República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

* B R 1 0 2 0 2 4 0 1 1 0 4 1 A 2 *

(21) BR 102024011041-2 A2

(22) Data do Depósito: 01/06/2024

(43) Data da Publicação Nacional: 09/12/2025

(54) Título: PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO POR BIOAUMENTAÇÃO COM BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AMBIENTAIS

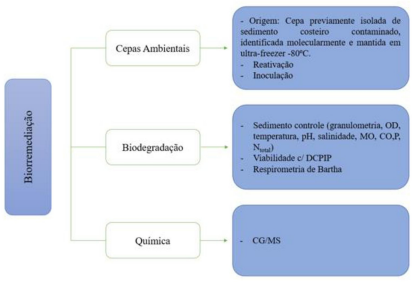
(51) Int. Cl.: B09C 1/10.

(52) CPC: B09C 1/10.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): ROBERTA ALVES MERGUIZO CHINELLATO; ANA JULIA FERNANDES; DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS; BRUNA DEL BUSSO ZAMPIERI; JOSÉ AUGUSTO SOUZA.

(57) Resumo: PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO POR BIOAUMENTAÇÃO COM BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AMBIENTAIS. O presente pedido de patente de invenção, pertencendo ao campo do Meio Ambiente, mais especificamente à Biotecnologia para aplicações nas indústrias de petróleo, aeroportos, portos, empresas de transporte e/ou armazenamento de combustíveis e agências públicas ambientais na mitigação dos efeitos de acidentes com contaminação ambiental, descreve um processo de biorremediação por meio da utilização de cepas ambientais (Bacillus subtilis e Bacillus licheniformis) para minimizar os danos ao meio ambiente devido a contaminação ambiental com espuma de controle de incêndio (AFFF), combustível (Diesel, Gasolina e Álcool), afetando a biodiversidade.



PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO POR BIOAUMENTAÇÃO COM BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AMBIENTAIS

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve um processo de biorremediação por meio da utilização de cepas ambientais (*Bacillus subtilis e Bacillus licheniformis*) para minimizar os danos ao meio ambiente devido a contaminação ambiental com espuma de controle de incêndio (AFFF), combustível (Diesel, Gasolina e Álcool), afetando a biodiversidade.

CAMPO DA APLICAÇÃO

[002] O campo de aplicação está relacionado com o Meio Ambiente, mais especificamente à Biotecnologia para aplicações nas Indústrias de petróleo, aeroportos, portos, empresas de transporte e/ou armazenamento de combustíveis e agências públicas ambientais na mitigação dos efeitos de acidentes com contaminação ambiental.

ESTADO DA TÉCNICA

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

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

[005] O meio ambiente tem capacidade limitada para absorver esses impactos, o que resulta em uma degradação ambiental considerável, gerando grande preocupação (TURNER e RENEGAR, 2017). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para diminuir

os impactos ambientais causados por derramamentos de petróleo e seus derivados, dentre elas destaca-se a biorremediação (MILLIOLI *et al*., 2008).

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

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

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

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

[010] As técnicas de biorremediação podem ser realizadas no local do derrame (in situ) ou fora deste (ex situ), envolvendo inúmeros procedimentos tais como: biorremediação passiva, bioventilação, landfarming, compostagem, bioaumentação e bioestimulação; (PEREIRA e LEMOS, 2004). As técnicas de biorremediação ex situ envolvem remoção física do material contaminado (geralmente solos ou sedimentos), seguida por tratamentos sob condições controladas em biorreatores, biopilhas ou lagoas (COLLERAN, 1997) ou até mesmo tratamentos físico-químicos, como lavagem do solo,

inativação química (uso de permanganato de potássio e/ou peróxido de hidrogênio como oxidante químico) e a incineração. Estas técnicas apresentam muitas limitações e alto custo (TRELLU *et al*., 2016). Ao utilizar micro-organismos na limpeza de compostos tóxicos através da diminuição da concentração de determinados poluentes, a biorremediação in situ é considerada uma alternativa mais promissora (ROSA e TRIGUIS, 2007). A técnica in situ ainda apresenta vantagens como o menor custo de operação, baixo consumo de energia e ausência de produtos residuais (SHIM *et al*., 2009). A velocidade e eficiência do processo de biorremediação in situ, está relacionada com a comunidade de micro-organismos degradadores. Quanto maior a comunidade de micro-organismos degradadores, mais rápida e eficaz será a biorremediação. De maneira mais detalhada, a biodegradação é o processo pelo qual as substâncias são quebradas por processos enzimáticos realizados por organismos vivos, sendo considerada eficaz, quando os produtos finais das reações são apenas dióxido de carbono (CO2) e água (H2O) (DIAZ, 2008). A taxa de biodegradação (tempo que leva para o contaminante biodegradar), é uma informação importante para as escolhas preliminares de micro-organismos candidatos a biorremediadores e para o monitoramento de seus processos (BAKER *et al*., 1994).

