utilizadas cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Quadro 2). Os microrganismos foram isolados de sedimentos contaminadas e identificados molecularmente por Merguizo (2017) e pertencem ao banco de cepas do Laboratório MICROMAR (UNESP- CLP).

Quadro 2: Identificação molecular das espécies selecionadas para o presente trabalho.

Cepa – Espécies	Código - NCBI	% de identidade
<i>Bacillus subtilis</i>	JQ410782.1	98%
<i>Bacillus licheniformis</i>	KY172828.1	98%

2.2.1.1. Origem das Amostras Microbiológicas

As amostras microbiológicas das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, utilizadas no presente estudo, foram isoladas de sedimentos provenientes da região portuária do Estuário de Santos, após o incêndio no terminal da ULTRACARGO. As amostras foram coletadas em abril de 2015, em cinco pontos ao longo do canal do Porto de Santos (Figura 13, ANEXO 1) (MERGUIZO, 2017).

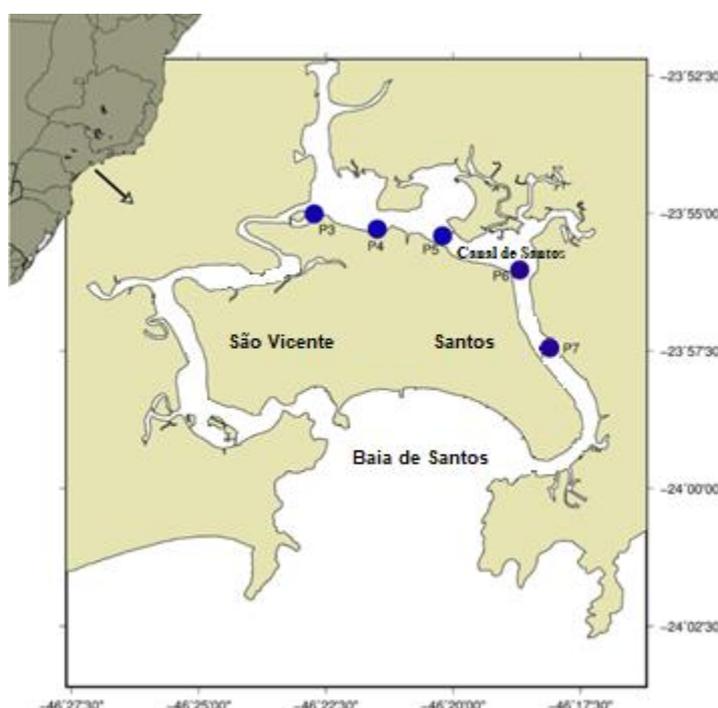


Figura 13: Localização dos pontos de coleta das amostras microbiológicas das de sedimento das quais foram isoladas as espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na região Portuária de Santos após o incêndio no Terminal da ULTRACARGO (ponto 4) em abril de 2015.

As amostras de sedimento foram processadas seguindo o protocolo utilizado por Oliveira & Pinhata (2008) e mantidas em microcosmos (Figura 14) pelo período de um ano, durante o qual as bactérias presentes nas amostras foram isoladas, caracterizadas e selecionadas para realizar a identificação molecular. Todas as cepas estudadas têm sido mantidas no Banco de Culturas, armazenadas em ultrafreezer -80°C.

Para o congelamento foi utilizado o método de congelamento de médio prazo, preservação em óleo mineral esterilizado. As culturas bacterianas ativas de cada espécie foram repicadas em microtubo (2 ml) contendo 1ml de ágar nutriente inclinado. Os tubos foram incubados a 35°C até o aparecimento do crescimento celular. Em seguida os microtubos foram completados com óleo mineral (glicerol) esterilizado (RHODES, 1957; COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).



Figura 14: Microcosmos com sedimentos a partir dos quais foram obtidas as cepas bacterianas. Foto: Roberta Merguizo Chinellato.

As cepas consideradas promissoras para utilização em processos de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos e compostos presentes nas AFFFs foram aquelas com maior predominância numérica e mais ampla distribuição espacial nos pontos de coleta ao longo do tempo de experimento. As espécies selecionadas, *B. subtilis* e *B. licheniformis* foram mantidas em Banco de cultivo para realização de estudo posteriores.

2.2.1.2. Reativação e Preparo do inóculo

Para reativação das cepas e preparo do inóculo para realização dos experimentos, as culturas puras de *B. subtilis* e *B. licheniformis* provenientes do banco de culturas, foram inoculadas em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 100 ml de meio de cultura caldo nutriente,

preparado com água do mar estéril. Os frascos Erlenmeyers foram então incubados em uma plataforma agitadora sob agitação contínua de 180 rpm, a 35°C, overnight (18h).

Após o período de 18 horas, a densidade bacteriana nas culturas (em cada frasco Erlenmeyer) foi determinada através de densidade ótica com espectrofotômetro (Versa max™ Absorbance Microplate Reader) no comprimento de onda de 600 nm. Para os testes o inóculo foi ajustado a concentração de 10^6 Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/ml).

2.2.1.3. Avaliação das colônias e das cepas em microscópio para confirmação da pureza dos isolados congelados

Antes da preparação do inóculo para uso nos experimentos foram realizados a avaliação das colônias por meio da Técnica *spread-plate*. Alíquotas de 0,1mL de amostra foram inoculadas e espalhadas com alça de Drigalsky em placas petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente e incubadas a $35 \pm 0,5^\circ$ C durante 48 horas e para a confirmação de pureza foi realizada a técnica de coloração de Gram.

2.2.2 Curva de crescimento

Após a reativação das cepas e a capacidade de obtenção de inóculos com 10^6 UFC/ml, os parâmetros de crescimento das bactérias nos cultivos (taxa de crescimento, tempo de geração) foram determinados através de suas curvas de crescimento.

Para determinação das curvas de crescimento também foi utilizado o método da Densidade Ótica no qual, amostras do cultivo foram retiradas periodicamente para medida da turbidez e para a determinação da densidade de células pelo método *Spread Plate* (Figura 15). Os dados obtidos foram utilizados para construir as curvas de crescimento.

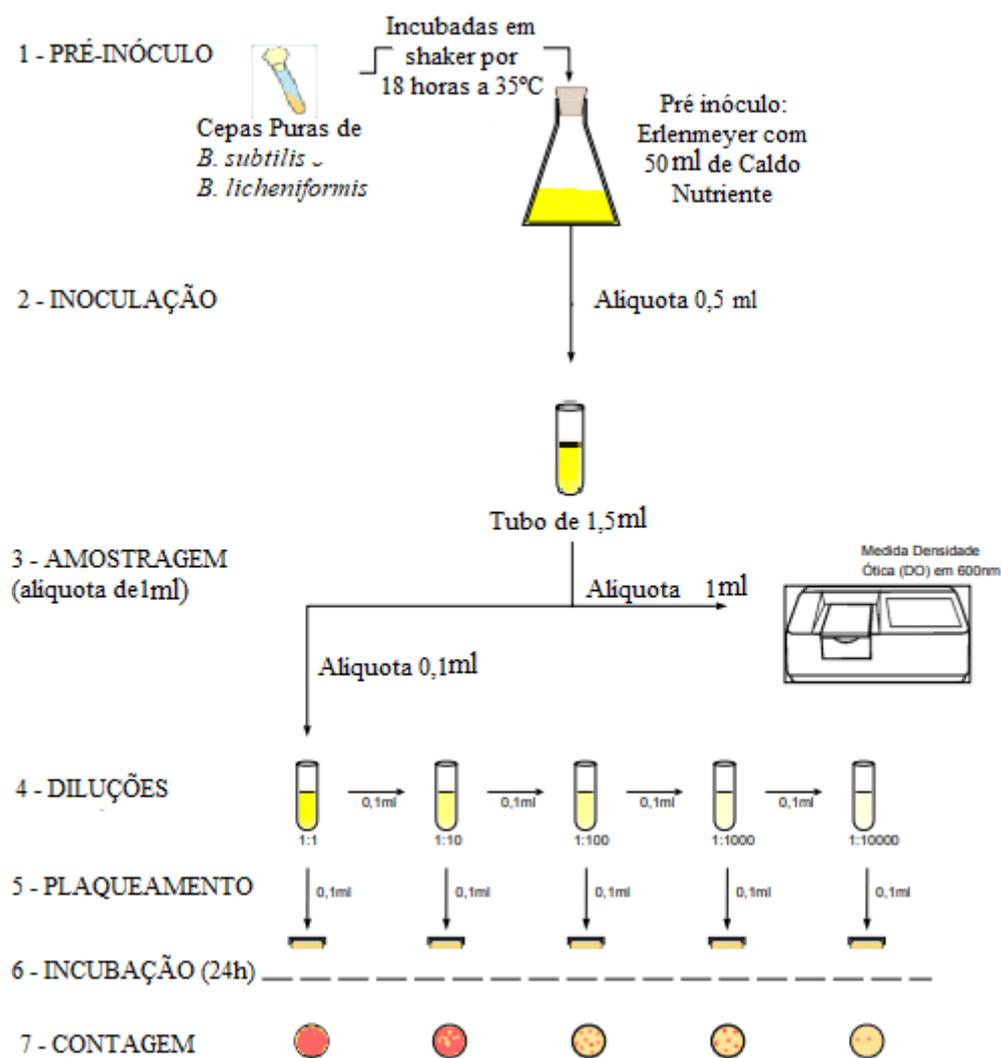


Figura 15: Fluxograma do experimento para obtenção de curva de crescimento. Adaptado de ASSIS et al. (2011) pelo autor.

As curvas de crescimento das bactérias foram construídas correlacionando os valores obtidos das densidades (UFC/ml) e turbidez (DO - Absorbância 600 nm), pelo tempo amostral.

2.2.3 Cálculo da Taxa de crescimento

Para cada curva de crescimento, considerando o crescimento bacteriano exponencial, foram aplicadas as fórmulas para o cálculo dos parâmetros de crescimento. Uma vez que o crescimento microbiano na fase exponencial ocorre em progressão geométrica, de base 2, o mesmo pode ser expressado pelas equações:

$$n = \frac{\log N_f - \log N_o}{\Delta t \times \log 2} \quad (1)$$

$$g = \frac{1}{n} \quad (2)$$

Onde:

N : número de geração no intervalo de crescimento exponencial;

n : taxa de crescimento bacteriano

N_o : número de células no tempo t_o ;

N_f : número de células no tempo t_f ;

g : tempo de geração da população celular;

t : tempo em horas ou minutos em que a cultura apresenta uma taxa de crescimento exponencial.

Dessa forma, conhecendo os parâmetros N_f e N_o , na fase de crescimento exponencial da cultura, é possível calcular n e, a partir de n e do tempo t , o tempo de geração g (tempo em que a população dobra ou tempo necessário para formar duas células a partir de uma) (MURRAY et al., 1980).

Também foi obtido outro índice relacionado à taxa de crescimento, a constante da taxa de crescimento, k . Esta constante é uma medida do número de gerações formadas numa população em crescimento exponencial, por unidade de tempo e pode ser expressa pela equação:

$$k = \frac{\ln 2}{g} \quad (3)$$

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Amostras microbiológicas – Inóculos

As cepas de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, mantidas congeladas no banco do Laboratório MICROMAR e avaliadas por densidade ótica e plaqueamento, se mostraram viáveis mesmo após amplo período de tempo (2 anos) de congelamento (congelamento de médio prazo com preservação em óleo mineral).

A viabilidade das cepas mantidas no Banco de Cepas possibilitou a realização dos experimentos para a obtenção de inóculos em densidade satisfatória para a realização dos experimentos e, conseqüente, para a determinação das curvas de crescimento, assim como para a obtenção dos parâmetros de crescimento (Figura 16).



Figura 16: Frasco de Erlenmeyer com *Bacillus subtilis*, após incubados em uma plataforma agitadora sob agitação contínua de 180 rpm, a 35°C, overnight (18h), para reativação. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

A avaliação das colônias, confirmou que as espécies de *B. subtilis* (Figura 17 A e B) e *B. licheniformis* (Figura 18 A e B), apresentaram viabilidade e estabilidade celular, mesmo após o congelamento. A coloração de Gram para avaliação microscópica mostrou que as cepas se mantiveram isoladas (puras).

Apesar de bastante utilizado o processo de congelamento de bactérias requer alguns cuidados para que a viabilidade e estabilidade celular não sejam afetados, no entanto, os danos celulares são decorrentes principalmente do processo de congelamento e

descongelamento. A lesão celular processo letal relacionado à formação de extensos cristais de gelo intracelular e estes são capazes de alterar as estruturas da membrana plasmática, modificando o fluxo de água para o meio extracelular (desidratação) e ao aumento da concentração intracelular de solutos (OLIVEIRA, 2008; CASTRO et al., 2011).

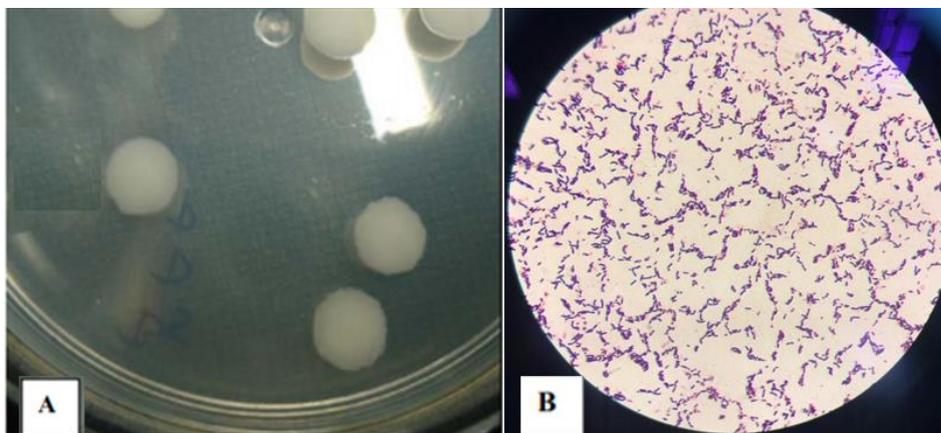


Figura 17: (A) colônia de *Bacillus subtilis* e (B) coloração de Gram de *Bacillus subtilis*. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

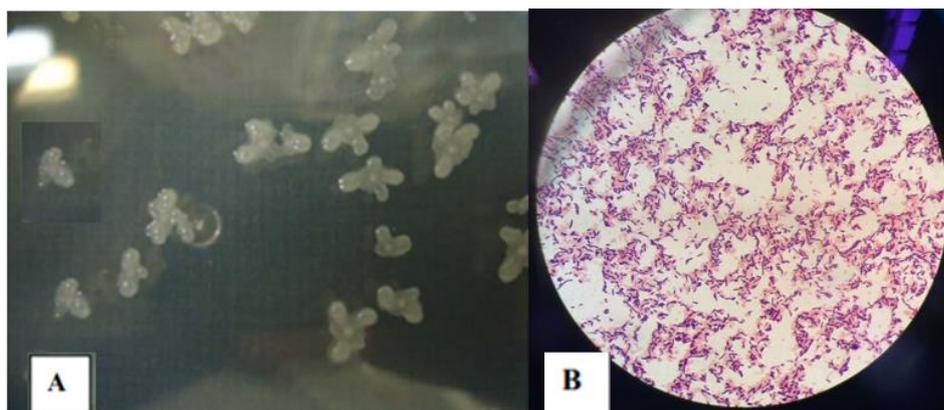


Figura 18: (A) colônia de *Bacillus licheniformis* e (B) coloração de Gram de *Bacillus licheniformis*. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

DUMONT et al., (2004) e COSTA et al., (2009) relataram que apesar da existência de diversas técnicas de manutenção de microrganismos, o princípio do congelamento-descongelamento se manteve entre os mais importantes e viáveis para a preservação células bacterianas.

2.3.2 Curva de crescimento

Na Tabela 1 são apresentados os resultados do crescimento de *Bacillus subtilis*, obtidos tanto através da absorbância (densidade óptica DO) quanto pela densidade (UFC/ml). A amostragem dos cultivos foi realizada durante 10 horas, com intervalo de 30 minutos no início e 1 hora até o final.

Tabela 1: Valores de Absorbância (DO) e da Densidade de bactérias (UFC/ml) durante o experimento do crescimento de *Bacillus subtilis*.

Tempo (h)	Densidade Óptica (DO) - Absorbância 600 nm	UFC/ml
0	0,068	1,03E+06
0,5	0,069	2,00E+06
1	0,072	1,60E+06
1,5	0,082	3,00E+07
2	0,092	4,00E+07
3	0,16	6,00E+06
4	0,251	5,00E+06
5	0,684	5,00E+07
6	0,955	6,00E+08
7	1,136	2,00E+09
8	1,194	4,00E+09
10	1,396	1,70E+10

Os valores de absorbância e de densidade de bactérias *B. subtilis* ao longo do período de experimento, foram utilizados para construção de curvas e obtenção dos parâmetros de crescimento (Figura 19).

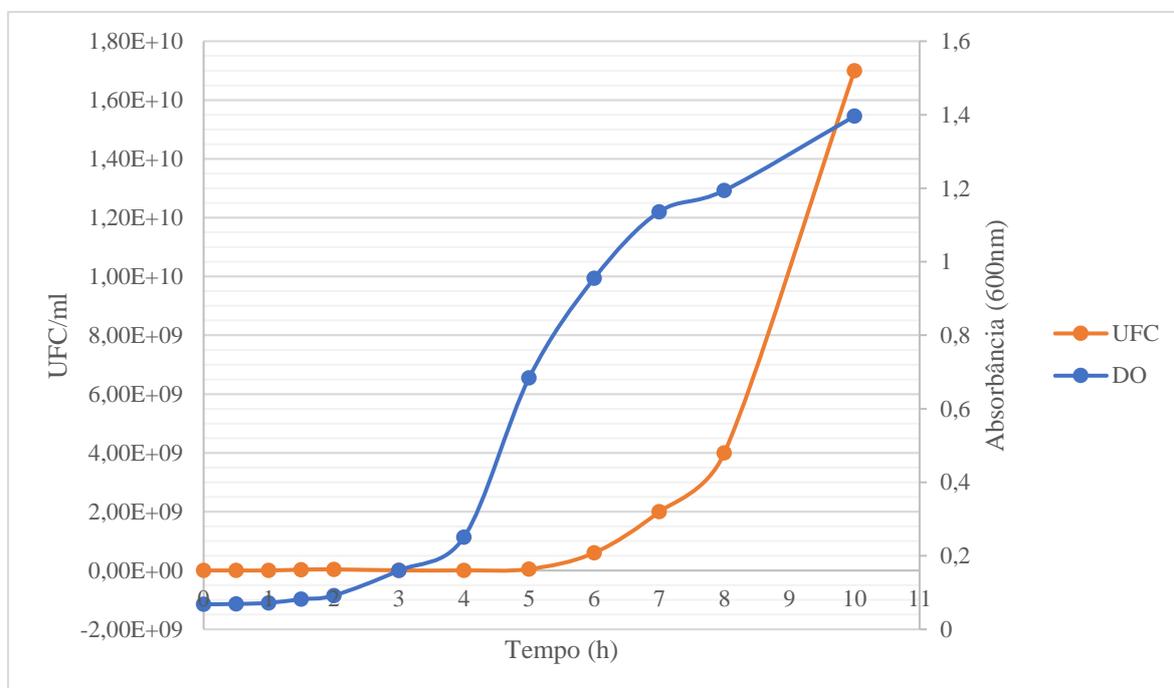


Figura 19: Curva de crescimento para *Bacillus subtilis*. UFC: Unidade Formadora de Colônia (Densidade bacteriana); DO: Densidade Óptica.

Observando a Figura 19 é possível notar que, aproximadamente 4 horas após a inoculação, o cultivo entrou em fase de crescimento exponencial (fase log).

A taxa de crescimento (k) obtida para *Bacillus subtilis* foi de $1,98 \text{ dh}^{-1}$ e o tempo de geração (g) de 0,35 horas ou 21 minutos. Isto significa que a cada 21 minutos a população dobrou de tamanho.

O crescimento de *Bacillus licheniformis*, avaliado tanto pela absorvância quanto pela densidade de células, pode ser observado na Tabela 2. A amostragem dos cultivos foi realizada durante 6 horas, com intervalo de 60 minutos.

Tabela 2: Valores de Absorvância (DO) e da Densidade de bactérias (UFC/ml) durante o experimento do crescimento de *Bacillus licheniformis*.

Tempo (h)	Densidade Óptica (DO) - Absorvância 600nm	UFC/ml
0	0,145	2,00E+06
1	0,157	1,30E+07
2	0,203	1,00E+08
3	0,323	2,00E+08
4	0,5	1,00E+08
5	0,837	6,00E+08
6	1,017	1,30E+09

Segundo Nicolau (2014) a fase estacionária é geralmente atingida quando uma população bacteriana atinge a densidade de 10^9 células por ml, o crescimento populacional exponencial cessa e em que o número de células resultantes da multiplicação iguala o número de células que morre, normalmente devido à falta de um composto ou elemento necessário ao seu metabolismo.

Os valores de absorvância e de densidade de bactérias *B. subtilis* ao longo do período de experimento, foram utilizados para construção de curvas e obtenção dos parâmetros de crescimento (Figura 20).

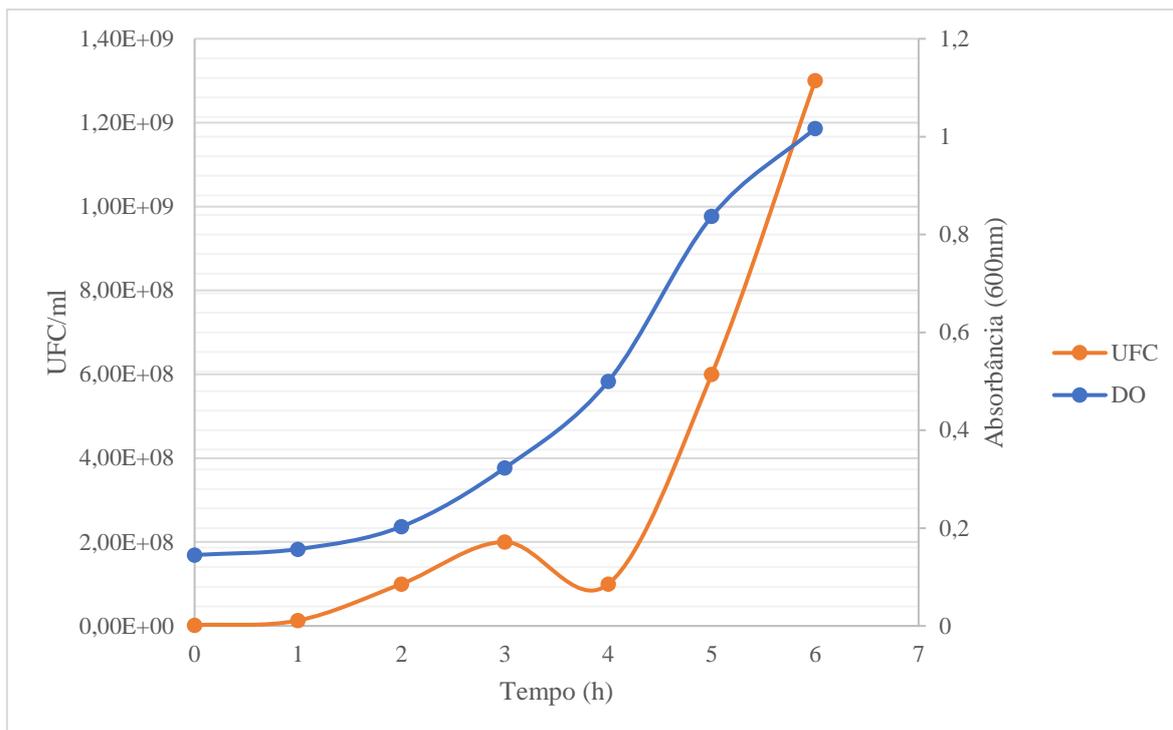


Figura 20: Curva de crescimento de *Bacillus licheniformis*. UFC: Unidade Formadora de Colônia (Densidade bacteriana); DO: Densidade Ótica.

A curva de crescimento de *B. licheniformis* (Figura 20) demonstra, que a fase exponencial de crescimento teve início após 4h de experimento.

Bacillus licheniformis apresentou tempo de geração de população (**g**) de 0,39 horas ou aproximadamente 23 minutos, o que significa que a cada 23 minutos a população dobra de tamanho. Já a taxa de crescimento (**k**) foi de $1,78 \text{ dh}^{-1}$.

Comparando ambas as curvas de crescimento obtidas por DO (Figura 21), é possível observar que *B. subtilis* e *B. licheniformis* apresentaram o mesmo padrão de comportamento (fases lag e exponencial) entrando na fase exponencial 4 horas após a inoculação do microrganismo.

A semelhança no padrão de crescimento de ambas as espécies, pode ser explicada por vários fatores tais como, condições de cultivo iguais, mesmo gênero bacteriano, mesmo local de origem, além de ambas terem a capacidade de formação de esporos, que, segundo (CANO et al., 1995), favorece que o crescimento ocorra de forma rápida.

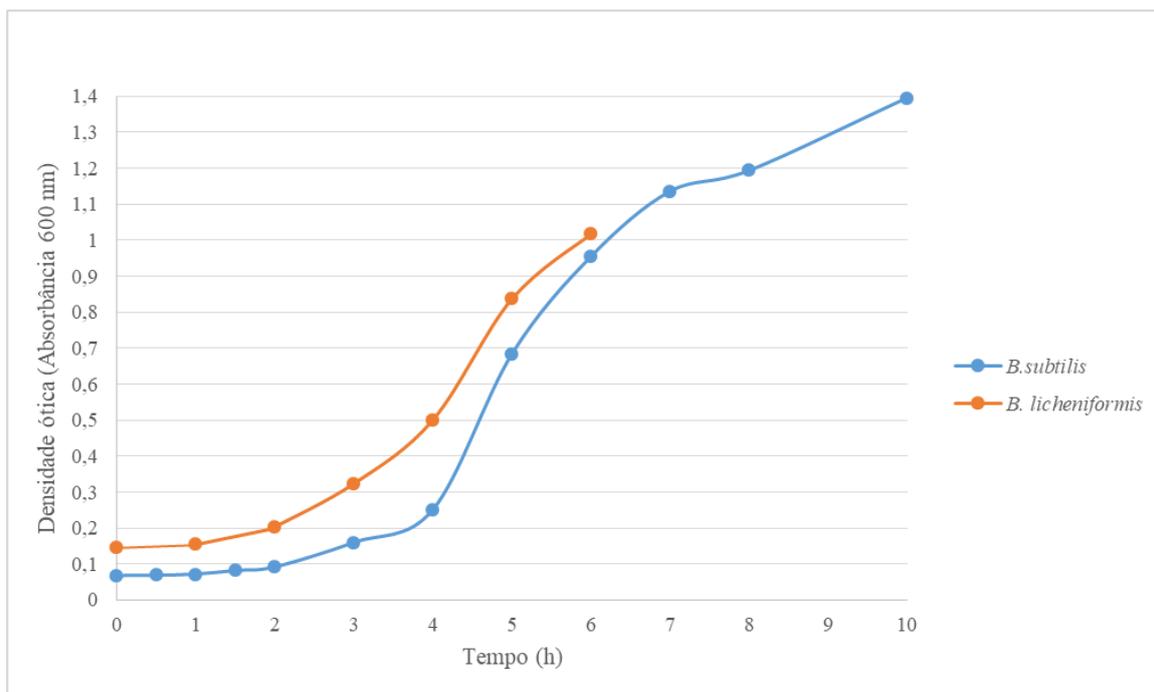


Figura 21: Comparação entre as curvas de crescimento por Densidade ótica de *B. subtilis* e *B. licheniformis*.

Os parâmetros cinéticos do crescimento de uma população bacteriana (tempo de geração e taxa de crescimento) são importantes, em estudos de caracterização de espécies ou estirpes de microrganismos, ou na avaliação dos efeitos de diferentes condições ambientais sobre o crescimento dos microrganismos (NICOLAU, 2014).

Segundo Tortora et al. (2005), a maioria das bactérias apresenta um tempo de geração de 60 a 180 minutos (1 a 3 horas), porém, pode ocorrer em 24 horas ou 20 minutos, dependendo do microrganismo em questão. Andrade (2015), obteve o tempo de geração entre 60 e 80 minutos/geração, de bactérias isoladas de sedimento de manguezal, na presença de BTEX, que reforça a ideia de um crescimento bacteriano típico.

O uso de cepas ambientais por já terem tido contato prévio com os contaminantes, quando inserido no ambiente para biorremediação, podem dar início ao processo de degradação imediatamente ou em poucas horas (ALISI et al. 2009). Deste modo as cepas de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, se destacam obtendo menores tempos de geração, apresentando potencial no contexto da biorremediação e para aplicação industrial.

2.4 Conclusão

A reativação das cepas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* após o congelamento em ultrafreezer -80°C foi eficiente. Os inóculos de *B. subtilis* e *B. licheniformis* apresentaram a densidade necessária para a realização dos experimentos, 10^6 UFC/ml, indicando que o processo de ultracongelamento permite manter a viabilidade de cepas ambientais para utilização em futuros estudos.

Por meio das curvas de crescimento indicaram que, *B. subtilis* e *B. licheniformis* foi possível verificar que as cepas apresentam uma taxa de crescimento e tempo de geração indicados para processos de biorremediação.

O rápido crescimento, em simples condições físico-químicas de cultivo e em meio de cultura de enriquecimento, sem grandes exigências nutricionais sendo, portanto, ótimas candidatas à utilização em processos industriais e/ou de biorremediação.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL S10 E AFFF POR BACTÉRIAS AMBIENTAIS

3.1 Introdução

A biodegradação consiste na eliminação de compostos orgânicos de um ecossistema pela atividade metabólica dos organismos presentes no local onde está a substância a ser biodegradada. A biodegradação por microrganismos é o melhor mecanismo para remoção de hidrocarbonetos poluentes do ambiente (JONES et al., 1970).

A biodegradação de hidrocarbonetos e a conversão para CO₂ envolve uma reação de oxidação, por isso, a maioria dos microrganismos que realizam esse processo são aeróbios (ROSATO, 1997). Entre eles, as bactérias são os agentes mais ativos neste processo e atuam como principais degradadoras em casos de derramamentos (RAHMAN et al., 2002; ROB et al., 2009).

Nos casos de derramamento de petróleo, a bioaugmentação é um dos recursos a ser utilizado para otimização da biodegradação no processo de descontaminação de uma área a ser biorremediada. A bioaugmentação consiste na adição de bactérias com potencial biodegradador de petróleo, afim de suplementar a microbiota local. A bioaugmentação tem várias vantagens em relação a outras técnicas. Quando uma população microbiana específica é injetada, o processo de degradação pode começar imediatamente (ALISI et al., 2009).

Para utilização de bioaugmentação devem ser realizados estudos prévios sobre os microrganismos a serem inseridos, pois os mesmos poderão desaparecer pela falta de nutrientes ou poderão permanecer na área, se adaptando as novas condições podendo, entretanto, provocar impactos ambientais ou a saúde humana (ALISI et al., 2009).

A utilização da bioaugmentação passou a ser permitida no Brasil em 2007, desde que sejam seguidas as normas pertinentes. No Estado de São Paulo, entre as normas a serem seguidas, destaca-se a norma técnica da CETESB nº L1.022, de junho de 2007, que trata sobre o uso de produtos biotecnológicos, constituídos de microrganismos, destinados ao tratamento de efluentes líquidos, de resíduos sólidos e à remediação de solos e de águas (CETESB, 2007).

3.1.1 Colorimetria – Indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol

Diferentes microrganismos são capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, sendo a Colorimetria com indicador redox DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol), (Quadro 3) (KUBOTA et. al., 2008) uma das técnicas para verificar essa capacidade, considerando que a reação de oxirredução é essencial para a biodegradação dos hidrocarbonetos.

Quadro 3: Propriedades do indicador redox 2,6- diclorofenol indofenol (DCPIP).

2,6- diclorofenol indofenol (DCPIP)	
λ máx.	600nm
Peso molecular	268,09g mol ⁻¹
Forma oxidada (DCPIP ox)	Azul
Forma reduzida (DCPIP red)	Incolor
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₇ Cl ₂ NO ₂

A técnica de colorimetria com uso de indicador redox DCPIP, está fundamentada na alteração de cor deste composto quando reduzido. Assim, quando o indicador DCPIP está oxidado (Figura 22) sua coloração é azul e, quando reduzido, torna-se incolor. Esta mudança de cor pode, portanto, ser utilizada em uma série de reações em que ocorram trocas de elétrons, como a biodegradação de compostos orgânicos (MARIANO et al., 2007; BIDOIA et al., 2010).

