

**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.**

**ROBERTA ALVES MERGUIZO CHINELLATO**

São Vicente - SP  
2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”

CÂMPUS LITORAL PAULISTA

**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.**

DISCENTE: ROBERTA ALVES MERGUIZO CHINELLATO

ORIENTADOR: ANA JULIA FERNANDES

CO-ORIENTADOR: ROBERTO FIORAVANTE CARELLI FONTES

Dissertação apresentada ao Câmpus Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Aquática.

São Vicente - SP  
2017

UNESP - Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP) Praça Infante D. Henrique s/nº - CEP 11330-900 - São Vicente/SP - Brasil Tel. (13) 3569-7100 –  
coordenadoria@clp.unesp.br

576.1 Chinellato, Roberta Alves Merguizo

C441q Diversidade e sucessão bacteriana em sedimentos contaminados por hidrocarbonetos, derivados e por dispersão de espumas para controle de incêndio (AFFF), no Estuário de Santos. / Roberta Alves Merguizo Chinellato. - São Vicente, 2017.

61 p.: il, figs., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.

Orientadora: Ana Júlia Fernandes

Co- orientador: Roberto Fioravante Carelli Fontes

1. Microbiologia ambiental. 2. Biorremediação. 3. Poluição marinha. 4. Bactérias. 5. Hidrocarbonetos. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP

Campus do Litoral Paulista

Dedico este trabalho à minha família: vocês sempre souberam compreender e incentivar meus sonhos. A realização deste trabalho só foi possível devido à presença de vocês em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Erik, por incentivar, me apoiar e auxiliar em todos os momentos, por toda a paciência, carinho, amor e compreensão dedicados a mim durante toda realização deste projeto.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Julia Fernandes, pela oportunidade, grande conhecimento e instrução que dedicou a mim.

Agradeço ao Prof. Dr. Roberto Fioravante Carelli Fontes, por sua co-orientação, auxílio, instruções para a modelagem e cooperação neste processo.

Agradeço a todos os integrantes do MICROMAR, que contribuíram de forma direta ou indireta para o sucesso deste trabalho. Em especial à Sonia Assami Doi e ao Matheus Maitan, que passaram por toda a jornada no laboratório junto a mim, nas alegrias, frustrações e realizações se tornando grandes amigos, e à Bruna Del Busso Zampieri por seu conhecimento, sua contribuição neste trabalho e por sempre estar à disposição com todo carinho em todos os momentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Denis Abessa junto com o IBAMA e equipe, que contribuíram nas coletas, possibilitando a execução do trabalho.

Agradeço ao Prof, Dr. Marcos de Oliveira e a toda a equipe do LABIMES, que possibilitaram e auxiliaram nas análises moleculares, sempre com a disposição em ajudar, em especial ao Dr. Carlos Breyer pelo conhecimento, auxílio e amizade.

Ao mais novo amigo Tássio Brito, por seu grande conhecimento e auxílio para a estatística deste trabalho.

À Iara Candida Chalela Genovese, por me ajudar em momentos de aflições e por sempre me lembrar de minha capacidade.

Agradeço à Unesp São Vicente, aos professores e corpo administrativo por todo o conhecimento e presteza.

Agradeço à Capes pelo apoio financeiro.

**“A natureza não faz nada em vão.”**

**Aristóteles**

**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.**

**RESUMO**

Com o processo de expansão industrial, as regiões costeiras e estuarinas passaram a perceber a instalação de várias indústrias, devido à proximidade aos mercados consumidores e produtores, além da facilidade de escoamento de sua produção. Essas indústrias consomem uma grande quantidade de água, que é devolvida ao ambiente juntamente com uma série de substâncias tóxicas dissolvidas, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, de biodegradabilidade intermediária e tendência à bioacumulação. Regiões estuarinas apresentam maior dificuldade de biorremediação, devido ao fato dos contaminantes ficarem aderidos ao sedimento. Além do descarte costeiro habitual, acidentes tendem a lançar uma quantidade maior e descontrolada de poluentes. A biorremediação é o processo de tratamento que utiliza os microrganismos encontrados tanto no ambiente terrestre como aquáticos contaminados para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas. As atividades para conter o incêndio no Terminal Químico Aratu S.A. (Ultracargo) lançou grande quantidade de hidrocarbonetos e líquido gerador de filme aquoso (AFFF) no estuário de Santos, modificando o perfil de contaminantes da região. As bactérias heterotróficas de ambientes marinhos apresentam grande potencial de biorremediação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, a sucessão de espécies de bactérias heterotróficas em sedimentos do Estuário de Santos, afetados por hidrocarbonetos e AFFF e isolar espécies bacterianas com possível potencial uso em processos de biorremediação. Foram analisadas as densidades de bactérias heterotróficas e identificadas aquelas de maior relevância, por características morfológicas e identificação molecular. Após análise das amostras locais e Microcosmo, destacaram-se as bactérias do gênero *Bacillus*. A sucessão sugeriu três espécies como potenciais biorremediadoras, sendo elas *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus sp.*

Palavras-chave: AFFF, *Bacillus*, Bactérias, Biorremediação, Hidrocarbonetos, Santos.

**Diversity and bacterial succession in sediments contaminated by hydrocarbons,  
petroleum derivatives and dispersion of and aqueous film-forming foam (AFFF) in the  
Estuário of Santos – SP.**

**ABSTRACT**

With the industrial expansion, coastal and estuarine regions began to perceive installation of several industries, due to the proximity to the consumer markets and producers, besides the ease of transportation of their production. These industries consume a large amount of water, which is returned to the environment with a series of dissolved toxic substances, which includes aromatic hydrocarbons, which are slightly biodegradable and have the tendency to bioaccumulate. Estuarine regions present higher difficulty of bioremediation, since the contaminants are adhered to the sediment. In addition to the usual coastal discard, accidents tend to release a larger and uncontrolled amount of pollutants. Bioremediation is the treatment process that uses microorganisms found in both the terrestrial and aquatic environments to degrade toxic substances by transforming them into less toxic or non-toxic substances. The fire at the Terminal Químico Aratu S.A. (Ultracargo) launched a large amount of hydrocarbons and aqueous film-forming foam (AFFF) in the Santos estuary, modifying the profile of contaminants in the region. The heterotrophic bacteria of marine environments present great bioremediation potential. The objective of the present work was to evaluate in vitro the succession of heterotrophic bacteria species in Santos Estuary sediments affected by hydrocarbons and AFFF and to isolate bacterial species with potential use in bioremediation processes. The densities of heterotrophic bacteria were analyzed and the most relevant ones were identified, by morphological characteristics and molecular identification, where the *Bacillus* genus deserved attention. The succession suggested three species as potential bioremediators, being *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus sp.*

Key words: AFFF, *Bacillus*, Bacteria, Bioremediation, Hydrocarbons, Santos.



**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVO</b> .....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1. Área de Estudo .....	18
3.2. Coleta e processamento .....	21
3.3. Processamento de Amostras .....	23
3.4. Contagem de Bactérias Heterotróficas (BH) .....	24
3.5. Isolamento e Caracterização das Bactérias Heterotróficas (BH) .....	25
3.6. Armazenamento das Bactérias Heterotróficas (BH) .....	25
3.7. Identificação molecular das Bactérias Heterotróficas (BH) .....	25
3.8. Análises Estatísticas .....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1. Parâmetros Físico-Químicos .....	28
4.1.1. Parâmetros <i>In Situ</i> .....	29
4.1.2. Parâmetros no MICROCOSMO .....	31
4.2. Densidade de Bactérias Heterotróficas (BH) .....	31
4.2.1. Densidade bacteriana <i>In Situ</i> .....	31
4.2.2. Densidade bacteriana no MICROCOSMO .....	33
4.2.3. <i>In Situ</i> x MICROCOSMO .....	38
4.3. Análise morfológica e isolamento das Bactérias Heterotróficas (BH) .....	41
4.4. Caracterização das Bactérias Heterotróficas (BH) .....	43
4.5. Identificação Molecular das Bactérias Heterotróficas (BH) .....	44
4.5.1 Distribuição de espécies por Ponto .....	50
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coordenadas e Localização dos pontos de coleta no Estuário de Santos – Região Portuária .....	21
Tabela 2: Plano de amostragens do MICROCOSMO ao longo do tempo.....	23
Tabela 3: Parâmetros físico-químicos referente às três coletas realizadas ao longo do estuário do Município de Santos, ocorridas logo em seguida ao incêndio e após 6 e 12 meses do mesmo.....	28
Tabela 4: Parâmetros Físico-Químicos mensurados dos Microcosmos .....	29
Tabela 5: Representação da média de densidade do Ponto 4, <i>in situ</i> .....	32
Tabela 6: Representação da média de densidade do Ponto 6, <i>in situ</i> .....	32
Tabela 7: Densidade bacteriana do Ponto 6 ao longo de todo o estudo.....	35
Tabela 8: Densidade bacteriana do Ponto 4 ao longo de todo o estudo.....	36
Tabela 9: Identificação molecular das cepas isoladas ao longo do estudo .....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de Funcionamento da espuma (AFFF) na extinção de incêndio. Fonte: Técnica Segurança em Risco.....	14
Figura 2: Localização do Sistema Estuarino Santos-São Vicente. Destaque para o Estuário de Santos – SP.....	18
Figura 3: Incêndio no estaleiro da ULTRACARGO – SANTOS –SP Fonte: Google - Foto: Delamonica/Futura Press.....	19
Figura 4: Incêndio e uso de espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) no estaleiro da ULTRACARGO – SANTOS –SP Fonte: Google – Foto: Diego Lameiro/ Corpo de Bombeiros.....	19
Figura 5: Modelagem da dispersão horizontal das concentrações de espuma lançada na superfície do estuário, após 5 dias. Imagem por FONTES, 2015.....	20
Figura 6: Área do Estuário de Santos – Região Portuária com determinação dos pontos de coleta. Fonte: FONTES, 2015.....	22
Figura 7: Microcosmos com sedimentos da primeira coleta. Foto: Roberta Merguizo Chinellato.....	24
Figura 8: Dispersão horizontal de temperatura na superfície do estuário, após 5 dias de despejo do efluente do incêndio. Imagem por FONTES, 2015.....	30
Figura 9: Distribuição da densidade bacteriana nos pontos de coleta na amostragem da primeira coleta.....	33
Figura 10: Distribuição da densidade bacteriana dos MICROCOSMOS na Amostragem 8 (17/11/2015).....	34
Figura 11: Distribuição da densidade bacteriana dos MICROCOSMOS na Amostragem 9 (23/04/2016), 1 ano após o incêndio.....	35
Figura 12: Gráfico de distribuição da densidade bacteriana dos MICROCOSMOS ao longo do estudo. Os pontos azuis escuros demonstram as amostragens realizadas nos MICROCOSMOS.....	36
Figura 13: Gráficos de densidade bacteriana ao longo do estudo do MICROCOSMO em comparação às coletas de todos os pontos estudados.....	38
Figura 14: Gráfico de distribuição da densidade bacteriana dos MICROCOSMOS ao longo do estudo. Os pontos azuis escuros demonstram as amostragens realizadas nos MICROCOSMOS no período de 6 meses (amostragem 8) e 1 ano (amostragem 9) após o incêndio e as coletas referentes 6 meses (coleta 2) e 1 ano (coleta 3).....	39
Figura 15: Morfologia bacteriana de estrutura rugosa, protuberante e branca. Foto: Roberta Merguizo Chinellato.....	40
Figura 16: Morfologia bacteriana de borda lisa e aspecto leitoso. Foto: Roberta Merguizo Chinellato.....	41
Figura 17: Morfologia bacteriana de estrutura rugosa e protuberante e rosa. Fonte: Foto: Roberta Merguizo Chinellato.....	41
Figura 18(A): Bactérias Bacilo – Gram Positivo. (B): Bactérias Cocos – Gram Negativo; Fotos: Roberta Merguizo Chinellato.....	42
Figura 19: Gráfico com a distribuição das características de Gram das cepas isoladas ao longo do estudo. BGP: bacilos gram-positivos; BGN: bacilos gram-negativos; CGP: cocos gram-positivos; CGN: cocos gram-negativos.....	42
Figura 20: Demonstração da qualidade das bandas de corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de alguns DNAs genômicos.....	43
Figura 21: Resultado da corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% depois da reação de polimerização em cadeia (PCR) dos DNAs genômicos extraídos.....	44
Figura 22: Exemplo da qualidade do eletroferograma gerado pelo FinchTV.....	44
Figura 23: Distribuições dos números de identificações por espécie para cada amostragem realizada.....	48
Figura 24: Sucessão das espécies <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumillus</i> e <i>Staphylococcus</i> sp., ao longo das amostragens de MICROCOSMO.....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Em todo o litoral brasileiro existe um grande adensamento populacional devido aos fatores naturais propícios (aporte de água doce, saída para o mar, abrigo, recursos naturais, entre outros), gerando várias atividades socioeconômicas tais como: exploração de petróleo, atividade portuária e pesca, quer seja artesanal ou industrial, turismo, entre outras, ocasionando uma série de conflitos entre essas atividades e a manutenção saudável do ambiente (HORTELLANI *et al.* 2008).

Como parte do processo de expansão industrial houve a instalação de várias indústrias em regiões costeiras e estuarinas, por estarem próximas a mercados de consumo, a seus produtores e pela facilidade para o escoamento da produção. Sendo as indústrias muitas vezes responsáveis pelo lançamento de efluentes líquidos e resíduos tóxicos no ambiente, ocasionando desequilíbrio da biota aquática (ZAGATTO, 2006).

Nos últimos 50 anos, as indústrias têm lançado mais resíduo no ambiente marinho do que nos séculos anteriores. Indústrias metalúrgicas, químicas, têxteis ou provenientes do setor agrícola, consomem uma grande quantidade de água que, posteriormente, é lançada no ambiente juntamente com uma série de substâncias tóxicas dissolvidas: ácidos, bases e compostos tóxicos prejudiciais para o ambiente costeiro (CARRASCO *et al.*, 2003).

Além do descarte industrial sem o tratamento adequado, o ecossistema costeiro recebe efluentes domésticos provenientes de um grande adensamento populacional que não conta com sistema de saneamento básico suficiente, além das várias ligações clandestinas, causando um aumento no desequilíbrio ambiental.

Os estuários se destacam entre os ecossistemas costeiros devido à sua grande importância tanto biológica quanto social. A definição para sistema estuarino é um ambiente costeiro amplo de planície costeira que se compõe de uma rede de canais interligados entre si e com o oceano, recebendo descarga fluvial de numerosas fontes (MIRANDA *et al.*, 2002).

Outros fatores a serem considerados são as atividades portuárias e da indústria do petróleo, pois geram grandes impactos por lançar nos ambientes costeiros diversos poluentes, entre estes os hidrocarbonetos e PAH (hidrocarbonetos poliaromáticos) (CETESB 2001).

O petróleo é uma mistura complexa de diferentes componentes, divididos em quatro grupos principais: alcanos, aromáticos, resinas e asfaltenos (WRENN & VENOSA, 1996). Ainda segundo Wrenn & Venosa (1996), os alcanos são os mais biodegradáveis. Entretanto, a fração polar é resistente à degradação biológica.

Já os compostos aromáticos são de biodegradabilidade intermediária, apresentando certa toxicidade e tendem a bioacumular (VOLKMAN *et al.*, 1983). A bioacumulação através da alimentação dos organismos da cadeia trófica pode, em longo prazo, atingir todos os diversos níveis da cadeia (CARDOSO, 2006; MILANELLI & LOPES, 2002).

A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 237/1997 dispõe sobre os procedimentos e critérios utilizados para o licenciamento ambiental, mas, devido ao intenso potencial poluidor de postos de combustíveis, em 2000 foi publicada a Resolução CONAMA 273, a qual dispõe especificamente sobre a instalação, ampliação e operação de postos de combustíveis. A Resolução 273/2000 considera que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo configuram-se como empreendimentos potencial ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Para tal, considera que os vazamentos de derivados de petróleo e outros combustíveis podem causar contaminação de corpos d'água subterrâneos e superficiais, do solo e do ar e considera os riscos de incêndio e explosões, decorrentes desses vazamentos, entre outros (CONAMA 273, 2000).