[011] Hidrocarbonetos (alcanos e resinas) são degradados mais facilmente pelos micro-organismos, enquanto hidrocarbonetos ramificados e poliaromáticos são mais difíceis de degradar, sendo, portanto, menos biodegradáveis (VARJANI, 2017). Entre os hidrocarbonetos, a fração de n-alcanos de C10-C20 torna o óleo diesel mais suscetível à biodegradação por micro-organismos que utilizam o carbono presente como fonte de energia para reações enzimáticas especificas (NWAOGU *et al*., 2008). Embora a biorremediação de hidrocarbonetos seja uma estratégia frequentemente adotada devido ao seu baixo custo (DOBLER, SANER & BACHOFEN, 2000) e ao fato de que o potencial das bactérias heterotróficas aeróbias neste processo seja eficiente e bem estabelecido na literatura, existem pouquíssimas informações sobre a eficiência da biorremediação com AFFFs como cocontaminantes (OLSEN *et. al*., 2006).

[012] O documento US 10087114 B2 trata-se de Composição biocatalítica para utilização nas áreas agrícola, zootécnica e de recuperação ambiental, para transformar

substratos com os quais reage, em substâncias não poluentes, incluindo um componente com atividade coenzimática incluindo Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, Propilgalato, Gorduras cruas, Proteínas cruas; um componente com atividade enzimática incluindo *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, Bacillus SPP, Aspergillus Oryzae, Aspergillus Niger, Lactobacillus bifidus, Lactobacillus acidophilus,* Amilase, Protease, Lipase, Celulase, Gumase; e um componente que inclui substâncias reguladoras do pH, incluindo ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, ácidos crênicos, ácidos apocrênicos, vitamina A, vitamina D3, vitamina PP, Arthrospira máxima, entre outros.

[013] O documento BR1020120335158 refere-se a um sistema de biorremediação desenvolvido para a biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo em sedimentos e solos estaurinos, através da aplicação de micro-organismos autóctones do ecossistema manguezal. Para alcançar os resultados o processo consiste em um modelo que foi desenvolvido através da construção das unidades de remediação (tanques de vidro), confeccionados com dimensões específicas para o bioprocesso (40x30x40cm). Dentro de cada unidade, existem 6 provetas de vidro (20x10x10cm) onde são adicionados os micro-organismos endêmicos hidrocarbonoclásticos (biodegradadores de hidrocarbonetos do petróleo). Cada tubo é uma repetição para o sistema desenvolvido, resultando em três unidades de simulação com seis réplicas para cada modelo. Este sistema diminui em até 71% a concentração de petróleo nos compartimentos simulados.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[014] O objetivo da presente invenção é desenvolver o processo de biorremediação por bioaumentação com bactérias heterotróficas ambientais, para obtenção de produtos para uso em situações de contaminação ambiental por combustíveis fósseis, como Diesel S10 e Espuma de controle de incêndio (AFFF), utilizando as cepas ambientais (*Bacillus subtilis e Bacillus licheniformis*).

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[015] A vantagem da presente invenção é o uso de cepas ambientais (*B. subtilis* e *B. licheniformis)* que apresentam maior adaptabilidade (início do processo de

biorremediação mais rápido) em degradar contaminante do ecossistema para um processo de biorremediação, em sedimento de ambientes costeiros, ambiente este em que as características da biorremediação são mais complexas, pois os sedimentos apresentam influência dos minerais, pH, granulometria, salinidade no processo de biorremediação. O impacto desses contaminantes no ecossistema vão de mortalidade de organismos vivos, bioacumulação, acumulação nas praias, costões, manguezais, além de danos socioeconômicos, desta forma este processo pretende minimizar os danos ao meio ambiente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[016] A Figura 1 mostra o fluxograma do processo de Biorremediação.

[017] A Figura 2 detalha o gráfico da curva de crescimento para *Bacillus subtilis*. UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia (Densidade bacteriana/mililitro); DO: Densidade Ótica.

[018] A Figura 3 detalha o gráfico da curva de crescimento de *Bacillus licheniformis*. UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia (Densidade bacteriana/mililitro); DO: Densidade Ótica.