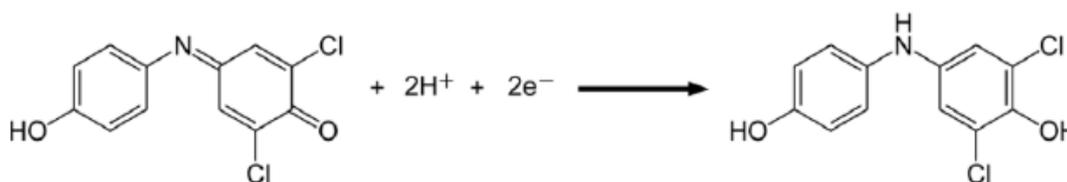


Figura 22: Reação do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol comceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre nitrogênio e carbono no centro da molécula é o aceceptor de elétrons, tornando-se uma ligação simples, modificando a estrutura da molécula (BIDOIA et. al., 2010).

Na técnica colorimétrica, as reações redox não estão associadas unicamente ao consumo de um substrato, mas sim ao metabolismo total das células. Desta forma, considera-se que o DCPIP realmente mede a resposta metabólica microbiana a um determinado substrato (contaminante) orgânico e/ou ambiente ao que é exposto (MONTAGNOLLI et al., 2017).

3.1.2 Teste de Biodegradação – Respirimetria

A respirometria é uma técnica que permite o acompanhamento indireto das atividades metabólicas realizadas pelos microrganismos, através da determinação do consumo de

oxigênio ou produção de dióxido de carbono, por unidade de volume e de tempo (BERNARDES e SOARES, 2005).

Entre as técnicas, a respirometria de Bartha e Pramer é uma das mais amplamente utilizada para avaliar processos de degradação de poluentes por microrganismos, em solos. Essa técnica mede a liberação de CO₂ por meio da sua captura por uma substância alcalina (Hidróxido de Potássio – KOH ou Hidróxido de Sódio) (MARIANI, 2005), tendo sido amplamente utilizada em trabalhos da comunidade científica brasileira que avaliaram a biodegradação de derivados de petróleo (LEI et al. 2005; MELLO, 2005; MARIANO, 2007; BIDOIA, 2010; MONTAGNOLLI et al., 2009; TAMADA, 2013; MONTAGNOLLI et al., 2015) biodiesel (OLIVEIRA et al., 2006) e compostos fenólicos (ALBURQUEQUE, 2000).

Uma das desvantagens da técnica de respirometria é que mesmo sendo realizada com misturas de contaminantes, é impossível prever qual contaminante da mistura está sendo metabolizado em determinado momento (BAKER e HERSON, 1994).

O objetivo deste capítulo é verificar por meio de teste de biodegradação – Respirometria de Bartha, o potencial das espécies *B. subtilis*, *B. licheniformis* e do consórcio entre ambas as cepas para biodegradar diesel S10 e substâncias presentes na espuma para combate a incêndios (AFFF).

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Contaminantes

3.2.1-1 Espuma de Controle de Incêndio - AFFF

Para os experimentos foi utilizado o líquido gerador de espuma (LGE) Sintex ®AFFF/ARC 3% e 6% fornecido pela empresa Kidde Brasil Ltda (Figura 23).



Figura 23: Embalagem da espuma de controle de incêndio – AFFF (LGE Kidde Sintex AFFF/ARC 3% e 6% fornecido pela empresa Kidde Brasil Ltda).

O Sintex® AFFF/ARC 3% x 6% deve ser misturado com água na proporção 97% de água para 3% de LGE quando utilizado para extinção de incêndios de derivados de petróleo, ou na proporção de 6% de LGE para 94% de água para extinção de incêndios de solventes polares. Sintex® AFFF/ARC é indicado para extinguir incêndios classe B, envolvendo derivados de petróleo como gasolina, querosene, óleo diesel, toluol, xilol, etc. e solventes polares, como álcool, acetona, éter etc. (KIDDE, 2021).

3.2.1-2 Diesel S10

Para os experimentos foram utilizado diesel S10 comercial, adquirido de bomba de combustível em Posto de Gasolina Petrobras.

Características do diesel S-10 da Petrobras (PETROBRAS, 2021):

- Baixo teor de enxofre: máximo de 10 mg/kg ou ppm (partes por milhão)
- Número de cetano mínimo de 48
- Faixa estreita de variação da massa específica (820 a 850 kg/m³)
- Curva de destilação com a temperatura dos 95% evaporados de no máximo 370°C.

3.2.2 Teste de capacidade de biodegradação pelas cepas – Método

Colorimétrico - DCPIP

O teste de viabilidade de biodegradação foi realizado pelo método colorimétrico usando o indicador redox DCPIP, considerando, a avaliação da descoloração visual, a análise do tempo de descoloração do meio, assim como a porcentagem de descoloração, medida por leitura da absorbância em 600nm.

A mudança de cor é devida à mudança na estrutura da molécula de DCPIP, assim, quando o indicador DCPIP está oxidado, sua coloração é azul e quando reduzido é incolor. Bactérias, ao apresentarem potencial em biodegradar uma substância, são capazes de alterar a estrutura de moléculas causando a mudança de cor de azul para incolor.

No presente trabalho, foram realizados testes prévios para constatar a capacidade das cepas selecionadas em biodegradar tanto diesel S10, quanto espuma de controle de incêndio (AFFF). Os testes foram realizados, empregando um controle com glicose (fonte de carbono de fácil assimilação) para verificar a capacidade das cepas em reduzir o DCPIP na presença de glicose.

3.2.2-1 Solução de indicador redox DCPIP

A solução do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) foi preparada na concentração de 1,00 g/L de acordo com estudos de Bidoia et al. (2010), Montagnolli et al. (2014). O armazenamento da solução de DCPIP 1,00 g/L foi realizado em frasco âmbar de vidro, ao abrigo de luz e a 4 °C em geladeira.

3.2.2-2 Meio de cultura Bushnell-Hass (BH)

O meio salino *Bushnell-Hass* (BH) foi preparado pela dissolução dos sais apresentados no Quadro 4 em 1,0 L de água destilada em balão volumétrico de mesmo volume.

Quadro 4: Composição do meio *Bushnell-Hass* no preparo de 1,0L

Composto	Massa (gr)	Composto	Massa (gr)
MgSO ₄	0,200	KH ₂ PO ₄	1,000
CaCl ₂	0,020	K ₂ HPO ₄	1,000
FeCl ₃	0,050	NH ₄ NO ₃	1,000

O método colorimétrico foi realizado segundo Hanson et al. (1993) e Bidoia et al. (2010), com adaptações. Os resultados consideraram a alteração da coloração do meio ao longo do tempo de incubação de 48 horas.

A descoloração do DCPIP, foi monitorada a cada 24 horas. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro Bel *spectrophotometer sp* 2000 UV/Vis (Figura 24), no comprimento de onda de 600 nm e convertidos em mg/L de DCPIP.



Figura 24: Espectrofotômetro Bel spectrophotometer sp 2000 UV/Vis, utilizado para as leituras do ensaio de colorimetria. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

Para a conversão da leitura de absorbância foi necessário estabelecer a reta padrão de DCPIP por meio de leituras de absorbância a 600 nm em concentrações diferentes da solução. A equação da reta de conversão absorbância para mg/L foi calculada conforme equação 1:

$$[\text{DCPIP}] = (15,92 \times \text{Abs}_{600\text{nm}}) + 2,21 \quad (1)$$

Onde:

[DCPIP]: Concentração do indicador redox DCPIP, em mg/L;

Abs_{600nm}: Absorbância no comprimento de onda 600nm.

A descoloração foi avaliada em termos de porcentagem (%), de acordo com a equação 1.

$$\text{Porcentagem da Descoloração (PD\%)} = \frac{C_F}{C_I} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C_I: Concentração inicial do DCPIP no ensaio (mg/L);

C_F: Concentração final do DCPIP no ensaio (mg/L);

3.2.2-3 Montagem dos ensaios

Os testes de colorimetria foram conduzidos em triplicata utilizando tubos de ensaio com tampa. Os inóculos utilizados foram reativados de acordo com o item 2.2.2, do capítulo anterior. Como fonte de carbono, foram adicionados Diesel S10 ou espuma de controle de incêndio (AFFF). A composição dos ensaios encontra-se detalhada na Tabela 3.

Tabela 3: Composição dos tubos dos testes colorimétricos, realizados em triplicata (BH: meio de cultura Bushnell-Hass; DCPIP: Indicador 2,6-diclorofenol-indofenol; E: Espuma de controle de incêndio – AFFF; D: Diesel S10).

	Meio	Reagente	Bactérias (10 ⁶ - UFC/ml) (µl)		Fonte de Carbono	
	BH (ml)	DCPIP (µl)	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	AFFF (µl)	Diesel S10 (µl)
AFFF	7,5	400	100	-	50	-
	7,5	400	-	100	50	-
S10	7,5	400	100	-	-	50
	7,5	400	-	100	-	50
Controles	7,5	400	-	-	-	-
	7,5	400	100	-	-	-
	7,5	400	-	100	-	-
	7,5	400	-	-	50	-
	7,5	400	-	-	-	50

3.2.3 Teste de Biodegradação – Respirometria de Bartha

Para realização dos testes de biodegradação por respirometria foi necessário o uso de um sedimento de referência o qual foi obtido a partir de coletas em uma área controle, apresentada a seguir, já referenciada para a realização de experimentos e que não foi atingida pelo incêndio e pelo efluente da espuma.

O uso de um sedimento controle, de unidade de conservação, livre de contaminação, permitiu um maior controle dos contaminantes e das concentrações inseridos durante a realização dos testes de biodegradação.

3.2.3-1 Sedimentos para biodegradação

As amostras de sedimentos para os experimentos foram coletadas no Rio Itaguapé, no município de Bertioga na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, que está localizado na Unidade de Conservação (UC) do Parque Estadual Restinga de Bertioga (PERB) (Figura 25).

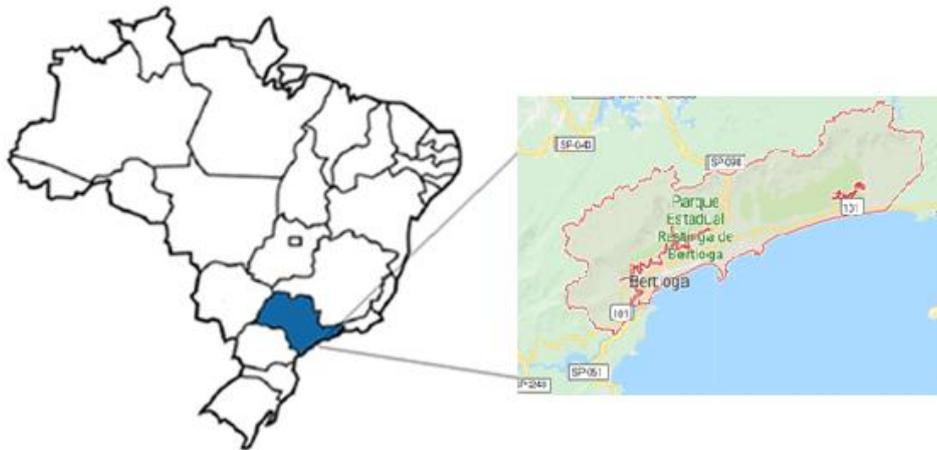


Figura 25: Mapa do Brasil, mostrando, em azul o Estado de São Paulo e a localização do município de Bertioga - SP. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

O Rio Itaguapé possui extensão de 12,5Km, sendo classificado como classe II de acordo com CONAMA274/2000. Não é receptor de nenhum efluente proveniente de estação de tratamento tem sua qualidade microbiológica classificada como excelente (CETESB, 2000).

As amostras de sedimento foram coletadas no ponto de coordenadas 23.780027S, 45.972731W, (Figura 26) na região da barra do estuário, que mostrou salinidade variável entre 0 e 35, de acordo com o regime de chuvas e marés. Quanto à granulometria, os sedimentos da região da barra apresentaram predominância de areia fina e, em menor proporção, de areia muito fina, com alto grau de seleção do material presente (BARALDO, 2018).



Figura 26: Imagem mostrando a área do ponto de coleta (A) de sedimento no estuário de Itaguapé município de Bertioga –SP. Fonte: Google, 2018.

As amostras de sedimento foram coletadas utilizando uma pá estéril, acondicionadas em sacos estéreis e armazenadas sob refrigeração. Durante a coleta foi determinada a temperatura, salinidade e pH do ponto de coleta utilizando sonda multiparâmetro (marca Horiba, modelo U-50 Series).

Capacidade de campo do sedimento

Para determinação da capacidade de campo do sedimento a ser utilizado nos Testes de Biodegradação (Respirometria de Bartha), foi avaliada a quantidade de água presente no mesmo, através da diferença entre o peso do sedimento seco e do sedimento úmido.

As amostras de sedimento coletadas foram colocadas em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 24h após as quais foram retiradas da estufa e resfriadas em dessecador. Após permanecer no dessecador, as amostras de sedimento foram novamente pesadas.

Após a pesagem, o sedimento foi colocado em um funil acoplado a um frasco Erlenmeyer ao qual foi adicionada água destilada estéril até haver a saturação do mesmo. A capacidade de campo foi calculada pela diferença de peso entre o sedimento encharcado (100% de água) e do sedimento seco.

Análise granulométrica do sedimento

Foi realizada análise granulométrica do sedimento aplicando o método de peneiramento descrito por Suguio (1973).

Porcentagem de matéria orgânica (MO)

A determinação do teor de matéria orgânica foi realizada pelo método gravimétrico, segundo Wetsel e Likens (1991). As amostras foram resfriadas em dessecador por 1 hora, de modo de minimizar a possível interferência da umidade do ar. As amostras 0,1 g foram colocadas em cadinhos, pesadas e, em seguida, colocadas na mufla a de temperatura de 550°C , por 4 horas. O resfriamento foi feito no dessecador por 2 horas e transcorrido este tempo, os cadinhos foram pesados novamente. O teor de matéria orgânica foi determinado através da diferença entre o peso seco do sedimento e o peso após a ignição, considerando o peso seco (% PS), conforme a equação abaixo.

$$\% \text{ M.O.} = [(\text{Peso seco g} - \text{Peso após Ignição g}) \times 100] / \text{Peso Seco g} \quad (3)$$

Carbono orgânico (CO)

A análise do percentual de carbono orgânico no sedimento foi realizada a partir da oxidação com dicromato de potássio, ataque com ácido sulfúrico e posterior titulação do dicromato excedente da oxidação com sulfato ferroso amoniacal, conforme Gaudette et al. (1974).

O método baseia-se na oxidação (exotérmica) com dicromato de potássio e ácido sulfúrico concentrado. A quantidade de dicromato consumido na oxidação do carbono orgânico foi determinada titulando-se o excesso de dicromato com sulfato ferroso amoniacal.

O carbono orgânico total (CO) foi determinado segundo a Equação 4:

$$[\%CO] = V \times [1 - (T/T_{Br})] \times 0,003 \times N \times (100/m) \quad (4)$$

Onde:

V: volume de dicromato utilizado, em ml;

N: normalidade do dicromato;

T: volume de sulfato ferroso gasto na amostra, em ml;

T Br: volume de sulfato ferroso gasto no branco, em ml;

M: massa da amostra de sedimento, em gramas.

Nitrogênio orgânico (NO)

Para determinação do NO total presente nas amostras foi pesado 1 g do sedimento coletado e colocado em tubo de digestão de 100 ml. Foram adicionados 300 mg da mistura de K₂SO₄ — catalisadores (composta por: 100 g de K₂SO₄ (ou Na₂ SO₄), 10 g de CuSO₄.5E1201 1g de selênio) e 10 ml de ácido sulfúrico concentrado. O composto foi mantido em ebulição até que o extrato ficasse claro, providenciando a exaustão dos gases que se desprenderam no processo. Após a digestão e esfriamento, o material foi transferido para balão de Kjeldahl de 500 ml, adicionando cerca de 150 ml de água destilada e uma pequena quantidade de pedra-pomes. A saída do destilador foi mergulhada em um copo de 400 ml, contendo 50 ml de ácido bórico 2 % com quatro gotas do indicador misto. Foram adicionados 50 ml de NaOH 40 % ao balão. Foi realizada a destilação até coletar 100 ml da solução destilada (perfazendo aproximadamente 150 ml). Foi realizada a titulação da solução obtida até com HCl 0,02N até desaparecimento da coloração azul. Ainda foram realizadas provas de brancos completas cada vez que novos reagentes e soluções foram utilizados, descontando esses resultados das determinações feitas em solos (CETESB, 2009).

$$N\% = (V_{HCl} \times N_{HCl} \times 0,014 \times 100) / p \quad (5)$$

Onde:

V_{HCl}: volume (ml) de HCl 0,02N gasto na titulação;

N_{HCl}: normalidade do HCl = 0,02;

p: peso da amostra.

Teor de fósforo

O teor de fósforo total foi medido segundo metodologia descrita por Jaramillo (1996), com algumas modificações, visando adequar o método ao tipo de solo estudado.

Foram pesados 13 gramas de solo e adicionados 90 ml de solução extratora, contendo fluoreto de amônio 1 N em solução ácida diluída (HCl). Este procedimento teve por finalidade extrair do solo as formas de fósforo facilmente solúveis em meio ácido, assim como grande parte dos fosfatos de cálcio e uma fração dos fosfatos de alumínio e ferro, devido à formação de complexos com os íons metálicos quando se encontram em solução ácida. Em geral, esse método permite a obtenção de bons resultados em solos ácidos, neutros e ligeiramente alcalinos (JARAMILLO, 1996).

Após um período de 24 horas de contato entre o solo estudado e a solução extratora, o extrato obtido foi centrifugado e posteriormente filtrado em membrana Millipore (0,45 µm de porosidade). Em seguida, foram adicionados a 35 ml do extrato, 10 ml de uma solução de molibdato vanadato (1 N) completando o volume de 50 ml de solução. Após 10 minutos, foi feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. A concentração de fósforo total foi obtida de acordo com curva-padrão previamente preparada, empregando-se KH₂PO₄ como solução padrão. O teor de fósforo foi calculado de acordo com a Equação 6.

$$P = \left(\frac{C_{extrato} \times V_{extratora}}{M_{solo} \times 1000} \right) \quad (6)$$

Onde:

P: teor de fósforo no solo [g/kg]

C_{extrato}: concentração de fósforo total [mg/L]

V_{extratora}: volume utilizado da solução extratora [ml]

m_{solo}: massa de solo [g]

1000: fator de conversão

Caracterização Microbiológica do Sedimento

Para avaliar a qualidade microbiológica do sedimento foram utilizadas como bioindicadoras as densidades de *Escherichia coli* e de *Enterococcus* spp, de acordo com a Resolução CONAMA 274/00. As amostras foram processadas segundo Oliveira & Pinhata (2008) utilizando a técnica de membrana filtrante (APHA, 2012), utilizando a membrana de 0,45µm de porosidade.

Para avaliação das colônias de *E. coli*, após a filtração das amostras, as membranas foram depositadas em placas contendo meio de cultura ágar mTec, e incubadas a 35± 2°C por 2 h, e posteriormente colocadas em banho-maria a 44,5 °C por mais 22h. Após a incubação foi realizada a identificação e contagem das colônias. Aquelas que apresentaram coloração amarelada foram consideradas colônias de *E. coli* e submetidas a teste confirmatório em substrato de uréia. As densidades foram expressas em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g).

Para avaliação das colônias de *Enterococcus*, após a filtração, as membranas foram depositadas em placas contendo meio de cultura ágar mEnterococcus, e incubadas em estufa bacteriológica 35 ± 2°C por 48h. Após a incubação, as colônias de coloração vermelho-marrom foram consideradas positivas, e foram submetidas a confirmação em Caldo Enterococosele. As densidades foram expressas em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g).

3.2.3-2 Teste de Biodegradação – Respirimetria de Bartha - método por condutividade

No presente trabalho foi utilizada a metodologia de respirometria de Bartha e Pramer (1965), por condutividade (STROTMANN et al., 2004; FARIA e DE ANGELIS, 2014) adaptada por Uemura et. al. (2013), de acordo com instrução da OECD 307 (2002) adaptado. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Industrial da Prof^a Dr^a Dejanira de Franceschi Angelis do Instituto de Biociências da UNESP – Câmpus Rio Claro.

Essa metodologia permitiu extrair, por meio da medida de condutividade, informações a respeito das concentrações de CO₂ na atmosfera criada no interior do respirômetro, como evidência indireta de biodegradação de compostos orgânicos (Figura 27). Dentro do sistema fechado foram quantificados o oxigênio consumido e o gás carbônico produzido durante a biodegradação.

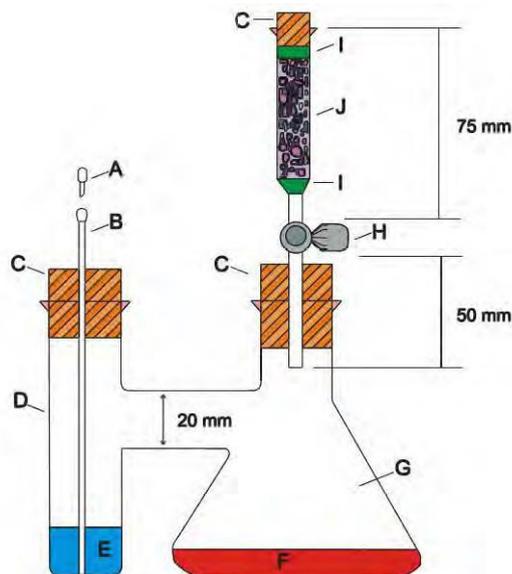


Figura 27: Esquema representativo da montagem utilizada para realizar os experimentos de respirometria. A: Tampa da cânula; B: Cânula; C: Rolha de borracha; D: Braço lateral; E: Solução de KOH; F: Sedimento para o teste de biodegradação; G: Frasco erlenmeyer (250 ml); H: Válvula; I: Suporte (algodão); J: Filtro de cal sodada (ascarita).

O CO_2 decorrente da biodegradação aeróbica da matéria orgânica presente em cada respirômetro (cada teste) foi capturado pela solução de KOH (10ml; 0,2N) localizada no braço lateral do respirômetro. A solução teve sua condutividade medida usando um condutivímetro TecnoPON CA150 previamente calibrado e seco.

Para transformar os valores de condutividade medidos em mS para μmol de CO_2 , foi utilizada a equação da curva de calibração de Uemura et al. (2013) (Figura 28

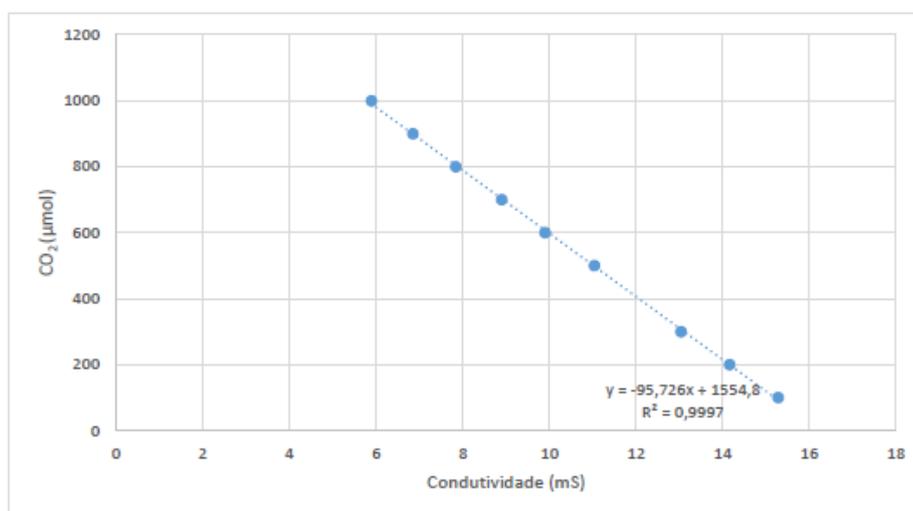


Figura 28: Curva de calibração de CO_2 em função da condutividade em solução 0,2M de KOH. Fonte: Uemura et al. (2013).

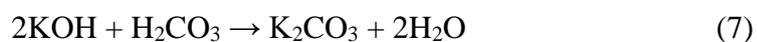
Todos os respirômetros foram hermeticamente fechados e incubados a 28°C durante todo o experimento. Periodicamente, a partir de cada respirômetro, foram coletadas amostras com uso de uma seringa estéril. A quantidade de gás carbônico nas seringas foi mensurada

por condutividade como descrito acima. Durante este procedimento os respirômetros foram aerados durante 1,5 minutos através dos filtros de ascarita, com a utilização de um compressor de ar (Vetec PA) localizado na parte superior dos respirômetros (Figura 29). Após processo de purga, a solução de KOH foi substituída por uma nova.



Figura 29: Sistema de renovação do ar através da utilização de um compressor de ar e um filtro de cal sodada (Vetec PA). Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

O teste de respirometria baseou-se na reação de óxido-redução que ocorre no braço lateral do respiromêtro descrita na equação 7, a seguir:



Ao observar a estequiometria da reação, nota-se que 0,2M de KOH geram 0,1 M de K_2CO_3 sendo que, à medida que ocorre o aumento de CO_2 proveniente da atividade microbiana (reativo), há um aumento da quantidade de sal na solução (deslocamento da reação para produtos para manter o equilíbrio), diminuindo a quantidade de KOH na solução e conseqüentemente a condutividade, dada a correlação linear inversa entre ambos parâmetros. Desta forma, quando a condutividade é máxima (cerca de 14,75 mS) a concentração de CO_2 é mínima, e quando a condutividade é mínima (cerca de 6,02 mS) a concentração de CO_2 é máxima.

Montagem do Teste de Biodegradação

Os experimentos de biodegradação foram realizados em triplicata (3 respirômetros) para cada tratamento. Em cada respirômetro foram colocados 50g de sedimento não esterilizado e água destilada estéril, no volume determinado pela capacidade de campo.

Foram realizados três grupos de experimentos: tratamentos com Espuma AFFF a diferentes concentrações (12 tratamentos), tratamentos com Diesel S10 a diferentes concentrações (9 tratamentos) e 11 tratamentos controle, incluindo controles para sedimentos, contaminantes e cepas, e um branco. No total foram avaliados 32 tratamentos, totalizando 96 amostras. Cada grupo de tratamentos está detalhado nos itens a seguir.

Nos tratamentos que receberam inóculos, *B. subtilis* e/ou *B. licheniformis* foram acrescentados aos respirômetros a uma concentração final de 10% (Figura 30).

Os experimentos foram mantidos por 120 dias, conforme instrução da OECD 307 (2002), para que pudesse ser avaliada a biodegradação no tempo máximo estabelecido pela OECD.



Figura 30: Garrafa de respirometria de Bartha, montada com 50 gramas de Sedimento + Contaminante + 10% de Inóculo. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

Tratamentos com espuma de controle de incêndio (AFFF)

Nos tratamentos realizados com espumas de controle de incêndio, foram avaliadas quatro diferentes concentrações da mesma: 1,5%, 3%, 4,5% e 6%, sendo que 3% e 6% são as concentrações comerciais. Os respirômetros com as diferentes concentrações foram inoculados com *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou com consórcio de ambas cepas (Figura 31).

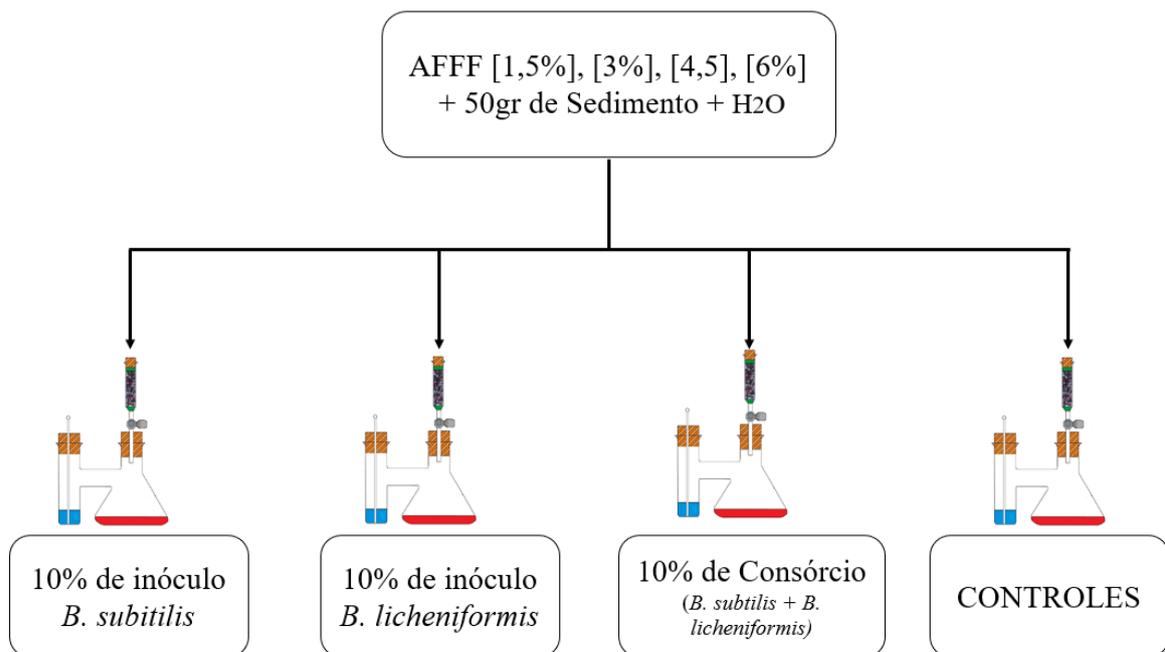


Figura 31: Composição do teste de biodegradação – Respirometria de Bartha para a espuma de controle de incêndio – AFFF. Elaborado pelo autor.

Tratamentos com Diesel S10

Nos tratamentos realizados com diesel S10, foram avaliadas três diferentes concentrações: 2,5%, 5% e 7,5%, sendo 5% a comumente utilizada em testes de biodegradação. Os respirômetros com as diferentes concentrações foram inoculados com *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou com consórcio de ambas cepas (Figura 32).

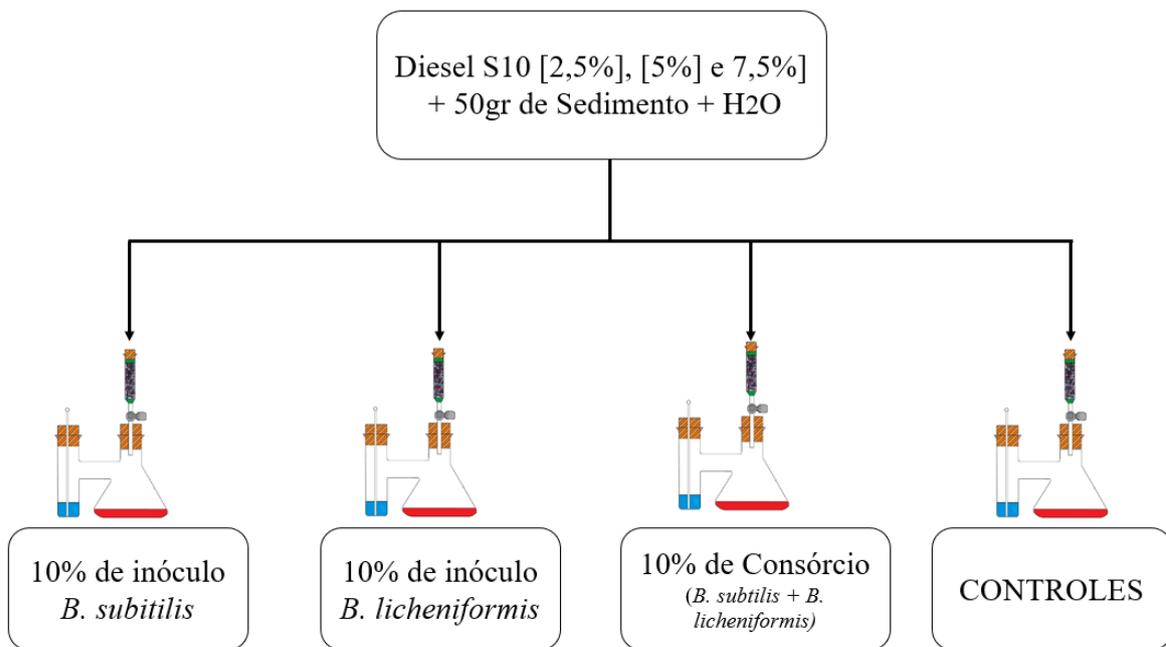


Figura 32: Composição do teste de biodegradação – Respirometria de Bartha para diesel S10. Elaborado pelo autor.