Os poluentes afetam não só água, mas também sedimentos e organismos marinhos que são capazes de concentrar inúmeros poluentes. Deste modo, os sedimentos acabam servindo como reservatório para diversos contaminantes causando bioacumulação e biomagnificação na biota (BURTON & LANDRUM, 2003). Muitos contaminantes são relativamente insolúveis em água e adsorvidos em partículas de matéria orgânica em suspensão que eventualmente se depositam no sedimento (DEL VALLS & CONRADI, 2000), desta forma atuando na mediação da troca de contaminantes entre as partículas de sedimento.

Nas regiões estuarinas os sedimentos contaminados apresentam maior dificuldade para remediação, pois estes ficam aderidos às partículas, sendo que uma parte deles pode ser ressuspensa por processos turbulentos para a coluna de água (MEDEIROS & BÍCEGO, 2004).

A contaminação de organismos vivos por óleo pode se dar de forma imediata ou em longo prazo. A forma imediata de contaminação pode causar morte por asfixia e o efeito tóxico pode levar à morte direta ou a efeitos subletais.

Uma categoria contaminante de bastante importância é a dos solventes aromáticos de hidrocarbonetos voláteis. Os principais solventes aromáticos e mais manipulados pelo setor industrial são Benzeno, etil-Benzeno, Tolueno e Xileno (BETX).

A quantidade de acidentes com danos ambientais causados pela indústria do petróleo cresceu juntamente com o desenvolvimento do setor (WILLIAMS & OLANIRAN, 1994).

Somente nas últimas décadas a indústria petrolífera investiu em medidas de proteção contra incêndio e explosão que foram analisadas e aceitas pela maioria das indústrias como uma medida de melhoramento operacional, simplesmente pelo fato de proteger a instalação contra a destruição (PASMAN & SUTER, 2005).

A espuma formadora de filme aquoso (denominadas AFFF - *Aqueous Film-Forming Foam*) melhora a eficiência no combate a incêndios devido à sua estrutura particular apresentada, garantindo uma vasta aplicação. A espuma foi desenvolvida a fim de contornar algumas limitações da água (ISENBERG, 1992). A água apresenta baixa viscosidade, provocando escoamento rápido, além do jato de água poder causar o transbordamento de um líquido em chamas, entre outras dificuldades (BHAKTA & RUCKENSTEIN, 1995). A espuma apresenta melhor aderência ao material em chamas, produzindo um recobrimento contínuo sobre ele. Como apresenta baixa densidade, espalha-se sobre a superfície do material em combustão, abafando-a e isolando-a do contato com o oxigênio atmosférico. O líquido presente na espuma ajuda a resfriar e a prevenir a re-ignição (FIGURA 1) (FIGUEREDO, 1999).



Figura 1: Esquema de Funcionamento da espuma (AFFF) na extinção de incêndio. Fonte: Técnica Segurança em Risco

A utilização das espumas é indicada em incêndios de hidrocarbonetos e derivados de petróleo, devido à sua formulação, que contém substâncias flúor-carbonadas e às interações moleculares das ligações C-F e do grupo sulfonato. Estes compostos apresentam alta estabilidade térmica e química ao surfactante.

Os diferentes fabricantes de espumas de combate incêndio não informam detalhadamente a composição química dos compostos, apenas a presença de tensoativos fluorados, solventes e água, na verdade vasto número de componentes em sua formulação.

A comercialização das espumas no Brasil é liberada como um Líquido Gerador de Espuma (LGE), não tóxico e biodegradável para uso nas concentrações de 3% e 6% (massa de LGE/volume de água). São geralmente aplicados a 3% para incêndios em hidrocarbonetos e 6% para incêndio de solventes polares, conforme ABNT NBR 11830 (ABNT, 1993). A

comercialização das espumas no Brasil é liberada para aeroportos, bases militares e para a Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS) (MULLIGAN, 1990), sem apresentar os verdadeiros fatores de toxicidade e de biodegradabilidade, pois pouco se sabe sobre as AFFF em relação ao seu comportamento e sua remediação por microrganismos.

O processo de biorremediação é definido como o emprego de microrganismos ou suas reações enzimáticas para transformar substâncias tóxicas em substâncias menos tóxicas ou não tóxicas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Embora a biorremediação seja uma estratégia frequentemente adotada por permitir o tratamento do contaminante geralmente a um baixo custo (DOBLER, SANER & BACHOFEN, 2000) e o potencial das bactérias heterotróficas aeróbias neste processo seja bastante eficiente e estabelecido na literatura em relação à degradação de hidrocarbonetos de petróleo *in situ*, não existem informações sobre sua eficiência na biorremediação como um co-contaminante da AFFF (OLSEN *et. al.*, 2006).

Para que o processo de biorremediação aconteça de forma satisfatória é essencial a existência de microrganismos que sejam capazes de catabolizar as reações químicas necessárias para a degradação dos compostos. É necessário ainda, que os compostos contaminantes estejam disponíveis para os microrganismos ou para as enzimas produzidas por eles (MENEGHETTI, 2007).

A utilização de microrganismos para compostos biorremediadores vem aumentando desde que Gray & Thornton (1928) isolaram vários microrganismos hidrocarbonoclasticos, pertencentes a vários gêneros, dentre eles, *Bacillus*, *Bacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* e *Spirillum*, capazes de decompor compostos aromáticos. De acordo com Wetler-Tonini, Rezende & Gravitol (2010), os principais gêneros de bactérias capazes de degradar derivados do petróleo são: *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Microoccus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyce* e *Vibrio*.

*Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella* são as bactérias mais utilizadas na biorremediação. O uso das bactérias do gênero *Pseudomonas* na descontaminação de ambientes poluídos por pesticidas ou petróleo é conseguido por oxidarem diversos compostos orgânicos nocivos, transformando-o em substâncias inócuas ao ambiente (AMABIS & MARTHO, 1990)

Além disso, os *Bacillus* sp 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).

Embora vários microrganismos utilizem diferentes processos metabólicos para obter energia, os heterotróficos são as bactérias mais utilizadas na degradação de contaminantes orgânicos, por empregarem a respiração para oxidar compostos como fonte de carbono e energia, seja por meio da fermentação, respiração aeróbica ou anaeróbica (ALEXANDER, 1994).

Em ambientes contaminados, espécies bacterianas com capacidade de utilizar o contaminante como fonte de carbono são susceptíveis sobre aquelas que não apresentam esta habilidade e tornam-se numericamente dominantes no ambiente, após um processo de sucessão ecológica.

Apesar da habilidade bacteriana em degradar diversos tipos de substratos nos mais variados ambientes seja bastante estudada, até o momento não existem muitos trabalhos a respeito dos efeitos ambientais de AFFFs sobre a comunidade bacteriana nem sobre a capacidade bacteriana de degradação destes compostos.

Para a aplicação de microrganismos em qualquer tipo de técnica de biorremediação é importante que os mesmos sejam identificados e seu metabolismo e comportamento no ambiente estudados (GAYLARD *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2008). A partir da aplicação recente das técnicas de biologia molecular, associada ao avanço da bioinformática, uma grande diversidade de microrganismos presentes em áreas impactadas foi detectada (CUNHA *et al.*, 2008; LEMOS *et al.*, 2009).

De acordo com Cunha *et al.*, (2008) e Lemos *et al.*, (2009), a revolução do conhecimento permitiu o desenvolvimento de uma nova área na Microbiologia Ambiental, denominada Ecologia Microbiana Molecular. A biologia molecular torna-se, portanto, uma ferramenta eficaz para o monitoramento de estudos de impactos ambientais.

Em vista disto, estudos de sedimentos *in situ* e *in vitro*, que tenham como objetivo não apenas o isolamento e a identificação de cepas com potencial de biodegradação, mas também a avaliação dos efeitos destas substâncias sobre a comunidade bacteriana são de extrema importância para o entendimento dos impactos causados por tais agentes, obtenção de consórcios bacterianos com potencial para biodegradação de AFFFs e de outras substâncias.



## **2. OBJETIVO**

Avaliar *in vitro*, a sucessão de espécies de bactérias heterotróficas em sedimentos do Estuário de Santos e isolar espécies bacterianas com potencial uso em processos de biorremediação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Área de Estudo

A área de estudo está localizada no estuário de Santos, situado no município de Santos (Porto de Santos).



Figura 2: Localização do Sistema Estuarino Santos-São Vicente. Destaque para o Estuário de Santos – SP.

Município de Santos está localizado na região sudeste do Estado de São Paulo, na Região metropolitana da Baixada Santista (RMBS). O sistema estuarino de Santos se interliga ao oceano pela Baía de Santos e pelo Canal de Bertioga (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1990).

A RMBS tem grande importância para o estado, tanto por seu aspecto ecológico pela presença de áreas protegidas, um estuário (Estuário Santos - São Vicente), manguezais e da Mata Atlântica, quanto pelo seu aspecto econômico, com intensas atividades industriais e portuárias urbanas (OLIVEIRA *et al.*, 2008). A região é exemplo de ocupações e grande impacto ambiental. Este sistema estuarino apresenta grande importância ambiental e econômica, abrigando o Porto de Santos (FONTES, OLIVEIRA, PINHEIRO, 2008).

Segundo a Comissão Econômica para a América Latina e Caribe (CEPAL, 2016) o Porto de Santos apresenta o maior movimento de importação e exportação da América Latina.

A presença do Porto de Santos, estaleiros, campos de petróleo e de gás tem influência na qualidade do ambiente e esta região é considerada crítica em relação à contaminação dos ecossistemas aquáticos (ABESSA *et al.*, 2012).

Em 2 de abril de 2015 o Porto de Santos, especificamente no Terminal Químico Aratu S. A. (TEQUIMAR) localizado no estaleiro da Ultracargo (Figura 3) protagonizou o maior incêndio em área industrial do Brasil. Ao todo, 6 tanques foram queimados pelas fortes

chamas durante 9 dias. O incêndio não teve vítimas fatais, mas deixou graves danos ambientais.



Figura 3: Incêndio no estaleiro da ULTRACARGO – SANTOS –SP Fonte: Google - Foto: Delamonica/Futura Press

Mais de 100 homens e cerca de 20 viaturas trabalharam no combate ao incêndio. Foram atingidos ao longo do incêndio 5 tanques de gasolina e 1 de etanol com capacidade de 6 mil m<sup>3</sup> cada (ULTRACARGO, 2015). De acordo aos valores apresentados pela Polícia Militar do Estado de São Paulo, para extinguir o incêndio foram necessários 300 m<sup>3</sup> de espumas formadoras de filme aquoso (denominadas AFFF) (Figura 4), disponibilizado por diversas empresas brasileiras (FONTES. 2015).



Figura 4: Incêndio e uso de espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) no estaleiro da ULTRACARGO – SANTOS –SP Fonte: Google – Foto: Diego Lameiro/ Corpo de Bombeiros.

Durante o combate ao incêndio foi necessário utilizar água do estuário para auxiliar no resfriamento dos tanques e, deste modo, parte desta água, já contaminada com hidrocarbonetos e com a espuma, foi despejada no estuário sem nenhum tratamento prévio, causando de imediato a mortalidade de peixes e organismos aquáticos e a contaminação ao longo do Estuário.

Inicialmente, os pontos foram analisados a partir do modelo matemático Deltares/Delf-3D, realizado com o objetivo de estudar a dispersão (Figura 5). Para realização da modelagem, o programa foi alimentado com dados ambientais pertinentes ao canal do Porto de Santos (salinidade, temperatura, variação temporal das marés).

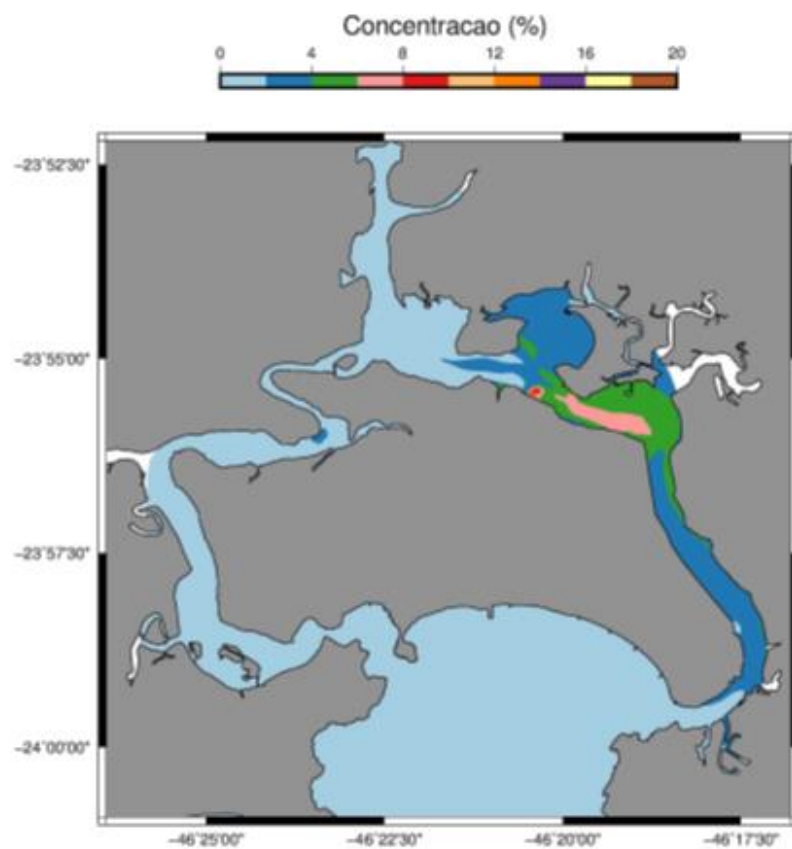


Figura 5: Modelagem da dispersão horizontal das concentrações de espuma lançada na superfície do estuário, após 5 dias.

Imagem por FONTES, 2015.

### 3.2. Coleta e processamento

No presente trabalho foram realizadas 3 coletas, sendo uma imediatamente após o incêndio, a segunda após 6 meses e a última 1 ano após o incêndio.

As coletas foram realizadas pelo IBAMA em diversos pontos do estuário, somando ao todo 11 pontos distribuídos longo do estuário. Dos pontos disponibilizados pelo IBAMA, 5 foram pré-selecionados, pela distribuição da dispersão da espumas e contaminantes. A nomenclatura dos pontos foi mantida de acordo com a dada pelo IBAMA conforme a Tabela 1 e Figura 6.

As coletas de sedimento foram realizadas a uma profundidade de 3 metros em cada ponto. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração de 4°C até seu processamento no Laboratório de Microbiologia Marinha (MICROMAR), do Instituto de Biociências (IB), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Campus do Litoral Paulista (CLP).

Os seguintes parâmetros físico-químicos foram mensurados *in loco*: pH, salinidade, oxigênio dissolvido e temperatura com multiparâmetro “Horiba U-50 Multi-Parameter Water Quality”.

Tabela 1: Coordenadas e Localização dos pontos de coleta no Estuário de Santos – Região Portuária.