[019] A Figura 4 mostram as fotografias dos testes de capacidade de biodegradação das cepas em meio com DCPIP e glicose: Figura 4A: tubos A1 e A2: DCPIP em BH e Glicose; tubos B1 e B2: contém *B. subtilis* + DCPIP em BH + Glicose e os tubos C1 e C2: *B. licheniformis* + DCPIP em BH + Glicose; Figura 4B exibem os tubos após incubação de 24 horas, os tubos B2 e C2 incolores demonstram a capacidade das cepas em biodegradar.

[020] A Figura 5 é um gráfico que ilustra a porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com glicose como fonte de carbono, por 24 horas. Controle: DCPIP em BH e Glicose (8,3%); *B. subtilis*: *B. subtilis* + DCPIP em BH + Glicose (33,9%); *B. licheniformis*: *B. licheniformis* + DCPIP em BH + Glicose (30,6%).

[021] A Figura 6 mostra a fotografia do resultado do teste de capacidade de biodegradação de *B. subtilis* utilizando AFFF ou diesel S10 como fonte de carbono. Figura 6A: DCPIP em BH, Figura 6B: *B. subtilis* + DCPIP em BH, Figura 6C: AFFF + DCPIP em BH, Figura 6D: diesel S10 + DCPIP em BH, Figura 6E: AFFF+ *B. subtilis* +

DCPIP em BH (descoloração); e Figura 6F: diesel S10 + *B. subtilis* + DCPIP em BH (descoloração).

[022] A Figura 7 detalha o gráfico da porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com a cepa *Bacillus subtilis* e os contaminantes após 48horas. *B. subtilis* + Espuma: AFFF+ *B. subtilis* + DCPIP em BH (13,5%); *B. subtilis* + diesel S10: diesel S10 + *B. subtilis* + DCPIP em BH (17,7%); Espuma: AFFF +DCPIP em BH (5,9%); Diesel: diesel S10 + DCPIP em BH (4,1%); *B. subtilis: B. subtilis* + DCPIP em BH (4,7%).

[023] A Figura 8 mostra a fotografia do resultado do teste de capacidade de biodegradação de *B. licheniformis* utilizando AFFF ou diesel S10 como fonte de carbono. Tubo A: DCPIP em BH, tubo B: *B. licheniformis* + DCPIP em BH, tubo C: AFFF + DCPIP em BH, tubo D: diesel S10 + DCPIP em BH, tubo E: AFFF+ *B. licheniformis* + DCPIP em BH; e tubo F: diesel S10 + *B. licheniformis* + DCPIP em BH.

[024] A Figura 9 detalha o gráfico da Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP em teste com a cepa *Bacillus licheniformis* e os contaminantes após 48horas. *B. licheniformis* + Espuma: AFFF+ *B. licheniformis* + DCPIP em BH (26,6%); *B. licheniformis* + diesel S10: diesel S10 + *B. licheniformis* + DCPIP em BH (11,4% - interferência na leitura devido a formação de biomassa); Espuma: AFFF +DCPIP em BH; Diesel: diesel S10 + DCPIP em BH; *B. licheniformis*: *B. licheniformis* + DCPIP em BH.

[025] A Figura 10 mostra a fotografia da Garrafa de respirometria de Bartha, montada com 50 gramas de Sedimento + Contaminante + 10% de Inóculo (*B. subtilis* e/ou *B. licheniformis*).

[026] A Figura 11 ilustra o esquema da Composição do teste de biodegradação – Respirometria de Bartha para a espuma de controle de incêndio – AFFF.

[027] A Figura 12 detalha os Gráficos do Total de C biodegradado (µmol), nos ensaios com a espuma de controle de incêndio – AFFF nas concentrações 1,5% (Figura 12A), 3% (Figura 12B), 4,5% (Figura 12C) e 6% (Figura 12D) de concentração ao longo de 120 dias.

[028] A Figura 13 detalha o gráfico do total de C biodegradado (µmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa *B. subtilis* com AFFF nas concentrações 1,5% , 3% 4,5% e 6% como contaminante , durante 120 dias.

[029] A Figura 14 detalha o gráfico do total de C biodegradado (µmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa *B. licheniformis* com AFFF nas concentrações 1,5%, 3% 4,5% e 6% como contaminante, durante 120 dias.

[030] A Figura 15 detalha o gráfico do total de C biodegradado (µmol) nos ensaios de respirometria realizados com consórcio das cepas *B. subtilis* e *B. licheniformis* com AFFF nas concentrações 1,5%, 3% 4,5% e 6% como contaminante , durante 120 dias.

[031] A Figura 16 mostra a composição do teste de biodegradação – Respirometria de Bartha para diesel S10.