Tratamentos Controles

Para avaliação dos experimentos foi necessário a montagem de tratamentos controles para o sedimento, para os contaminantes (espuma de controle de incêndio – AFFF e diesel S10) nas concentrações estudadas, assim como para as espécies utilizadas e seu consórcio (Figura 33).

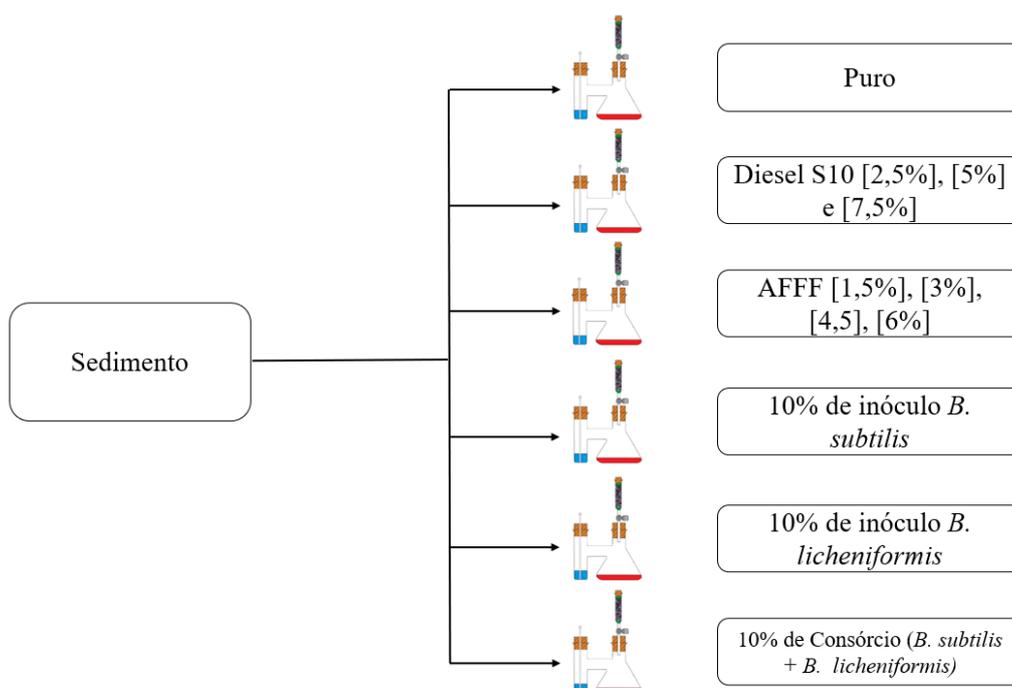


Figura 33: Composição do teste de biodegradação – Respirometria de Bartha para os controles. Elaborado pelo autor.

Modelagem Matemática

Cada tratamento foi realizado em triplicata. Para obtenção da produção média em cada respirômetro, foi calculada a média aritmética das três réplicas que receberam o mesmo tratamento.

Para cálculo da Produção Média Acumulada, foi realizada a soma dos valores médios obtidos em cada medição. A produção efetiva de CO₂ foi obtida subtraindo-se a produção nos respirômetros submetidos aos tratamentos, da produção nos respirômetros controle.

De acordo com a Norma ABNT 14.283, DE 1999, admite-se que metade da quantidade de carbono que é biodegradado é convertida em CO₂ e os outros 50% incorporam-se ao solo na forma de biomassa, a quantidade total de carbono biodegradado foi calculada pela Equação 8:

$$C_b (\mu molC) = \times CO_{2b} \mu molCO_2 \quad (8)$$

Onde:

C_b (μmolC) = μmols de Carbono biodegradados;

CO_{2b} (μmolCO_2) = μmols de CO_2 produzidos.

3.2.4 Densidades Bacterianas

As densidades bacterianas viáveis no início e ao final dos testes de respirometria foram avaliadas pela técnica “*Pour Plate*” utilizando o meio de cultura Ágar Nutriente, temperatura de incubação de $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e período de 24 a 72h (Standard Methods for examination of water and wastewater Analysis APHA, 2012).

As densidades consideradas como iniciais para os testes de biodegradação foram aquelas densidades dos inóculos das espécies de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Ao final dos experimentos de respirometria, foram determinadas as densidades de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* em todos os tratamentos com bioaumentação, ou seja, tanto nos experimentos com uma única espécie quanto naqueles com o consórcio das duas cepas. As densidades bacterianas também foram determinadas nos ensaios de controle com sedimento em todas as concentrações utilizadas para os dois contaminantes.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Teste de capacidade de biodegradação das cepas – Método Colorimétrico – DCPIP

No teste de avaliação visual realizado tendo a glicose como fonte de carbono de fácil assimilação, foi observado que, após o período de incubação de 24 horas, o DCPIP foi reduzido nos tubos com a presença de bactérias, evidenciado pela ausência de coloração azul (Figura 34B).

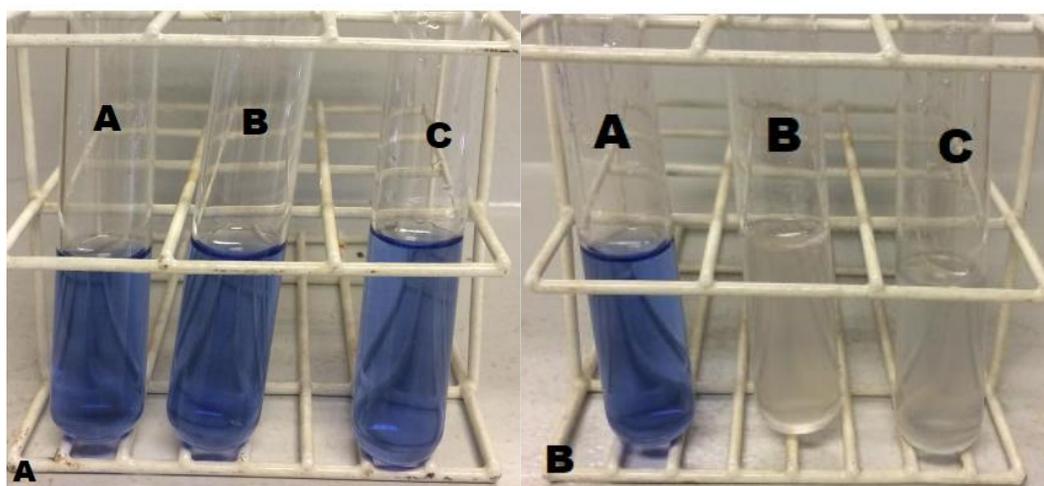


Figura 34: Teste de capacidade de biodegradação das cepas em meio com DCPIP e glicose: **A:** tubo A: DCPIP em BH e Glicose; tubo B: contém *B. subtilis* + DCPIP em BH + Glicose e o tubo C: *B. licheniformis* + DCPIP em BH + Glicose; **B:** tubos após incubação de 24 horas. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

Em relação aos valores de absorbância obtidos, ele foi o mesmo para *B. subtilis* e *B. licheniformis* (aproximadamente 30%), enquanto que, para o controle (DCPIP em BH + glicose) a porcentagem foi de aproximadamente 8% (Figura 35). Estes resultados confirmaram a capacidade das cepas e seu potencial de consumir fontes de carbono.

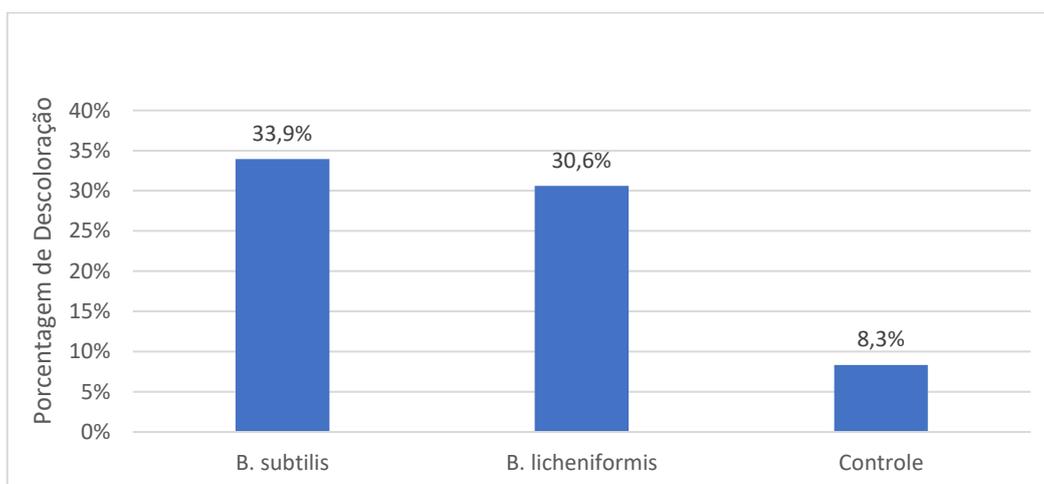


Figura 35: Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com glicose como fonte de carbono, por 24 horas. **Controle:** DCPIP em BH e Glicose; ***B. subtilis*:** *B. subtilis* + DCPIP em BH + Glicose; ***B. licheniformis*:** *B. licheniformis* + DCPIP em BH + Glicose.

Uma vez confirmado o potencial das cepas para degradar fontes de carbono, foi realizado o teste de viabilidade de biodegradação da espuma de controle de incêndio - AFFF e do diesel S10.

Na Figura 36 pode se observar o resultado do teste para a cepa *B. subtilis* na presença da espuma de controle de incêndio - AFFF ou diesel S10 (1% (v/v)).

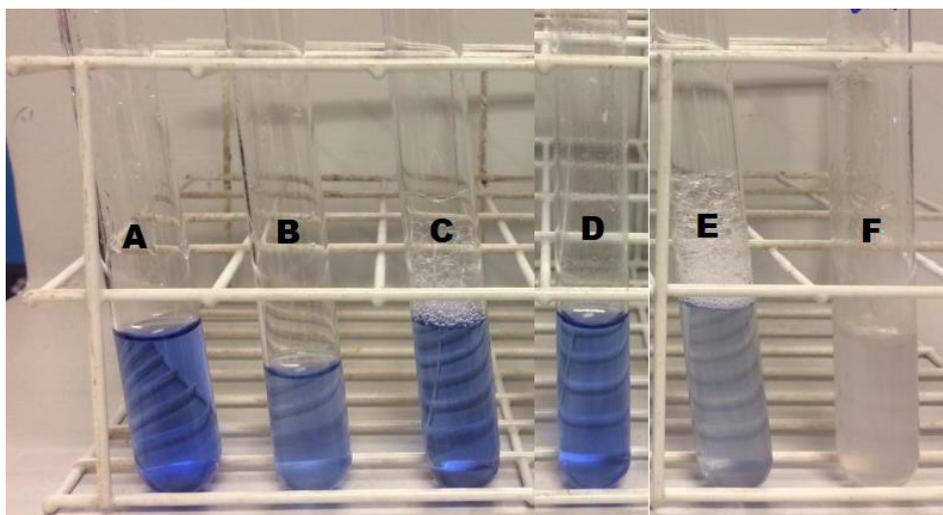


Figura 36: Resultado do teste de capacidade de biodegradação de *B. subtilis* utilizando AFFF ou diesel S10 como fonte de carbono. Tubo A: DCPIP em BH, tubo B: *B. subtilis* + DCPIP em BH, tubo C: AFFF + DCPIP, tubo D: diesel S10 + DCPIP em BH, tubo E: AFFF + *B. subtilis* + DCPIP em BH; e tubo F: diesel S10 + *B. subtilis* + DCPIP em BH. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

Nota-se que, após o período de incubação de 48 horas, os tubos E e F, que contém *B. subtilis* e um dos contaminantes como fonte de carbono, apresentam descoloração, sendo mais evidente a descoloração no tubo contendo diesel.

As porcentagens de descoloração nos testes contendo *B. subtilis* e em presença dos contaminantes como fonte de carbono foram de, 13,5% para a espuma e de 17,7% para o diesel. As menores porcentagens de descoloração após 48 horas foram observadas nos controles, apresentando valores de 5,9% para espuma + DCPIP em BH, 4,1% para diesel + DCPIP em BH, e 4,7% para *B. subtilis* sem fonte de carbono (Figura 37).

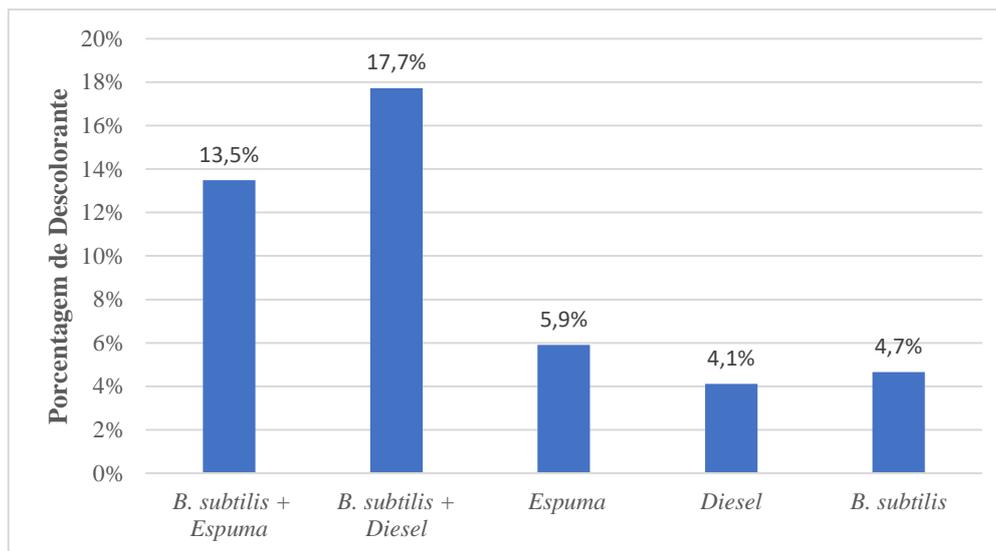


Figura 37: Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com a cepa *Bacillus subtilis* e os contaminantes após 48 horas. ***B. subtilis* + Espuma**: AFFF+ *B. subtilis* + DCPIP em BH; ***B. subtilis* + diesel S10**: diesel S10 + *B. subtilis* + DCPIP em BH; **Espuma**: AFFF +DCPIP em BH; **Diesel**: diesel S10 + DCPIP em BH; ***B. subtilis***: *B. subtilis* + DCPIP em BH.

O teste com *Bacillus subtilis* apresentou maior porcentagem de descoloração (17,7%) para o diesel S10 1% (v/v), resultado que se mostrou coerente com estudos prévios como o de Montagnolli et al. (2009). Estes autores comprovaram através da técnica colorimétrica de DCPIP, a eficiência de *B. subtilis* em biodegradar biodiesel e óleos vegetais.

Adicionalmente, Prathyusha et al. (2016) que testaram a biodegradação de hidrocarbonetos com concentrações entre 0,5 a 1,5% e Kwapisz et al. (2008) que testou a degradação de óleo diesel 6%, também observaram tal capacidade de degradação por diferentes microrganismos.

Na Figura 38 é possível observar os resultados do teste colorimétrico para a cepa *B. licheniformis* na presença da espuma AFFF ou diesel S10.

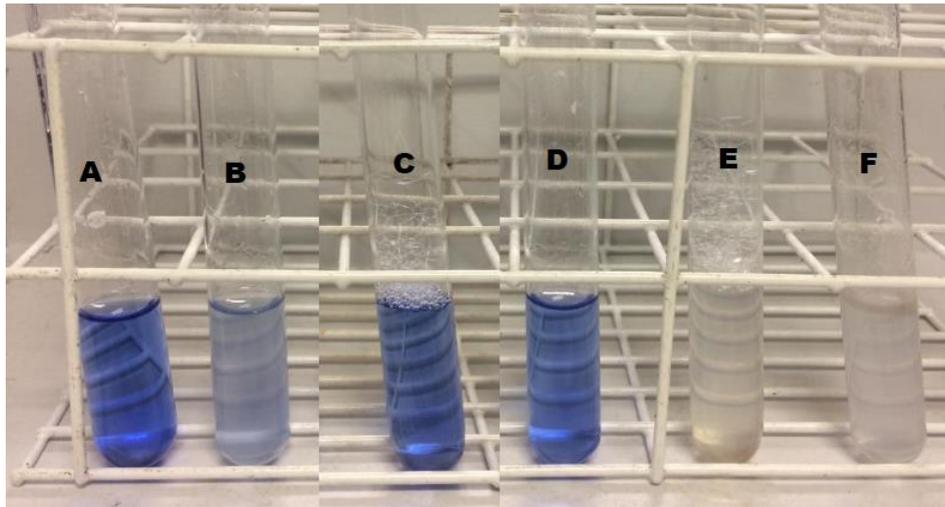


Figura 38: Resultado do teste de capacidade de biodegradação de *B. licheniformis* utilizando AFFF ou diesel S10 como fonte de carbono. Tubo A: DCPIP em BH, tubo B: *B. licheniformis* + DCPIP em BH, tubo C: AFFF +DCPIP, tubo D: diesel S10 + DCPIP em BH, tubo E: AFFF+ *B. licheniformis* + DCPIP em BH; e tubo F: diesel S10 + *B. licheniformis* + DCPIP em BH.

Observando a Figura 38 é possível notar que, após o período de incubação de 48 horas, os tubos E e F, que contém *B. licheniformis* e um dos contaminantes como fonte de carbono, carecem de coloração, tanto no tubo contendo AFFF como diesel. Quando comparado ao teste realizado com *B. subtilis* (Figura 36), *B. licheniformis* parece ter melhor capacidade para reduzir o DCPIP após o período de incubação de 48 horas.

A porcentagem de descoloração da cepa em presença dos contaminantes como fonte de carbono foi de 26,5% para a espuma e 11,4% para o diesel.

As menores porcentagens de descoloração após 48 horas foram observadas nos controles, apresentando valores de 5,9% para espuma + DCPIP em BH, 4,1% para diesel + DCPIP em BH, e 4,2% para *B. licheniformis* sem fonte de carbono (Figura 39).

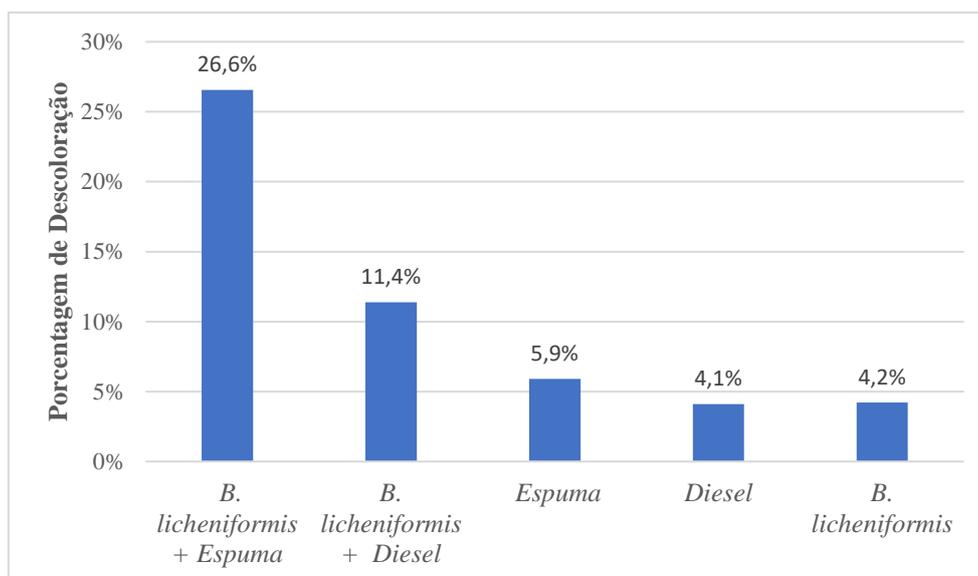


Figura 39: Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com a cepa *Bacillus licheniformis* e os contaminantes após 48 horas. **B. licheniformis + Espuma**: AFFF+ *B. licheniformis* + DCPIP em BH; **B. licheniformis + diesel S10**: diesel S10 + *B. licheniformis* + DCPIP em BH; **Espuma**: AFFF +DCPIP em BH; **Diesel**: diesel S10 + DCPIP em BH; **B. licheniformis**: *B. licheniformis* + DCPIP em BH.

Em relação ao diesel, apesar do meio ter ficado incolor (Figura 38, tubo F), a porcentagem de descoloração calculada a partir da absorbância a 600nm foi mais baixa do que o esperado. Este fato pode ser explicado pelo aumento da turbidez do meio devido ao aumento da biomassa bacteriana, capaz de biodegradar o diesel, o que influenciou na leitura da densidade ótica.

De fato, como constatado por Kubota et al. (2008), apesar da técnica com DCPIP se mostrar adequada para avaliar a biodegradação de compostos orgânicos, a mesma pode apresentar uma limitação em relação ao grande crescimento e ao tamanho das células bacterianas, o que, provavelmente ocorreu neste trabalho.

Os resultados do teste com *Bacillus licheniformis* mostraram-se coerentes com os resultados obtidos por Kumar et al. (2006), que descreveram a espécie como produtora de biossurfactantes, eficiente tanto para a indústria de alimentos, quanto para a indústria petroquímica, com potencial para uso em processos de biorremediação. O biossurfactante produzido pelo *B. licheniformis* apresenta propriedades importantes em relação a temperaturas acima de 50°C e também para pH entre 4,5 a 9 (MCINERNEY et. al., 1990).

Segundo Mariano et al. (2007) cepas ambientais apresentam maior adaptabilidade em degradar os contaminantes com o quais já tiveram contato. No trabalho destes autores foi possível avaliar o potencial de biorremediação por DCPIP, em área contaminada com óleo diesel (comercial e intemperizado) em 3 dias.

3.3.2 Teste de Biodegradação – Respirometria de Bartha

3.3.2-1 Caracterização do Sedimento

Análise granulométrica

O sedimento coletado foi classificado como predominantemente composto por areia fina e muito fina (Tabela 4).

Tabela 4: Classificação textural do sedimento coletado em Itaguaré.

Granulometria		
Diâmetro (μm)	Fração	%
2000-1000	Areia muito grossa	0,47
1000-500	Areia grossa	0,393
500-250	Areia média	1,04
250-125	Areia fina	28,42
125-75	Areia muito fina	65,87
<75	Silte e argila	3,73

A granulometria do sedimento interfere na distribuição da matéria orgânica presente, nas concentrações de hidrocarbonetos presentes pela contaminação e na distribuição e atividade da comunidade microbiana, incluindo bactérias (OLIVEIRA et al., 2007).

Sedimentos arenosos são considerados mais adequados para a atividade de microrganismos, pois permitem uma melhor permeação da água e do ar (SEABRA, 1997), fatores necessários para o crescimento de bactérias.

Em relação ao diâmetro dos grãos, segundo trabalho de Nakazawa (2011) as maiores concentrações de hidrocarbonetos em sedimentos estiveram associadas aos maiores grãos (>250 μm) enquanto que, frações mais finas (<62 μm), apresentaram concentrações mais baixas.

Diferentes concentrações de hidrocarbonetos entre as frações do tamanho de sedimentos costeiros (<62, 62-125, 125-250 e >250 μm) também foram observadas por WANG et al. (2001) e relacionadas à matéria orgânica associada aos sedimentos.

Parâmetros físico-químicos e composição química

A Tabela 5 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos avaliados *in situ* no momento da coleta dos sedimentos, bem como a composição química do sedimento: matéria orgânica (MO), Carbono Orgânico (CO), Fósforo (P) e Nitrogênio Orgânico (NO).

Tabela 5: Fatores abióticos do Sedimento de Itaguapé, utilizados nos testes de biodegradação – Respirometria de Bartha.

Sedimento Itaguapé							
OD (mg/L) “in loco”	Temp. (°C) “in loco”	pH	Salinidade	MO (g/kg) – (%)	CO (g/kg)	P (g/kg)	NO (g/kg)
7,05	20,6	7,2	2,4	2,67 - 0,267	1,43	0,013	1,05

Embora a temperatura do sedimento no momento da coleta tenha sido de 20,6°C, os experimentos em laboratório foram conduzidos a uma temperatura de 28±2°C, mais adequada ao crescimento bacteriano. Apesar desta diferença, a escolha da temperatura foi semelhante à de outros trabalhos (MARIANO et al., 2007; COSTA, 2009; MONTAGNOLLI et al., 2015; QUITERIO et al., 2017).

Considerando que, os parâmetros físico-químicos dos sedimentos no local da coleta são altamente variáveis (BARALADO, 2018) e que a temperatura do sedimento afeta diretamente a atividade dos microrganismos e influencia no estado físico-químico dos contaminantes, a temperatura escolhida para os experimentos pode dificultar ou facilitar a biodegradação (BAKER e HERSON, 1994). No presente trabalho os resultados obtidos sugerem que a temperatura tenha tido efeito positivo nos processos de biodegradação.

No momento da coleta o pH do sedimento apresentou valores neutros (pH=7,2), correspondendo com os resultados de Moreira e Siqueira (2006) que determinaram que o pH da maioria dos solos/sedimentos estão na faixa entre 4,5 e 8,0. A neutralidade dos sedimentos evita a perda de nutrientes pelo solo (que ocorre em solos ácidos), garantindo a disponibilidade de elementos essenciais para o metabolismo microbiano na degradação dos contaminantes (OLIVEIRA et al., 2000). Segundo Moreira (2002), a degradação de poluentes orgânicos em solos/sedimentos é otimizada a temperaturas de 24 a 35°C e pH de 5,6 a 8, pelo que os sedimentos coletados se mostraram apropriados para a utilização nos experimentos em laboratório.

Embora seja já conhecida a influência que a salinidade pode ter nas células e nos processos bacterianos, interferindo até mesmo na sobrevivência de algumas espécies de bactérias, isto não foi observado no presente trabalho, pois ambas as espécies não sofreram influência da salinidade presente no sedimento, em seu crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Haghghat et al. (2008) que avaliaram que a presença de sal não influenciou a ação das espécies de *B. subtilis* e *B. licheniformis*.

A concentração de carbono presente no sedimento do presente trabalho pode ser considerada baixa, o que é esperado para sedimentos arenosos e sugere que não houve contaminação previa por hidrocarbonetos nem por outros compostos orgânicos nos sedimentos (FROEHNER & MARTINS, 2008).

Apesar dos baixos valores de carbono e matéria orgânica presentes nos sedimentos, estas concentrações não foram limitantes para o crescimento de *B. subtilis* e *B. licheniformis* nos testes realizados, uma vez que os contaminantes orgânicos adicionados supriram as necessidades de carbono para os microrganismos (BAKER e HERSON, 1994). Sendo assim, o sedimento coletado pode ser considerado ideal para a avaliação da biodegradação dos contaminantes.

Além das fontes de carbono, nutrientes inorgânicos como nitrogênio e fósforo também são necessários para o metabolismo microbiano (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Devido a isto, processos de biorremediação de solos contaminados que tem como prática a adição de nutrientes inorgânicos ao material a ser degradado, tem obtido sucesso. Em solos e sedimentos contaminados por hidrocarbonetos, a adição de nutrientes como o Nitrogênio permite que o contaminante seja rapidamente consumido pelos microrganismos presentes (LU et al., 2011).

No presente estudo, embora o sedimento utilizado tenha sido considerado pobre, pois solos ricos são os que apresentam concentrações de nitrogênio e fósforo maiores que 2,22 g/kg e 0,03 g/kg, respectivamente (Jaramillo, 1996), não apresentou limitação aparente para a realização dos testes de biodegradação – Respirimetria de Bartha. Possivelmente devido ao inóculo e os contaminantes adicionados forneceram carbono, nitrogênio e fósforo.

Umidade e Capacidade de Campo

A umidade dos sedimentos amostrados foi de 32,07%, e a capacidade de campo de aproximadamente 70%. A partir desses dados, determinou-se que era necessário acrescentar 18,48g (18,48%) de água destilada na montagem dos testes de biodegradação.

Caracterização Microbiológica do Sedimento

Os valores das densidades de *E. coli* e *Enterococcus* encontrados nos sedimentos coletados na barra do Rio Itaguapé encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Densidade microbiológica do Sedimento de Itaguapé.

<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i>	Bactérias Heterotróficas
907 UFC/g	46 UFC/g	3340 UFC/g

Quando comparada com a classificação de praias em relação à balneabilidade segundo a Resolução CONAMA 274/00 (Quadro 5), os sedimentos coletados se enquadram nas categorias *Própria* considerando *Enterococcus* e *Imprópria* considerando *E. coli*. Para bactérias heterotróficas não existem valores de referência na legislação. Vale ressaltar que a classificação CONAMA 274/00 faz referência à análise microbiológica da água e não do sedimento e contempla amostras coletadas ao longo de cinco semanas consecutivas. no entanto, no Brasil, ainda não existe uma legislação específica para sedimentos.

Quadro 5: Classificação de balneabilidade de acordo com a CONAMA 274/00

Categoria		Coliformes Termotolerantes (UFC/100ml)	<i>Escherichia coli</i> (UFC/100ml)	Enterococos (UFC/100ml)
Própria	Excelente	Máx de 250 em 80% ou mais tempo	Máx de 200 em 80% ou mais tempo	Máx de 25 em 80% ou mais tempo
	Muito boa	Máx de 500 em 80% ou mais tempo	Máx de 400 em 80% ou mais tempo	Máx de 50 em 80% ou mais tempo
	Satisfatória	Máx de 1000 em 80% ou mais tempo	Máx de 800 em 80% ou mais tempo	Máx de 100 em 80% ou mais tempo
Imprópria		Superior a 1.000 em mais de 20% do tempo	Superior a 800 em mais de 20% do tempo	Superior a 100 em mais de 20% do tempo
		Maior que 2.500 na última medição	Maior que 2.000 na última medição	Maior que 2400 na última medição

Segundo relatório da CETESB (2018) as praias do município de Bertioga foram consideradas próprias o ano todo, com classificação anual de **BOM** para a maioria das praias (Quadro 6).

Quadro 6: Porcentagem de ocorrência em cada categoria e qualificação anual, segundo Relatório Qualidade das Praias Litorâneas no Estado de São Paulo. 2018. Fonte: CETESB (2018).

PRAIA - LOCAL DE AMOSTRAGEM	EXCELENTE (%)	MUITO BOA (%)	SATISFATÓRIA (%)	IMPRÓPRIA (%)	QUALIFICAÇÃO ANUAL
BORACEIA - COL. MARISTA	63	25	12	0	BOA
BORACEIA - SUL	65	21	13	0	BOA
GUARATUBA	67	25	8	0	BOA
SÃO LOURENÇO (JUNTO AO MORRO)	75	15	10	0	BOA
SÃO LOURENÇO (RUA 2)	70	10	20	0	BOA
ENSEADA - INDAIÁ	73	6	21	0	BOA
ENSEADA - VISTA LINDA	46	21	33	0	BOA
ENSEADA - COLÔNIA DO SESC	67	13	19	0	BOA
ENSEADA - R. RAFAEL COSTABILI	31	27	33	10	REGULAR

Amostragens realizadas por Moraes (2011), no ano de 2008, pelo período de 6 meses consecutivos, consideram a classificação qualitativa da balneabilidade do Itaguapé se

apresenta BOM, mantendo a classificação qualitativa da balneabilidade do Itaguaré a mesma pelos últimos 11 anos.

3.3.2-2 Respirometria de Bartha - método por condutividade

Tratamentos com espuma de controle de incêndio (AFFF)

A concentração de carbono biodegradado nos testes foi avaliada comparando os tratamentos com sedimento contaminado com AFFF em diferentes concentrações (1,5%, 3%, 4,5% e 6%), em presença da bactéria *B. subtilis*, na presença de *B. licheniformis* e em consórcio de ambas, com controles de sedimento puro e sedimento com contaminante. Em todos os tratamentos foi utilizado o sedimento coletado no Rio Itaguaré. O CO total biodegradado (μmol) foi mensurado ao longo dos 120 dias do experimento para cada tratamento e cada respirometro (OECD 307, 2002). Os valores médios encontram-se representados nas Figura 40 a Figura 43, e os resultados numéricos no ANEXO 2.

Para a concentração de espuma 1,5% *B. subtilis* e o consórcio apresentaram bom desempenho tanto nos primeiros dias, quanto aos 120 dias, sendo que *B. subtilis* apresentou desempenho um pouco inferior ao do consórcio. A diminuição do desempenho por volta dos 30 dias, pode estar relacionado com a diminuição de substrato (Figura 40).