PONTOS	COORDENADAS		DESCRIÇÃO
P3	23°55'0,54"S	46°22'43,90"O	Próximo ao Banco de sedimentos – PBA-CODESP
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 do Canal de Bertioga
P7	23°57'25,81"S	46°18'5,24"O	Torre Grande ( próx.TA-11 do PBA-CODESP)

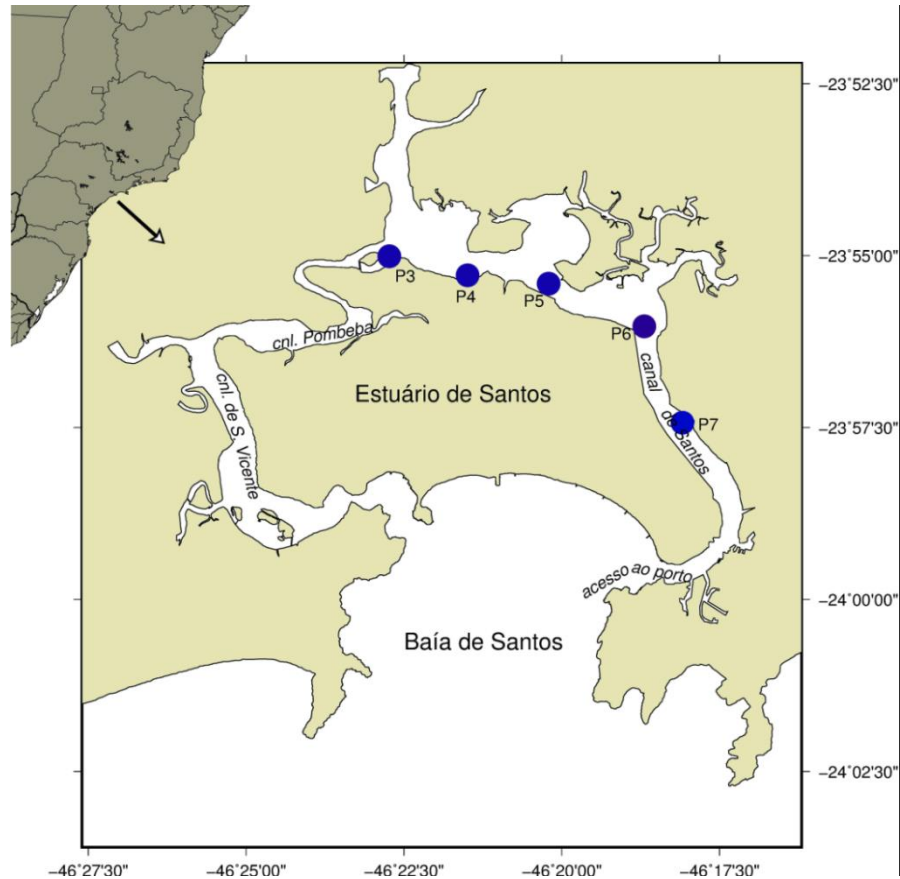


Figura 6: Área do Estuário de Santos – Região Portuária com determinação dos pontos de coleta. Fonte: FONTES, 2015

Dentre as localidades foram selecionados 5 pontos de estudo para este trabalho. O ponto 3 fica próximo ao banco de sedimentos (PBA-CODESP) antes do local do acidente. No ponto 4 localiza-se a Ultracargo, ponto inicial da dispersão. Ponto 5 encontra-se na Ilha de Barnabé. Ponto 6, região entre Vicente de Carvalho e a entrada do Canal de Bertioga. Ponto 7 localiza-se a Torre Grande, conforme a tabela 1 (figura 6).

As coletas de amostras foram realizadas em três etapas distintas, conforme descrito a seguir. Na Etapa 1, dia 17 de abril de 2015, logo após o incêndio, foram coletadas amostras de sedimento (200g) nos 5 pontos de estudo para montagem dos MICROCOSMOS com a finalidade de acompanhar, ao longo do tempo e sob condições controladas, as alterações na comunidade microbiana nas áreas estudadas. Concomitantemente à montagem dos MICROCOSMOS, amostras do sedimento de cada ponto foram também utilizadas para determinação das densidades bacterianas e composição específica.

Nas Etapas 2 e 3, foram realizadas coletas nos pontos estudados apenas para determinação dos parâmetros físico-químicos e bacterianos *in situ*. As coletas foram

realizadas com defasagem de 6 meses (outubro de 2015) e 1 ano (abril de 2016) após o incêndio, respectivamente.

### 3.3. Processamento de Amostras

As amostras de sedimento, tanto para montagem dos MICROCOSMOS, quanto aquelas obtidas nos pontos de coleta foram processadas segundo Oliveira & Pinhata (2008).

Para montagem dos MICROCOSMOS, alíquotas de 80g de sedimento de cada ponto de coleta foram acondicionadas em *Erlenmeyers* estéreis de 500mL contendo 240mL de água do mar filtrada e estéril (Figura 6). O experimento foi realizado em duplicata.

As amostras foram processadas assim que disponibilizadas pelo IBAMA, desta forma existe uma faixa de tempo entre a primeira coleta e a montagem dos MICROCOSMOS. Cada MICROSCOMO foi amostrado ao longo do tempo, de acordo com a Tabela 2, sendo a primeira amostragem realizada imediatamente após a montagem do MICROCOSMO.

Tabela 2: Plano de amostragens do MICROCOSMO ao longo do tempo.

Amostragem	DATA	PERÍODO
Amostragem/Coleta 1	10/06/2015	Início
Amostragem 2	25/06/2015	0,5 meses
Amostragem 3	09/07/2015	1mês
Amostragem 4	29/07/2015	1,5 meses
Amostragem 5	05/08/2015	2 meses
Amostragem 6	15/09/2015	3 meses
Amostragem 7	13/10/2015	4 meses
Amostragem 8	17/11/2015	5 meses
Amostragem 9	23/04/2016	10 meses

A cada amostragem dos MICROCOSMOS, foram retiradas alíquotas para determinação das densidades bacterianas e isolamento, por meio da técnica de esgotamento.

Os MICROCOSMOS (Figura 7) foram mantidos em estufa incubadora, modelo NT718, Nova Técnica, com fotoperíodo de 12 horas de iluminação por 04 lâmpadas fluorescentes de 20 W, a temperatura controlada de 25°C, com agitação diária manual, pelo período de todo o experimento.





Figura 7: Microcosmos com sedimentos da primeira coleta. Foto: Roberta Merguizo Chinellato.

No período de realização das Etapas 2 e 3, houve análise dos microcosmos (MC), para comparação entre o ambiente controlado para a amostra ambiental.

Nas amostras ambientais das Etapas 2 e 3, 20g de sedimento foram colocados em frascos estéreis contendo 180mL de água do mar filtrada e estéril, submetidos a agitação em um agitador do tipo Kline, para promover a desagregação dos microrganismos das partículas do sedimento, e depois mantidos em repouso por 1 hora.

Alíquotas do sobrenadante das amostras foram utilizadas para determinar as densidades, para o isolamento e posteriormente identificação molecular bacteriana.

### 3.4. Contagem de Bactérias Heterotróficas (BH)

As densidades de bactérias heterotróficas foram determinadas através 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 (Biolog).

As placas foram incubadas a  $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$  durante 48 horas. As contagens de colônias foram realizadas segundo norma técnica da CETESB L5.201 de 2006, utilizando um contador de colônias Tipo Quebec. Os resultados foram expressos como Unidades Formadoras de Colônias por gramas (UFC/g).



### 3.5. Isolamento e Caracterização das Bactérias Heterotróficas (BH)

Após analisar macroscopicamente as colônias de cada placa, foi isolada uma colônia de cada um dos todos os morfotipos diferentes existentes nas placas. Os aspectos morfológicos avaliados foram tamanho, cor, forma, estrutura, borda, elevação e brilho.

As colônias selecionadas foram isoladas e purificadas através de repicagens sucessivas no mesmo meio de cultura através da técnica de esgotamento. Estas foram submetidas ao teste de coloração de Gram, para determinar as características microscópicas Gram Positiva ou negativa.

### 3.6. Armazenamento das Bactérias Heterotróficas (BH)

As cepas foram armazenadas em microcubos contendo Ágar Nutriente preparado com água do mar filtrada e esterilizada e acrescido de 20% de glicerol. Os tubos foram armazenados em freezer à temperatura de -20°C, para posterior identificação molecular.

### 3.7. Identificação molecular das Bactérias Heterotróficas (BH)

A identificação molecular das cepas armazenadas se deu de acordo com Souza, 2013. Para reação de extração do DNA genômico, foi utilizado o PureLink® Genomic DNA Kit de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 0,8% e quantificado.

Em seguida foi realizada a amplificação do gene 16S por reação de polimerase em cadeia (PCR). Foram utilizados oligonucleotídeos para o domínio Eubacteria fD1 “forward” (5’ -17AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) e rD1 “reverse” (5’ AAGGAGGTGATCCAGCC-3’) (WEISBURG *et al.*, 1991).

A reação de amplificação (PCR) foi realizada em termociclador modelo ProFlex™ 3x32 – well PCR System (AppliedBiosystems), dentro do programa 94°C/4 minutos, 27 ciclos de amplificação (94°C/45 segundos, 55°C/30 segundos, 72°C/1 minuto) e manter em 4°C.

Para as reações de amplificação (PCR), foi utilizado o volume final de 50 µl contendo, 15pmols de oligonucleotídeos, 8µl de dNTP a 2,5µM, 5µl de tampão 10, 5 U/µl da enzima

Taq DNA polimerase (ThermoFisher), 5µl de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM e 2µl de DNA molde a 100 ng/µL.

A avaliação dos amplificadores foi feita por eletroferese em gel de agarose 0,8%. O tamanho do fragmento esperado era de, aproximadamente, 1500 pares de base.

A purificação das cepas amplificadas foi realizada de acordo com a instrução do fabricante, pelo kit GeneJet Gel Extraction da linha da Fermentas Life Sciences. Após a purificação, foram retirados 5µl do produto final, para avaliação por eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificação do DNA para realização da reação de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Sequencing- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism versão 3 – Life Technologies. Cada reação de sequenciamento foi ajustada para um volume final de 10 µl, utilizando 20ng dos fragmentos de interesse, 5pmols de oligonucleotídeos iniciadores rD1 ou fD1, 1,0 µl de tampão 10x e 2,0µl dos terminadores Big Dye Terminator. As condições de reação foram: 96°C/1 min; 25 ciclos (96°C/30 s., 50°C/5s., 60°C/ 4 min.) (SOUZA, 2013).

Após a reação, foi realizada a precipitação adicionando-se 2,5 µl de EDTA 125mM, 30 µl de etanol 100%. A solução foi misturada por inversão e centrifugada por 20 min. a 13.4000 rpm a 4°C. Depois o sobrenadante foi descartado, adicionados 30µl de etanol 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado, a amostra seca a temperatura ambiente e depois armazenada a 4°C.

O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano e células-tronco (CEGH-CEL), no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), através de sequenciador ABI, modelo 3130 (Applied Biosystems).

As sequências encontradas foram ajustadas com o auxílio do programa FinchTV, após serem ajustadas, as sequências foram inseridas na ferramenta BLASTn, da base de dados do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) para identificação das cepas isoladas. A análise de distância foi feita com base na região 16S rDNA, utilizando o programa Mega6. Cada sequência obtida neste trabalho foi alinhada às sequências semelhantes (selecionadas pela busca no BLAST) (SOUZA, 2013).

### **3.8. Análises Estatísticas**

Utilizou-se o programa EstimateS e Past para realizar as análises estatísticas.

Como os resultados não se apresentam contínuos e não seguem distribuição normal foram utilizados testes estatísticos não paramétricos.

Para avaliar se houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos resultados das densidades das bactérias nos MICROCOSMOS foi realizada uma Análise de Similaridade (ANOSIM One-Way), utilizando o índice de similaridade de Bray-Curtis. Este teste é utilizado para dados não paramétricos de diferença significativa entre dois grupos com base de uma medida de distância (CLARKE, 1993). Os mesmos testes foram aplicados para avaliar a similaridade entre as medidas registradas para o MICROCOSMOS em relação ao ambiente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros foram mensurados *in situ* em cada ponto de coleta, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos referente às três coletas realizadas ao longo do estuário do Município de Santos, ocorridas logo em seguida ao incêndio e após 6 e 12 meses do mesmo.

COLETA	PONTO	pH	SALINIDADE	O.D. (mg/L)	T (°C)
1º Coleta (acidente)	P3	7,4	34	3,23	25,8
	P4	7,3	32	3,32	25,8
	P5	7,6	35	3,72	25,8
	P6	7,6	36	3,95	25,8
	P7	7,6	37	4,16	25,8
2º Coleta (6 meses)	P3	7,8	15	4,3	21,5
	P4	7,9	22	3,8	21,5
	P5	8,0	26	3,5	21,5
	P6	8,2	30	3,8	21,5
	P7	8,0	28	4,2	21,5
3º Coleta (1 ano)	P3	7,4	34	7,7	21,5
	P4	7,3	32	11,6	21,5
	P5	7,7	32	6,3	21,5
	P6	7,6	36	6,5	21,5
	P7	7,6	37	6,2	21,5

Nos MICROCOSMOS foram realizadas medidas no segundo e nono mês após sua montagem (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros Físico-Químicos mensurados dos Microcosmos.

MICROCOSMO					
(MC)	PONTO	pH	SALINIDADE	O.D. (mg/L)	T (°C)
2º MÊS	P3	6,5	36	3,0	25
	P4	6,0	38	3,2	25
	P5	6,1	37	3,2	25
	P6	7,0	40	3,8	25
	P7	7,0	37	3,3	25
9º MÊS	P3	6,7	36	3,3	25
	P4	6,8	38	3,3	25
	P5	6,6	38	3,6	25
	P6	6,5	37	3,7	25
	P7	6,5	37	3,4	25

#### 4.1.1. Parâmetros *In Situ*

Os valores mensurados *in situ* apresentam alguns dados com expressiva disparidade de valores ambientais para regiões estuarinas, como pode ser observado principalmente nos valores mensurados em Oxigênio Dissolvido (OD), nos valores referentes a salinidades e também para temperatura (tabela 3).

Como os valores mensurados *in situ*, apresentaram uma variação acima do normal encontrado em estuários, esses valores não foram considerados neste trabalho.

Mesmo com este problema, observou-se que a variação pH ficou entre 7,3 a 8,2 ao longo de todas as coletas, apresentando-se dentro da normalidade para água salina, de acordo com a Resolução CONAMA 357 de 2005 (CONAMA 357, 2005).

Variações na salinidade em regiões estuarinas são comuns e de acordo com Harari, Franca e Camargo (2008), o Estuário de Santos pode apresentar uma variação entre 15 e 35, apresentando salinidade maior na porção da coluna d'água próxima ao sedimento, por apresentarem os fatores ambientais como estratificação, *input* de água doce no local dos efluentes adjacentes e regime de chuvas. (HARARI, FRANCA, CAMARGO, 2008). A variabilidade da salinidade em sistemas estuarinos causa influência direta nos processos físico-químicos de interação entre a água e as partículas dos elementos provenientes da drenagem continental (MORRIS, 1985; TURNER & MILLWARD, 2002).

Diferentes processos biológicos que ocorrem dentro do estuário resultam na variabilidade espacial do oxigênio dissolvido (OD). As cargas crescentes de matéria orgânica e de nutrientes podem diminuir as concentrações de OD, tal como o resultado da respiração

microbiana que ocorre durante os processos de degradação da matéria orgânica (CHAPMAN, 1992) sendo a concentração de OD estabelecida em alguns países para padrão de qualidade de água de 4 a 5 mg/L, nos oceanos tende a variar de 4 a 6 mg/L (RILLEY & CHESTER, 1978), para a Resolução CONAMA 357 (CONAMA 357, 2005) o valor não deverá ser inferior a 6 mg/L para águas salinas. Neste trabalho mensurou-se uma concentração mais baixa, variando entre 3,20 a 4,3mg/L nas duas primeiras coletas.

Valores baixos de OD verificados no presente trabalho indicam uma possível entrada excessiva de contaminantes no estuário, e, segundo Kleerekoper (1990), podem também ser influenciados por mudanças de temperaturas. Além de aumentar o metabolismo e, conseqüentemente, o consumo de oxigênio pelos organismos aquáticos, temperaturas mais elevadas dificultam a dissolução deste na água, o que explicaria as quedas nos níveis do gás.