[032] A Figura 17 detalha os Gráficos do total de C biodegradado (µmol) nos ensaios de respirometria com Disel S10 nas concentrações 2,5% (Figura 17A), 5% (Figura 17B) e 7,5% (Figura 17C) como contaminante, durante 120 dias.

[033] A Figura 18 detalha o gráfico do total de C biodegradado (µmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa *B. subtilis* com Diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante , durante 120 dias.

[034] A Figura 19 detalha o Gráfico do total de C biodegradado (µmol) nos ensaios de respirometria realizados com a cepa *B. licheniformis* com Diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante, durante 120 dias.

[035] A Figura 20 detalha o Gráfico do total de C biodegradado (µmol) nos ensaios de respirometria realizados com consórcio das cepas *B. subtilis* e *B. licheniformis* com Disel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% como contaminante , durante 120 dias.

[036] A Figura 21 detalha o gráfico da comparação entre as curvas de C total biodegradado pelo consórcio (*B. subtilis* e *B. licheniformis)* e a degradação natural dos contaminantes nas diferentes concentrações utilizadas (AFFF: [1,5%], [3%], [4,5%], [6%]; Diesel S10: [2,5%], [5%], [7,5]) nos sedimentos.

[037] A Figura 22 detalha o gráfico o perfil cromatográfico do diesel S10 puro, extraído por *headspace* para análise em CG/MS, em que a referência 1 é Benzeno; 2: Tolueno; 3: Etilbenzeno e 4: o-Xileno.

[038] A Figura 23 detalha o gráfico da comparação entre o perfil do diesel puro (Figura 23H) e as diferentes concentrações de 2,5% (Figura 23I), 5% (Figura 23J) e 7,5% (Figura 23K) de diesel misturado no sedimento ao início do teste de biodegradação.

[039] A Figura 24 detalha o gráfico dos perfis cromatográficos do diesel S10 [2,5%] ao início (Figura 24A) dos testes de respirometria e degradado (Figura 24B) após 120 dias de teste em presença do sedimento, extraído por *headspace* para análise em CG/MS.

[040] A Figura 25 detalha o gráfico do perfil cromatográfico após 120 dias de teste de respirometria do diesel S10 [2,5%] sem inóculo (Figura 25A), e com inóculos de *Bacillus subtilis* (Figura 25B), *Bacillus licheniformis* (Figura 25C) e consórcio (Figura 25D) (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*), extraído por *headspace* para análise em CG/MS, em que a referência UCM é a mistura complexa não resolvida.

[041] A Figura 26 detalha o gráfico dos perfis cromatográficos do diesel S10 [5%] ao início (Figura 26A) dos testes de respirometria e degradado (Figura 26B) após 120 dias de teste em presença do sedimento, extraído por *headspace* para análise em CG/MS.

[042] A Figura 27 detalha o gráfico do perfil cromatográfico após 120 dias de teste de respirometria do diesel S10 [5%] sem inóculo (Figura 27A), e com inóculos de Bacillus subtilis (Figura 27B), *Bacillus licheniformis* (Figura 27C) e consórcio (Figura 27D) (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*), extraído por *headspace* para análise em CG/MS, em que UCM é a mistura complexa não resolvida.

[043] A Figura 28 detalha o gráfico do perfil cromatográfico do diesel S10 [7,5%] início (Figura 28A) e degradado (Figura 28B), extraído por *headspace* para análise em CG/MS.

[044] A Figura 29 detalha o gráfico do perfil cromatográfico após 120 dias de teste de respirometria do diesel S10 [7,5%] sem inóculo (Figura 29A) com inóculo de *Bacillus subtilis* (Figura 29B), *Bacillus licheniformis* (Figura 29C) e consórcio (Figura 29D) (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*) (C), extraído por *headspace* para análise em CG/MS em que UCM é a mistura complexa não resolvida.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[045] Para o desenvolvimento da tecnologia foram utilizadas as cepas ambientais, *B. subtilis* e *B. licheniformis.* As Cepas foram isoladas de sedimentos provenientes da

região portuária do Estuário de Santos, as amostras foram processadas, isoladas, purificadas e identificadas molecularmente. Posteriormente as cepas foram mantidas em Banco de cultivo para realização de estudo posteriores.

[046] Para a elaboração das amostras, os micro-organismos foram isolados de sedimentos contaminados e identificados molecularmente e pertencem ao banco de cepas do Laboratório MICROMAR (UNESP- CLP).

[047] Quadro 1 mostra a identificação molecular das espécies selecionadas.

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

[048] As amostras microbiológicas das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, utilizadas, foram isoladas de sedimentos provenientes da região portuária do Estuário de Santos, após o incêndio no terminal da ULTRACARGO. As cepas utilizadas têm sido mantidas no Banco de Culturas, armazenadas em ultra freezer -80ºC.