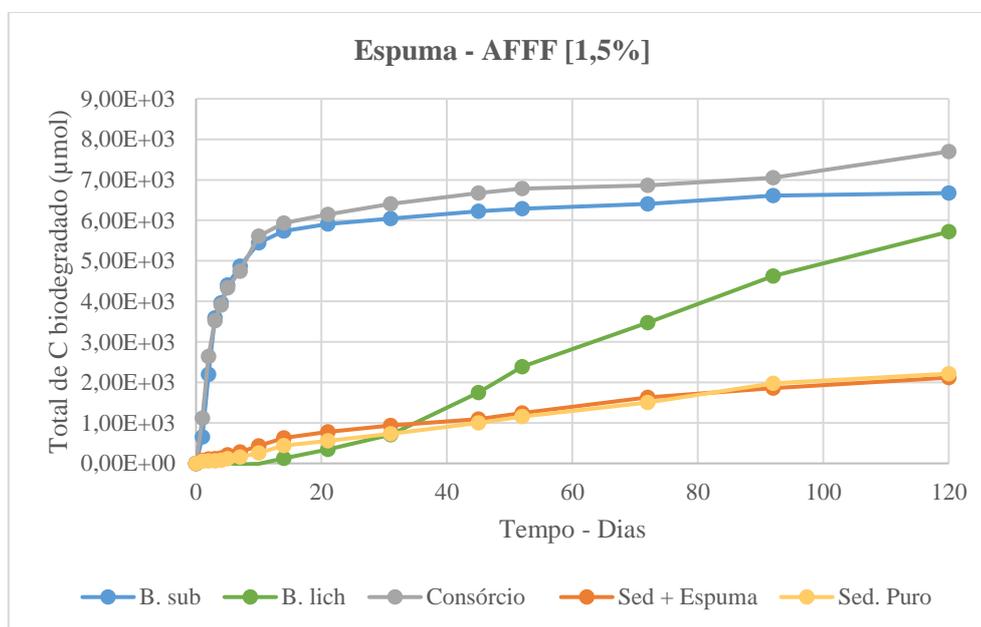


Figura 40: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com [AFFF 1,5%] como contaminante, durante 120 dias.

Na mesma concentração, *B. licheniformis* apresentou baixo desempenho (menor que a degradação natural do contaminante (Sed+Espuma) até aproximadamente o dia 30 do

experimento, melhorando o desempenho até dia 120 (valor máximo de C biodegradado observado).

Para a concentração 3% da espuma (concentração comercial) ambas cepas e o consórcio apresentaram bom desempenho. *B. licheniformis* e o consórcio apresentaram curvas semelhantes e *B. subtilis* um desempenho bom, porém inferior. O máximo de C biodegradado ocorreu em torno dos 45 dias de teste. Foi possível observar que, quando mudou a taxa de degradação natural (aumento no dia 52), diminuiu o desempenho de degradação das cepas únicas e do consórcio, essa diminuição no desempenho, pode estar relacionado com a diminuição de substrato. Aos 120 dias, *B. licheniformis* e o consórcio apresentaram bom desempenho, sendo que a curva de *B. subtilis* foi semelhante à obtida para a degradação natural do contaminante no sedimento (Figura 41).

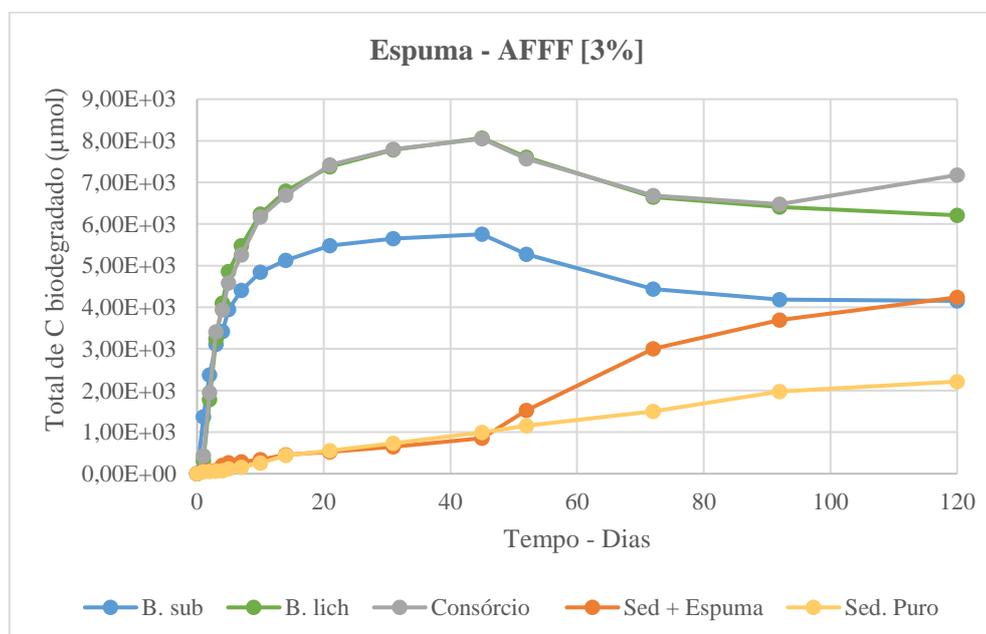


Figura 41: Total de C biodegradado (µmol) nos ensaios de respirometria com [AFFF 3%](concentração comercial) como contaminante, durante 120 dias.

Para a concentração 4,5% da espuma, tanto os tratamentos com cepas únicas quanto o consórcio, apresentaram bom desempenho nos primeiros dias (aprox. 45 dias). Entretanto, a partir dos 70 dias (aprox.) a degradação natural da espuma foi aumentando, ultrapassando a curva de degradação de *B. subtilis*. Aos 80 dias, a degradação natural também ultrapassou a degradação por *B. licheniformis* e, aos 90 dias também igualou a curva de crescimento do consórcio (Figura 42).

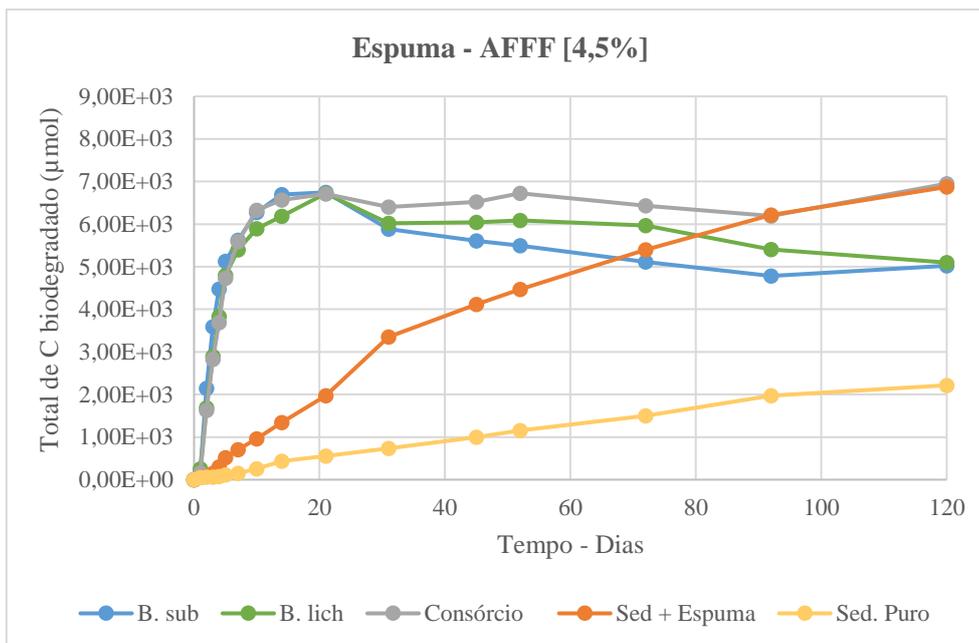


Figura 42: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com [AFFF 4,5%] como contaminante, durante 120 dias.

Para a concentração de 6% da espuma (concentração comercial) *B. licheniformis* e o consórcio apresentaram bom desempenho de degradação, com o desempenho de *B. licheniformis* sendo notavelmente superior ao do consórcio. Entretanto, ao final do período de 120 dias, a degradação natural da espuma ultrapassou ambas as curvas de degradação com inóculo. Tal resultado parece bem pertinente pois corrobora o fato de que, as bactérias degradadoras são capazes de realizar a autodepuração do ambiente contaminado, porém em longos períodos de tempo e sem que haja perturbação do sistema há necessidade de manutenção ou mesmo a bioestimulação (Figura 43).

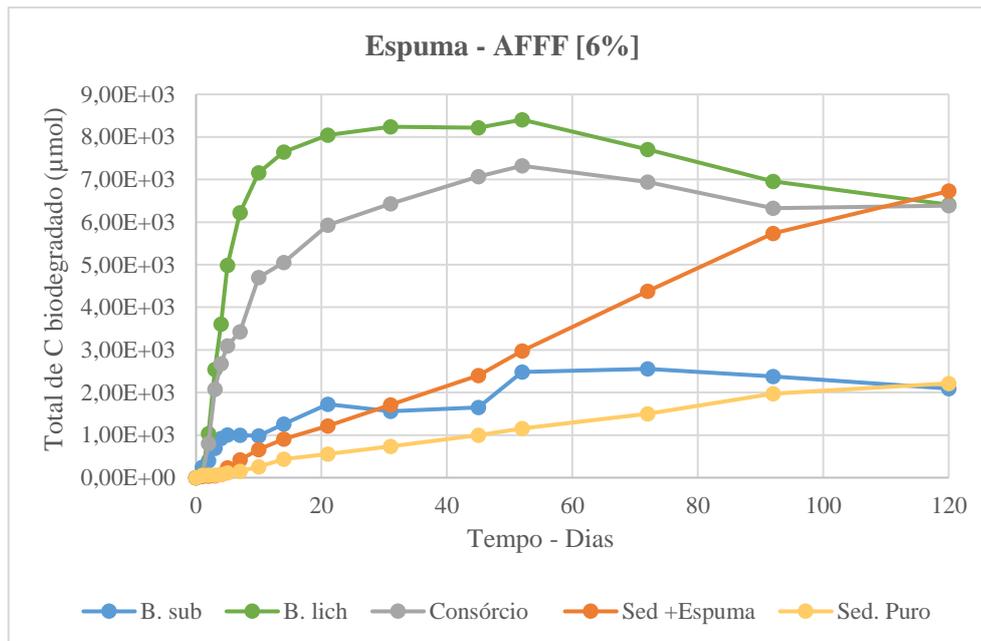


Figura 43: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com [AFFF 6%](concentração comercial) como contaminante, durante 120 dias.

Comparando em relação à concentração de 6% de espuma, *B. subtilis*, não apresentou bom desempenho, permanecendo abaixo da curva de degradação natural do contaminante e sem apresentar uma boa resposta nos primeiros dias. O baixo desempenho de *B. subtilis* poderia indicar que a cepa apresentou maior sensibilidade (toxicologia) quando exposta a essa concentração da espuma. Apesar de *B. subtilis* ser amplamente estudado para aplicações em processos de biorremediação e aplicação industrial, por conta do biosurfactante que é capaz de produzir, mostrou-se mais frágil na utilização para biorremediação de espumas de controle de incêndios – AFFF.

É possível considerar que, para todas as concentrações de espuma testadas, as cepas e o consórcio apresentaram bom desempenho na biodegradação dos C presentes nos componentes da espuma, com exceção de *B. licheniformis* na concentração 1,5% e *B. subtilis* na concentração de 6%.

Foi possível observar que, nas concentrações estudadas de AFFF, tanto as cepas únicas quanto o consórcio, apresentaram, comparativamente a degradação natural, uma concentração de C biodegradado consideravelmente superior entre os 20 a 40 dias de experimento. No entanto, nas concentrações de 4,5% e 6%, ao final de 120 dias, a degradação natural da espuma foi similar ou maior que dos testes com bioaugmentação.

Os resultados dos testes de biodegradação por cepa/consórcio estão representados nas Figura 44, Figura 45 e Figura 46.

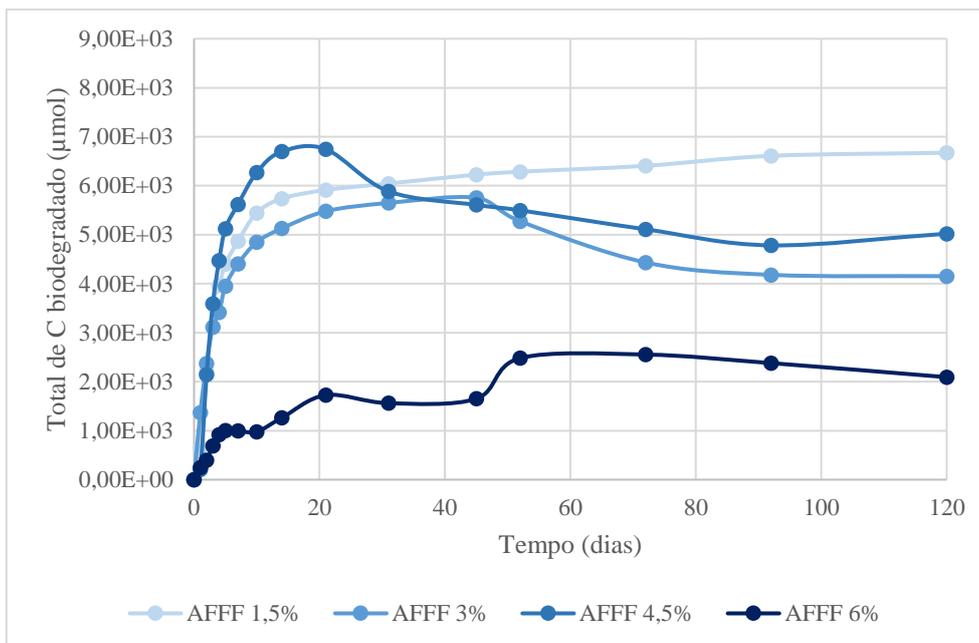


Figura 44: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa *B. subtilis* com AFFF nas concentrações 1,5%, 3% 4,5% e 6% como contaminante, durante 120 dias.

B. subtilis apresentou o melhor desempenho ao longo do tempo para a concentração 1,5% de AFFF. Para as concentrações 3% (comercial) e 4,5% apresentou melhor desempenho no início do teste, diminuindo a partir do 50º dia (aproximadamente). Para AFFF 6% (comercial) apresentou baixo desempenho, permanecendo abaixo da curva de degradação natural do composto (como mencionado anteriormente) (Figura 44).

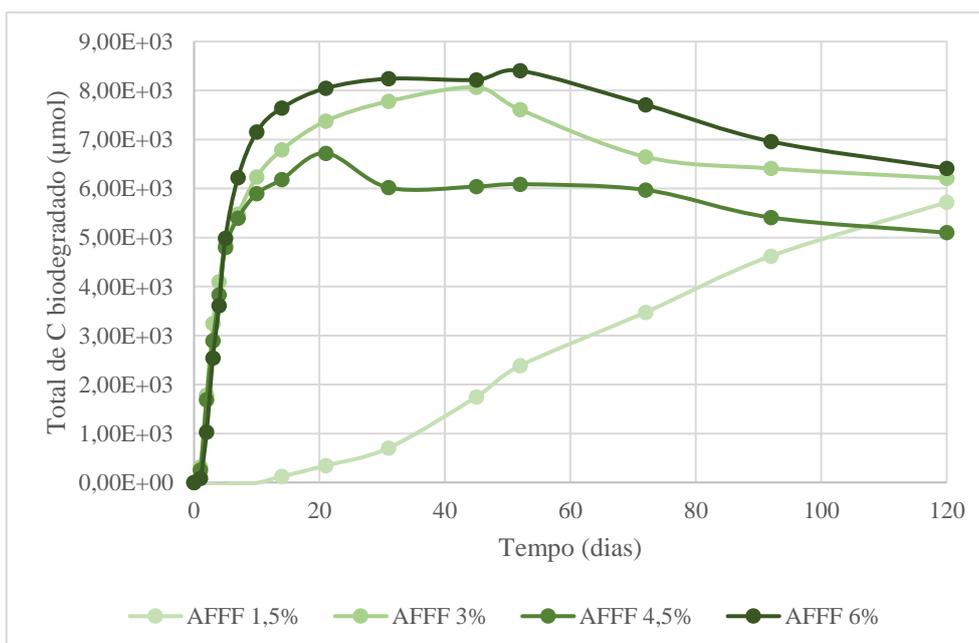


Figura 45: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa *B. licheniformis* com AFFF nas concentrações 1,5%, 3% 4,5% e 6% como contaminante, durante 120 dias.

B. licheniformis apresentou o melhor desempenho ao longo do tempo para a concentração 6% (comercial) de AFFF, porém apresentou bom desempenho também para as concentrações 3% (comercial) e 4,5%. Analogamente, *B. subtilis* apresentou melhor desempenho no início do teste, diminuindo a partir do 70º dia (aproximadamente). Para [AFFF 1,5%] apresentou pior desempenho, aproximando-se às curvas das outras concentrações só a partir do 90º dia (Figura 45).

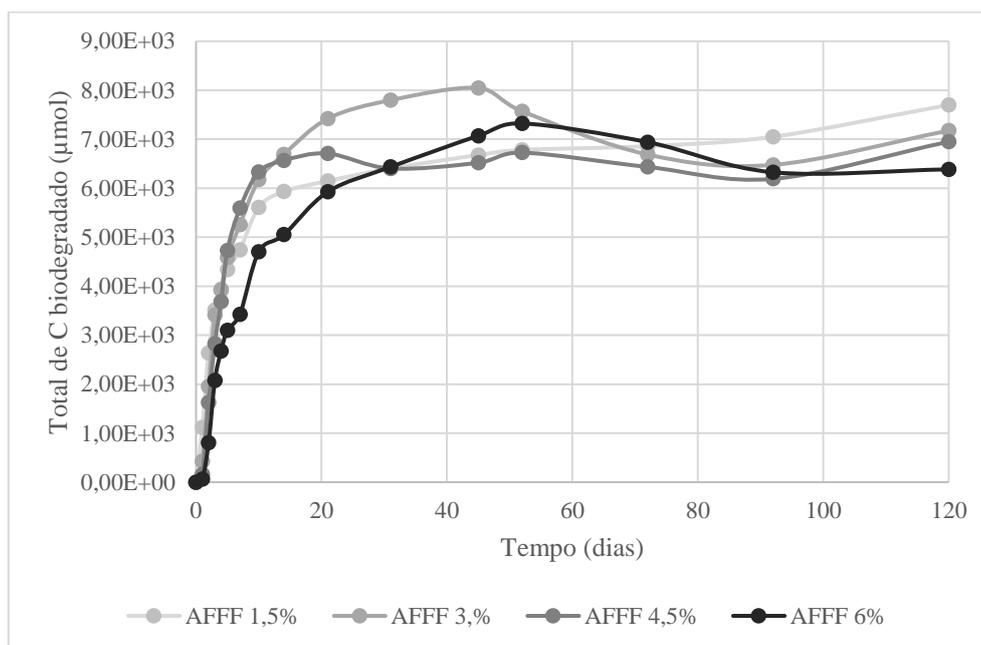


Figura 46: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com consórcio das cepas *B. subtilis* e *B. licheniformis* com AFFF nas concentrações 1,5%, 3%, 4,5% e 6% como contaminante, durante 120 dias.

O consórcio apresentou desempenho similar em todas as concentrações da AFFF as quais foi exposto (Figura 46).

Tratamentos com Diesel S10

Os valores médios de C biodegradados de Diesel S10 encontram-se representados na Figura 47 (resultados numéricos no ANEXO 3). As cepas de *B. subtilis*, de *B. licheniformis* e do consórcio apresentaram o mesmo comportamento de biodegradação nas três concentrações de diesel S10 analisadas (2,5%, 5% e 7,5%) em relação aos controles.

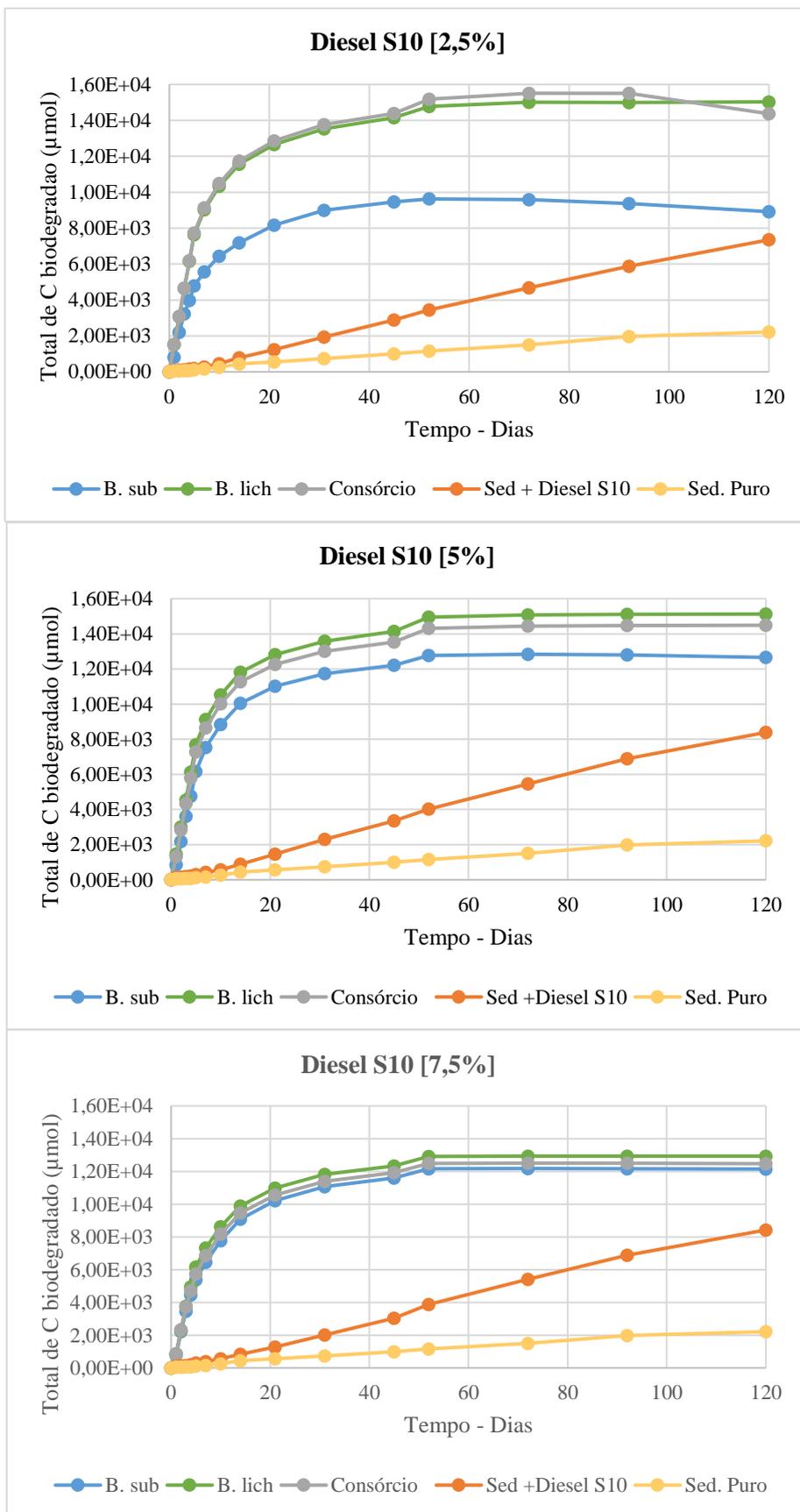


Figura 47: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria com Diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante, durante 120 dias.

Os testes de biodegradação de diesel S10 contendo espécie única ou consórcio, apresentaram comportamentos semelhantes ao longo de todo o experimento de respirometria e em todas as concentrações de diesel S10 analisadas (Figura 48).

Esta semelhança é observada facilmente, comparando o crescimento nos testes com cepas com os controles. Em nenhum dos testes, seja com cepas únicas ou em o consórcio, em todas as concentrações testadas, apresentaram valores de C total biodegradado inferiores à degradação natural do contaminante no substrato.

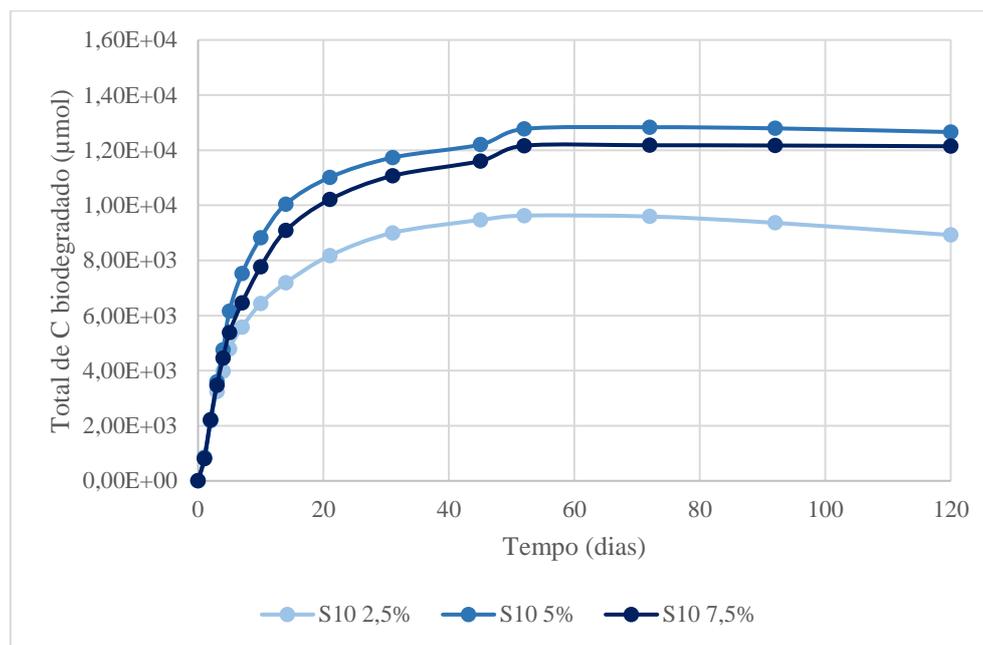


Figura 48: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa *B. subtilis* com Diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante, durante 120 dias.

Quando comparadas diferentes concentrações de contaminante para *B. subtilis* (Figura 48), foi possível observar que a bactéria apresentou melhor desempenho nas concentrações 5% e 7,5% de diesel S10. Na concentração de 2,5% de diesel S10 a biodegradação pouco inferior.

Em relação a *B. licheniformis*, as curvas foram muito semelhantes para todas as concentrações (Figura 49), com um desempenho melhor e muito similar para as concentrações de 2,5% e 5% de diesel S10, e um desempenho inferior, porém bom, para a concentração 7,5%.

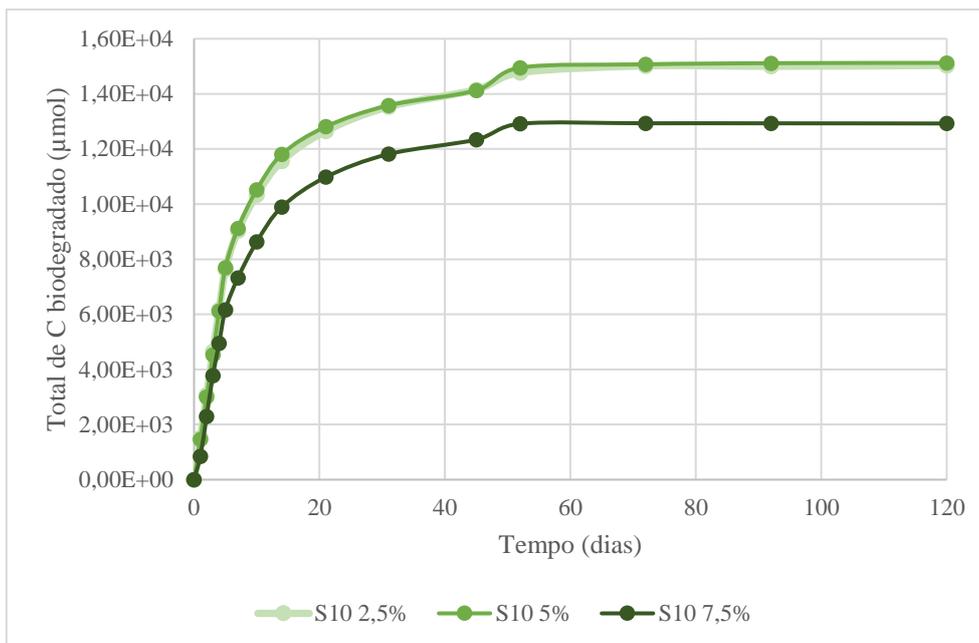


Figura 49: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa *B. licheniformis* com Diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante, durante 120 dias.

O consócio apresentou bom desempenho para todas as concentrações de diesel testadas (Figura 50), porém seu desempenho foi levemente inferior que o de *B. licheniformis* para as concentrações de 5% e 7,5%.

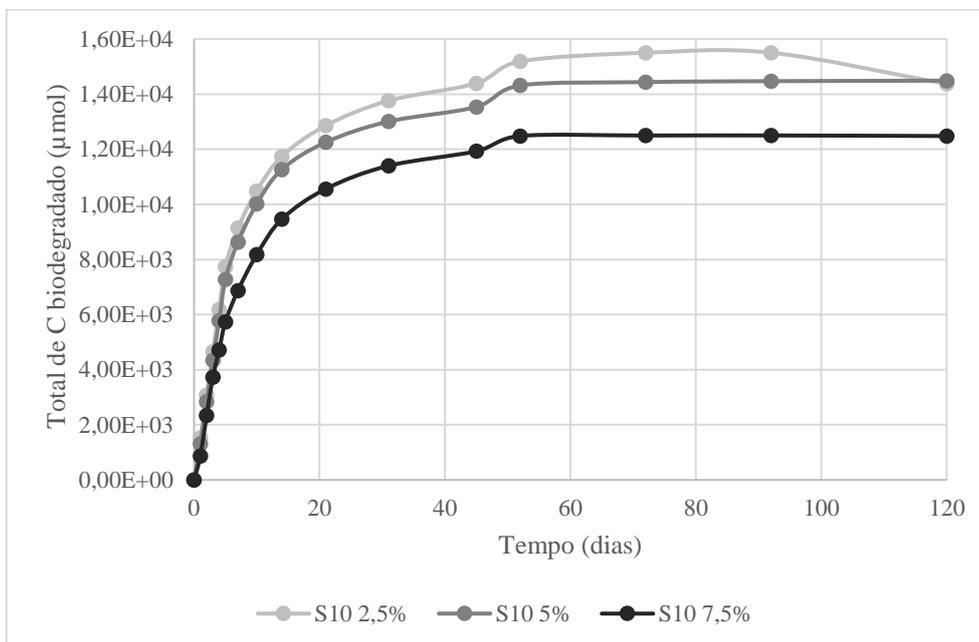


Figura 50: Total de C biodegradado (μmol) nos ensaios de respirometria realizados com consócio das cepas *B. subtilis* e *B. licheniformis* com Diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante, durante 120 dias.

Ao comparar os valores de degradação natural dos contaminante no sedimento (Figura 51) observa-se que a degradação natural do diesel é superior à da AFFF. Para [1,5%] de AFFF a curva de degradação natural quase não se diferencia da curva controle (sedimento

puro) o que pode ser explicado pela presença de substâncias como perfluorados (PFC) e pouca quantidade de butil-carbitol a ser degradado pelas bactérias presente no sedimento, isso nas condições as quais foram testados, a degradação dos PFC ocorre melhor em metabolismo anaeróbico.

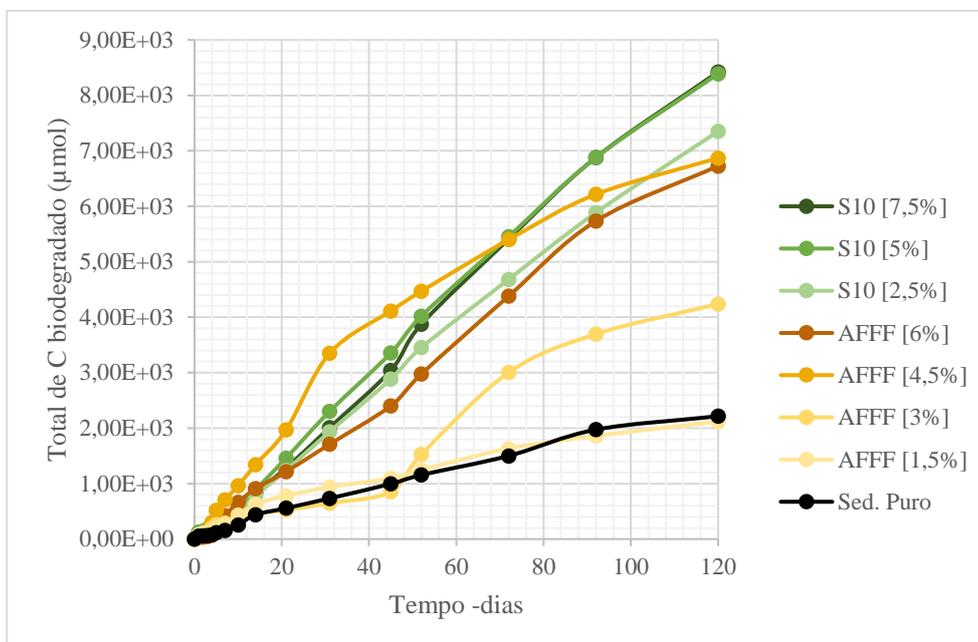


Figura 51: Comparação do total de C degradado naturalmente no sedimento, utilizando AFFF e Diesel S10 em diferentes concentrações como fonte C, em contraste do total de C degradado na amostra de sedimento sem outra fonte de carbono (sedimento puro – controle).