De fato, a temperatura média do estuário de Santos foi de 24°C (transição de verão para outono) e a variação térmica no estuário durante o incêndio foi de 2 a 4°C acima do valor de referência. Os resultados obtidos no relatório mostraram, ainda, que o local de lançamento (P4) apresentou o maior valor de temperatura, em torno de 30°C (Figura 8) (FONTES, 2015).

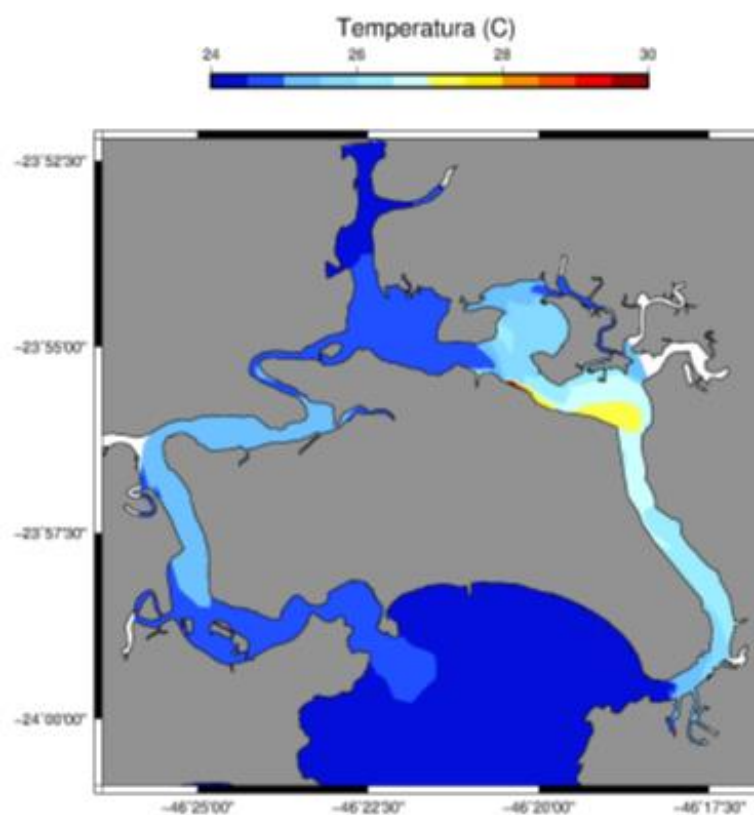


Figura 8: Dispersão horizontal de temperatura na superfície do estuário, após 5 dias de despejo do efluente do incêndio. Imagem por FONTES, 2015.

#### **4.1.2. Parâmetros no MICROCOSMO**

Os valores de pH obtidos no MICROCOSMO, variaram entre 6,0 e 7,0 e, embora estejam abaixo de 8,0, valor considerado como indicador de influência marinha, esta diferença pode ser explicada pela atividade de microrganismos. Segundo Cunha (2000), o pH é intimamente relacionado com a produtividade microbiológica.

A salinidade apresentou-se sempre acima de 30 de acordo com as condições salinas (Tabela 4), não ocorrendo mudança de valor do início ao momento da medição. Durante a montagem dos MICROCOSMOS foi utilizada água do mar filtrada e estéril e não estuarina, devido à dificuldade de obtenção de água estuarina livre de contaminação.

Os valores de Oxigênio Dissolvido (OD) se apresentaram pouco inferiores nas análises do MICROCOSMO, apresentando uma variação de 3,0 a 3,8, o qual provavelmente está intimamente relacionado à atividade microbiana.

No processo de oxidação biológica, o OD é utilizado pelos microrganismos aquáticos para metabolizar a matéria orgânica, segundo Marques & Barbosa (1994). A quantidade de OD influencia todos os processos químicos e biológicos que ocorrem na água.

#### **4.2. Densidade de Bactérias Heterotróficas (BH)**

Para melhor caracterização de cada ponto foram utilizadas as médias das contagens bacterianas obtidas nas réplicas dos MICROCOSMOS, ao longo de todo período de estudo. Os resultados foram expressos como Unidades Formadoras de Colônias por grama de sedimento (UFC/g). A densidade de Bactérias Heterotróficas (BH) foi realizada avaliando a sucessão bacteriana dos MICROCOSMOS e as mesmas foram comparadas com a densidade *in situ* em determinados períodos.

##### **4.2.1. Densidade bacteriana *In Situ***

Em relação às densidades bacterianas, o ponto 4 (ponto de lançamento) apresentou  $0,67 \times 10^4$  UFC/g (Tabela 5).

Tabela 5: Representação da média de densidade do Ponto 4, *in situ*.

Origem	Data	Média (10 <sup>4</sup> UFC/g)
Amostragem/ Coleta 1	10/06/2015	0,67
Coleta 2 (6 meses)	05/11/2015	0,97
Coleta 3 (12 meses)	23/04/2016	0,53

Na análise das variações das densidades bacterianas é preciso considerar não só a influência da grande quantidade de efluente (água, espuma e combustíveis armazenados nos tanques) que foi drenada para o estuário, mas também a elevação da temperatura, devido ao incêndio.

Segundo CETESB (2001), o estuário de Santos já conta com uma contaminação proveniente do parque industrial do município de Cubatão, que antecede o incêndio. Com o incêndio, a situação da qualidade ambiental do estuário de Santos se agravou.

O Ponto 6 apresentou maior densidade:  $3,32 \times 10^4$  UFC/g (Tabela 6) na primeira coleta, quase 5 vezes maior do que na mesma data, registrado no local da descarga de poluentes, demonstrando um possível acúmulo de material proveniente do incêndio. Este ponto está localizado na entrada do canal de Bertioga e apesar do acúmulo de poluentes, apresentava valores de HPA bastante inferiores a outros pontos do canal (CETESB 2001). Além disto, segundo os resultados da modelagem realizada para a dispersão do efluente do incêndio, a própria localização do Ponto 6 favorece a deposição de sedimentos, o que pode ser justificado não só por sua configuração geográfica mas também pela presença de sedimentos finos, variando de argila a silte médio, sendo essa uma das raras áreas da Baixada Santista onde foi assinalada predominância de argilas (FÚLFARO & PONÇANO, 1976). Em locais com sedimentos mais finos se evidencia uma maior adsorção de metais e outros poluentes.

Tabela 6: Representação da média de densidade do Ponto 6, *in situ*.

Origem	Data	Média (10 <sup>4</sup> UFC/g)
Amostragem/ Coleta 1	10/06/2015	3,32
Coleta 2	05/11/2015	0,72
Coleta 3	23/04/2016	0,57

Os acidentes ambientais constantes envolvendo derrames de óleo nas áreas industriais e portuária situadas no Sistema Estuarino de Santos são uma importante fonte de BETX para



os ecossistemas da região. Entretanto, benzeno, tolueno, xileno e alguns de seus derivados são moderadamente voláteis e solúveis em água e acumulam em larga escala nos sedimentos, principalmente em sedimentos finos com características argilosas ou de silte, o que resulta em baixas concentrações na maioria dos rios e áreas costeiras (MOORE & RAMAMOORTHY, 1984).

O Ponto 7 também apresentou alta densidade bacteriana na primeira coleta, com média de  $3,30 \times 10^4$  UFC/g, desta forma vislumbrando a movimentação hidrodinâmica na região (Figura 9).

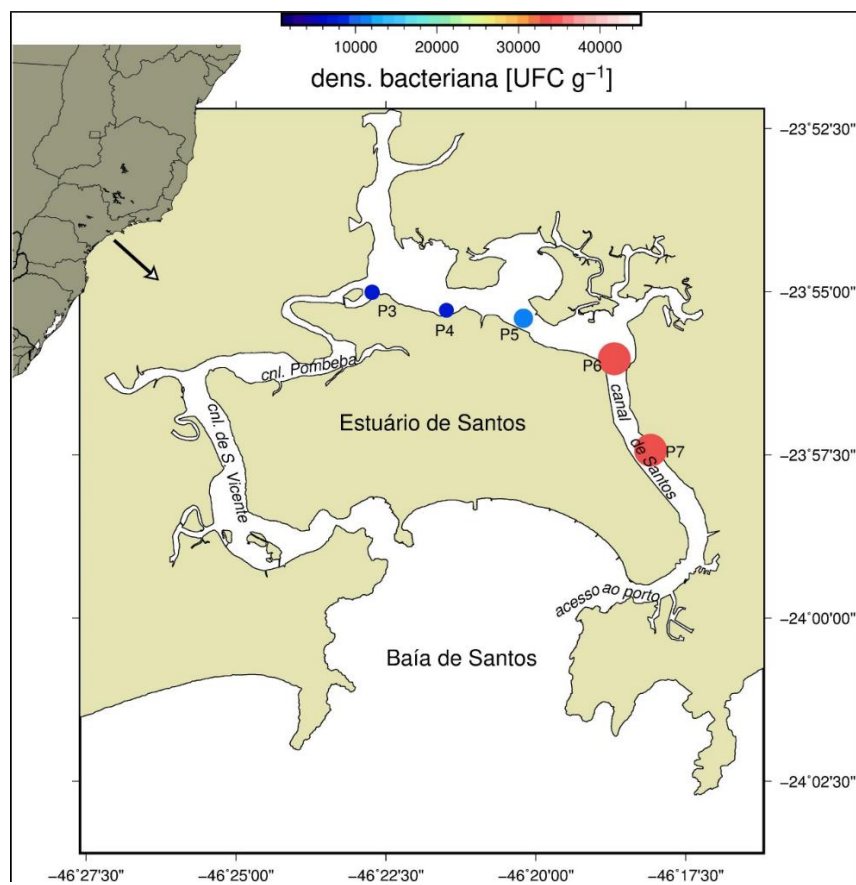


Figura 9: Distribuição da densidade bacteriana nos pontos de coleta na amostragem da primeira coleta.

#### 4.2.2. Densidade bacteriana no MICROCOSMO

A variação das densidades bacterianas nos microcosmos apresentaram um padrão bem típico com constâncias ou até mesmo diminuições iniciais das densidades bacterianas nos MICROCOSMOS, o que está relacionado ao período de adaptação das mesmas às novas condições.

Após o período de adaptação, as densidades das bactérias nos MICROCOSMOS apresentaram um aumento exponencial na Amostragem 8 (17/11/2015) em todos os pontos (Figura 10). Este crescimento exponencial (log) indica uma grande atividade metabólica.

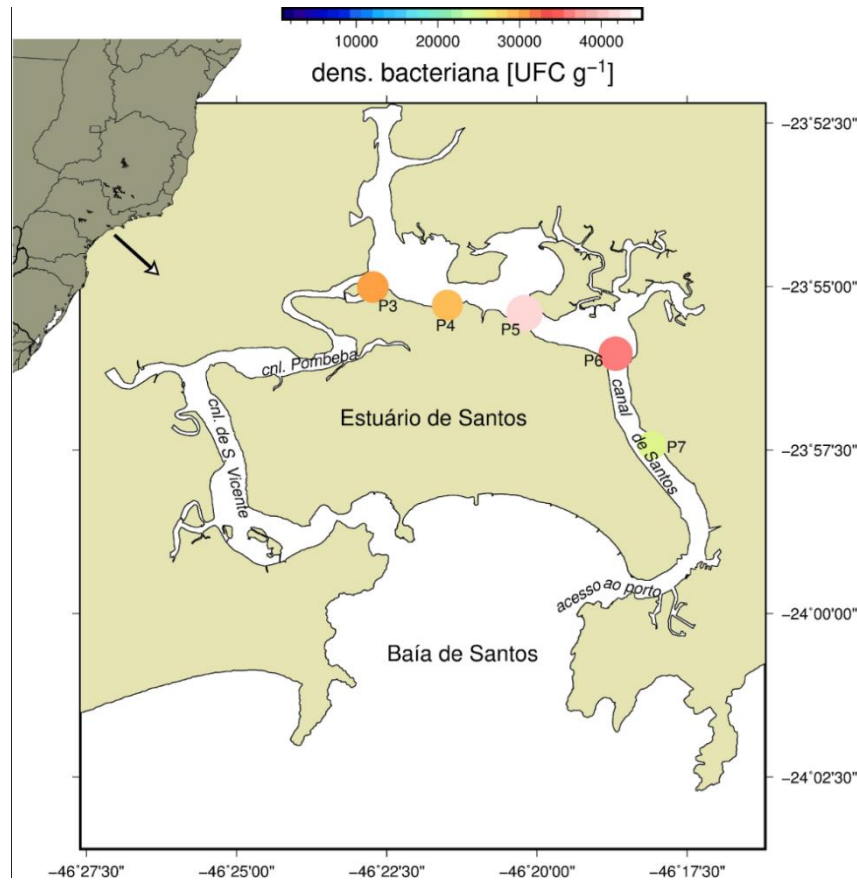


Figura 10: Distribuição da densidade bacteriana dos MICROCOSMOS na Amostragem 8 (17/11/2015).

Os sedimentos utilizados no presente estudo são provenientes de áreas consideradas cronicamente contaminadas e com altas concentrações de contaminantes (ABESSA 2002), apresentando, assim, um grande aporte de nutrientes para as comunidades microbianas. Além disto, as espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) contêm substâncias flúor-carbonadas, que podem, também, ser utilizadas como nutrientes para determinados grupo de bactérias, segundo Zhou *et al.* (2009).

Segundo Pinto *et al.* (2015), foram isoladas cepas de cianobactérias, bactérias heterotróficas e leveduras no sedimento do sistema Estuarino Santos-São Vicente. Em ambientes contaminados há um maior potencial de crescimento de cianobactérias (SORKHOH *et al.*, 1995) e de leveduras nos sedimentos, conforme descrito no trabalho de Pinto *et al.* (2015).

A presença da espuma e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS), somada à contaminação crônica pré-existente, pode causar uma alteração na comunidade bacteriana,

tendo em vista que poluentes orgânicos podem aumentar a diversidade ou causar um efeito contrário, agindo como uma ameaça tóxica e causando a diminuição da diversidade.

Na amostragem de 1 ano após o acidente notou-se uma diminuição na densidade em todos os pontos. Os valores se igualam com os ambientais. Segundo Thomaz & Esteves (1997) vários fatores abióticos podem influenciar um aumento ou diminuição da densidade bactéria, sendo, neste caso, o mais provável a diminuição das concentrações de nutrientes (Figura 11).

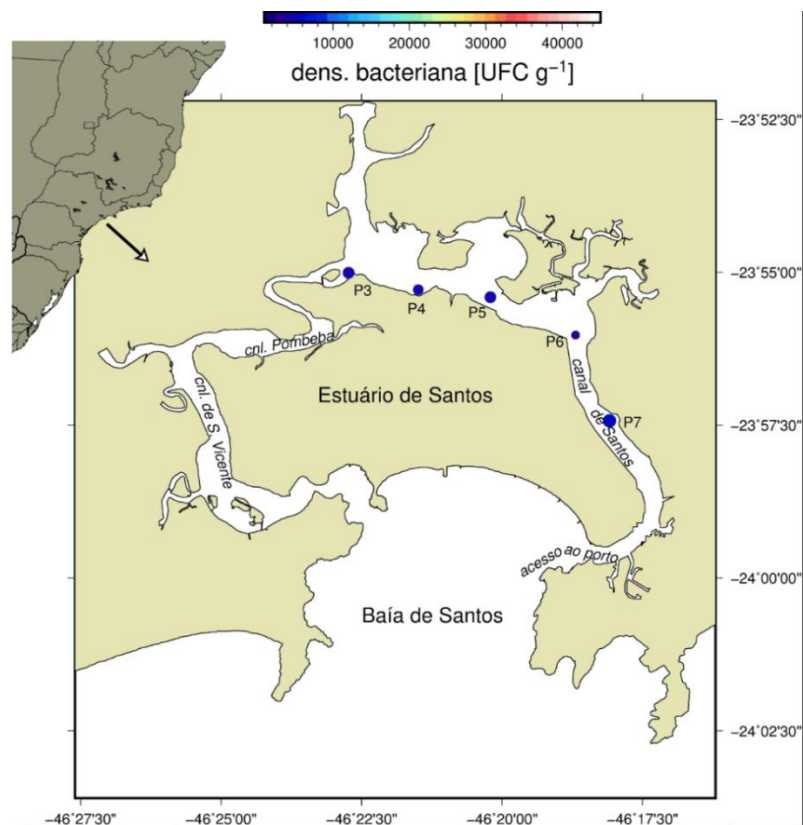


Figura 11: Distribuição da densidade bacteriana dos MICROCOSMOS na Amostragem 9 (23/04/2016), 1 ano após o incêndio.