Contudo, ao comparar a degradação natural dos contaminantes com a biodegradação na presença do consórcio (Figura 52), é possível observar que a produção de CO₂ no ensaio com diesel S10 foi maior comparativamente a produção nos ensaios com espumas, nos quais a degradação dos contaminantes foi consideravelmente superior.

De fato, o uso de consórcios de microrganismos é mais eficaz em processos de biorremediação, devido à complexidade dos processos metabólicos necessários. O uso de bactérias de gêneros e espécies diferentes age com complementaridade a ação em degradar uma ou várias frações de hidrocarbonetos (LITTLEJOHNS e DAUGULIS, 2008). O consórcio microbiano tem uma capacidade para agir na degradação de compostos complexos (GHAZALI *et. al.*, 2004).

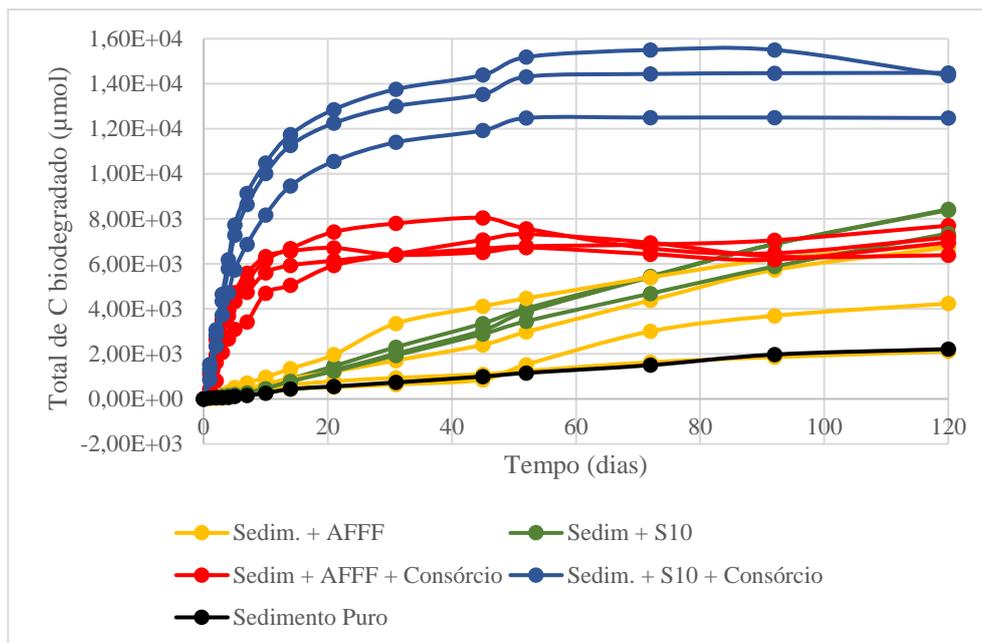


Figura 52: Comparação entre as curvas de C total biodegradado pelo consórcio e a degradação natural dos contaminantes nas diferentes concentrações utilizadas (AFFF: [1,5%], [3%], [4,5%], [6%]; Diesel S10: [2,5%], [5%], [7,5]) nos sedimentos.

A diferença observada provavelmente se deve ao fato que as formulações comerciais da espuma incluem um conjunto de substâncias químicas, como solventes, diferentes classes de surfactantes fluorados e compostos aditivos (MOODY; FIELD, 2000; PLACE; FIELD, 2012) o quais podem ser mais ou menos refratários à biodegradação.

Dentre os principais componentes da espuma encontram-se os compostos perfluorados (PFC) (KISH et al., 2008; BADUEL et al., 2017), substâncias que possuem forte polaridade na ligação carbono-flúor, que confere forte estabilidade na molécula (KEY, 1997).

Dentre o grupo dos PFC, destacam-se os PFOS (ácido perfluorooctano sulfônico) e os PFOA (ácido perfluorooctanóico), os quais são os subprodutos da degradação dos PFC (MONTAGNOLLI, 2015), porção de fluorcarbonados que é inerte e não biodegrada em testes aeróbicos. De fato, a desalogenação de compostos organo-halogênicos por microrganismos ocorre com eficácia em sistemas anaeróbicos, sendo um desafio a realização da biorremediação *in situ*.

Os subprodutos gerados pela degradação da espuma, podem causar efeito tóxico nas cepas, o que explica a queda nos valores de C biodegradado próximos ao teste de biodegradação natural (ensaio sem inóculo) em altas concentrações de espuma (MONTAGNOLLI, 2015). A biotransformação dos PFC, indicam a presença de um processo biológico que altera a estrutura e metaboliza a substância.

Montagnolli (2015), em seu trabalho encontrou valores inferiores de produção acumulada de CO₂, para a AFFF, no entanto foi avaliado apenas a degradação natural da AFFF, sem a realização de bioaumentação.

Na composição da espuma é possível encontrar de 12% a 15% de butil-carbitol, substância que não contém flúor em sua estrutura (C₈H₁₈O₃), sendo assim biodegradável, a qual possivelmente tenha sido consumida pelas cepas, sendo responsável pela produção das concentrações de C biodegradado encontradas nos testes de respirometria. Vale ressaltar que o butil-carbitol, assim como os éteres de glicol, são móveis, biodegradam rapidamente e não são adsorvidos às partículas de solo (CMA, 1994).

Waggy et al. (1994) relataram a remoção de 88% de butil carbitol de uma amostra de água em 28 dias. Outros estudos demonstraram 58% e 100% de biodegradação ocorrendo entre 15 a 28 dias (ZAHN; WEELENS, 1980), resultados estes muito similares aos obtidos nos testes realizados neste trabalho. No entanto no presente trabalho o butil-carbitol é um dos componentes da formulação das AFFF, desta forma a maior dificuldade para remoção total das espumas do ambiente, seriam os perfluorcarbonados. Não há trabalhos de biodegradação das AFFF, com a metodologia utilizada neste trabalho.

As curvas obtidas para diesel S10 apresentaram aumento da concentração de carbono total até o dia 72 e mantiveram a produção até os 120 dias, indicando uma melhor biodegradabilidade dos hidrocarbonetos presentes.

A produção de CO₂ no ensaio com diesel S10 foi maior que aquelas dos ensaios com espumas. Esta diferença se deve ao fato de as bactérias heterotróficas terem maior facilidade em degradar hidrocarbonetos. Segundo Wrenn & Venosa (1996), as moléculas lineares de hidrocarbonetos são mais facilmente biodegradadas do que compostos BTEX, presentes no diesel (SASAKI et al., 1998).

A biodegradação dos derivados de petróleo, não depende exclusivamente do tamanho da cadeia de carbono, segundo Prince e Walters (2007), a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos apresenta a seguinte ordem: n-alcanos > alcanos ramificados > compostos aromáticos de baixo peso molecular > ciclo-alcanos > compostos poliaromáticos > compostos polares.

Em alguns estudos, o bioaumento da população bacteriana presente no solo/sedimento favoreceu a degradação de óleo diesel e outros hidrocarbonetos presentes no solo (KATAOKA, 2001; BENTO et al., 2003). Marchal et al. (2003) observaram considerável degradação intrínseca do óleo diesel (60 a 73%), o que era esperado, uma vez que o óleo diesel é constituído por hidrocarbonetos mais pesados e recalcitrantes.

Nos testes de respirometria de ambos os contaminantes, observa-se que a biodegradação atinge fase estacionária, sendo necessário um novo aporte de inóculo para a continuidade de biorremediação dos contaminantes ou testes de bioestimulação. Para a continuidade da biodegradação da AFFF, idealmente deveria ser realizado entre 20 a 40 dias após o início do processo de biorremediação, quanto ao diesel S10 a inserção de mais inóculo deverá ser realizada entre 40 a 60 dias.

3.3.4 Densidade Bacteriana

Densidade do Inóculo – *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*

Os resultados das densidades bacterianas obtidas para os inóculos, expressas como UFC/ml indicaram a presença de quantidades adequadas de células viáveis para a utilização nos ensaios de biodegradação (Tabela 7).

Tabela 7: Densidade em UFC/ml de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* adicionadas nos ensaios de respirometria.

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
3,90E+09 (UFC/ml)	3,85E+09 (UFC/ml)

As densidades para *B. subtilis* e *B. licheniformis*, foram da ordem de 10^9 UFC/ml, densidade superior à mínima necessária para obtenção dos inóculos para os testes de biodegradação.

De acordo com o resultado da curva de crescimento (item 2.3.2) ao começo da fase de crescimento exponencial (fase “log”), as densidades das cepas foram de $5,00E+06$ para *B. subtilis* e de $1,00E+08$ para *B. licheniformis*. Foi nessa fase que as cepas apresentaram maior crescimento e atividade metabólica, sendo esse o melhor momento para obtenção dos inóculos em estudos laboratoriais ou até mesmo em processos industriais (ALTERTHUM, 2008) ou de biorremediação.

Densidade de Bactérias Totais pós Teste de Biodegradação – Respirometria de Bartha

Foram verificadas as densidades das bactérias totais (UFC/ml), dos sedimentos, após a finalização dos testes de respirometria, para todos os tratamentos realizados, ensaios de bioaumentação para *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, consórcio, para todas as concentrações utilizadas dos contaminantes (AFFF [1,5%], [3%], [4,5%], [6%] e Diesel S10 [2,5%], [5%], [7,5]), bem como os controles de sedimentos para as cepas, os contaminantes e o sedimento puro. Foi utilizada a técnica “Pour plate”, com incubação dos cultivos à 35°C.

As densidades bacterianas obtidas após os testes de degradação são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8: Densidades de bactérias (UFC/ml) pós testes de biodegradação para espuma de controle de incêndio (AFFF) e diesel S10, nas diferentes concentrações e respectivos controles, após 120 dias do início dos experimentos de respirometria.

Contaminante	Concentração	Inóculo com cepa			Sedimento sem inóculo
		<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	Consórcio	
Espuma AFFF	[1,5%]	9,26E+02	1,10E+03	7,22E+02	9,30E+01
	[3%]	2,01E+05	9,50E+04	3,62E+05	1,68E+05
	[4,5%]	4,90E+05	4,80E+04	3,58E+05	2,60E+05
	[6%]	8,62E+02	7,50E+04	5,96E+02	2,10E+05
Diesel S10	[2,5%]	1,66E+05	2,10E+05	3,46E+05	2,65E+02
	[5%]	2,29E+05	1,02E+05	2,45E+05	7,98E+02
	[7,5%]	1,73E+05	1,49E+05	7,60E+04	6,68E+02
	Sedimento sem contaminante	6,51E+05	5,90E+02	9,82E+02	1,20E+04

De acordo com os dados da Tabela 8 é possível verificar que, ao final da realização dos testes de respirometria, foi constatada a presença de bactérias totais em todos os tratamentos, indicando a adaptação das mesmas à presença dos contaminantes aos quais foram expostas previamente.

De fato, segundo alguns trabalhos, microrganismos que tiveram contato prévio com contaminantes, possuem capacidade e resistência metabólica suficiente para sobreviver e crescer na presença destes poluentes (KUMAR, 2011; GAUR et al., 2014).

Para as espumas, foi observado que os ensaios com as concentrações de 1,5% e 6%, realizados com *B. subtilis* e com o consórcio, apresentaram densidades bacterianas inferiores, podendo ser um indício de toxicidade para *B. subtilis*.

Esses resultados são coerentes com as curvas dos testes de biodegradação obtidos, considerando que as AFFF e seu subprodutos apresentam elevada toxicidade, principalmente em elevadas concentrações (SILVA et. al., 2019; CARVALHO et al., 2019; CARA et al., 2021 e POZO et al., 2022). Deste modo, conforme o butil-carbitol da composição é degradado, só restam compostos como solventes, surfactantes fluorados e compostos aditivos, junto com produtos da biotransformação da espuma no meio, podendo resultar tóxicos para essa espécie.

Os resultados obtidos para o diesel, apontam que os valores de densidade de bactérias totais foram maiores nos ensaios com contaminante do que no sedimento controle. As bactérias testadas apresentam maior adaptabilidade e maior facilidade em degradar

contaminantes de PAH (hidrocarbonetos poliaromáticos), comparativamente à degradação da AFFF. De acordo com Lima (2009), os microrganismos do gênero *Bacillus* sp. são os mais resistentes e mais adaptáveis a presença de petróleo.

Segundo Penet et al. (2004), o diesel é formado em maior parte por componentes saturados. Microrganismos são capazes de degradar frações alifáticas e aromáticas de hidrocarbonetos simultaneamente, no entanto a composição de algumas misturas, podem interferir na degradação dos componentes (BENTO et al., 2005), como no caso das espumas.

3.4 Conclusão

As cepas ambientais demonstraram ser viáveis para utilização nos testes de biodegradação, mesmo após seu congelamento. Apresentando boa densidade no inóculo utilizado (10^9 UFC/ml).

O teste colorimétrico com DCPIP é uma importante ferramenta para tomadas de decisões em pouco tempo e de baixo custo, avaliando a atividade dos microrganismos em relação a degradação de forma simples e sensível. Entretanto, podem apresentar limitações quando analisado isoladamente, levando a conclusões errôneas. Para contornar essa limitação sugere-se realizar uma avaliação da densidade bacteriana após realização dos testes colorimétricos, assim como foi realizado para a respirometria de Bartha.

Para realização de testes de respirometria de Bartha é imprescindível a obtenção de sedimentos que apresentem características e parâmetros físico-químicos e microbiológicos adequados para a sua utilização dos testes em laboratório.

No presente trabalho, a introdução das cepas *B. subtilis*, de *B. licheniformis* ou de um consórcio entre ambas, acelerou o processo de degradação das AFFF não sendo, entretanto suficiente para a biodegradação total deste composto.

A partir dos ensaios de biodegradação com diesel S10, foi possível concluir que em todos os tratamentos com contaminante o desempenho das cepas e o consórcio foi muito bom, e melhor que o obtido para as AFFFs.

As bactérias *B. subtilis* e *B. licheniformis* foram capazes de utilizar, como fonte de nutrientes, componentes presentes na espuma e/ou mesmo produtos da biotransformação, mesmo presente a toxicidade conhecida e estudada das AFFFs.

Já em relação aos resultados do controle diesel + sedimento, indicaram que as bactérias do sedimento foram sensíveis a toxicidade do diesel S10 ou não apresentaram adaptabilidade em consumir o diesel como nutriente.

A exposição previa a contaminantes fornece adaptabilidade fisiológica e metabólica necessária para que as cepas sejam capazes de utilizar esses contaminantes como fonte de nutrientes e carbono, e se reproduzam.

Uma conclusão importante em relação às bactérias utilizadas no presente trabalho foi que elas não apresentaram crescimento desmedido na presença dos contaminantes, fazendo com que seu uso seja seguro para o ambiente em caso de serem utilizadas para processos de biorremediação *in situ*.

CAPÍTULO 4

VERIFICAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CG/MS

4.1 Introdução

O uso de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) data do fim dos anos 1950. Essa técnica une a capacidade de separação da cromatografia com a capacidade de identificação de compostos da espectrometria de massas (BARTLE e MYERS, 2002; SPARKMAN et al., 2011).

A cromatografia gasosa é um método físico-químico de separação, utilizado para separar componentes em amostras, cujos analitos orgânicos são voláteis ou se volatilizam até 350°C de temperatura sem se degradarem.

O cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (Figura 53) se baseia no princípio da retenção diferencial dos componentes do analito (segundo as suas propriedades físico-químicas) em uma coluna capilar (também chamada de fase estacionária) com ajuda do gás de arraste (fase móvel). Posteriormente os componentes são eluidos seletivamente para o analisador, podendo-se determinar o tempo de retenção (TR) em função da razão massa/carga (m/z) para cada componente.

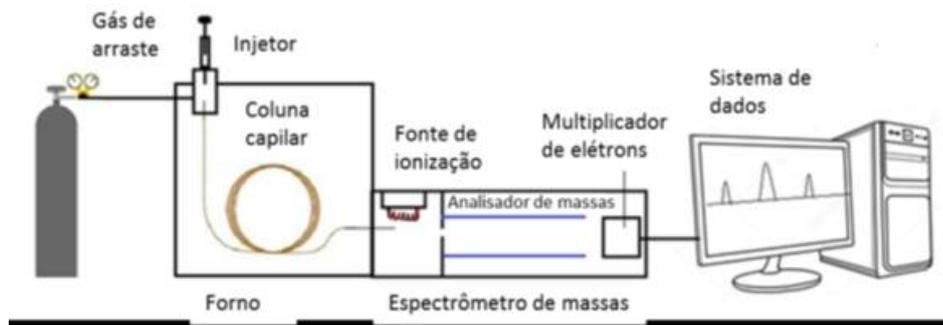


Figura 53: Esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG/MS).

Para uma melhor resolução da CG/MS deve-se escolher o modo de extração dos analitos mais adequado. A técnica de extração *headspace* é sensível e amplamente aplicada para analisar compostos em baixas concentrações. Na técnica de extração *headspace*, o analito é mais volátil que a amostra total e, quando ele se volatiliza, pode ser identificado sem os interferentes de outros componentes da amostra (GOBATO e LANÇAS, 2001).

A extração por *headspace* apresenta várias vantagens por ser uma técnica pouco onerosa, que não requer instrumentação complexa nem solventes orgânicos. Sua sensibilidade para BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos) é melhor que a do método de injeção direta (GILBERT-LÓPEZ et al., 2010) e o procedimento de extração é simples: a amostra é colocada em um frasco selado e mantido sob aquecimento até que os compostos alcancem o equilíbrio com a fase gasosa (BOSSE et al., 2017).

O uso de equipamentos como o espectrômetro de massas acopladas ao cromatógrafo a gás (CG/MS) possui ampla aplicação, pois permite identificação de diversos compostos, combinando as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens de identificação de compostos da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (LURIE, et al., 1998).

Por sua sensibilidade e efetividade em separar componentes das misturas, a cromatografia gasosa (CG) é uma das técnicas mais importantes em química e é amplamente utilizada em análises quantitativas e qualitativas (SETTLE, 1997). Também é utilizada em diversas áreas de estudo, como a ambiental, a indústria química e petroquímica e pesquisa, entre outras (BARTLE e MYERS, 2002; SPARKMAN et al., 2011). Em petroquímica é comumente utilizada para a identificação das fontes do petróleo, e para obter um conhecimento mais detalhado sobre a sua composição.

Wang e Fingas (1995, 1997) usaram a técnica de CG/MS para identificar e quantificar hidrocarbonetos presentes em amostras ambientais obtidas após um derramamento de petróleo. Os compostos analisados foram alcanos (cadeias de 8 a 40 átomos de carbono), BTEX e HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) entre outros. A concentração de BTEX é frequentemente utilizada como indicador de degradação do diesel, porém existem frações do diesel que não podem ser caracterizadas no CG/MS, sendo consideradas como misturas complexas não resolvidas “UCM - *Unresolved Complex Mixture*”. Denomina-se “TPH – *Total Petroleum Hydrocarbons*” à soma dos UCM e dos “TRH – *Total Resolvable Hydrocarbons*”. Os hidrocarbonetos totalmente resolvidos, TRH aparecem como picos nos cromatogramas e mudanças nos perfis cromatográficos permitem avaliar a degradação do diesel (Marchal et al., 2003).

Essa técnica também resulta eficiente na avaliação da biodegradação, pois é capaz de quantificar resíduos oleosos por meio do ponto de ebulição, proporcionando informações sobre os tipos de moléculas presentes nos compostos (GRAS et al., 2018).

Deste modo o objetivo do capítulo é verificar por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/MS) a biodegradação do diesel S10.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Ensaios Cromatográficos

Em adição aos testes de biodegradação realizados, foram realizados ensaios de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS) com os sedimentos no início e no fim dos testes de respirometria de Bartha, para cada concentração de diesel S10 com a finalidade de comprovar a ocorrência da degradação do diesel.

4.2.2 Montagem dos ensaios

Para verificar se houve biodegradação do contaminante diesel S10 nos testes de respirometria de Bartha (Capítulo 3) foram realizados ensaios de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS) com os sedimentos antes do início e após o fim dos testes de biodegradação de respirometria de Bartha, para cada concentração de diesel S10 (2,5%, 5% e 7,5%). Pode apresentar limitações quando analisado isoladamente, levando a conclusões errôneas. Para contornar essa limitação sugere-se realizar uma avaliação da densidade bacteriana após realização dos testes colorimétricos, assim como foi realizado para a respirometria de Bartha.

Foram realizadas CG-MS das amostras de sedimento contaminado com diesel no início dos testes de biodegradação de Bartha e após os 120 dias de iniciados os ensaios para cada tratamento (inóculo com *B. subtilis*, inóculo com *B. licheniformis*, inóculo com o consórcio e sem inóculo), totalizando 15 ensaios conforme Quadro 7.

Quadro 7: Composição dos ensaios de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) para o diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% com sedimentos antes e após teste de biodegradação por respirometria de Bartha, com os diferentes inóculos.

Diesel S10 + sedimento					
Concentração do diesel S10	Prévio aos inóculos	Após 120 dias de inóculo			
		<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	Consórcio	Sem inóculo
[2,5%]	x	x	x	x	x
[5%]	x	x	x	x	x
[7,5%]	x	x	x	x	x

Para verificar a curva do diesel S10 utilizado em todo experimento, também foi realizada uma corrida do diesel S10 puro.

4.2.2 Preparo de *headspace*

As amostras (sedimentos + diesel) foram acondicionadas em frascos de vidro estéreis (do tipo penicilina) de 20ml fechados hermeticamente com tampa de silicone, faceados com fita teflon e lacre de alumínio, conforme pode ser visualizado na Figura 54. Esse

procedimento foi realizado para evitar ao máximo a perda dos compostos por volatilização. Todos os ensaios de cromatografia foram realizados em duplicata.



Figura 54: Frascos de 20mL utilizados nos ensaios de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS), com amostras de sedimentos contaminadas. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

Os frascos com as amostras e os controles foram transferidos para banho-maria (Marconi, modelo MA 127) a 60°C e mantidos por 15 minutos.

Foram recolhidos 100µL de vapor (*headspace*) à meia altura entre a tampa do frasco e a superfície da amostra de sedimento contaminado, com uso de seringa *gastight* (Hamilton) (Figura 55 A) os quais foram injetados posteriormente no CG/MS (Figura 55 B), onde foram mantidos por 10 minutos para pré-concentração dos compostos presentes no *headspace* (Figura 55 C).

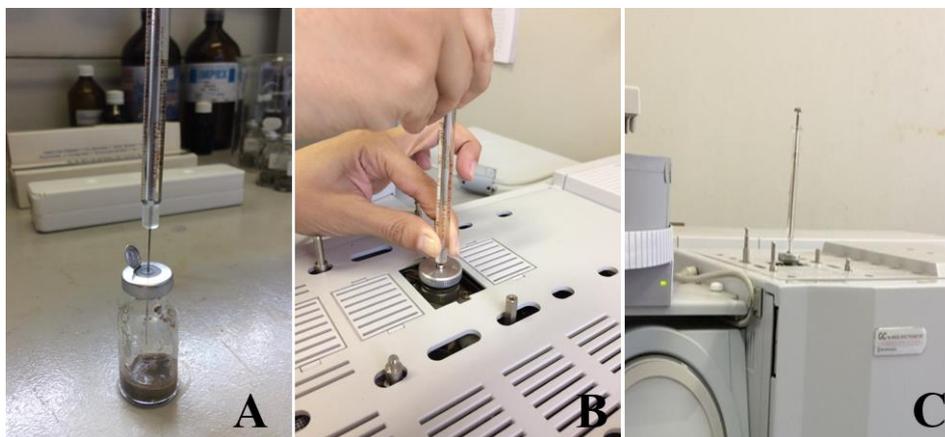


Figura 55: A: Coleta da fase de vapor (*headspace*) da amostra de diesel S10 volatilizado; B: Injeção da amostra de gás recolhida com uma seringa *gastight* no CG/MS; C: Pré-concentração dos compostos presentes no *headspace* por 10 minutos. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

4.2.3 Análises cromatográficas

As concentrações do diesel S10 no sedimento antes e após a biodegradação, bem como a do diesel puro, foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa no equipamento CG/MS Shimadzu QP2010 ULTRA (Figura 56). Todos os ensaios foram realizados no departamento de Microbiologia Aplicada da UNESP – Câmpus Rio Claro.



Figura 56: Equipamento GC/MS Shimadzu QP2010 ULTRA, com espectrômetro de massas com detector com fonte ionizada (EI -70 eV) e analisador de massas quadrupolo. Fonte: Roberta Merguizo Chinellato.

As condições experimentais cromatográficas utilizadas foram as estabelecidas no protocolo de Claro et al. (2018) e adaptadas com a finalidade de aumentar a eficiência de separação dos compostos na coluna cromatográfica e melhorar a resolução dos picos. Para tais fins foram utilizados uma coluna Rtx®-5MS (5%fenil, 95%dimetilpolissiloxano) da Restek (30m (comprimento) x 0,25mm (diâmetro) x 0,25 μ m (espessura de filme)) e um liner com diâmetro interno de 0,75mm, especial para injeção da amostra por headspace. As condições cromatográficas da análise dos compostos do óleo diesel encontram-se no Quadro 8.

Quadro 8: Condições utilizadas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa nos ensaios para verificar as concentrações dos compostos do óleo diesel S10 antes e após a biodegradação. Legenda: Programa de temperatura, tem se: Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$); Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de permanência na temperatura (min).

Parâmetros	Condições GC/MS para óleo diesel S10
Modo de injeção	Split - razão 1:16
Temperatura do injetor	250 $^{\circ}\text{C}$
Volume injetado	100 μL
Fase móvel	Hélio
Vazão da fase móvel	3 mL/min de He
Programa de temperatura	34 $^{\circ}\text{C}$ (2 min)* 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 200 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)* 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 230 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)*
Tempo de corrida	30 min
Taxa de varredura	35,9 cm/sec
Temperatura do detector	250 $^{\circ}\text{C}$

Para a detecção por espectrometria de massas utilizou-se um detector com fonte ionizada por elétrons (EI -70 eV) e um analisador de massas quadrupolo. O analisador foi operado no modo de varredura (SCAN) para identificação dos compostos e, no modo “*Total Ion Current*” (TIC), para quantificação dos mesmos. O detector foi mantido a 250 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura e a fonte de íons a 200 $^{\circ}\text{C}$. Para análise e interpretação dos resultados obtidos pelo equipamento foram utilizados o programa *LabSolutions GCMSsolution*, da Shimadzu e a biblioteca de espectrometria de massa disponível no software NIST11 Mass Spectral Library EPA/NIH fornecida com o GC/MS.

A curva de calibração utilizada para as análises de cromatografia foi do protocolo de Claro et al. (2018). Foram preparadas curvas analíticas para cada composto de BTEX, conforme Figura 57.

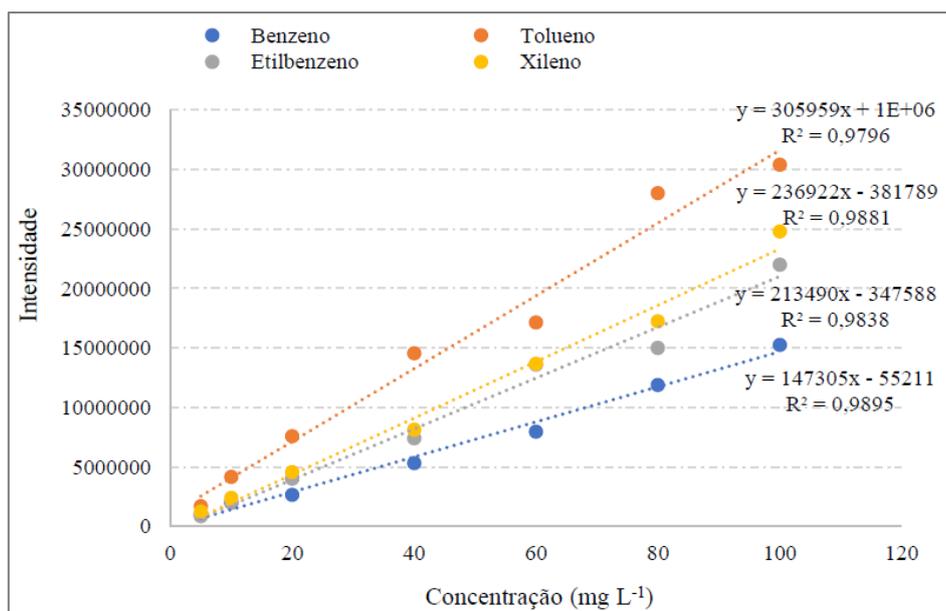


Figura 57: Curva de Calibração em CG/MS para compostos BTE(o)X. Fonte: Claro et al. (2018).

Os componentes analisados para verificar a degradação ou biodegradação do diesel, foram os BTEX, as substâncias benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno apresentam picos de respostas distintos e em diferentes tempos de retenção (Figura 58).

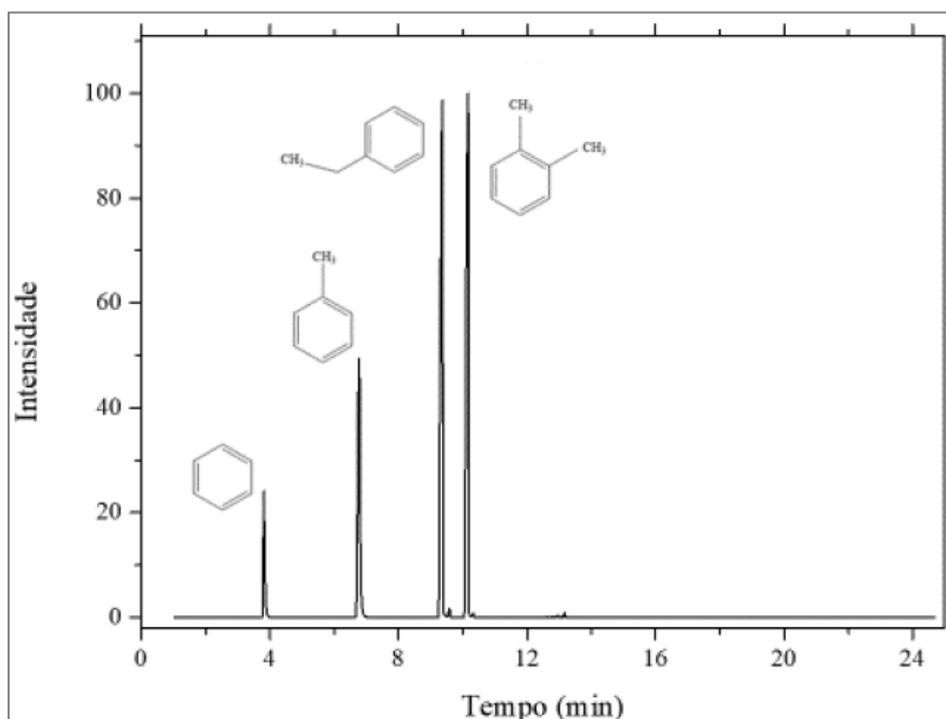


Figura 58: Perfil cromatográfico do padrão de BTEX, os picos indicam respectivamente as substâncias benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno. Fonte: Claro et al. (2018).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Diesel S10 puro e no sedimento ao início dos testes

O perfil cromatográfico do diesel S10 puro (Figura 59), foi utilizado como referência para comparação com os perfis cromatográficos realizados após os testes de biodegradação, com a finalidade de verificar se houve degradação dos componentes presentes do diesel S10.