Ao longo de todo o estudo o Ponto 6 foi o que apresentou maior densidade total de bactérias heterotróficas, com média total de  $1,34 \times 10^4$  UFC/g, conforme Tabela 7, conforme modelagem realizada para dispersão dos efluentes do incêndio, este ponto apresenta maior permanência da pluma de poluentes.

Tabela 7: Densidade bacteriana do Ponto 6 ao longo de todo o estudo.

P6		
Origem	Data	Média (UFC/g)
Coleta 1	10/06/2015	$3,32 \times 10^4$
Coleta 2	05/11/2015	$0,72 \times 10^4$
Coleta 3	23/04/2016	$0,57 \times 10^4$
Amostragem 2	25/06/2015	$1,80 \times 10^4$
Amostragem 3	09/07/2015	$0,91 \times 10^4$
Amostragem 4	29/07/2015	$0,83 \times 10^4$
Amostragem 5	05/08/2015	$0,44 \times 10^4$
Amostragem 6	15/09/2015	$0,47 \times 10^4$
Amostragem 7	13/10/2015	$0,44 \times 10^4$
Amostragem 8	17/11/2015	$3,61 \times 10^4$
Amostragem 9	23/04/2016	$2,64 \times 10^4$

O ponto com menor densidade foi o Ponto 4, com média de  $0,86 \times 10^4$  UFC/g (Tabela 8).

Tabela 8: Densidade bacteriana do Ponto 4 ao longo de todo o estudo.

P4		
Origem	Data	Média (UFC/g)
Coleta 1	10/06/2015	$0,67 \times 10^4$
Coleta 2	05/11/2015	$0,97 \times 10^4$
Coleta 3	23/04/2016	$0,53 \times 10^4$
Amostragem 2	25/06/2015	$1,22 \times 10^4$
Amostragem 3	09/07/2015	$0,74 \times 10^4$
Amostragem 4	29/07/2015	$0,66 \times 10^4$
Amostragem 5	05/08/2015	$0,28 \times 10^4$
Amostragem 6	15/09/2015	$0,46 \times 10^4$
Amostragem 7	13/10/2015	$0,35 \times 10^4$
Amostragem 8	17/11/2015	$2,94 \times 10^4$
Amostragem 9	23/04/2016	$0,39 \times 10^4$

Observou-se estatisticamente a distribuição da densidade através da análise Multivariada Correspondente (Figura 12).

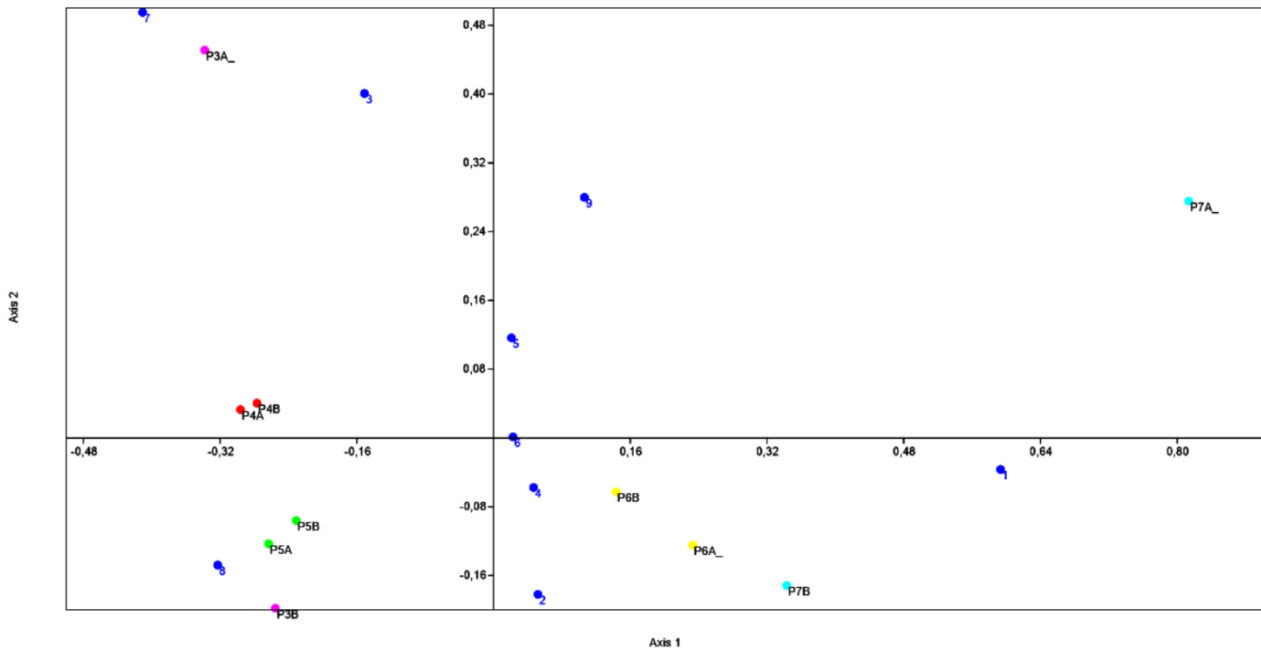


Figura 12: Distribuição da densidade bacteriana dos MICROCOSMOS ao longo de todo o estudo. Os pontos azuis escuros demonstram as amostragens realizadas nos MICROCOSMOS.

■ AMOSTRAGENS ■ P3 ■ P4 ■ P5 ■ P6 ■ P7

O *AXIS 1* (eixo x) mostra a densidade bacteriana dos pontos ao longo do tempo. Por ele pode-se observar que os pontos com maior diferença são os pontos 6 e 7. O restante dos pontos apresentou densidades com valores muito semelhantes.

Estatisticamente, os dados gerados ao longo do estudo apresentaram uma significância de  $p < 0,001$ , para distribuição das densidades nos MICROCOSMOS.

Ao decorrer deste estudo as densidades das bactérias se mantiveram dentro da mesma ordem de grandeza,  $10^4$ . Resultado diferente foi obtido por Ramsay *et al.* (2000), que observou que em sedimentos de manguezais contaminados ocorria um aumento de  $10^3$  para  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g, na densidade de bactérias, embora o mesmo pudesse ter sido também observado neste estudo se considerado um período maior de amostragem dos MICROCOSMOS.

Em relação aos fatores abióticos (Thomaz & Esteves, 1997), apesar de sua influência na abundância e na produção da comunidade bacteriana, no presente estudo tais influências não foram objeto de estudo e foram minimizadas, tendo em vista que os MICROCOSMOS foram mantidos em condições controladas.

#### **4.2.3. *In Situ* x MICROCOSMO**

Ao comparar os resultados obtidos nos MICROCOSMO com aqueles obtidos *in situ*, notou-se que os valores das densidades bacterianas foram semelhantes no final do período de estudo. Ambas as densidades apresentam valores bastante próximos para todos os pontos (Figura 13), mesmo sendo de extrapolação dos resultados do MICROCOSMO para o ambiente natural.

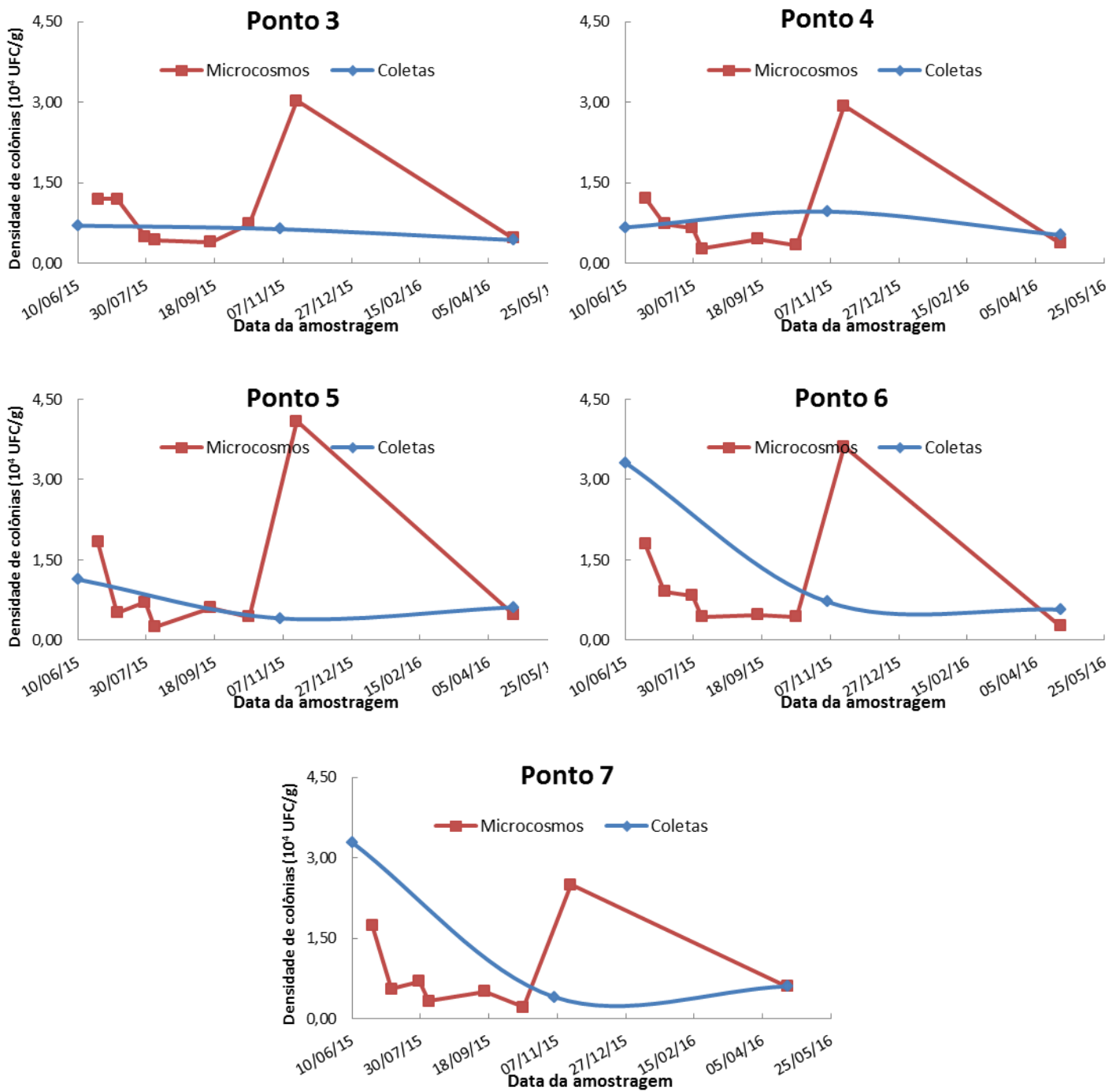


Figura 13: Gráficos de densidade bacteriana ao longo do estudo do MICROCOSMO em comparação às coletas de todos os pontos estudados.

A distribuição de densidades obtidas *in situ* (coleta 1, coleta 2 e coleta 3) e as respectivas amostragens dos MICROCOSMOS (coleta 1, amostragem 8 e amostragem 9) do período, apresentam o mesmo comportamento estatístico de distribuição. Observa-se que os pontos 6 e 7 apresentam maior densidade ao longo do tempo em relação aos demais pontos (Figura 14).

Verificaram-se diferenças estatísticas entre os dados *in loco* e MICROCOSMO através da Análise de Similaridade (ANOSIM), pelo teste de Bray-Curtis ( $p < 0,009$ ).

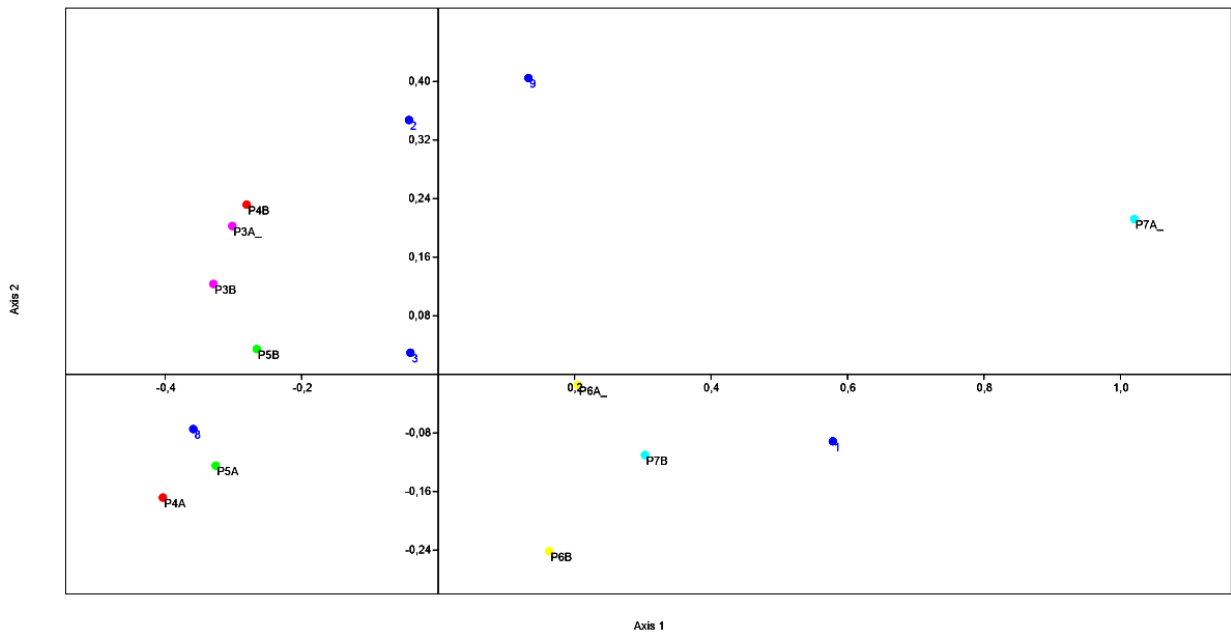


Figura 14: Distribuição da densidade bacteriana dos MICROCOSMOS ao longo do estudo. Os pontos azuis escuros demonstram as amostragens realizadas nos MICROCOSMOS no período de 6 meses (amostragem 8) e 1 ano (amostragem 9) após o incêndio e as coletas referentes 6 meses (coleta 2) e 1 ano (coleta 3).

COLETAS E AMOSTRAGENS P3 P4 P5 P6 P7

No Brasil, pouco se tem conhecimento sobre a ecologia microbiana de ecossistemas marinhos este conhecimento é a distribuição, densidade e produção de microrganismos em águas costeiras do sudeste (ANDRADE *et al.*, 2004; FERNANDES & MESQUITA, 1991a,b; GONZALEZ *et al.*, 2000; MESQUITA, 1993; MESQUITA & FERNANDES, 1996; OLIVEIRA & MESQUITA, 2000; PEREIRA, 2011).

No caso das bactérias, cianobactérias, nanoflagelados e dos vírus, a densidade e a distribuição no ambiente marinho dependem de vários fatores, alguns relacionados ao status trófico do sistema, e outros à interação predador-presa (ANDERSEN & FENCHEL, 1985).