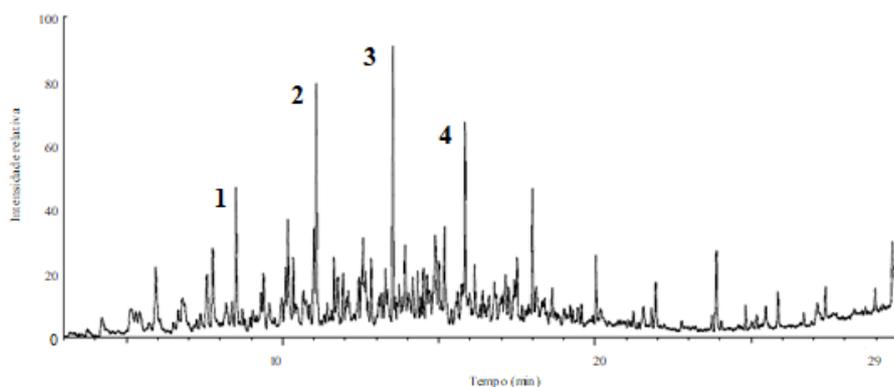


Figura 59: Perfil cromatográfico do diesel S10 puro, extraído por headspace para análise em CG/MS. Legenda: 1: Benzeno; 2: Tolueno; 3: Etilbenzeno e 4: o-Xileno. Elaborado pelo autor.

Ao comparar o perfil do diesel puro com os perfis do diesel nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% (Figura 60), observa-se que os picos principais, as intensidades de resposta e os tempos de retenção são muito semelhantes tanto para o diesel puro, quanto para qualquer uma das concentrações, evidenciando que a presença de sedimentos não alterou a composição do diesel.

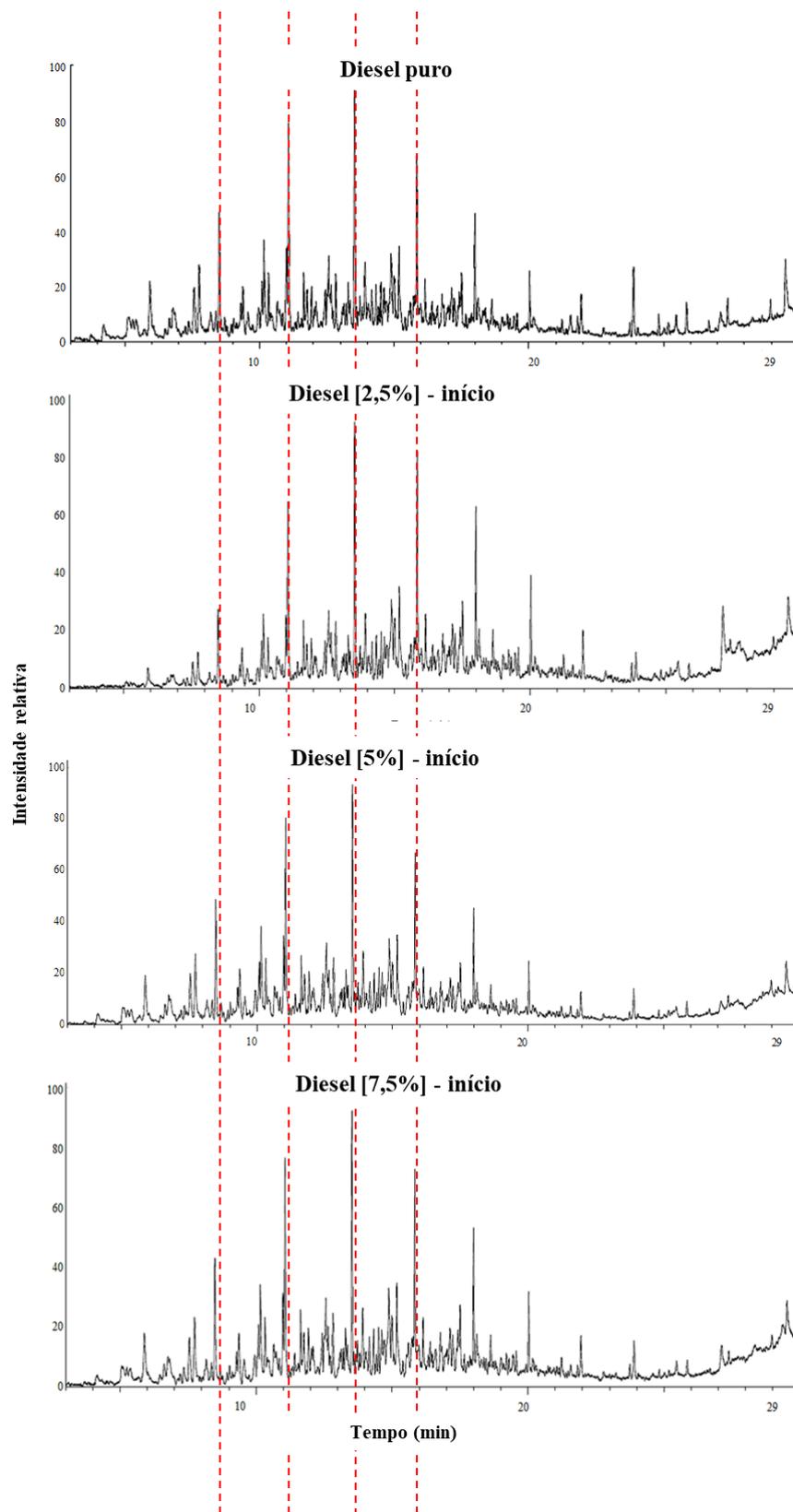


Figura 60: Comparação entre o perfil do diesel puro e as diferentes concentrações (2,5%, 5% e 7,5%) de diesel misturado no sedimento ao início do teste de biodegradação.

4.3.2 Diesel [2,5%]

Para avaliar possível degradação do diesel [2,5%] presente nos sedimentos ao longo dos 120 dias do ensaio de respirometria, foram comparados os perfis cromatográficos ao início e após finalizado o teste. Os resultados encontram-se na Figura 61.

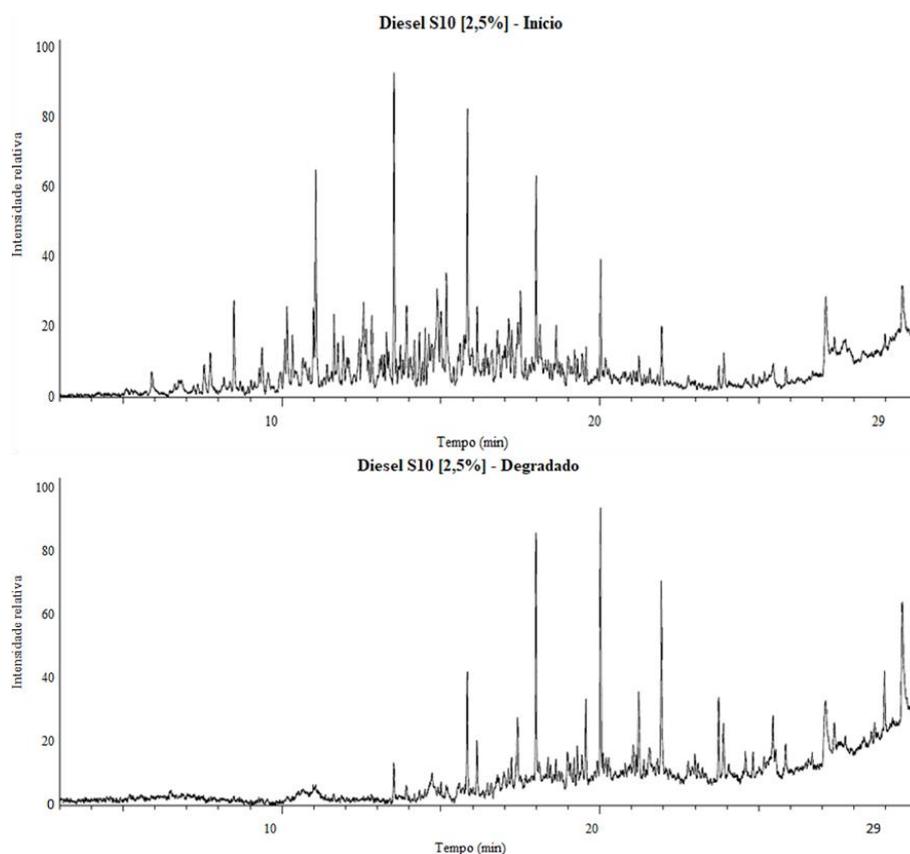


Figura 61: Perfis cromatográficos do diesel S10 [2,5%] ao início dos testes de respirometria e degradado (após 120 dias de teste em presença do sedimento), extraído por headspace para análise em CG/MS.

Os perfis cromatográficos foram avaliados visualmente buscando picos que tenham surgido, diminuído ou aumentado em comparação do perfil cromatográfico antes dos testes de biodegradação.

Foi possível observar que o perfil cromatográfico do diesel S10 sem inóculo apresentou uma mudança após os 120 dias do início do teste de biodegradação, porém picos de intensidade relativa são facilmente identificáveis e, em linhas gerais, a sua distribuição no perfil se manteve, embora defasada no tempo (aumento dos tempos de retenção).

Comparando o perfil da amostra sem inóculo com os perfis das amostras inoculadas com *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou com o consórcio (Figura 62), foi possível observar nitidamente uma mudança nos perfis que foram inoculados com bactérias, com o desaparecimento dos picos de intensidade relativa.

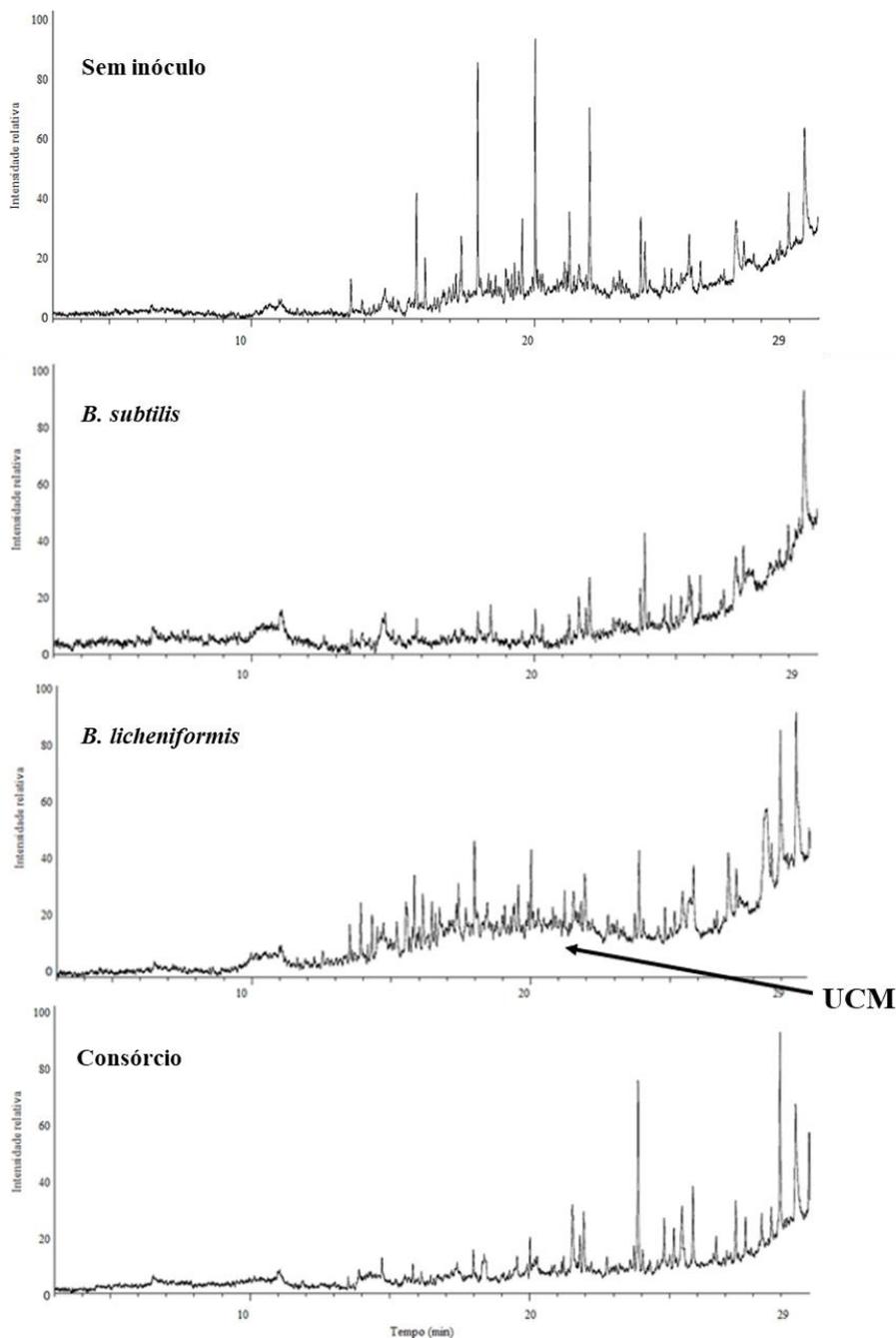


Figura 62: Perfil cromatográfico do diesel S10 [2,5%] sem inóculo, e com inóculos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e consórcio (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*), extraído por headspace para análise em CG/MS. Legenda: UCM: – mistura complexa não resolvida.

Essas mudanças nos perfis demonstraram a degradação do diesel por ação das bactérias inoculadas no sedimento utilizado para os testes de biodegradação. Como exposto no **item 3.3.2**, o sedimento apresentou uma textura arenosa-fina, o que facilitou a ação dos microrganismos, conforme descrito por Seabra (1997).

Ao comparar os 3 perfis dos sedimentos contaminados com diesel S10 [2,5%] inoculados com as cepas, observa-se que os perfis de *B. subtilis* e do consórcio são bastante

semelhantes. Já o perfil do inóculo com *B. licheniformis* é diferente e apresenta uma mistura complexa não resolvida (UCM), que corresponde a uma fração mais pesada do óleo constituída por hidrocarbonetos ramificados e cíclicos, que nem sempre são resolvidos em coluna capilar (FARRINGTON e QUINN, 2015).

4.3.3 Diesel [5%]

Para avaliar possível degradação do diesel [5%] presente nos sedimentos ao longo dos 120 dias do ensaio de respirometria, foram comparados os perfis cromatográficos ao início e após finalizado o teste. Os resultados encontram-se na Figura 63.

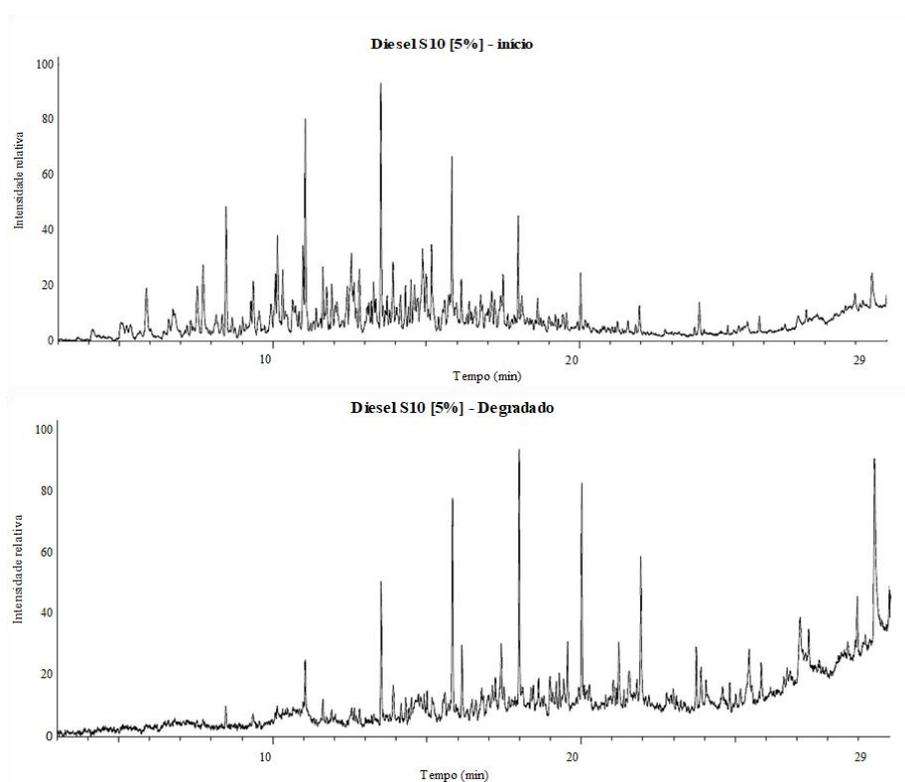


Figura 63: Perfis cromatográficos do diesel S10 [5%] ao início dos testes de respirometria e degradado (após 120 dias de teste em presença do sedimento), extraído por headspace para análise em CG/MS.

Conforme Figura 64, o perfil da amostra inoculada com *B. subtilis* apresentou tempos de retenção semelhantes aos encontrados no perfil sem inóculo, porém, as intensidades relativas destes foram notoriamente menores. Também apresentou um novo pico muito intenso no TR 27 min. O perfil com *B. licheniformis* apresentou picos semelhantes em posição e intensidade ao perfil sem inóculo, porém no meio deles é possível identificar uma UCM, análogo ao acontecido para [2,5%]. Já para o consórcio, embora os picos tenham sido mantidos, os tempos de retenção diminuíram, resultando em um perfil semelhante ao do diesel no início dos ensaios.

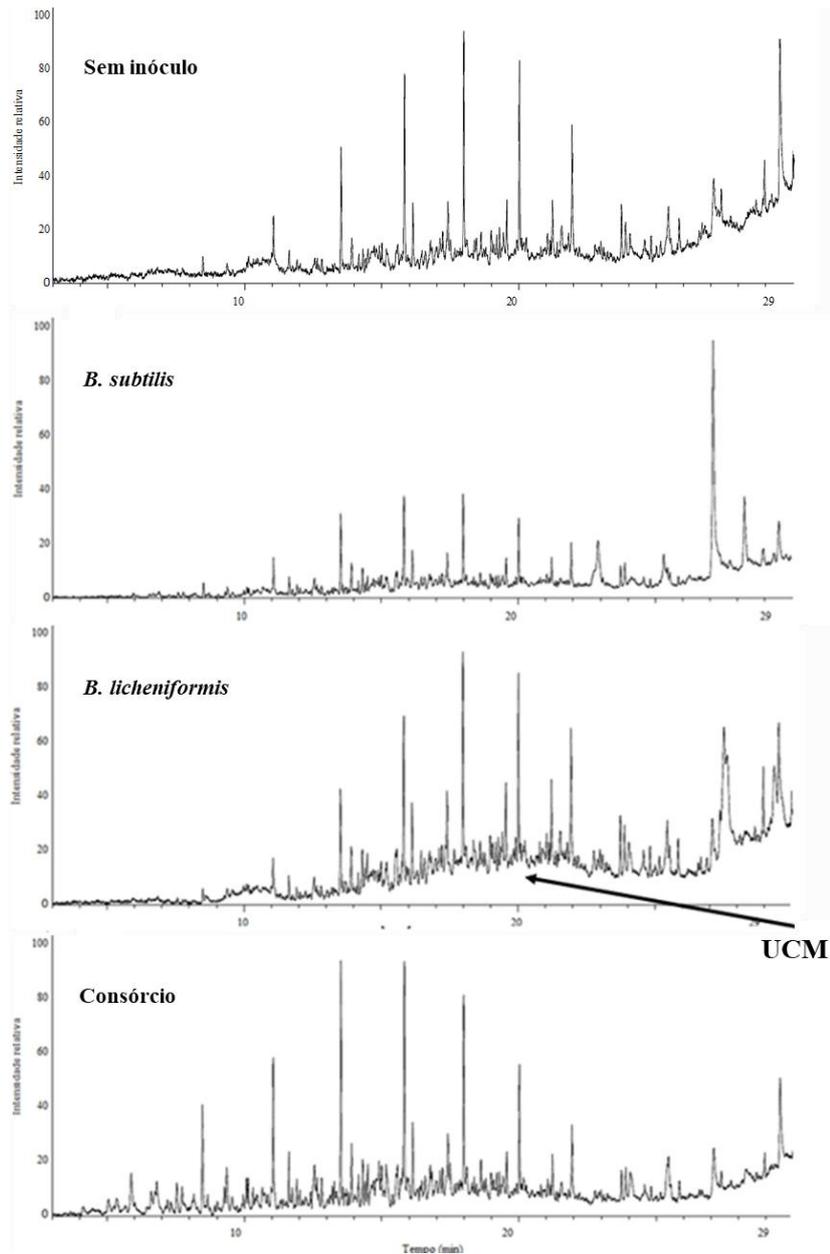


Figura 64: Perfil cromatográfico do diesel S10 [5%] sem inóculo, e com inóculos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e consórcio (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*), extraído por headspace para análise em CG/MS. Legenda: UCM: – mistura complexa não resolvida.

No presente estudo, as mudanças nos perfis evidenciaram a ação das cepas em todos os tratamentos, entretanto, a presença de picos poderia indicar que as mesmas atingiram o máximo potencial de biodegradação, entrando em uma fase estacionária de crescimento (Figura 47) havendo ainda diesel sem degradar presente na amostra, diferente do observado para diesel [2,5%].

4.3.4 Diesel [7,5%]

Para avaliar a possível degradação do diesel [7,5%] presente nos sedimentos ao longo dos 120 dias do ensaio de respirometria, foram comparados os perfis cromatográficos ao início e após finalizado o teste. Os resultados encontram-se na Figura 65.

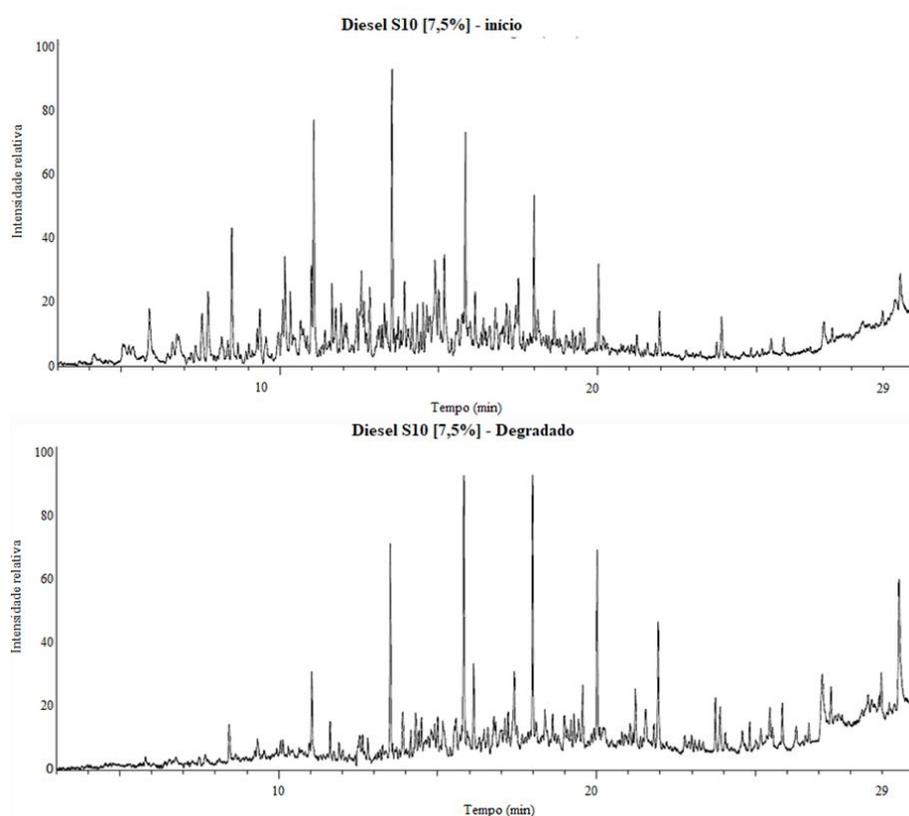


Figura 65: Perfil cromatográfico do diesel S10 [7,5%] início e degradado, extraído por headspace para análise em CG/MS.

O perfil cromatográfico do diesel S10 sem inóculo apresentou uma mudança após os 120 dias do início do teste de biodegradação, apresentando o mesmo comportamento que as demais concentrações.

Quando comparado o perfil da amostra sem inóculo com os perfis das amostras inoculadas com *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou o consórcio (Figura 66), foi possível observar mudanças sutis nos perfis que foram inoculados com as cepas ou com o consórcio. Os picos permanecem com intensidades semelhantes ao da amostra sem inóculo.

O perfil da amostra inoculada com *B. subtilis* apresentou tempos de retenção semelhantes aos encontrados no perfil sem inóculo, porém, as intensidades relativas destes foram diferentes. Foi possível observar uma região com UCM, indicando que existe alguma ação de degradação das bactérias.

O perfil com *B. licheniformis* apresentou picos semelhantes em posição e intensidade ao perfil de *B. subtilis*, sendo possível identificar uma UCM. Já para o consórcio, embora os picos tenham sido mantidos, os tempos de retenção diminuíram, resultando em um perfil semelhante ao perfil do diesel no início dos ensaios.

As mudanças nos perfis evidenciam ação das cepas em todos os tratamentos, mas a presença de picos de intensidades muito semelhantes aos do perfil da amostra inicial, reforçaria a hipótese de que as cepas atingiram o máximo potencial de biodegradação, entrando em uma fase estacionária de crescimento (Figura 47) havendo, ainda, nas amostras, quantidades de diesel a serem degradadas.

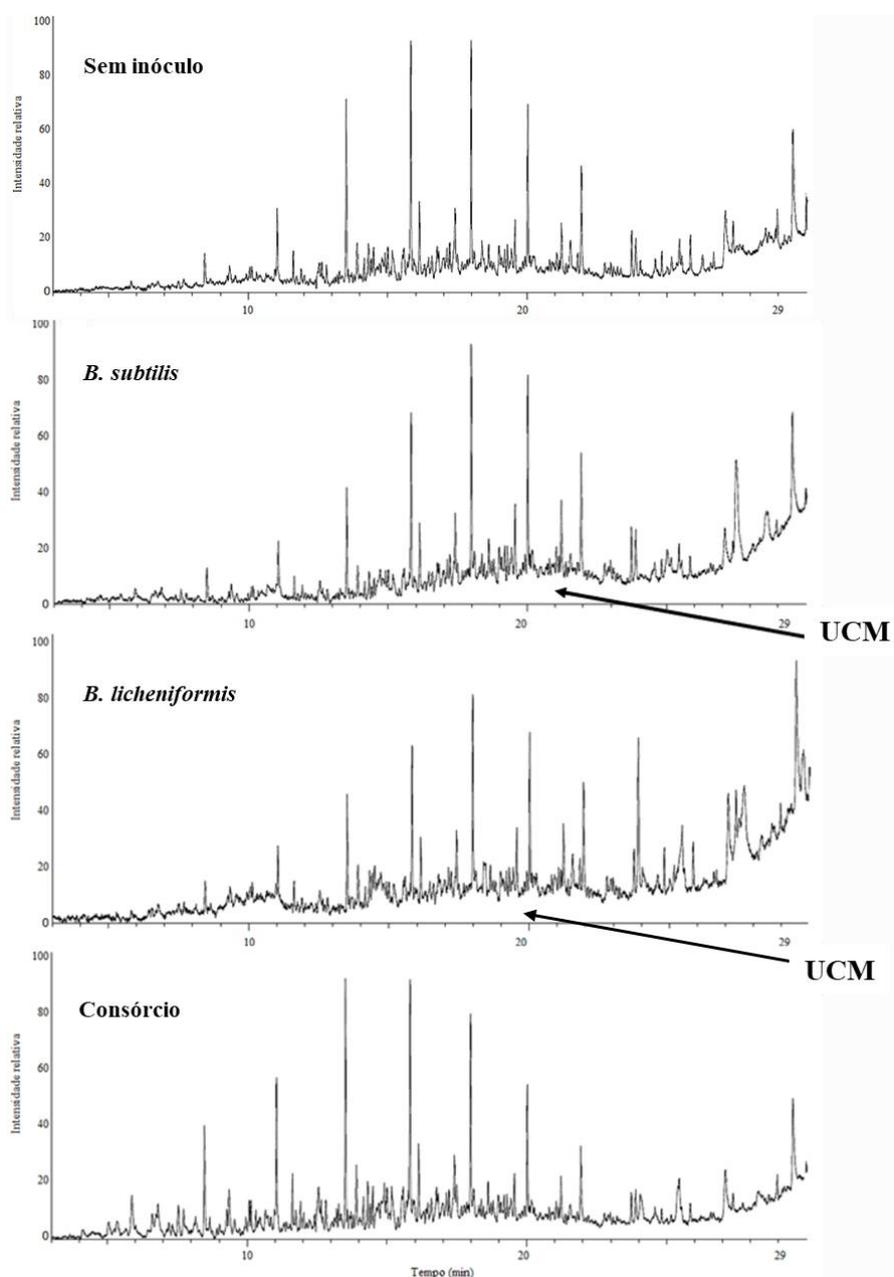


Figura 66: Perfil cromatográfico do diesel S10 [7,5%] com inóculo de *Bacillus subtilis* (A), *Bacillus licheniformis* (B) e consórcio (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*) (C), extraído por headspace para análise em CG/MS. Legenda: UCM: – mistura complexa não resolvida.

Os perfis cromatográficos possibilitaram inferir o comportamento de degradação do diesel, em relação ao controle, principalmente na concentração de [2,5%], com a diminuição significativa dos picos cromatográficos e elevação na linha-base dos cromatogramas, caracterizando a biodegradação ocorrida.

O deslocamento dos picos cromatográficos indicou a biotransformação das substâncias em subprodutos (ésteres das moléculas), o registro dos íons separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) (LANÇAS, 2004).

A perda de alcanos lineares e o aumento na complexidade da fração de hidrocarbonetos alifáticos, leva ao aparecimento de UCM, no perfil cromatográfico das amostras (FARRINGTON e QUINN, 2015).

Segundo Frysinger et al. (2003) e Booth et al. (2007) a presença de UCM na amostra indica frações mais biodegradadas ou intemperizadas de hidrocarbonetos presentes na amostra, dos quais não foi possível caracterizar por cromatografia gasosa. Deste modo o perfil cromatográfico de concentração [7,5%] apresenta ação das cepas no processo de degradação do diesel, no entanto não tão eficaz quanto para a concentração de [2,5%].

A taxa de degradação é comumente depende da concentração do contaminante e da quantidade de microrganismos hábeis em metabolizar o contaminante. Desta forma qualquer fator que afetar a concentração do contaminante, o número de microrganismos presentes, pode aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante (ANDRADE et al. 2010).

A presença de UCM evidencia a degradação de hidrocarbonetos, sendo um importante parâmetro na identificação de contaminação (CARREIRA et al., 2009), alguns estudos mostram preocupação com o potencial de bioacumular e de toxicidade em relação a UCM (PETERSEN et al., 2017).

Nos perfis cromatográficos de *B. licheniformis* foi possível notar em todas as concentrações, um comportamento diferente demonstrado que nas curvas de respirométricas (Figura 47), que indicam uma capacidade em biodegradar superior à de *B. subtilis*. Nos perfis cromatográficos é possível observar maior presença de picos, este comportamento de *B. licheniformis*, segundo Mnif et al. (2011), está relacionado com o fato de a cepa não apresentar a capacidade de utilizar tolueno como fonte de carbono, podendo ser tóxico a cepa.

A dificuldade de *B. licheniformis* em utilizar o tolueno como fonte de carbono também afetou os perfis cromatográficos do consórcio, principalmente nas concentrações 5% e 7,5%.

O diesel apresenta diversas fontes de hidrocarbonetos, que podem ser utilizadas por *B. licheniformis*, como fonte de carbono, corroborando os dados de C biodegradados da respirometria (Figura 47).

Uma biodegradação efetiva depende da ação simultânea de microrganismos metabolicamente versáteis e de condições ambientais favoráveis ao processo (VENKATESWARAN e HARAYAMA, 1995). *B. subtilis* e *B. licheniformis* utilizaram óleo cru (2%) como fonte de carbono em trabalho realizado por Haghghat et al. (2008).

4.4 Conclusão

Os perfis cromatográficos de *B. subtilis* demonstraram uma melhor eficiência na biodegradação do diesel, em todas as concentrações.

O uso da espécie de *B. licheniformis* pode ser limitante para a biorremediação das substâncias do diesel, devido à sua dificuldade em metabolizar tolueno como fonte de C, mesmo apresentando eficiência na respirometria (produção de C biodegradados).

Na concentração de 2,5%, o pico cromatográfico referente ao benzeno foi totalmente degradado, para ambas as cepas.

Os resultados permitiram concluir que, para uma maior eficiência no processo de biodegradação, há a necessidade do aporte de inóculos bacterianos durante o processo de biorremediação ou bioestimulação, para permitir uma degradação maior ou completa do contaminante.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido à complexidade das substâncias presentes na AFFF e da ausência de informações por parte das indústrias quanto a composição química do material, não foi possível realizar as análises químicas. Foram realizadas algumas tentativas de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas, tem em cromatografia líquida, mas ambas sem sucesso. A realização das análises químicas poderia ter elucidado informações quanto ao comportamento das cepas em relação a biodegradação de substâncias perfluoradas.