As bactérias heterotróficas presentes no ambiente apresentam populações degradadoras de poluentes, mesmo que tais ambientes não tenham sido submetidos à presença destes substratos. Essa característica inerente proporciona um grande potencial assimilatório dos poluentes. Assim sendo, a adição acidental ou proposital do poluente ao meio ambiente, enriquece, seletivamente, a comunidade capaz de utilizar esse substrato (HILL, 1994).



### 4.3. Análise morfológica e isolamento das Bactérias Heterotróficas (BH)

Foram isoladas 335 cepas durante o presente trabalho, com diferentes morfologias. A morfologia predominante, encontrada em 70 (20,9%) cepas isoladas, apresentava estrutura rugosa, elevação protuberante, de forma circular com tamanho médio (2 a 5mm) e coloração branca, como demonstrado na Figura 15.

A maior quantidade destas cepas foi isolada no Ponto 6 (16 cepas), enquanto que a menor quantidade de isolados foi obtida no Ponto 7 (12 cepas). Ao longo do período de estudo, as maiores quantidades de cepas morfológicamente distintas foram observadas na coleta de 1 ano.



Figura 15: Morfologia bacteriana de estrutura rugosa, protuberante e branca. Foto: Roberta Merguizo Chinellato.

Outra cepa que apresentou elevada quantidade, 59 (17,6%) cepas isoladas ao longo de todo o estudo, apresenta forma circular com tamanho médio (2 a 5mm), borda lisa, com aspecto leitoso (Figura 16). Entretanto, a presença desta cepa foi diminuindo ao longo do estudo e na coleta de 1 ano não apresentou nenhuma colônia, sendo que sua maior densidade foi observada na amostragem 8, com 11 cepas.

Fatores ambientais podem afetar no crescimento microbiano, como por exemplo, temperatura, pH, OD, nutrientes entre outros, além da capacidade de adaptação e reprodução das bactérias, ocasionando uma variação na diversidade encontrada no local (BROCK, 2010). A sucessão ecológica envolve mudanças na estrutura de espécies e processos da comunidade ao longo do tempo e resulta da modificação do ambiente físico pela comunidade e de interações de competição e coexistência em nível de população (ODUM, 1988).



Figura 16: Morfologia bacteriana de borda lisa e aspecto leitoso. Foto: Roberta Merguizo Chinellato.

A cepa que aumentou a quantidade ao longo do tempo apresentava estrutura rugosa, elevação protuberante, de forma circular com tamanho médio (2 a 5mm) e coloração para rosa (Figura 17), com 57 (17%) cepas isoladas. Destas 57 cepas, pode-se observar que a maior densidade se deu na Coleta de 1 ano após o incêndio, e sua menor densidade na primeira coleta.



Figura 17: Morfologia bacteriana de estrutura rugosa e protuberante e rosa. Fonte: Foto: Roberta Merguizo Chinellato.

A maior diversidade de tipos morfológicos foi obtida na amostragem 9 (1 ano após o incêndio), com 36 cepas isoladas. As cepas foram mantidas em um banco de cultivo até a realização da identificação molecular.

#### 4.4. Caracterização das Bactérias Heterotróficas (BH)

Realizou-se a coloração de Gram quanto à caracterização e a forma mais presente foi de Bacilo - Gram Positivo (Figura 18A), com 53%, seguida de Cocos - Gram Negativo (Figura 18B), que apresentou 24%. A distribuição da característica Gram das cepas isoladas ao longo do estudo pode ser observada na Figura 19.

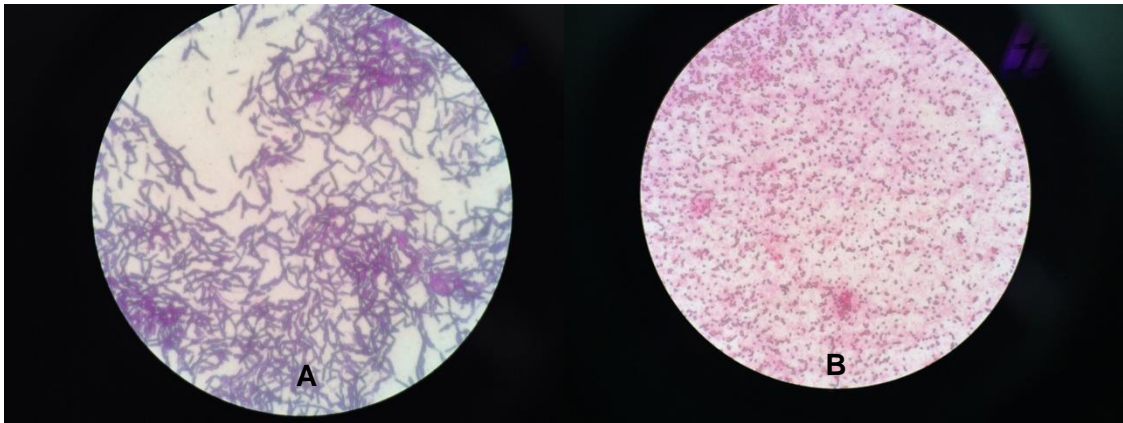


Figura 18(A): Bactérias Bacilo – Gram Positivo. (B): Bactérias Cocos – Gram Negativo;  
Fotos: Roberta Merguizo Chinellato

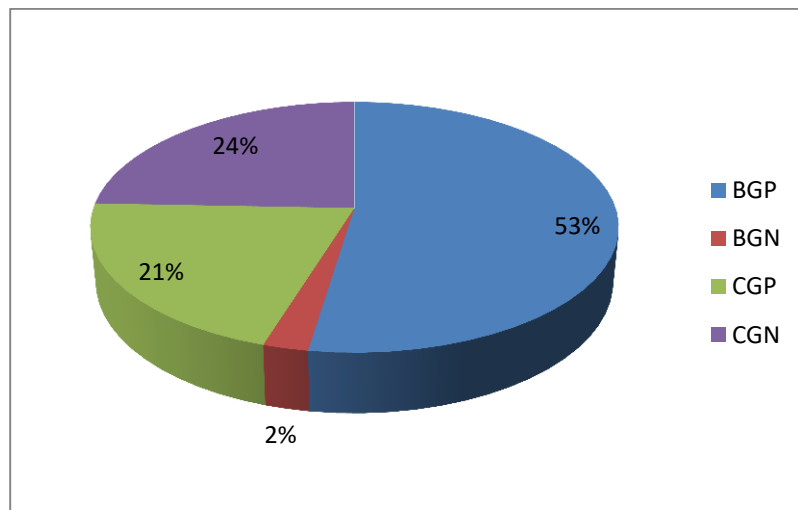


Figura 19: Gráfico com a distribuição das características de Gram das cepas isoladas ao longo do estudo. BGP: bacilos gram-positivos; BGN: bacilos gram-negativos; CGP: cocos gram-positivos; CGN: cocos gram-negativos.

Segundo Zobell (1946), acreditava-se que o número de bactérias gram-positivas encontradas no oceano não ultrapassava 5%. Todavia, ao longo do tempo e com o advento do surgimento de novas técnicas mais precisas para estudos de microbiologia é sabido atualmente que as diversidades de bactérias gram-positivas são bem maiores (Jensen *et al.*,

2005). Shome *et al.* (1995) isolaram 38 bactérias distintas no mangue ao sul da Índia e caracterizaram que 76,3% eram Gram Positivas.

Os microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos estão amplamente distribuídos nos oceanos. Em estudos realizados na costa do Japão, Shaerun *et al.* (2004), isolaram bactérias com potencial para degradar hidrocarbonetos.

Os resultados encontrados neste estudo se assemelham aos encontrados na Baía do Araçá - São Sebastião/SP, que também é considerada cronicamente contaminada e com predominância de bactérias Gram Positivas (ZAMPIERI *et al.*, 2016).

#### 4.5. Identificação Molecular das Bactérias Heterotróficas (BH)

Foram selecionadas 33 cepas com características morfológicas distintas para identificação molecular. Após a extração do DNA o resultado foi visualizado através corrida do gel de eletroforese de acordo com a Figura 20.

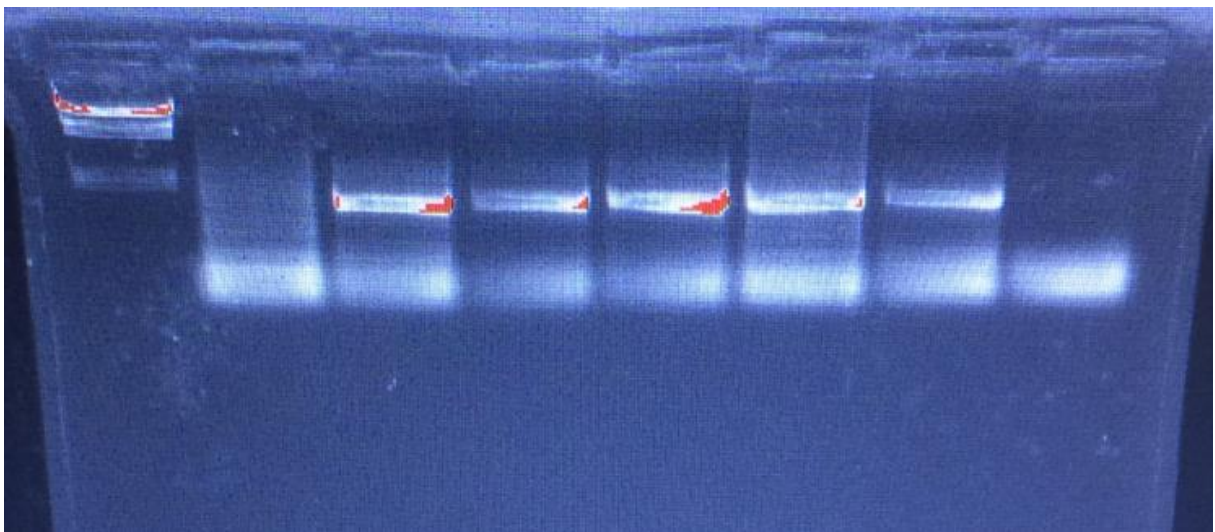


Figura 20: Demonstração da qualidade das bandas de corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de alguns DNAs genômicos.

Para verificação da amplificação dos DNAs extraídos, observou-se pelo gel da corrida de eletroforese Figura 21.

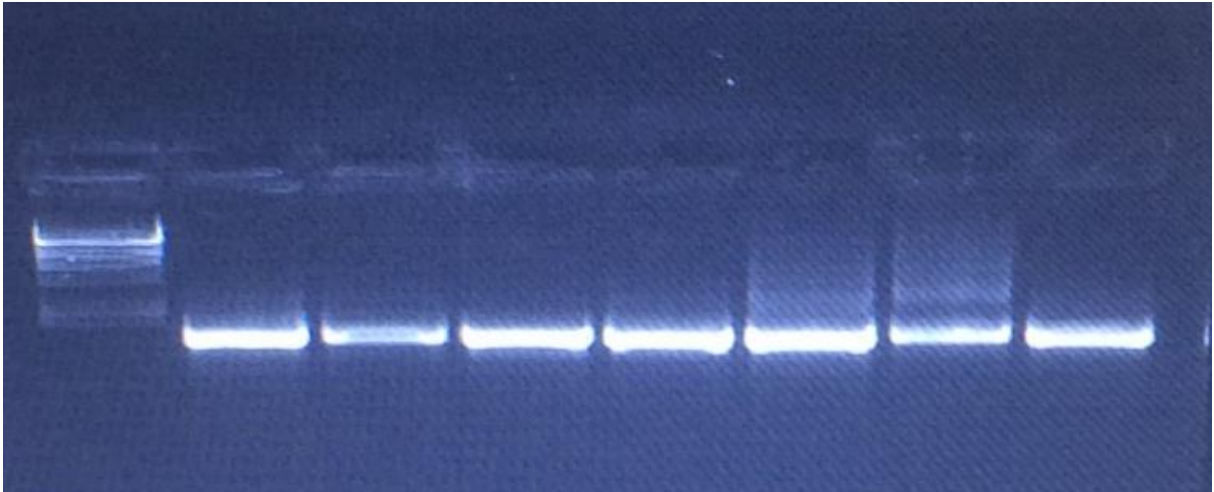


Figura 21: Demonstração da qualidade das bandas da corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% depois da reação de polimerização em cadeia (PCR) dos DNAs genômicos extraídos.

Após o sequenciamento é gerado o eletroferograma para processamento dos dados e verificação da espécie no banco de dados do NCBI. A qualidade do eletroferograma pode ser verificada na Figura 22.

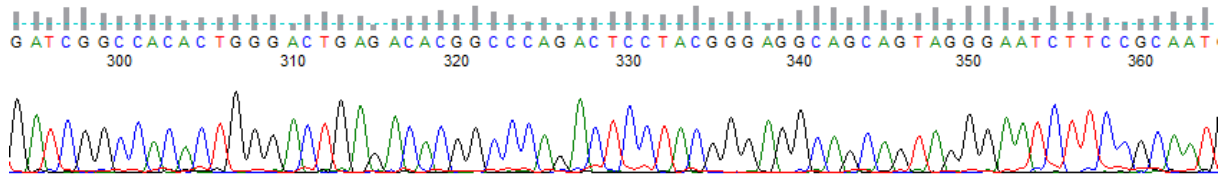


Figura 22: Exemplo da qualidade do eletroferograma gerado pelo FinchTV.

Através das análises moleculares foi possível realizar a identificação das espécies de bactérias descritas na Tabela 9.

Tabela 9: Identificação molecular de 16 cepas isoladas ao longo do estudo.

Cepa (ID)	Espécies	Código NCBI	% de identidade
2	<i>Staphylococcus sp.</i>	KX267953.1	99%
5	<i>Bacillus cereus</i>	KX529697.1	100%
11	<i>Bacillus pumilus</i>	HQ143628.1	98%
13	<i>Vibrio paraemoolyticus</i>	FN997623.1	98%
14	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ410782.1	98%
15	<i>Staphylococcus sp.</i>	KX267953.1	100%
16	<i>Bacillus licheniformis</i>	KY172828.1	98%
19	<i>Bacillus pumilus</i>	KU962124.1	97%
20	<i>Staphylococcus sp.</i>	KX267953.1	99%
21	<i>Bacillus cereus</i>	KX529697.1	100%
22	<i>Bacillus subtilis</i>	EF428250.1	98%
23	<i>Enterococcus sp.</i>	FJ372772.1	97%
25	<i>Pantoea sp.</i>	KR780425.1	100%
30	<i>Bacillus licheniformis</i>	KY202705.1	100%
31	<i>Bacillus licheniformis</i>	KY202705.1	100%
32	<i>Vibrio aestuarianus</i>	GQ906358.1	96%

Analisando a tabela 9, verificou-se que das cepas identificadas a maior quantidade é do gênero *Bacillus*, sendo que das 16 cepas identificadas, 3 são *Bacillus licheniformis*, 2 *Bacillus pumilus*, 2 *Bacillus subtilis*, 2 *Bacillus cereus*, 3 *Staphylococcus sp.*, 1 *Vibrio aestuarianus*, 1 *Vibrio paraemoolyticus*, 1 *Enterococcus sp.* e 1 *Pantoea sp.*. Apenas os gêneros *Vibrio* e *Pantoea* pertencem ao grupo de gram-negativas, as demais cepas são gram-positivas.

Não foi possível realizar a identificação das demais cepas isoladas por haver alguns problemas na extração do DNA genômico, outras por apresentarem baixa percentagem de identificação com as sequências depositadas na ferramenta BLASTn da base de dados do NCBI.

Bactérias do gênero *Bacillus* são geralmente encontradas no solo e apresentam habilidades fisiológicas que permitem crescer em todos os ambientes e competir com outros organismos dentro do ambiente devido à capacidade de produzir esporos extremamente resistentes (KUTA, 2008). Espécies de bactérias *B. marinus*, *B. badius*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. firmus* e *B. lentus* foram isoladas dos habitats marinhos (BOEYE & AERTS, 1976; CLAUS & BERKELEY, 1986; ORTIGOSA, GARAY & PUJALTE, 1997). Trabalho de Ivanova, Mikhailov & Andreev (1992) mostrou que bacilos marinhos das espécies *B. marinus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* e *B. mycoides* são

habitantes comuns no Oceano Pacífico. Ivanova *et al.* (1999) isolou bacilos de origem marinha em esponjas, ascídias, caranguejos e amostras de água do mar coletadas no Mar do Japão, no Mar de Okhotsk e no Mar de Coral do Oceano Pacífico.

Algumas espécies de *Bacillus* são sabidamente degradadoras de hidrocarbonetos e formadoras de esporos, o que facilita sua permanência e dominância em sedimentos contaminados por muito tempo. O gênero *Bacillus* contém espécies economicamente importantes em áreas diversas, processos industriais e de remediação ambiental. Este gênero vem sendo utilizado em controle biológico de insetos, processos de biosurfactante, produção de antibióticos, entre outros (SCHALLMEY *et al.*, 2004).

Ao longo de todo o trabalho foi possível observar que houve variação da quantidade das cepas isoladas para todas as espécies. No entanto, *Bacillus subtilis* apresentou as maiores quantidades, mesmo não tendo sido dominante no começo do trabalho. Na Amostragem 8 (17/11/2015), o aumento na quantidade de isolados foi bastante significativo, provavelmente devido à sua capacidade em metabolizar os contaminantes utilizados por ela, como nutrientes para seu crescimento (Figura 23).

De fato, a presença de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos é bem documentada e reconhecida na literatura bem como sua ampla distribuição nos solos e sedimentos. Populações desses microrganismos normalmente constituem menos que 1% da comunidade microbiana total, mas quando hidrocarbonetos estão presentes, essas populações aumentam até em 10% da comunidade (ATLAS, 1995). Altas concentrações de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos foram observadas por Hagler, De Oliveira & Mendonça-Hagler (1982) em um estuário contaminado do Rio de Janeiro, sendo as maiores densidades encontradas a uma profundidade de 2m.

Os biosurfactantes são polímeros produzidos pelos microrganismos, que permitem o bloqueio da formação de pontes de hidrogênio e de certas interações hidrofóbicas – hidrofílicas, reduzindo a tensão superficial da superfície a ser biorremediada (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011). São com frequência produzidos por bactérias capazes de crescer em hidrocarbonetos que estimulam o crescimento e aceleram a biorremediação. Os biosurfactantes são vantajosos também por apresentarem baixa toxicidade, biodegradabilidade, estabilidade em valores extremos de pH e temperatura, dentre outros (FIECHTER, 1992).

Esses microrganismos são ubíquos na natureza e capazes de degradar diversos tipos de hidrocarbonetos de cadeia curta, cadeia longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo os PAH (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) (ROSENBERG, 1993).

De fato, *Bacillus subtilis*, por exemplo, tem eficiência comprovada de produção de biossurfactante, contribuindo na remoção de petróleo (AL-BAHRY *et al.*, 2012). As cepas de *Bacillus subtilis* produzem 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).

Os microrganismos agem, principalmente, na interface óleo-água (AMUND & ADEBIYI, 1991) e por isso o aumento da área de superfície pelos biossurfactantes acelera a biorremediação.

Segundo Whang *et al.* (2009), *Bacillus subtilis* apresentou resultado bastante significativo na remoção de óleo diesel de areia através do biossurfactante produzido pela espécie. Na Índia em 2007, Joshi e colaboradores realizaram a produção de biossurfactantes com *Bacillus subtilis* isolado de alimentos fermentados, no qual se verificou uma possível aplicação deste produto em recuperação de óleos (JOSHI *et al.*, 2007).

Quanto à espécie de *Bacillus pumilus*, foi possível observar que o número de isolados desta espécie aumentou ao longo do tempo de estudo, apresentando um aumento na quantidade em relação às outras espécies. Estas bactérias estão presentes em ambientes contaminados por óleo, corroborando com trabalhos de Calvo, Toledo & González-López (2004), Domingos *et al.* (2013), Khanna, Goyal & Khanna (2011). Bueno (2008) isolou vários microrganismos de amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos para avaliar a produção de biossurfactantes e concluiu que *Bacillus pumilus*, são excelentes produtores. Calvo *et al.* (2008) indicou que a bactéria demonstra ser um agente promissor para aplicação ambiental.



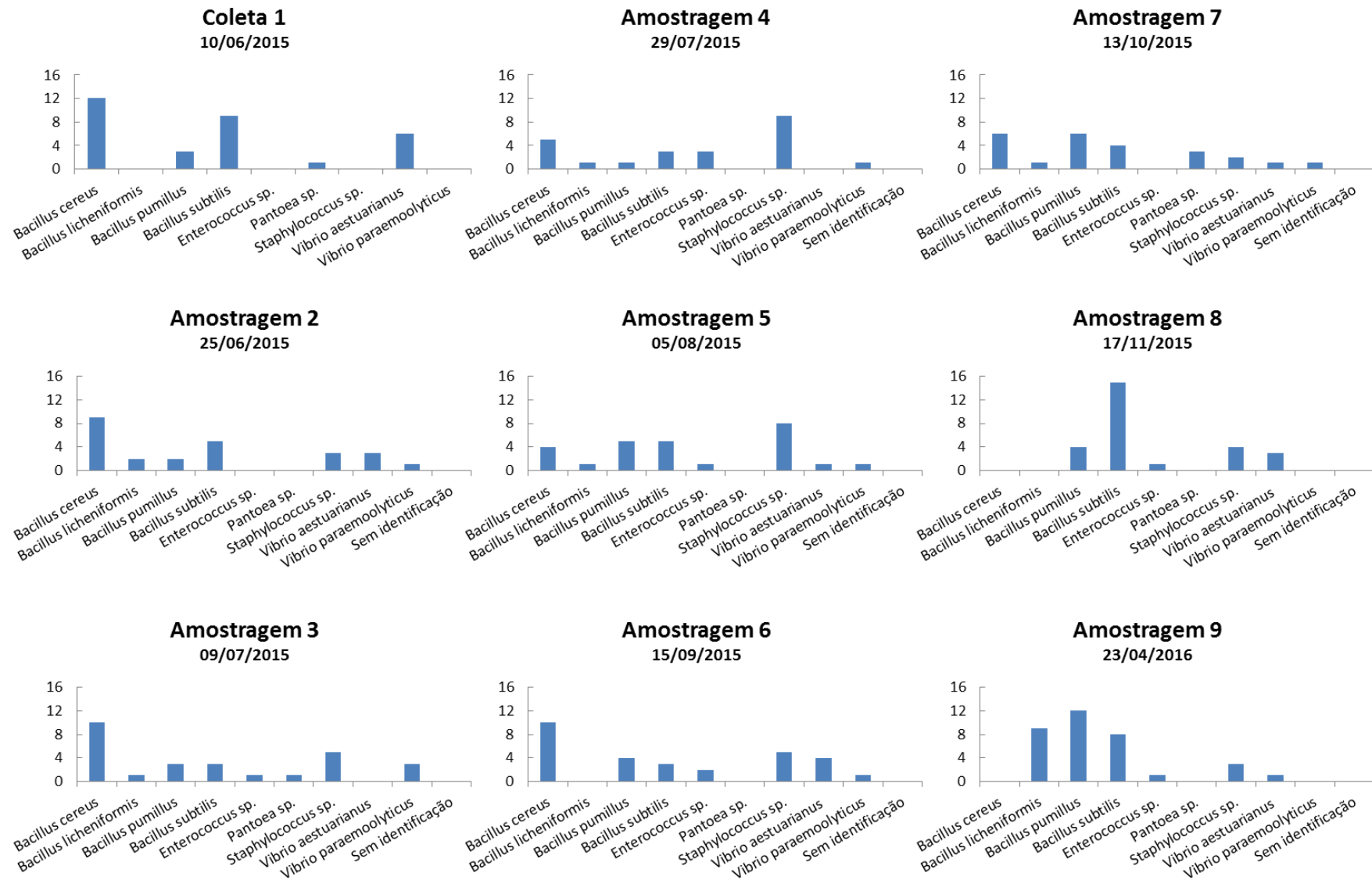


Figura 23: Distribuições dos números de identificações por espécie para cada amostragem realizada.

O gênero *Staphylococcus* também apresentou grande quantidade de isolados de acordo com a figura 23, os estafilococos estão entre os microrganismos não esporulados mais resistentes ao calor e podem tolerar uma concentração aumentada de sal (ANVS, 2004). Este gênero de bactéria também apresenta potencial de biorremediação. Contudo, a espécie *Staphylococcus aureus* tem se tornado bastante relevante nas últimas décadas por ser responsável por causar infecções hospitalares com altos níveis de morbidade e letalidade, e em boa parte dos casos, sua multirresistência acaba dificultando o tratamento (VELASQUEZ-MEZA, 2005).

#### 4.5.1 Distribuição de espécies por Ponto

A sucessão causada por fatores externos à comunidade é denominada sucessão alogênica. Na sucessão, dentre as perturbações causadas, pode-se citar a mudança climática, tempestades, furacões e, principalmente, a ação do homem, que está modificando seriamente o ambiente. A sucessão alogênica ocorre numa escala de tempo comensurável com a escala de tempo do distúrbio (RICKLEFS & MILLER, 1999), e quando ocorre frequentemente, esta sucessão é a força mais importante que rege as mudanças na comunidade.

Podemos observar este tipo de comportamento por meio da predominância da quantidade de isolados das espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus sp.* (Figura 24). Juntas, as 3 espécies representam 63% das cepas isoladas e identificadas, sendo *Bacillus subtilis* 30%, *Bacillus pumilus* 18% e *Staphylococcus sp.* 15%.

Os *Bacillus subtilis* apresentam um período de adaptação da espécie ao ambiente do MICROCOSMO nas primeiras amostragens. Na amostragem 8 (17/11/2015), após 6 meses do incêndio, foi evidenciado um grande aumento da quantidade, indicando uma fase de crescimento exponencial, provavelmente devido ao uso dos contaminantes como substrato pela própria bactéria e/ou de sub produtos da degradação dos contaminantes por outros microrganismos. Este aumento ocorreu em todos os pontos, menos no ponto 7 onde o aumento ocorreu apenas 1 ano após o incêndio (amostragem 9).

Desta forma, os resultados do presente trabalho corroboram com de trabalhos publicados (AL-BAHRY *et al.*, 2012; DESAI & BANAT, 1997; NITSCHKE & PASTORE, 2006; WHANG *et al.*, 2009; JOSHI, 2007), de que *Bacillus subtilis* apresenta potencial de biorremediação.

A presença de *Bacillus pumilus*, foi mais evidenciada no ponto 4, porém, apenas após a Amostragem 3. Nos pontos 3, 4 e 6, houve uma tendência de aumento da presença dessa

cepa, enquanto nos pontos 5 e 7 não houve modificação visível ao longo do tempo (Figura 24). Calvo *et al.* (2004) apontam que *Bacillus pumilus* foi capaz de crescer e utilizar naftaleno como fonte de carbono e energia, enquanto Rahman *et al.* (2003) observaram que as cepas de *Bacillus pumilus* obtiveram resultados promissores com a presença de gasolina. As cepas de *Bacillus pumilus* ou o biossurfactante por ela produzido podem ter aplicação na biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos do petróleo (CALVO *et al.*, 2004).

Em relação à *Staphylococcus sp.*, os resultados mostraram um crescimento inicial seguido de uma queda na quantidade de cepas isoladas. O ponto 3 foi particularmente representativo desse efeito (Figura 24). Esse efeito sugere que os *Staphylococcus sp.* podem ter características biorremediadoras interessantes, pois o crescimento foi alto com maior presença de hidrocarbonetos e há uma queda populacional acentuada na ausência ou diminuição da presença do contaminante. Todavia, trata-se de microrganismos com potencial patogênico, o que poderia inviabilizar seu uso.

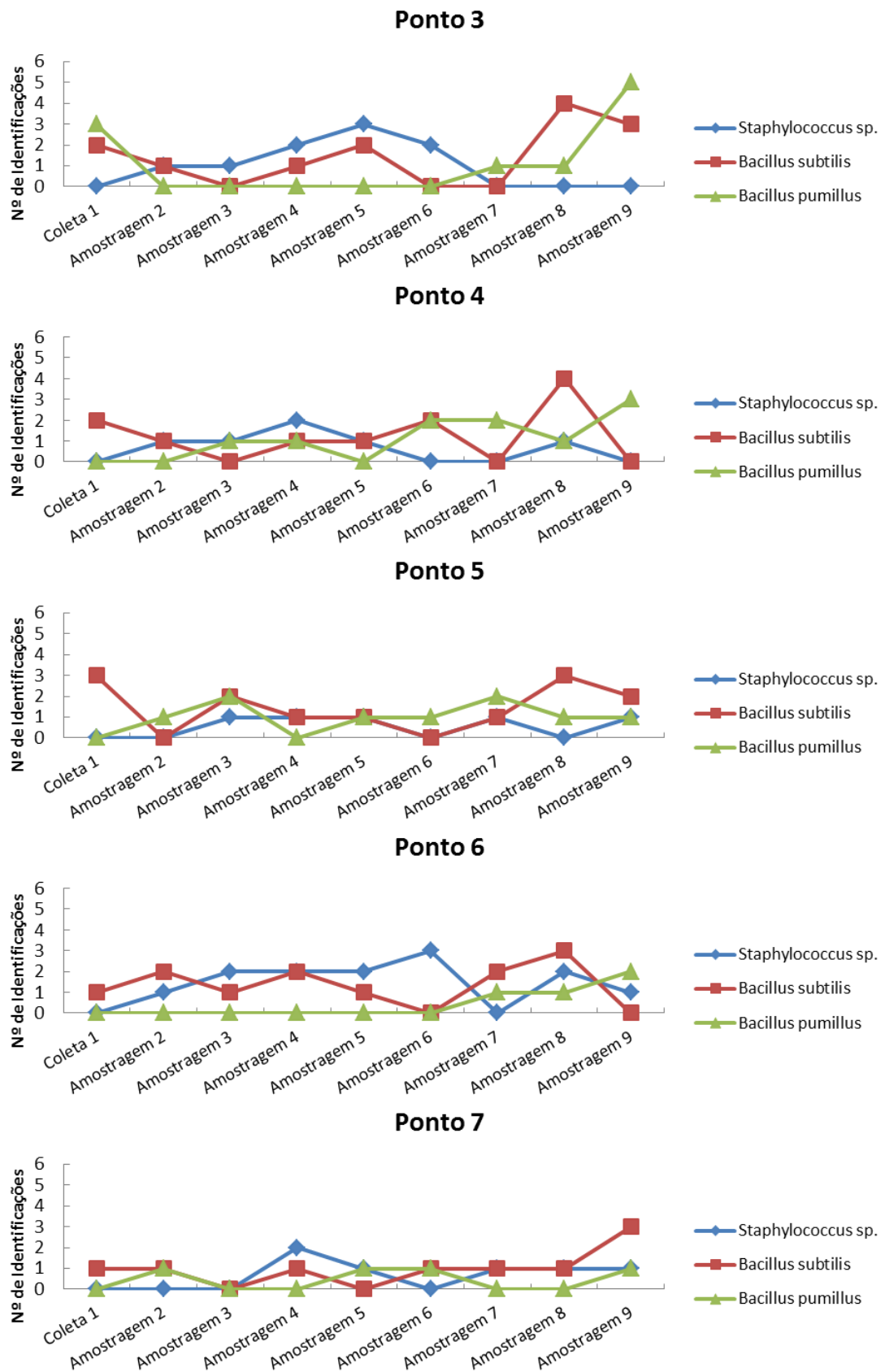


Figura 24: Sucessão das espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumillus* e *Staphylococcus sp.*, ao longo das amostragens de MICROCOSMO.