Dos trabalhos já realizados quanto a biorremediação da AFFF, sabe que há o consumo do butil-carbitol, desta forma estabilizado a biodegradação, sendo necessário aprofundar o conhecimento sobre o uso de microrganismos aeróbicos, biosurfactantes, biodegradação de sistema conjunto aeróbico e anaeróbico ou mesmo enriquecimento com nutrientes para viabilizar a biorremediação *in situ*.

O uso de consórcio de microrganismos é mais adequado para biorremediação, desta forma, as diferentes espécies são capazes de contornar a complexidade em degradar as diferentes frações de hidrocarbonetos, assim como em degradar subprodutos da degradação dos contaminantes.

O uso das espécies de *B. subtilis* e *B. licheniformis* em consórcio é bastante promissor, podendo também ser utilizado em conjunto com outras espécies, afim de contornar a complexidade dos processos de biorremediação. Entretanto, para o uso de novas espécies nos processos de biorremediação são necessários estudos complementares para determinar a capacidade de biodegradação, a melhor concentração de inóculos, inserções de inóculos durante o processo ou mesmo bioestimulação.

A realização de testes de toxicidade é de suma importância, para se conhecer o grau de toxicidade de substâncias químicas. No processo de biodegradação, os testes de toxicidade são ferramentas importantes, para verificar se os compostos degradados tiveram sua toxicidade inalterada, reduzida ou mesmo aumentada. Contudo não foi possível a realização, devido à pandemia da Covid-19.

Devido à Pandemia, as universidades ficaram fechadas por todo o ano de 2020, as atividades permaneceram por um longo tempo com restrições à quantidade de pessoas nos laboratórios, retomando a normalidade somente em 2022.

O acompanhamento com análises químicas é uma ferramenta fundamental, para determinar a presença de contaminantes e eficácia do processo de biorremediação.

O presente trabalho foi realizado para preencher a lacuna quanto a biorremediação do diesel S10 e das AFFFs, em sedimento de ambientes costeiros. O impacto desses

contaminantes nos ecossistemas vão de mortalidade de organismos vivos, bioacumulação, acumulação nas praias, costões, manguezais, além de danos socioeconômicos. Preencher as lacunas quanto ao processo de biorremediação e sobre o comportamento dos contaminantes, fornece ferramentas, para ações rápidas, de forma a minimizar os danos ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Líquido Gerador de Espuma de Película Aquosa (AFFF) à 3% para Uso Aeronáutico. Norma NBR 11830. Brasil: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1993.

ABNT. Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Norma NBR 14.283. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1999.

ADAMS, G. O.; FUFYIN, P. T.; OKORO, S. E.; EHNOME, I.. “Biostimulation na Bioaugmentation: A Review”. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, vol.3 (1), p. 28-39. 2015.

ALBURQUERQUE, A.F.. Biodegradação de compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem utilizando microrganismos do solo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 2000.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHAMARI, H. S.; AL-SULAIMANI, H. S.. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 81, p. 141-146, 2012.

ALEXANDER, M.. *Introduction to Soil Microbiology*. 12^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

ALEXOPOULOS, C. et al.. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, v. 88, p. 381-392, 2004.

ALISI, C.; MUSELLA, R.; TASSO, F.; UBALDI, C.; MANZO, S.; CREMISINI, C.; SPROCATI, A. R.. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*, n.407, p.3024–3032, 2009.

ALHO, C. J. S.. The Value of Biodiversity, *Brazilian Journal of Biology*, vol. 68(4), p. 1115-1118. 2008.

ALTERTHUM, F.. Crescimento Microbiano. In: TRABULSI, L.R.. *Microbiologia* 4^o edição. São Paulo: Atheneu, p. 30-35. 2008.

ANDRADE, J. A., AUGUSTO, F. e JARDIM, I. C. S. F.. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, v. 35, n. 3, pp. 17-43. 2010.

ANDRADE, W. B. Bactérias endógenas degradadoras de btx na remediação do sedimento contaminado de manguezal. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia (UFBA). Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente (POSPETRO), Salvador, 2015.

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* - 9230 C. 22nd ed. 2012.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R.. “Fundamentos da Biologia Moderna”, editor Moderna. 4^o edição. Volume Único. 856p. 1990.

AMUND, O. O.; ADEBIYI, A. G.. Effect of viscosity on the biodegradability of automotive lubricating oils. *Tribology International*, v. 24, n. 4, p. 235–237, 1991.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/boletins/arquivos-bmppgn/2021/12-2021-boletim.pdf>>. Acesso: 06 de junho de 2022.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Diesel S10. 2012. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso 15 de outubro de 2019.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Investigação do incidente de vazamento de petróleo no Campo de Frade -Relatório final. 2012. Disponível em: <www.anp.gov.br/SITE/acao/download/?id=61108>. Acesso: 15 de maio 2022.

ASIMIEA, O. A.; SAM-WOBO, S. O.. The Impact of Hydrocarbon Waste from Brass Oil terminal on the Phytoplankton and Periphyton Communities of Lower Brass River, Niger Delta, Nigeria. *J. Emer. Trends Eng. Appl. Sci.* 2, p. 729-733. 2011.

ASSIS, A.A.R.; Valadão, G.E.S.; Cisalpino, P.S.. Levantamento da Curva de Crescimento da bactéria *M. phlei* para obtenção de biomassa em ensaios de separação sólido-líquido. XXIV ENTMME - Salvador/Bahia – 2011.

AWAD, E.; ZHANG, X. M.; BHAVSAR, S. P.; PETRO, S.; CROZIER, P. W.; REINER, E. J.; FLETCHER, R.; TITTEMIER, S. A., BRAEKEVELT, E.. Long-term environmental fate of perfluorinated compounds after accidental release at Toronto airport. *Environmental Science and Technology*, v. 45, n. 19, p. 8081-8089. 2011.

BADUEL, C., MUELLER, J. F., ROTANDER, A., CORFIELD, J., GOMEZ-RAMOS, M. J.. Discovery of novel per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) at a fire fighting training ground and preliminary investigation of their fate and mobility. *Chemosphere*, 185, 1030-1038. 2017.

BARALDO, Kleber B. Caracterização e comparação dos estuários dos rios Itaguapé e Guaratuba (Bertioga, SP) com base nos parâmetros geo-físico-químicos, batimetria e imageamento do fundo. 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/154810>>.

BARTHA, R.; PRAMER, D.. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.*, v.100, n.1, p.68-70. 1965.

BARTHA, R.; BOSSERT, I.. The treatment and disposal of petroleum wastes. In: *Petroleum Microbiology*, Macmillan Pub Co., New York, 1984.

BARTLE, K. D. e MYERS, P.. History of gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21, 547–557. 2002.

BARROS F. F. C.; QUADROS C. P.; JÚNIOR M. R. M.; PASTORE G. M.. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, p. 409-414. 2007.

BAKER, K. H.; HERSON, D. S.. *Bioremediation*. McGraw-Hill, New York, 1994.

BEANS, C.. How “forever chemicals” might impair the immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118 (15). 2021.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34 (Suppl.1), p. 65-68, 2003.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T.. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1049-1055. 2005.

BERNARDES, R.S. e SOARES, S.R.A.. Fundamentos da Respirimetria no controle de poluição da água e do solo. Editora Universidade de Brasília: Finatec, Brasília, DF, p.164. 2005.

BHAKTA, A.; RUCKENSTEIN, E.. Foams and Concentrated Emulsions: Dynamics and "Phase" Behavior. *Langmuir*, v. 11, n. 12. p. 4642–4652, 1995.

BICEGO, M. C.. Contribuição ao estudo de hidrocarbonetos biogênicos e do petróleo no ambiente marinho. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. p. 156. 1988.

BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Méndez-Vilas, A. (Ed.), p. 1277-1288. 2010.

BOOTH, A. M.; SUTTON, P. A.; LEWIS, C. A.; LEWIS, A. C.; SCARLETT, A.; CHAU, W.; ROWLAND, S. J. Unresolved complex mixtures of aromatic hydrocarbons: thousands of overlooked persistent, bioaccumulative, and toxic contaminants in mussels. *Environmental Science Technology*, v. 41, p. 457-464, 2007.

BOSSE, R.; WIRTH, M.; KONSTANZ, A.; BECKER, T.; WEISS, J.; GIBIS, M.. Determination of volatile marker compounds in raw ham using headspace-trap gas chromatography. *Food Chemistry*, v.219, p. 249-259. 2017.

BRASIL, Lei nº 9.605/98 de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções administrativas derivadas de atividades lesivas ao meio penais condutas e ambiente, e dá outras providências; 1998.

BRASIL, CONAMA – RESOLUÇÃO nº 273 de 29 de novembro de 2000. Dispõe sobre a instalação de sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis. 2000.

BRASIL, CONAMA – RESOLUÇÃO nº 274 de 29 de novembro de 2000. Dispõe sobre a Balneabilidade. 2000.

BRASIL 2001. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Relatório sobre o impacto ambiental causado pelo derramamento de óleo na Baía de Guanabara. 2001. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/processos/67B2E6A7/artigo5.doc>. Acesso: 25 de junho de 2022.

BRASIL, Lei nº 11.097/05, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a Introdução do Biodiesel na Matriz Energética Brasileira; 2005.

BRASIL, CONAMA. RESOLUÇÃO nº 415, de 24 de setembro de 2009. Diário oficial da União. Brasília, DF, nº 184, p. 53 e 54, 25 set. 2009.

BRASIL, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº65, de 9 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 dez. 2011.

BRASIL, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº 46, de 20 de dezembro de 2012, Diário oficial da União. Brasília, DF, 12 dez. 2012.

BRASIL, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução ANP nº 50, de 23 de dezembro de 2013. Diário oficial da União. Brasília, DF, 23 dez. 2013.

BURTON, G.A.; LANDRUM, P.F.. Toxicity of sediments. *In*: Encyclopedia of sediments and sedimentary rocks, G.V. Middleton, M.J. Church, M.Corigilo, L.A. Hardie, F.J. Longstaffe (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 748-751. 2003.

BUTENHOFF, J.; COSTA, G.; ELCOMBE, C.; FARRAR, D.; HANSEN, K.; IWAI, H.; JUNG, R.; KENNEDY, G. J.; LIEDER, P.; OLSEN, G.; THOMFORD, P. Toxicity of ammonium perfluorooctanoate in male cynomolgus monkey after oral dosing for 6 months. *Toxicological Sciences*, v. 69, n. 1, p. 244–257. 2002.

CANO, R.J.; BORUCKI, M.K.. Revival and Identification of Bacterial Spores in 25- to 40-Million-Year-Old Dominican Amber. *Science*, v.268, p. 1060-1064. 1995.

CANTAGALLO, C; MILANELLI, J.C.C.; DIAS-BRITO, D.. Limpeza de ambientes brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. *Pan-American Journal of Sciences*, v. 2(1), p. 1-12. 2007.

CARA, A.L., ORTEGA, A.S.B., PUSCEDDU, F.H., ABESSA, D.M.S., PEREIRA, C.D.S., MARANHO, L.A.. Could aqueous film-forming foams (AFFFs) and encapsulator agents (EAs) interfere on the reproduction and growth of *Daphnia similis*? *Water Air Soil Pollut.* 232, 416. 2021.

CARDOSO, C. D. P. Estudo da macrofauna bêntica de parias do parque estadual da Ilha do Cardoso, como subsídio a elaboração de cartas de sensibilidade ambiental a derramamentos de petróleo. 65f. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

CARMAN, K. R.; FLEEGER, J. W.; MEANS, J. C.; POMARICO, S.M.; McMILLIN, D. J.. Experimental investigation of the effects of polynuclear aromatic hydrocarbons on an estuarine sediment food web. *Marine Environmental Research*, v 40(3), p. 289-318. 1995.

CARMO, E.H.; TEIXEIRA, M.G.. Desastres tecnológicos e emergências de saúde pública: o caso do derramamento de óleo no litoral do Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2. 2020.

CARREIRA, R. S.; RIBEIRO, P. V.; SILVA, C. E. M. Hidrocarbonetos e esteróis como indicadores de fontes e destino de matéria orgânica em sedimentos da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. *Química Nova*, v. 32, p. 1805-1811, 2009.

CARVALHO, M.U., MOREIRA, L.B., MARANHO, L.A., ABESSA, D.M.S.. Chronic effects of fire suppressors on the reproduction of the copepod *Nitocra* sp. *Rev. Ciênc. Agron.* 36, 82–94. 2019.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 39, n.2, p. 1-18, 2011.

CERNIGLIA, C.E.. “Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons,” *Biodegradation*, Vol. 3, No. 2-3, p. 351-368. 1992.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Resolução CONAMA nº274 – Qualidade da Água. 2000.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Avaliação do uso de produtos biotecnológicas para tratamento de efluentes líquidos, resíduos sólidos e remediação de solos e águas. Norma técnica da CETESB nº L1.022, de junho de 2007.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. 2009.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Relatório Qualidade das Praias Litorâneas no Estado de São Paulo. 2018.

CMA. HEDSET for Ethylene Glycol Butyl Ether. Washington: EU Risk Assessment of Existing Chemicals Program by the Chemical Manufacturers Association, 1994.

COLLERAN, E.. Uses of bacteria in bioremediation. In: SHEEHAN, D. *Bioremediation protocols – Methods in biotechnology 2*. New Jersey, Humana Press p. 339. 1997.

COLEDAM, D.A.C.; PUPO, M.M.S.; SILVA, B.F.; SILVA, A.J.; EGUILUZ, K.I.B.; SALAZAR-BANDA, G.R.; AQUINO, J.M.. Electrochemical mineralization of cephalixin using a conductive diamond anode: A mechanistic and toxicity investigation. *Chemosphere*, v. 168, p. 638-647. 2017.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO; PIERINA, S.. *Fundamentos de Cromatografia*. Editora Unicamp - Campinas, SP. 2006.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, M. R. Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em latossolo vermelho-escuro. *Dissertação (Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos)*. Faculdade de Engenharia Civil e Ambiental – UNB. 2009.

COSTA, A. S.; ROMÃO, L. P. C.; ARAÚJO, B. R.; LUCAS S. C. O.; MACIEL, S. T. A.. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresouce Technology*. V. 105, p. 31-39, 2012.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de mostras microbiológicas. *Ciência Animal*, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R.. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International*, v. 37, n. 1, p. 226–247. 2011.

CLARKE, D. B.; BAILEY, V. A.; ROUTLEDGE, A.; LLOYD, A. S.; HIRD, S.; MORTIMER, D. N.. Dietary intake estimate for perfluorooctanesulphonic acid (PFOS) and

other perfluorocompounds (PFCs) in UK retail foods following determination using standard addition LC–MS/MS. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, v. 27, n. 4, p. 530–545.2010.

CLARO, E.M.T.; CRUZ, J.M.; MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M.; JÚNIOR, J.R.M.; BIDOIA, E.D.. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: Technology and Mechanism. In: Kumar, V., Kumar, M., Prasad, R. (eds) *Microbial Action on Hydrocarbons*. Springer, Singapore.2018.

CLAXTON, L.D..The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 3: Diesel and gasoline. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. v. 763. P.30-85. 2014.

CLEMENTS, Laura D.; MILLER, Brian S.; STREIPS, Uldis N.. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. *Systematic and applied microbiology*, v. 25, n. 2, p. 284-286. 2002.

DAS, N., CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, v. 2011, 2010.

DAS, S.; DASH, H. R. Microbial biodegradation and bioremediation. A potential toll for restoration of contaminated areas. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, p. 1-22. 2014.

DALTIN, D.. Tensoativos química, propriedades e aplicações. 2012. Disponível em: <http://www.usp.br/massa/2014/qfl2453/pdf/Tensoativos-livrodeDecioDaltin-Capitulo1.pdf>. Acesso em 25 julho de 2019.

DEL VALLS, T.A.; CONRADI, M. 2.. Avances en ecotoxicología marina: Comparación entre tests de laboratorio y estudios *in situ* para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. Departamento de Química e Física. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Cádiz. *Ciencias Marinas*. España. 26 (1): p. 39 - 64. 2000.

DEMAIN AL.. The business of biotechnology. *Ind. Biotech*. 3: 269-283. 2007.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M.. Microbial production of surfactants and their comercial potential.*Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47-64. 1997.

DIAZ, E.. *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*, 1ª edição, Caister Academic Press, New York, 2008.

DOBLER, R.; SANER, M.; BACHOFEN, R.. Population changes of soil microbial communities induced by hidrocarbon and heavy metal contamination. *BioremediationJournal*, v.4, p.41-56. 2000.

DOLFING, J.. Energetics of anaerobic degradation pathways of chlorinated aliphatic compounds. *Microbial Ecology*, v. 40, n. 1. p. 2–7. 2000.

DONG, C-D.; TSAI, M-L.; CHEN, C-W.; HUNG, C-M.. Heterogeneous persulfate oxidation of BTEXand MTBE using Fe₃O₄-CB magnetite compositesand the cytotoxicity ofdegradation products. *International Biodeterioration &Biodegradation*, *In Press*. 2017.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 3, p. 268-272, 2004.

- EL-NAAS, M. H.; ACIO, J. A.; EL TELIB, A. E.. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 2, p. 1104-1122. 2014.
- EMMONS, H. W. The further history of fire science. *Fire Technology*, v. 21, n. 3, p. 230-238, 1985.
- EURONEWS 2022. Incêndio em Cuba continua fora de controle. Disponível em: <<https://pt.euronews.com/2022/08/09/incendio-em-cuba-continua-fora-de-controlo>>. Acesso: 20 de outubro de 2022.
- FARRINGTON, J.W.; QUINN, J.G.. Unresolved Complex Mistura (UCM): A brief history of the term and Moving beyond it. *Marine Pollution Bulletin*, v. 96, p. 29-31. 2015.
- FARHADIAN, M.; DUCHEZ, D.; VACHELARD, C.; LARROCHE, C.. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors-a review. *Water Research*, v. 42, p. 1325-1341. 2008.
- FETZNER, S.. Bacterial dehalogenation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 50, n. 6, p. 633–657. 1998.
- FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E.. Ciências de Espumas - Aplicação na Extinção de Incêndios. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 126-130. 1999.
- FONTES, R.F.C.. Dispersão de LGE e da Pluma Térmica no Estuário de Santos Durante Incêndio da ULTRACARGO. Technical report presented to the Public Ministry of the State of São Paulo (GAEMA) to subsidize the process "Danos materiais de correntes de incêndio em tanques de armazenagem na empresa Ultracargo, em Santos – Inquérito Civil n. 28/15-GAEMA-BS". São Paulo State University – UNESP, São Vicente, SP, Brazil, 16p. 2016.
- FREITAS, B. G.; BRITO, J. G. M.; BRASILEIRO, P. P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SAMTOS, V. A.; SARUBBO, L. A.. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum by-products spilled in oceans. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-9. 2016.
- FRYSINGER, G. S.; GAINES, R. B.; XU, L.; REDDY, C. M. Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments. *Environmental Science and Technology*, v.37, p.1653-1662, 2003.
- FROEHNER, Sandro; MARTINS, Raquel Fernandes. Avaliação da Composição Química de Sedimentos do Rio Barigüi na Região Metropolitana de Curitiba. *Revista Química Nova*, v.31, n.8, p. 2020-2026, 2008.
- GAUDETTE, H. E.; FLIGHT, W. R.; TONER, L. & FOLGER, D. W. 1.. An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *J. sedim. Petrology*, 44(1):249-253. 1974.
- GAUR, N.; FLORA, G.; YADAY, M.; TIWARI, A.; A.. Review with Recent Advancements on Bioremediation Based Abolition of heavy metals. *Environmental Science. Processes & Impacts*. Vol 16(2). 2014.
- GEERDINK, M. J.; LOOSDRECHT, M. C. M.; LUYBEN, K. C. A. M.. Biodegradability of diesel oil. *Biodegradation*, v. 7, p. 73–81. 1996.

- GERLACH, S. A.. Marine Pollution. Diagnosis and Therapy. Springer Verlag, Berlin, p. 218. 1976.
- GIESY, J. P.; KANNAN, K.. Perfluorochemical surfactants in the environment. *Environmental Science and Technology*, v. 36, n. 7, p. 146A–152A. 2002.
- GILBERT-LÓPEZ, B.; ROBLES-MOLINA, J.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A.. Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS). *Talanta*, v. 83, p. 391-399. 2010.
- GHAZALI, F.M., RAHMAN, R.N.Z.A, SALLEH, A.B., BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International biodeterioration & biodegradation*, v.54, p. 61-67, 2004.
- GHERNA et al.. *Bacillus licheniformis* Final Risk Assessment. Biotechnology Program Under Toxic Substances Control Act (TSCA). Environmental Protection Agency – U.S.. 1989.
- GLASBY, G. P.. “Abiogenic origin of hydrocarbons: An historical overview,” *75 Resour. Geol.*, vol. 56, no. 1, pp. 83–96. 2006.
- GRANDJEAN, P.; ANDERSEN, E. W.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; NIELSEN, F.; MOLBAK, K.; WEIHE, P.; HEILMANN, C.. Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *Journal of the American Medical Association*, v. 307, n. 4, p. 391-397. 2012.
- GRAVES A.; LANG C.; LEAVITT M.. Respirometric analysis of the biodegradation of organic contaminants in soil and water. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 28, n. 1, p. 813–26. 1991.
- GRAS, R.; LUONG, J.; HADDAD, P.R.; SHELLIE, R.A.. Gas chromatography with simultaneous detection: Ultraviolet spectroscopy, flame ionization, and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v 1563. p. 171-179. 2018.
- GRAY, P. H. H.; THORNTON, H. G.. Soil bacteria that decompose certain aromatic compounds. *Zentr.Bakt.Parasitenk., Abt. II*, v. 2, p. 74–96. 1928.
- GREENPEACE 2015. Desastre no Golfo do México completa cinco anos. 20 de abril de 2015. Disponível em:< <https://www.greenpeace.org/brasil/blog/desastre-no-golfo-do-mexico-completa-cinco-anos/>> Acesso: 03 de agosto de 2018.
- GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, M. F. Comparação entre injeção na coluna ("on-column") e *headspace* dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. *Química Nova*, v. 24, 2001.
- HAGHIGHAT, S.; AKHAVAN, A.S.; MAZAHERI, A.M.; PASDAR, H.. Ability of indigenous *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in microbial enhanced oil recovery. *In. J. Environ. Sci. Technol* 5. 2008.
- HANSON, K.G.; DESAI J.D.; DESAI A.J.. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*, v. 7, n. 10, p. 745-748. 1993.

HARMSSEN, J.; RIETRA, R.. 25 years monitoring of PAHs and petroleum hydrocarbons biodegradation in soil. *Chemosphere* 207:229–238. 2018.

HENRIQUE, A.O.; MORAN JUNIOR, C.P.. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods*, v.20, p.95-110. 2000.

HIGGINS, C. P.; FIELD, J. A.; CRIDDLE, C. S.; LUTHY, R. G.. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environmental Science and Technology*, v. 39, n. 11, p. 3946–3956. 2005.

HOFFMAN, K.; WEBSTER, T. F.; WEISSKOPF, M. G.; WEINBERG, J.; VIEIRA, V. M.. Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and attention deficit/hyperactivity disorder in U.S. children 12e15 years of age. *Environmental Health Perspectives*, v.118, n. 12, p. 1762-1767. 2010.

HOLLAWAY, S. L.; FAW, G. M., SIZEMORE, R. K.. The bacterial Community composition of an active oil field in the North Western Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, v. 11, p. 153-156. 1980.

HUANG, H.; HUANG, C.; WANG, L.; YE, X.; BAI, C.; SIMONICH, M. T.; TANGUAY, R. L.; DONG, Q.. Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonicacid (PFOS). *Aquatic Toxicology*, v. 98, n. 2, p. 139-147. 2010.

HUSAIN, T.. *Kuwaiti Oil Fires: Regional Environmental Perspectives*. 1st ed. Oxford: Pergamon Press, 1995.

IEA 2022. International Energy Agency. Relatório de análise e previsão 2021. Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/oil-2021>>. Acesso: 06 de junho de 2022.

ISSAKOV, A. Como minimizar os riscos de acidentes em plataformas de petróleo offshore, 2013.

ISENBERG, C.. *The Science of Soaps Films and Soap Bubbles*. Mineola: Dover Publications Inc., 1992.

ITOPF (International Tanker Owners Federation) (2002). Fate of marine oil spills, Technical Information Paper, (2). Disponível em <<http://www.itopf.com/knowledgeresources/documents-guides/document/tip-2-fate-of-marine-oil-spills>>. Acesso: 30 de julho de 2019.

JARAMILLO, I. R.. *Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciencia del suelo*. Universidade Autónoma Metropolitana, México. 1996.

JIANG, Z.; HUANG, Y.; XU, X.; LIAO, Y.; SHOU, L.; LIU, J.; CHEN, Q.; ZENG, J.. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. *Acta Ecologica Sinica*, v. 30, p. 8-15. 2010.

JONES, J.; KNIGHT, M.; BYRON, J. A.. Effect of gross population by querosene hydrocarbons on the micro flora of a moorland soil. *Nature*, v. 227, p. 1166. 1970.

- KAPLAN, I.R.; GALPERIN, Y.; LU, S.; LEE, R.. Forensic environmental geochemistry: differentiation of fuel-types, their sources and release time. *Org. Geochem.*, 27, 289-317. 1997.
- KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.
- KENSA, M. V.. “Bioremediation no overview”, *Journal of Industrial Pollution Control*, vol. 27(2), p. 161-168. 2011.
- KEY, B. D., HOWELL, R. D., & CRIDDLE, C. S.. Fluorinated organics in the biosphere. *Environmental science & technology*, 31(9), 2445-2454. 1997.
- KINNER, D. L.. Fluorinated Organic Chemicals. The Florida Times-Union. 1998.
- KISHI, T.; ARAI, M.. Study on the generation of perfluorooctane sulfonate from the aqueous film-forming foam. *Journal of Hazardous Materials*, 159 (1), 81– 86. 2008.
- KISSA, E.. Fluorinated surfactants: Synthesis, properties, and applications. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1994.
- KLEIN, R.. Focus on foam. *Fire Engineering Journal and Fire Prevention*, v. 1, n. 1, p. 40–42. 2004.
- KNEPPER, T. P.; FRÖMEL, T.. Biodegradation of fluorinated alkyl substances. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 208, n. 53, p. 161–77. 2010.
- KNOTHE, G.; Gerpen, J. V.; KHRAL, J.; RAMOS, L. P.. Manual do biodiesel, Blucher: São Paulo, 2006.
- KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y.. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbons-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation*, v. 19, p. 749-757. 2008.
- KUMAR, A.; BISHT, B.S.; JOSHI, V.D.; DHEWAT, T.. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Toll. Vol 1(6), p. 1079-1093. 2011.
- KUMAR, M; LEON V; DE SISTO MATERANO A; ILZINO O. A; GALINDO-CASTRO I; FUENMAYOR S. L.. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant producing *Pseudomonas* sp. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 61. 2006.
- KUTA, F.A. Antifungal effects of *Calotropis Procera* stem bank extract against *Trichoplyton gypseum* and *Epiderinoplyton Flocosum*. *Afr J. Biotechnol.* 7(13):2116-8. 2008.
- KWAPISZ, E.; WSZELAKA, J.; MARCHUT, O.; BIELECKI, S.. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 61, p. 214-222. 2008.
- LANÇAS, F. M.. Validação de métodos cromatográfico de análise, RiMa, São Carlos, P. 62. 2004.
- LALLO, R., RAMCHURAN, S., RAMDUTH, D., GÖRGENS, J., GARDINER, N.. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of

water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1471–1479. 2007.

LEI, L., KHODADOUST, A.P., SUIDAN, M.T. e TABAK, H.H. “Biodegradation of sediment-bound PAHS in field contaminated sediment”. *Water Research*, 39, 349-361. 2005.

LIMA, L.A.; RAMOS, L.R.; FILHO, R.F.C.; SANTOS, J.G.. Isolamento e Identificação de Bactérias Tolerantes a Presença de Hidrocarbonetos (In Vitro) em Solo Amazônico. 25º Congresso Brasileira de Microbiologia, Porto de Galinhas- PE. 2009.

LITTLEJOHNS, J. V.; DAUGULIS, A. J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. **Process Biochemical**, 43, p. 1068-1076, 2008.

LOPES, A.G.; MARKER, A.; GLOEDEN, E.; CROZERA, E.H.; WEBER, J.; FRACCAROLI, M.J.B.; ALMEIDA, N. A.; CUNHA, R.C.A; AQUINO NETO, V.; AQUINI, W.F.. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. São Paulo: CETESB/GTZ, 2001.

LOURENÇO, R.A.; COMBI, T.; ALEXANDRE, M.R.; et al.. Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019-2020): Trying to find answers and filling data gaps. *Marine Pollution Bulletin*, Elsevier Ltd., Oxford, v. 156, p. 111219. 2020.

LU, X.Y.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P.. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. V. 89, p. 1357-1371. 2011.

LUNA B, Townsend MU.. Tipranavir: the first nonpeptidic protease inhibitor for the treatment of protease resistance. *Clin. Ther.* 11: 2309-2318. 2007.

LURIE, I. S., HAYS, P. A., CASALE, J. F., MOORE, M. J., CHAN, K. C., ISSAQ, H. .. Capillary electrophoresis analysis of isomeric truxillines and other high molecular weight impurities in illicit cocaine. *Electrophoresis*, v. 19, p. 51–56. 1998.

MACDONALD, D.. Corporate Risk Control. 1st ed. New York: John Wiley and Sons, Co. 1990.

MAGRIS, R.A. & GIARRIZZO, T.. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 153. 10.1016/j.marpolbul. 2020.

MALINA, G.; ZAWIERUCHA, I.. Potential of bioaugmentation and biostimulation for enhancing intrinsic biodegradation in oil hydrocarbon-contaminated soil. *Bioremediation Journal*, v. 11, p. 141-147. 2007.

MANAHAN, STANLEY E.. Ambiental – Tradução Félix Nonnenmacher; revisão técnica Wilson de Figueiredo Jardim 9ª edição Porto Alegre: Bookman, P. 222. 2013.

MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J.P.. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science Technology*, 58, 441-448. 2003.

MARIANI, P.D.S.C.. Estudo da biodegradação da blenda de poli (e caprolactona) e amido modificado em meios sólidos e líquidos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, sp, p.77. 2005.

MARIANO A. P., et al. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007.

MCINERNEY, M. J.; JAVAHERI, M.; NAGLE, D. P.. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus liqueniformis* strain JF-2, *Journal Microbiology Biotechnology*, v5. 1990.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.. *Ecologia microbiana*. Jaguariuna: Embrapa, CNPMA, p.308-314. *Microbiology*, New York, v. 73, p 66-73. 1998.

MELLO, G.S.L.. Avaliação da viabilidade da utilização do teste respirométrico de Bartha para determinar a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares em solo tropical: caso do Fenantreno. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, Universidade de São Paulo. 2005.

MELZER, D.; RICE, N.; DEPLEDGE, M. H.; HENLEY, W.E.; GALLOWAY, T.S.. Association between serum perfluorooctanoic acid (PFOA) and thyroid disease in the US national health and nutrition examination survey. *Environmental Health Perspectives*, v. 118, n. 5, p. 686-692. 2010.

MENEGHETTI, L. R. R.. Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. Passo Fundo: UPF. 2007.

MERGUIZO, R.A.C.. Diversidade e sucessão bacteriana em sedimentos contaminados por hidrocarbonetos, derivados e por dispersão de espumas para controle de incêndio (AFFF), no Estuário de Santos – SP. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências – Biodiversidade Aquática) – Universidade Estadual Paulista UNESP- Câmpus Litoral Paulista, São Vicente, SP, 2017.

METCALF & EDDY.. *Wasterwater Engineerring – Treatment*, 3º edição p. 1334. 1991.

MILANELLI, J. C. C.; LOPES, C. F. Efeitos do óleo e métodos de limpeza em praias arenosas. In CETESB. Derrames de óleo no mar e os ecossistemas costeiros. Companhia de tecnologia e saneamento ambiental – CETESB – Apostila do curso “Derrames de óleo no mar e os ecossistemas costeiros”. São Paulo: Cap.10, p. 167-176. 2002.

MILLE, G.; GIULIANO, M.; ASIA, L.; MALLERET, L.; JALALUDDIN, N.. Sources of hydrocarbons in sediments of the Bay of Fort de France (Martinique) *Chemosphere*, Atlanta, v. 64, p. 1062-1073. 2006.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfatantes. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. A biodiversidade na Zona Costeira e Marinha do Brasil. Disponível em:< <http://www.mma.gov.br/informma/item/6618-a-biodiversidade-na-zona-costeira-e-marinha-do-brasil>>. Acesso em: 20 de outubro de 2021.

MNIF, S.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; SAYADI, S.. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bactéria. *Journal of Applied Microbiology*, v.111, p. 525-536. 2011.

- MNIF, I.; SAHNOUN, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.;GHRIBI, D. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 109, p. 72–81, 2017.
- MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D.. Petroleum derivatives biodegradation: Environmental impact and bioremediation strategies. Amazon, p. 104. 2012.
- MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. e BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009.
- MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D.. Screening the toxicity and biodegradability of petroleum hydrocarbons by a rapid colorimetric method. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. V. 67. p. 1-12. 2014.
- MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; CRUZ, J. M.; CLARO, M. T.; QUITERIO, G. M.; BIDOIA, E. D.. Metabolical shifts towards alternative BTEX biodegradation intermediates induced by perfluorinated compounds in firefighting foams. *Chemosphere*, v. 173, p. 49-60. 2017b
- MONTAGNOLLI, R. N.; MATOS LOPES, P. R.; BIDOIA, E. D.. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 187, p. 4116. 2015.
- MORAES, A. V., BRETAS, E. S., PEREIRA, C. D. S., CORTEZ, F. S., CESAR, A., & SANTOS, A. R.. Avaliação da qualidade ambiental do rio Itaguapé, Bertioga-SP, com base em testes de toxicidade e indicadores microbiológicos de balneabilidade. *O Mundo Da Saúde*, 35(1), 55–63. 2011.
- MOREIRA, F.M.S.. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Editora UFLA, p. 625. 2002.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.
- MORIARTY, D.J.W.. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351-358. 1998.
- MOODY, C.A.; FIELD, J.A.. Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams. *Environmental science & technology*, 34 (18), 3864-3870. 2000.
- MULKINS-PHILLIPS, G.J.; STEWART, J. E.. Distribution of hydrocarbon utilizing bacteria in North Western Atlantic waters and coastal sediments. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 20, p. 955-962. 1974.
- MURRAY, P.R. et al. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 513. 1992.
- MULLIGAN, D. J.. Fire-Fighting Foams - True Specialities. *Speciality Chemicals*, v. 1, n. 1, p. 343–347. 1990.

NASCIMENTO, P. T. H. *et al.* “Fractionation of Asphaltene by Adsorption onto Silica and Chemical Characterization by Atmospheric Pressure Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, Fourier Transform Infrared Spectroscopy Coupled to Attenuated Total Re,” *Energy & Fuels*, vol. 30, no. 7, pp. 5439–5448. 2016.

NAKAZAWA, M.M.. Avaliação da Remoção de HPAs e Diversidade de Micro-organismos em Experimento de Biorremediação de Sedimento Estuarino Contaminado com Óleo Diesel. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Recife. 2011.

NICOLAU, P.B.; Microrganismos e crescimento microbiano. Universidade AbERTA. Portugal. Fevereiro de 2014. Disponível em: <https://repositorioaberto.uab.pt/>. Acesso: 30 de novembro de 2022.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grow on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 336-341. 2006.

NOEL, C.; GOURRY, J. C.; DEPARIS, J.; BLESSING, M.; IGNATIADIS, I.; GUIMBAUD, C.. Combining geoelectrical measurements and CO₂analyses to monitor the enhanced bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils: A field implementation. *Applied and Environmental Soil Science*, v. 2016, p. 1-15. 2016.

NWAOGU, L. A.; ONYEZE, G. O. C.; NWABUEZE, R. N.. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 1939-1943. 2008.

NWANKWEGU, A.; ONWOSI, C. O. Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environmental Technology & Innovation*, v. 7, p. 1-11, 2017.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test n° 307: Aerobic and Anaerobic transformation in soil, Organization for the Economic Cooperation and Development, 2002.

OLIVEIRA, C. H. Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.

OLIVEIRA I.P. de, CUNHA R., R. SANTOS, S. M. dos, FARIA, C. D. de e CUNHA, G. F.. Efeito da correção da fertilidade do solo no desenvolvimento da *brachiaria brizantha* cv. Marandu em latossolo com diferentes históricos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 30(1): 57-64, jan./jun. 2000.

OLIVEIRA, D.M.; HENCKEIN, F.A., SATOW, M.M., ANGELIS, D.F., ALMEIDA, A.F., BERTOLETTI, A.C.D., MESSETTI, M.A., GUERRA, R.C. e RONCON, T.J.. “Avaliação da Biodegradação de Biodeisel”. In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, Varginha, MG. 2006.

OLIVEIRA, A.J.F.C; HOLLNAGEL, H. C.; MESQUITA, H.S. L. ; FONTES, R. F. C. . Physical, chemical and microbiological characterization of the intertidal sediments of Pereque Beach, Guarujá (SP), Brazil.. *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, p. 921-927, 2007.

OLIVEIRA, A. J. F. C.; PINHATA, J. M. W.. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research*, 42(8-9):2242-50. 2008.

OLSEN, G. H.; SVA, E.; CARROLL, J.; CAMUS, L.; DE COEN, W.; SMOLDERS, R.; ØVERAAS, H.; HYLLAND, K.. Alterations in the energy budget of Arctic benthic species exposed to oil-related compounds. *Aquatic Toxicology*, 83(2):85-92. 2006.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L.. Bioremediation in Latin America, current research and perspectives. In: Chapter 5. Bioremediation of soils contaminated with pesticides: experiences in Mexico. Springer: New York, 2014, p. 69-100. 2014.

PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANT'ANNA, G. L.. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.58, p.254–260. 2006.

PRATHYUSHA, K.; MOHAN, Y. S. Y. V. J.; SRIDEVI, S.; SANDEEP, B. V.. Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon degrading indigenous bacteria from contaminated sites of Visakhapatnam. *International Journal of Advanced Research*, v. 4, p. 357-362. 2016.

PASMAN, H. J.; SUTER, G.. Effect working party on loss prevention and safety promotion in the process industries. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 83, n. 1, p. 18–21. 2005.

PENET, S.; MARCHARAL, R.; SGHIR, A.; MONOT, F.. Biodegradation of hydrocarbon cuts used for diesel oil formulation. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 66, p. 40-47. 2004.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S.. Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum*. *Anais do XII Jornada de Iniciação Científica - CETEM*, 2004.

PETERSEN, K.; HULTMAN, M. T.; ROWLAND, S. J.; TOLLEFSEN, K. E. Toxicity of organic compounds from an unresolved complex mixture (UCM) to primary fish hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, v. 190, p. 150-161, 2017.

PETROBRAS. Manual técnico ÓLEO DIESEL -Informações Técnicas. 2021.

PLACE, B. J., & FIELD, J. A.. Identification of novel fluorochemicals in aqueous film-forming foams used by the US military. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 7120-7127. 2012.

PLUMLEE, M.H.; LARABEE, J.; REINHARD, M.. Perfluorochemicals in water reuse. *Chemosphere*, v. 72, n. 10, p. 1541–1547. 2008.

POZZO, K.; MOREIRA, L.B.; KARASKOVA, P.; PRIBYLOVÁ, P.; CARVALHO, M.U.; MARANHO, L.A.; ABESSA, D.M.S.. Using large amounts of firefighting foams releases per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) into estuarine environments: A baseline study in Latin America. *Marine Pollution Bulletin* 182. 2022.

PRINCE, R.C.; NAHS, G.W.; HILL, S.J.. The biodegradation of crude oil in the deep ocean. *Marine Pollution Bulletin*, v. 111, p. 354-357. 2016.

PRINCE, R. C.; WALTERS, C. C. Biodegradation of oil hydrocarbons and its implications for source identification. In: WANG, Z; STOUT, S. *Oil Spill Environmental Forensics*. Canada: Academic Press, 2007.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. Identification of *Bacillus* species. 2018.

QUITERIO, G. M.; CRUZ, J.M.; MONTAGNOLLI, R.N. Bioremediation of diesel/biodiesel blends in soil: a respirometric approach. *African journal of biotechnology* v. 7, n. 9, 2017.

QU, D.; ZHAO, Y.; SUN, J.; REN, H.; ZHOU, R.. BTEX biodegradation and its nitrogen removal potential by a newly isolated *Pseudomonas thivervalensis* MAH1. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 61, p. 691-699. 2015.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M.. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *Journal of Basic Microbiology*, v. 4, p. 284-291. 2002.

RAMSAY, M. A.; SWANNELL, R. P. J.; SHIPTON, W. A.; DUKE, N.C.; HILL, R. T.. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 41, n. 7-12, p. 413-419.. 2000.

REDDY, C. M.; NELSON R.K.; HANKE U.M.; CUI X.; SUMMONS, R.E.; VALENTINE, D.L.; RODGERS, R.P.; CHACÓN-PATIÑO, M.L.; NILES, S.F.; TEIXEIRA C.E.P.; BEZERRA, L.E.A.; CAVALCANTE, R.M.; SOARES, M.O.; OLIVEIRA, A.H.B.; WHITHE, H.K.; SWARTHOUT, R.F.; LEMKAU, K.L.; RADOVIC, J.R.. Synergy of Analytical Approaches Enables a Robust Assessment of the Brazil Mystery Oil Spill. *Energy & Fuels* 36 (22), 13688-13704. 2022

REVISTA FAPESP. Edição 286: Os caminhos da Mancha. Fevereiro de 2020. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/os-caminhos-da-mancha/>. Acesso: 25 de junho de 2022.

RHODES, M. E. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 20, n. 1, p.108–118, apr. 1957.

ROB, J. W. B.; MARGREET, I. P.; ROLAND, J. S.. Hydrocarbon degrading bacteria: the oil–spill clean up crew. *Microbial Biotechnology*, v. 2., p. 587-594. 2009.

ROBERTSON, C.; KRAUSS, C.. Gulf Spill Is the Largest of Its Kind, Scientists Say. *The New York Times Company*, New York, 2010. Disponível em: <www.nytimes.com/2010/08/03/us/03spill.html>. Acesso: 10 de agosto de 2018.

ROMEIRO, R. S. Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

ROSA, A. P.; TRIGUIS, J. A.. Bioremediation process on Brazil shoreline. *Environmental Science Pollution Resource International*, v. 17, p. 470-476. 2007.

- ROSATO, Y. B.. Biodegradação de Petróleo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, p. 440. 1997.
- ROSENBERG, E.. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. Trends Biotechnology, v.11, p.419-424. 1993.
- ROTANDER, A., TOMS, L.L., AYLWARD, L., MULLER, J.F.. Elevated levels of PFOS and PFHxS in firefighters exposed to aqueous film forming foam (AFFF). Environ. Int. 82, 28–34. 2015.
- RUPPERT, W. H.; VERDONIK, D. P.; HANAUSKA, C. H.. Environmental impact of fire fighting foams. Baltimore: Hughes Associates Inc., 2005.
- SAITO, N.; HARADA, K.; INOUE, K.; SASAKI, K.; YOSHINAGA, T.; KOIZUMI, A.. Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. Journal of Occupational Health, v. 46, n. 1, p. 49–59. 2004.
- SANDU, C.; POPESCU, M.; ROSALES, E.; PAZOS, M.; LAZAR, G.; SANROMÁN, M. A.. Electrokinetic oxidant soil flushing: A solution for in situ remediation of hydrocarbons polluted soils. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 799, p. 1-8. 2017.
- SALAZAR, S. M. Technical Report 825. San Diego: Naval Ocean Systems, 1985.
- SARDQVIST, S. Water and other extinguishing agents. 4th ed. Karlstad: Swedish Rescue Services Agency, 2002.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P.. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology, v. 50, p. 1-17. 2004.
- SEABRA, P.N.C.. Uso de tensoativos na mobilização e biodegradação de óleo diesel em solos impactados. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 1997.
- SETTLE, F. A.. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, 1a. ed.; Prentice Hall, 1997.
- SHIM, H.; MA, W.; LIN, A.; CHAN, K.. Bio-removal of mixture of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes/ total petroleum hydrocarbons/ trichloethylene from contaminated water. Journal of Environmental Sciences. 21 (6), 758-763. 2009.
- SIERRA-GARCIA, I.N.; OLIVEIRA, V.M.. Microbial Hydrocarbon Degradation: Efforts to Understand Biodegradation in Petroleum Reservoirs. engineering and technology, 2013.
- SILVA, S.C., PUSCEDDU, F.H., ORTEGA, A.S.B., ABESSA, D.M.S., PEREIRA, C.D.S., MARANHO, L.A.. Aqueous film-forming foams (AFFFs) are very toxic to aquatic microcrustaceans. Water Air Soil Pollut. 230, 260. 2019.
- SILVERTEIN, R. M.; WEBSTER, FRANCIS, X.. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6a. edição.; Editora, LTC: Rio de Janeiro, 2000.
- SOLLA, S.R., DE SILVA, A.O., LETCHER, R.J.. Highly elevated levels of perfluorooctane sulfonate and other perfluorinated acids found in biota and surface water downstream of an international airport, Hamilton, Ontario, Canada. Environ. Int. 39, 19–26. 2012.
- SONG, H. C.; WANG, X.; BARTHA, R.. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. Applied Environmental Microbiology, v. 56, p. 652–656. 1990.

SORKHOH, N.A.; GHANNOUM, M.A.; IBRAIM, A.S.; STRETTON, R.J.; RADWAN, S.S.. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolate from soil and marine environment in Kuwait. *Environmental Pollution*, v. 65, p. 1-17. 1995.

SOUZA, M. M.; COLLA, T. T.; BUCKER, F.; FERRÃO, M.F.; HUANG, C. T.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M.. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. *International Biodegradation & Biodegradation*, v. 110. 2016.

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z. KITSON, F. G.. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, Academic Press, Oxford, 2011.

SPEIGHT, J. G.. *Handbook of Petroleum Product Analysis global properties*, 4th ed. Hoboken, New Jersey: Wiley- Interscience, 2002.

SPEIGHT, J.. "The Chemistry and Technology of Petroleum, Fourth Edition," vol. 20064186.. 2006.

STICKLEY, A. R. J.; TWEDT, D. J.; HEISTERBERG, J. F.; MOTT, D. F.; GLAHN, J. F. Surfactant spray system for controlling blackbirds and starlings in urban roosts. *Wildlife Society Bulletin*, v. 14, n. 4, p. 412-418. 1986.

SUGUIO, K. *Introdução a Sedimentologia*. São Paulo: Edgar Blucher, Editora da USP. p. 317. 1973.

TAMADA, I.S.. *Biodegradação e Avaliação Fitotoxicológica do Diesel e Biodiesel*. Dissertação de Mestrado. Microbiologia aplicada. Universidade Estadual Paulista -UNESP. 2013.

TANGLEY, L.. *Bird Habitats Threatened by Oil Spill*. National Wildlife Federation, 2010. Disponível em < <http://www.nwf.org/News-and-Magazines/National-Wildlife/Birds/Archives/2010/Oil-Spill-Birds.aspx>>. Acesso: 10 de agosto de 2018.

TEIXEIRA, A. S.. *Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial*. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2007.

TESTA, S. M.; WINEGARDNER, D. L.. *Restoration of Contaminated Aquifer: Petroleum Hydrocarbons and Organic Compounds*. Lewis Publishers, Chelsea, 2000.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. Biosurfactants from marine bacterial isolates. In MENDEZ-VILAS, A. ed. *Current research technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. v.2, p.1367-1373 (Microbiology book series, n.2). 2010.

THOMAS, J. E.; TRIGGIA, A. A.; CORREIA, C. A.; VEROTTI FILHO, C.; XAVIER, J. A. D.; MACHADO, J. C. V.; SOUZA FILHO, J. E.; PAULA, J. L.; DE ROSSI, N. C. M.; PITOMBO, N. E. S.; GOUVEIA, P. C. V. M.; CARVALHO, R. S.; BARRAGAN, R. V.. *Fundamentos de Engenharia de Petróleo*. Editora Interciência/PETROBRAS, Rio de Janeiro. 2001.

THOMÉ, C.. Mancha de óleo teve redução de 12km² para 2km². O Estadão de São Paulo, 22 novembro de 2011. Caderno de Notícias. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/geral.mancha-de-oleo-teve-reducao-de-12-km2-para-2-km2,801679,0htm>. Acesso: 03 de agosto de 2018.

- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 894, 2005.
- TRELLU, C.; MOUSSET, E.; PECHAUD, Y.; HUGUENOT, D.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; ESPOSITO, G.; OTURAN, M. A.. Removal of hydrophobic organic pollutants from soilwashing/flushing solutions: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 306, p. 149-174. 2016.
- TURNBULL PCB. *Bacillus*. In: *Barron's Medical Microbiology* (Baron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. 1996.
- TURNER, N. R.; RENEGAR, D. A.. Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. *Marine Pollution Bulletin*, v. 119, p. 1–16. 2017.
- UEMURA, A.; MARIN-MORALES, E.; ANGELIS, D. F. *Manual de protocolos de laboratório*. Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Rio Claro: Publicação interna / UNESP - IB, 2013.
- ULTRACARGO – Comunicados 2015. Disponível em: <<http://www.ultracargo.com.br/br/a-ultracargo/destaques>>. Acesso: 07 de setembro de 2016.
- VAN DOMMELEN SM, van der Meel R, van Solinge WW, Coimbra M, Vader P, Schiffelers RM. Cetuximab treatment alters the content of extracellular vesicles released from tumor cells. *Nanomedicine*. 2016 Apr;11(8):881-90. 2016.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular Biology Reviews*, v. 67. N.4, p. 503-549. 2003.
- VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N.. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 120, p. 71-83. 2017.
- VEITH, B. et al.. The complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v.7, p.204-211. 2004.
- VENKATESWARAN, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 767–775, 1995.
- WAGGY, G. T.; CONWAY, L. A.; HANSEN, J. L.; BLESSING, R. L.. Comparison of 20-d BOD and OECD Closed-Bottle Biodegradation Tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.13, n. 8, p. 1277-1280. 1994.
- WANG, Z.; FINGAS, M.. Review: Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 774, p. 51-58. 1997.
- WANG, X.C.; ZHANG, Y.X.; CHEN, R.F.. Distribution and partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different size fractions in sediments from Boston Harbor, United States. *Marine Pollution Bulletin*, v. 42(1), p. 1139-149. 2001.
- WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 1025-1035. 2010.

- WETZEL, R. G. & LIKENS, G. E.. *Limnological Analyses*: Springer-Verlag.1991.
- WILLIAMS, D. E.; OLANIRAN, B. A.. Exxon's decision-making flaws: The hypervigilant response to the Valdez grounding. *Public Relations Review*, v. 20, n. 1, p. 5-18. 1994.
- WHITACRE, D.. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 5th ed. New York: Springer Science & Business Media, 2008.
- WRENN, B. A.; VENOSA, A. D. Seletive enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bactéria by most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, 42. 1996.
- XIAO, F.; SASI, P.C.; YAO, B.; KUB´ATOV´A A.; GOLOVKO, S.A.; GOLOVKO, M.Y.; SOLI, D.. Thermal stability and decomposition of perfluoroalkyl substances on spent granular activated carbon. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 7, 343–350. 2020.
- XIE, F.; LU, Q.; TOLEDO, R. A.; SHIM, H.. Combined removal of an MTBE and BTEX mixture using indigenous microbe immobilized on waste silicagel. *International Journal of Environmental Science and Development*,v. 7, p. 244-247. 2016.
- YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N.. Obligate oil degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 257-266. 2007.
- YU, S. H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y.. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, v. 31, p. 149 -154. 2005.
- ZAGATTO, P.A.. *Ecotoxicologia*. Capítulo 1. In: ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. Rima. São Carlos. SP. 1-13p. 2006.
- ZAHN, L.; WELLENS, H. Testing of biodegradability in the batch experiment – further experiences and new applicabilities. *Z. Wasser A bwasser Forsch*, v. 13, n. 1, p. 1-7, 1980.
- 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*, 90, p. 1340-1347. 2013.
- ZOBELL, C. E.; *Action of Microorganisms on Hydrocarbons*; *Zeitng Fur Allegemeine Mikribiolie*, 10. 1946.

ANEXO 1

Quadro: coordenadas e descrição dos pontos de coleta de sedimentos no Estuário de Santos.

PONTOS	COORDENADAS		DESCRIÇÃO
	LATITUDE	LONGITUDE	
P3	23°55'0,54"S	46°22'43,90"O	Próximo à banco de Sedimentos
P4	23°55'17,21"S	46°21'29,49"O	Ultracargo, local da dispersão inicial
P5	23°55'24,50"S	46°20'12,44"O	Ilha Barnabé
P6	23°56'1,75"S	46°18'41,55"O	Entre Vicente de Carvalho e Entrada ao Canal de Bertiooga
P7	23°57'25,81"S	46°18'5,24"O	Torre Grande

ANEXO 2

A concentração C biodegradado de espuma de controle de incêndio – AFFF, foi mensurado em micromol (μmol) ao longo dos 120 dias de teste de biodegradação – respirometria de Bartha (OECD 307, 2002).

Tabela: Concentração de C biodegradado (μmol) ao longo dos 120 dias do teste de biodegradação - respirometria de Bartha com espuma a 1,5%.

Total de Carbono Biodegradação (uMol) Espuma [1,5%]					
Dias	Sed. Puro	Sed + Espuma	<i>B. sub</i>	<i>B. lich</i>	Consórcio
0	0	0	0	0	0
1	5,19E+01	7,87E+01	6,52E+02	-5,11E+00	1,12E+03
2	5,84E+01	1,11E+02	2,20E+03	-3,38E+01	2,64E+03
3	6,43E+01	1,13E+02	3,59E+03	-3,51E+01	3,52E+03
4	7,47E+01	1,35E+02	3,96E+03	-5,36E+01	3,91E+03
5	1,16E+02	2,08E+02	4,40E+03	-4,34E+01	4,34E+03
7	1,54E+02	2,81E+02	4,87E+03	-2,36E+01	4,74E+03
10	2,55E+02	4,32E+02	5,45E+03	-9,57E+00	5,61E+03
14	4,38E+02	6,29E+02	5,74E+03	1,24E+02	5,93E+03
21	5,57E+02	7,81E+02	5,91E+03	3,45E+02	6,15E+03
31	7,34E+02	9,39E+02	6,05E+03	7,04E+02	6,40E+03
45	9,96E+02	1,09E+03	6,23E+03	1,75E+03	6,68E+03
52	1,16E+03	1,25E+03	6,29E+03	2,38E+03	6,78E+03
72	1,50E+03	1,63E+03	6,41E+03	3,48E+03	6,86E+03
92	1,97E+03	1,86E+03	6,61E+03	4,62E+03	7,05E+03
120	2,22E+03	2,12E+03	6,67E+03	5,72E+03	7,70E+03

Tabela: Concentração de C biodegradado (μmol) ao longo dos 120 dias do teste de biodegradação - respirometria de Bartha com espuma a 3%.

Total de Carbono Biodegradação (uMol) Espuma [3%]					
Dias	Sed. Puro	Sed + Espuma	<i>B. sub</i>	<i>B. lich</i>	Consórcio
0	0	0	0	0	0
1	5,19E+01	6,72E+01	1,37E+03	3,19E+02	4,30E+02
2	5,84E+01	7,56E+01	2,37E+03	1,78E+03	1,95E+03
3	6,43E+01	7,71E+01	3,11E+03	3,24E+03	3,41E+03
4	7,47E+01	2,02E+02	3,41E+03	4,10E+03	3,94E+03
5	1,16E+02	2,61E+02	3,95E+03	4,86E+03	4,58E+03
7	1,54E+02	2,91E+02	4,40E+03	5,48E+03	5,26E+03
10	2,55E+02	3,41E+02	4,85E+03	6,24E+03	6,17E+03
14	4,38E+02	4,58E+02	5,13E+03	6,79E+03	6,69E+03
21	5,57E+02	5,24E+02	5,48E+03	7,38E+03	7,42E+03
31	7,34E+02	6,47E+02	5,65E+03	7,78E+03	7,80E+03
45	9,96E+02	8,53E+02	5,75E+03	8,07E+03	8,05E+03
52	1,16E+03	1,53E+03	5,27E+03	7,61E+03	7,57E+03
72	1,50E+03	3,00E+03	4,43E+03	6,65E+03	6,69E+03
92	1,97E+03	3,70E+03	4,18E+03	6,41E+03	6,48E+03
120	2,22E+03	4,24E+03	4,15E+03	6,21E+03	7,18E+03

Tabela: Concentração de C biodegradado (μmol) ao longo dos 120 dias do teste de biodegradação - respirometria de Bartha com espuma a 4,5%.

Total de Carbono Biodegradação (uMol) Espuma [4,5%]					
Dias	Sed. Puro	Sed + Espuma	<i>B. sub</i>	<i>B. lich</i>	Consórcio
0	0	0	0	0	0
1	5,19E+01	5,00E+01	2,06E+02	2,53E+02	1,59E+02
2	5,84E+01	7,56E+01	2,15E+03	1,69E+03	1,62E+03
3	6,43E+01	1,54E+02	3,59E+03	2,89E+03	2,83E+03
4	7,47E+01	3,01E+02	4,47E+03	3,83E+03	3,69E+03
5	1,16E+02	5,18E+02	5,13E+03	4,79E+03	4,73E+03
7	1,54E+02	7,08E+02	5,62E+03	5,40E+03	5,59E+03
10	2,55E+02	9,64E+02	6,27E+03	5,90E+03	6,33E+03
14	4,38E+02	1,34E+03	6,70E+03	6,19E+03	6,57E+03
21	5,57E+02	1,97E+03	6,75E+03	6,72E+03	6,71E+03
31	7,34E+02	3,35E+03	5,88E+03	6,02E+03	6,40E+03
45	9,96E+02	4,11E+03	5,61E+03	6,04E+03	6,52E+03
52	1,16E+03	4,47E+03	5,50E+03	6,09E+03	6,73E+03
72	1,50E+03	5,40E+03	5,11E+03	5,97E+03	6,43E+03
92	1,97E+03	6,22E+03	4,78E+03	5,41E+03	6,19E+03
120	2,22E+03	6,87E+03	5,02E+03	5,10E+03	6,95E+03

Tabela: Concentração de C biodegradado (μmol) ao longo dos 120 dias do teste de biodegradação - respirometria de Bartha com espuma a 6%.

Total de Carbono Biodegradação (uMol) Espuma [6%]					
Dias	Sed. Puro	Sed +Espuma	<i>B. sub</i>	<i>B. lich</i>	Consórcio
0	0	0	0	0	0
1	5,19E+01	3,08E+01	2,48E+02	8,23E+01	6,06E+01
2	5,84E+01	3,48E+01	3,97E+02	1,03E+03	8,05E+02
3	6,43E+01	4,77E+01	6,90E+02	2,54E+03	2,07E+03
4	7,47E+01	7,60E+01	9,20E+02	3,61E+03	2,68E+03
5	1,16E+02	2,33E+02	1,01E+03	4,99E+03	3,10E+03
7	1,54E+02	4,23E+02	9,95E+02	6,22E+03	3,43E+03
10	2,55E+02	6,62E+02	9,81E+02	7,16E+03	4,70E+03
14	4,38E+02	9,11E+02	1,26E+03	7,65E+03	5,05E+03
21	5,57E+02	1,22E+03	1,73E+03	8,05E+03	5,93E+03
31	7,34E+02	1,71E+03	1,56E+03	8,24E+03	6,43E+03
45	9,96E+02	2,40E+03	1,65E+03	8,22E+03	7,07E+03
52	1,16E+03	2,98E+03	2,48E+03	8,41E+03	7,32E+03
72	1,50E+03	4,38E+03	2,55E+03	7,71E+03	6,94E+03
92	1,97E+03	5,73E+03	2,38E+03	6,96E+03	6,33E+03
120	2,22E+03	6,73E+03	2,09E+03	6,41E+03	6,39E+03

ANEXO 3

A concentração C biodegradado de diesel S10, foi mensurado em micromol (μmol) ao longo dos 120 dias de teste de biodegradação – respirometria de Bartha (OECD 307, 2002).

Tabela: Concentração de C biodegradado (μmol) ao longo dos 120 dias do teste de biodegradação - respirometria de Bartha com diesel S10 a 2,5%.

Total de Carbono Biodegradação (uMol) Diesel S10 [2,5%]					
Dias	Sed. Puro	Sed + Diesel S10	<i>B. sub</i>	<i>B. lich</i>	Consórcio
0	0	0	0	0	0
1	5,19E+01	8,76E+01	8,14E+02	1,52E+03	1,53E+03
2	5,84E+01	1,01E+02	2,20E+03	3,07E+03	3,09E+03
3	6,43E+01	1,13E+02	3,23E+03	4,64E+03	4,66E+03
4	7,47E+01	1,55E+02	3,98E+03	6,16E+03	6,19E+03
5	1,16E+02	1,96E+02	4,79E+03	7,64E+03	7,74E+03
7	1,54E+02	2,78E+02	5,58E+03	9,03E+03	9,14E+03
10	2,55E+02	4,59E+02	6,44E+03	1,03E+04	1,05E+04
14	4,38E+02	7,83E+02	7,19E+03	1,16E+04	1,17E+04
21	5,57E+02	1,24E+03	8,17E+03	1,27E+04	1,29E+04
31	7,34E+02	1,94E+03	9,00E+03	1,35E+04	1,38E+04
45	9,96E+02	2,89E+03	9,47E+03	1,42E+04	1,44E+04
52	1,16E+03	3,45E+03	9,63E+03	1,48E+04	1,52E+04
72	1,50E+03	4,68E+03	9,59E+03	1,50E+04	1,55E+04
92	1,97E+03	5,89E+03	9,36E+03	1,50E+04	1,55E+04
120	2,22E+03	7,35E+03	8,92E+03	1,50E+04	1,44E+04

Tabela: Concentração de C biodegradado (μmol) ao longo dos 120 dias do teste de biodegradação - respirometria de Bartha com diesel S10 a 5%.

Total de Carbono Biodegradação (uMol) Diesel S10 [5%]					
Dias	Sed. Puro	Sed + Diesel S10	<i>B. sub</i>	<i>B. lich</i>	Consórcio
0	0	0	0	0	0
1	5,19E+01	1,31E+02	8,49E+02	1,46E+03	1,31E+03
2	5,84E+01	1,43E+02	2,18E+03	3,00E+03	2,84E+03
3	6,43E+01	1,84E+02	3,60E+03	4,53E+03	4,34E+03
4	7,47E+01	2,18E+02	4,76E+03	6,12E+03	5,79E+03
5	1,16E+02	2,98E+02	6,16E+03	7,69E+03	7,27E+03
7	1,54E+02	4,13E+02	7,52E+03	9,12E+03	8,63E+03
10	2,55E+02	5,63E+02	8,83E+03	1,05E+04	1,00E+04
14	4,38E+02	8,89E+02	1,00E+04	1,18E+04	1,13E+04
21	5,57E+02	1,46E+03	1,10E+04	1,28E+04	1,23E+04
31	7,34E+02	2,30E+03	1,17E+04	1,36E+04	1,30E+04
45	9,96E+02	3,36E+03	1,22E+04	1,41E+04	1,35E+04
52	1,16E+03	4,02E+03	1,28E+04	1,50E+04	1,43E+04
72	1,50E+03	5,45E+03	1,28E+04	1,51E+04	1,44E+04
92	1,97E+03	6,88E+03	1,28E+04	1,51E+04	1,45E+04
120	2,22E+03	8,39E+03	1,27E+04	1,51E+04	1,45E+04

Tabela: Concentração de C biodegradado (μmol) ao longo dos 120 dias do teste de biodegradação - respirometria de Bartha com diesel S10 a 7,5%.

Total de Carbono Biodegradação (uMol) Diesel S10 [7,5%]					
Dias	Sed. Puro	Sed +Diesel S10	<i>B. sub</i>	<i>B. lich</i>	Consórcio
0	0	0	0	0	0
1	5,19E+01	1,14E+02	8,06E+02	8,51E+02	8,72E+02
2	5,84E+01	1,35E+02	2,22E+03	2,29E+03	2,34E+03
3	6,43E+01	1,61E+02	3,47E+03	3,78E+03	3,73E+03
4	7,47E+01	2,06E+02	4,45E+03	4,95E+03	4,71E+03
5	1,16E+02	2,99E+02	5,39E+03	6,16E+03	5,74E+03
7	1,54E+02	3,90E+02	6,46E+03	7,32E+03	6,87E+03
10	2,55E+02	5,64E+02	7,77E+03	8,63E+03	8,18E+03
14	4,38E+02	8,38E+02	9,08E+03	9,90E+03	9,46E+03
21	5,57E+02	1,28E+03	1,02E+04	1,10E+04	1,06E+04
31	7,34E+02	2,01E+03	1,11E+04	1,18E+04	1,14E+04
45	9,96E+02	3,04E+03	1,16E+04	1,23E+04	1,19E+04
52	1,16E+03	3,88E+03	1,22E+04	1,29E+04	1,25E+04
72	1,50E+03	5,41E+03	1,22E+04	1,29E+04	1,25E+04
92	1,97E+03	6,88E+03	1,22E+04	1,29E+04	1,25E+04
120	2,22E+03	8,42E+03	1,21E+04	1,29E+04	1,25E+04