## 5. CONCLUSÕES

O presente estudo verificou uma grande diversidade de espécies de bactérias no ambiente estuarino. No entanto, esta diversidade foi afetada pela presença de contaminantes, devida ao despejo inadequado da espuma formadora de filme aquoso (AFFF) e pelas altas temperaturas do efluente despejado no estuário.

Em algumas amostragens ocorreram grandes aumentos das densidades de determinadas cepas, demonstrando que algumas espécies tem a capacidade de metabolizar com mais eficiência os compostos presentes e, portanto, seriam cepas com potencial uso biotecnológico.

O uso de MICROCOSMO como simulação do ambiente possui limitações, pois não considera todas as variáveis do ambiente marinho, como aporte de água doce, de outros contaminantes, variação das marés e correntes marítimas, bem como a renovação natural da biota. Entretanto, através do método foi possível verificar quais as cepas mais promissoras para biorremediação, uma vez que os resultados dos microcosmos e do ambiente apresentaram a mesma tendência neste trabalho.

Após o período de adaptação, houve um aumento da densidade das diversas espécies, sendo que o gênero *Bacillus* se destacou, evidenciando a sua utilização com possível potencial biorremediador. Merece atenção o *Bacillus subtilis*, que se demonstrou promissor para biorremediação, seja diretamente ou por meio do biossurfactante por ele produzido.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. M. S. Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil. 290 f. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 2002.
- ABESSA, D. M. S.; RACHID, B. R. F.; MOSER, G. A. O.; OLIVEIRA, A. J. F. C. Revisão: Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos. *O Mundo da Saúde*, 36:643-661. 2012.
- 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. Sistema de Combate a Incêndio por Espuma. Norma NBR 12615. Brasil: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1992.
- 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<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R.. “Fundamentos da Biologia Moderna”, editor Moderna. 4<sup>o</sup> edição. Volume Único. 856p. 1990.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 15th ed. New York, 1998. 1134p.
- 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.
- ANDERSEN, P.; FENCHEL, T. Bacterivory by microheterotrophic flagellates in seawater samples. *Limnology and Oceanography*, v. 30, p. 198-202. 1985.
- ANDRADE, L; GONZALEZ, A. M.; VALENTIN, J. L.; PARANHOS, R. Bacterial abundance and activity in the southwest Atlantic Ocean. *Hydrobiologia (The Hague)*, v. 511, p. 103-111. 2004.
- ANVS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. 2004
- APARNA, A.; SRINIKETHAN, G. HEDGE, S. Effect of addition of biosurfactant Produced by *Pseudomonas sp.* on Biodegradation of Crude Oil. *Int. Proc. Chem. Biol. Environ. Eng.* 6, 2011.
- ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad Oxford*, v.35, n.1-3, p.317-327, 1995.
- BOEYE, H.; AERTS, M. Numerical taxonomy of *Bacillus* isolates from North Sea sediments. *Int J Syst Bacteriol* 26:427–441. 1976.

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.

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

BROCK. MADIGAN, M.; MARTINKO. J.; DUNLOP, P.; CLARK, D. *Brock Biology of Microorganisms* 12th ed. 2009, Pearson Prentice Hall

BUENO, S. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese (doutorado em engenharia de alimentos), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto - SP, 86 f, 2008.

CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology*, v. 109, ed. 3, p. 255-262, 2004.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Environment*. 2008.

CARDOSO, C. D. P. Estudo da macrofauna benthica de parias do parque estadual da Ilha do Cardoso, como subsidio 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.

CARRASCO, M.; LÓPEZ-RAMÍREZ, J.A.; BENAVENTE, J.; LÓPEZ-AGUAYO, F.; SALES, D. Assessment of urban and industrial contamination levels in the bay of Cádiz, SW Spain *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, n 3, p. 335-345, 2003.

CEPAL 2016. Disponível em: <http://www.cepal.org/pt-br>; Acessado em 25 de agosto de 2016.

CETESB (SÃO PAULO). Sistema Estuarino Santos-São Vicente. Relatório técnico, CETESB, 2001.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Norma Técnica L5.201 - Contagem de bactérias heterotróficas : método de ensaio. Jan/2006.

CHAPMAN, D., 1992. *Water Quality Assessments*. Chapman and Hall, New York, NY.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, v. 18, n. 1, p. 117-143, 1993.

Claus, D.; Berkeley, R.C.W. Genus *Bacillus*, Cohn 1872. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, pp 1105–1139. 1986.

CONAMA - RESOLUÇÃO No 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

CUNHA, A. C. Monitoramento, Parâmetros e Modelos de Qualidade da Água. Macapá/AP:Secretaria de Estado do Meio Ambiente (SEMA). 83 p. 2000.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F.; ROSADO, A. S.. Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. CETEM/MCT - Série Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro: 45p. 2008.

DEL VALLS, T.A.; CONRADI, M. 2000. 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):39 - 64p.

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

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

DOMINGOS, D. F.; DELLAGNEZZE, B. M.; GREENFIELD, P.; REYE, L. R.; MELO, I. S.; MIDGLEY, D. J.; OLIVEIRA, V. M.. 2013. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* CCMA-560, isolated from an oil-contaminated mangrove swamp. *Genome Announc.* 1(5):e00707-13. doi:10.1128/genomeA.00707-13.

FERNANDES, A. J.; MESQUITA, H. de S. L. Estudo quantitativo da população microbiana da região de Ubatuba, Estado de São Paulo: inverno. In: Simpósio sobre Oceanografia IOUSP. Resumos. São Paulo: Instituto Oceanográfico, 1991a, 94 p.

FERNANDES, A.J.; MESQUITA, H. de S. L. Estudo quantitativo da população microbiana da região de Ubatuba, Estado de São Paulo: verão. In: Simpósio sobre Oceanografia IOUSP. Resumos. São Paulo: Instituto Oceanográfico, 1991b, 93 p.

FIECHTER, A., "Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application." *Trends in Biotechnology*, 10, 1992.

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.; OLIVEIRA, A. J. F. C.; PINHEIRO, M. A. A., VISÃO DIDÁTICA SOBRE O MEIO AMBIENTE NA BAIXADA SANTISTA. 1º Edição; Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2008.

FONTES, R. F. C. Relatório de Dispersão de LGE e da Pluma Térmica no Estuário de Santos Durante Incêndio da ULTRACARGO. 2015.

FÚLFARO, V.J.; PONÇANO, W.L. Sedimentação atual do estuário e baía de Santos: um modelo geológico aplicado a projetos de expansão da zona portuária. *Anais do I Congresso Brasileiro de Geologia e Engenharia*, volume 2, p. 67-90. 1976.



GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. Revista digital: Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. 2005.

GONZALEZ, A. M.; PARANHOS, R.; ANDRADE, L.; VALENTIN, J. L. Bacterial production in Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil) evaluated by 3H-leucine incorporation. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 43, n. 5, p. 493-500. 2000.

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.

HAGLER, A. N.; OLIVEIRA, R. B.; HAGLER, L. C. M. Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brazil. Antonie van Leeuwenhoek, v. 48, n. 1, p. 53-56, 1982.

HARARI, J.; FRANCA, C. A.; CAMARGO, R. Perspectives on integrated coastal zone management in south america. In: . Lisbon: IST Press, 2008. cap. Climatology and Hydrography of Santos Estuary, p. 147-160.

HILL, E. C. Biodegradation of petroleum products. In: Petroleum Microbiology. Atlas, R.M. (ed.) 2nd. Ed. 1984. McMillan Publishing Co., New York pp. 579-612.

HORTELLANI, M.A.; SARKIS, J.E.S.; ABESSA, D.M.S.; SOUSA, E.C.P.M. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos – São Vicente. Química Nova, v.31, p.10-19, 2008.

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

Ivanova, E.P.; Mikhailov, V.V.; Andreev, L.A. Marine bacilli and some approaches to their identification. Mikrobiol Zhurnal 54:27-33 (in Russian). 1992.

Ivanova, E.P.; Mikhailov, V.V.; Svetashev, V.; Nedashkovskaya, O.; Gorshkova, N.M.; Mikhailov, V.V.; Yumoto, N.; Shigeri, Y.; Taguchi, T.; Yoshikawa, S. Characterization of Bacillus strains of marine origin. INTERNATL MICROBIOL. 2:267-271 © Springer-Verlag Ibérica. 1999.

JENSEN, P. R.; MINCER, J.; WILLIAMS, P. G.; FENICAL, W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. Antonie Leeuwenhoek, v. 87. P. 43-48, 2005.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A.J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. Bioresource Technology, v.30, p. 1010-1016, 2007.

KHANNA, P.; GOYA, D.; KHANNA, S.. Pyrene Degradation by Bacillus pumilus Isolated from Crude Oil Contaminated Soil. Polycyclic Aromatic Compounds, 31:1-15, 2011

KLEEREKOPER, H. Introdução ao estudo da limnologia. 2ª ed. (facsimilar). Porto Alegre, Editora da Universidade/UFRGS, 1990. 330 p.

KUTA FA. Antifungal effects of *Calotropis Procera* stem bank extract against *Trichoplyton gypseum* and *Epiderinoplyton Flocosum*. *Afr J. Biotechnol.* **7**(13):2116-8. 2008.

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.

LEMOS, J. L. S.; OLIVEIRA, S. D.; SCHLITTER, L. D. F. S.; PEREIRA JR. N. Técnicas de Biorremediação de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo. *Diálogo e Ciência – Revista da Rede de ensino FTC, Ano II, n. 11, dez.* 2009.

MARQUES, M.M.G. S. & BARBOSA, F. A. R.. Eficiência de alguns parâmetros da comunidade de macroinvertebrados utilizados na avaliação da qualidade de água. *Anais do VIII Seminário Regional de Ecologia.* p. 113-126. 1994.

MEDEIROS, P. M.; CARUSO BICEGO, M. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP–Brazil. *Marine pollution bulletin*, v. 49, n. 9-10, p. 761–769, 2004.

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

MESQUITA, H. de S. L. Densidade e distribuição do bacterioplâncton nas águas de Ubatuba (23o S 45o W), Estado de São Paulo. *Publicação especial do Instituto Oceanográfico*, v. 10, p. 45-63. 1993.

MESQUITA, H. de S. L.; FERNANDES, A J. Variação de curta escala temporal de bactérias, picofitoplâncton e nanoheterótrofos na região de Ubatuba-SP, Brasil. *Revista Brasileira de Oceanografia*, v. 44, n. 1, p. 47-56. 1996.

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: 2002. Cap.10, p. 167-176.

MIRANDA, L. B.; CASTRO, B. M.; KJERFVE, B.. *Princípios de oceanografia física de estuários.* São Paulo: EDUSP, 2002.

MOREIRA, F. M.S.; SIQUEIRA, J.O. 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo.* 1aed. Lavras, MG, Brasil: Editora UFLA, 626p.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, **164**, 351-358. 1998

MORRIS, A. W. 1985. *Estuarine Chemistry and General Survey Stratege.* In: *Practical Estuarine Chemistry – A Handbook*, (Eds. Head, P. C.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 1-60.

MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. *Organic chemicals in natural waters: Applied monitoring and impact assessment.* 1984.

MULLIGAN, D. J. Fire-Fighting Foams - True Specialities. *Speciality Chemicals*, v. 1, n. 1, p. 343–347, 1990.

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.

ODUM, E. P.. *Fundamentos de Ecologia* 6º Edição. 1988.

OLIVEIRA, A. J. F. C.; MESQUITA, H. S. L. An Experimental study of nanoflagellate bacterivory. *Revista de Microbiologia*, São paulo, v. 30, n.4, p. 369-372, 2000.

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.

OLIVEIRA, A.J.F.C.; PINHEIRO, M.A.A.; FONTES, R.F.C. *Panorama Ambiental da Baixada Santista*.1.ed. São Vicente: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 127p. 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, 2007.

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.

PEREIRA, C. R. Densidade de Bactérias Heterotróficas, Cianobactérias e Nanoflagelados Heterótrofos em dois Estuários do Estado de São Paulo. 2011. 29 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Vicente, 2011.

PINTO, A. B.; PAGNOCA, F. C.; PINHEIRO, M. A. A.; FONTES, R. F. C.; OLIVEIRA, A. J. F. C.. Heavy metals and TPH effects on microbial abundance and diversity in two estuarine areas of the southern-central coast of São Paulo State, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 2015.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta Biotechnology*, v. 23, ed. 4, p. 335-345, 2003.

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

RICKLEFS, R. E.; Miller, G. L. *Ecology*. 4 th.Ed. Library of Congress Cataloging-in Publication Data. Printed in U.S.A. 1999.

Rilley & Chester. *Chemical Oceanography*. Academic Press Inc., 2nd edition, 508 p., London, 1978.

ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. *Trends Biotechnology*, v.11, p.419-424, 1993.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; ADAIME, R. R.; CAMARGO, T. M. 1990. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. *Estuaries*. (13) 2: 204-218.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. 1995. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo, Caribbean Ecological Research.

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.

SHAERUN, S. H.; TAKAI, K.; ASADA, R.; KOGURE, K. Bioremediation of Coastal Areas 5 Years after the Nakhodka Oil Spill in the Sea of Japan: Isolation and Characterization of Hydrocarbon-degrading Bacteria *Environmental International*, 2004.

SHOME R.; SHOME B. R.; MANDAL A. B.; BANDOPADHYAY, A. K. Bacterial flora in mangroves of Andaman Part 1: Isolation, identification and antibiogram studies. *Indian Journal of Marine Sciences*, v. 24, p. 97-98, 1995.

SORKHOH, N. A.; AL-HASAN, R. H.; KHANAFER, M.; RADWAN, S. S. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 78, n. 2, p. 194-199, 1995.

SOUZA, A. F. C. Caracterização molecular e avaliação de resistência a chumbo e cádmio em bactérias isoladas de rizosferas de plantas coletadas em santo amaro (BA). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2013.

Técnica Segurança em Risco <http://www.risco.com.br/NL/MOL/08/Espumas-B.htm> Acessado 30 de novembro de 2016.

TURNER, A.; MILLWARD, G.E. 2002. *Suspended particles: their role in estuarine biogeochemicals cycles*. *Estuar Coast Shelf Sci*, 55, p. 857-883.

THOMAZ, S.M.; ESTEVES, F.A., 1997 Bacterial dynamics in periphyton from different regions of a tropical coastal lagoon. *Arch. Hydrobiol.*, 139(4): 495-507.

ULTRACARGO – Comunicados 2015; Site acessado em 07 de setembro de 2016: <http://www.ultracargo.com.br/br/a-ultracargo/destaques>

VELÁZQUEZ-MEZA, M E. Staphylococcus aureus methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Pública de México, Mexico*, v. 47, p. 381-387, 2005.

VOLKMAN, J. K.; ALEXANDER, R.; KAGI, R. I.; NOBLE, R. A.; WOODHOUSE, G. W. A geochemical reconstruction of oil generation in the Barrow Sub-basin of Western Austrália. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47, 2091-2106, 1983.

WHANG, L. M.; LIU, P. W. G.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Aplicação of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation-Effects of pH and ammonium addition. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, 1045-1050, 2009.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 697-703.

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.

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.

WRENN, B. A.; VENOSA, A. D. Seletive enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, 42.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. Capítulo 1. In: ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Rima. São Carlos. SP. 1-13p. 2006.

ZAMPIERI, B. D.B.; PINTO, A.B.; SCHULTZ, L.; OLIVEIRA, M. A.; OLIVEIRA, A. J. F. C. Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araçá Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations. *MicrobEcol*, v. 72, p. 1–13, 2016.

ZHOU, H. W.; WONG, A. H. Y.; YU, R. M. K.; PARK, Y. S.; TAM, N.F.Y. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *MicrobEcol*, v. 58, p. 153–160, 2009.

ZOBELL, C. E.; Action of Microorganisms on Hydrocarbons; *Zeitung Fur Allgemeine Mikrobiologie*, 10, 1946.