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

[050] Para reativação das cepas e preparo do inóculo para realização dos experimentos, as culturas puras de *B. subtilis* e *B. licheniformis* provenientes do banco de culturas, foram inoculadas em *Erlenmeyers* de 250 ml, contendo 100 ml de meio de cultura caldo nutriente, preparado com água do mar estéril. Os frascos *Erlenmyers* foram então incubados em uma plataforma agitadora sob agitação contínua de 180 rpm, a 35ºC, overnight (18h).

[051] Após o período de 18 horas, a densidade bacteriana nas culturas (em cada frasco Erlenmeyer) foi determinada através de densidade ótica com espectrofotômetro (Versa *max*™ *Absorbance Microplate Reader) no* comprimento de onda de 600 nm. Para os

testes o inóculo foi ajustado a concentração de 10^6 Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/ml).

[052] As cepas mantidas no Banco de Cepas se mostraram viáveis e possibilitaram a realização dos experimentos para a obtenção de inóculos em densidade satisfatória para a realização dos experimentos e, consequente, para a determinação das curvas de crescimento, assim como para a obtenção dos parâmetros de crescimento.

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

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

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

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

[057] Tabela 1: Valores de absorbância (DO) e da densidade de bactérias (UFC/ml) durante o experimento do crescimento de *Bacillus subtilis*.

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

[058] Os valores de absorbância e de densidade de bactérias *B. subtilis* ao longo do período de experimento, foram utilizados para construção de curvas e obtenção dos parâmetros de crescimento (Figura 2).

[059] Observando a Figura 2 é possível notar que, aproximadamente 4 horas após a inoculação, o cultivo entrou em fase de crescimento exponencial (fase log).

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

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

[062] Tabela 2: Valores de absorbância (DO) e da densidade de bactérias (UFC/ml) durante o experimento do crescimento de *Bacillus licheniformis*.

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

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

[064] Os valores de absorbância e de densidade de bactérias *B. licheniformis* ao longo do período de experimento, foram utilizados para construção de curvas e obtenção dos parâmetros de crescimento (Figura 3).

[065] A curva de crescimento de *B. licheniformis* (Figura 3) demonstra, que a fase exponencial de crescimento teve início após 4h de experimento.

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

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

[068] Segundo Tortora *et al*. (2005), a maioria das bactérias apresenta um tempo de geração de 60 a 180 minutos (1 a 3 horas), porém, pode ocorrer em 24 horas ou 20 minutos, dependendo do micro-organismo em questão. Andrade (2015), obteve o tempo de geração entre 60 e 80 minutos/geração, de bactérias isoladas de sedimento

de manguezal, na presença de BTEX, que reforça a ideia de um crescimento bacteriano típico.

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

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

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

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

[073] A biodegradação consiste na eliminação de compostos orgânicos de um ecossistema pela atividade metabólica dos organismos presentes no local onde está a substância a ser biodegradada. A biodegradação por micro-organismos é o melhor mecanismo para remoção de hidrocarbonetos poluentes do ambiente.

[074] A bioaumentação é um dos recursos a ser utilizado para otimização da biodegradação no processo de descontaminação de uma área a ser biorremediada. A bioaumentação consiste na adição de bactérias com potencial biodegradador de petróleo, afim de suplementar a microbiota local. A bioaumentação tem várias vantagens em relação a outras técnicas. Quando uma população microbiana específica é injetada, o processo de degradação pode começar imediatamente.

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

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

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

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

[079] Os testes de colorimetria foram conduzidos em triplicata utilizando tubos de ensaio com tampa. Os inóculos utilizados foram os reativados anteriormente. Como fonte de carbono, foram adicionados Diesel S10 ou espuma de controle de incêndio (AFFF). A composição dos ensaios encontra-se detalhada na Tabela 3.

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

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

[081] No teste de avaliação visual realizado tendo a glicose como fonte de carbono de fácil assimilação, foi observado que, após o período de incubação de 24 horas, o DCPIP foi reduzido nos tubos com a presença de bactérias, evidenciado pela ausência de coloração azul (Figura 4B2 e C2).

[082] Em relação aos valores de absorbância obtidos, ele foi o mesmo para *B. subtilis* e *B. licheniformis* (aproximadamente 30%), enquanto que, para o controle (DCPIP em BH + glicose) a porcentagem foi de aproximadamente 8% (Figura 5). Estes resultados confirmaram a capacidade das cepas e seu potencial de consumir fontes de carbono.

[083] Confirmado o potencial das cepas para degradar fontes de carbono, foi realizado o teste de viabilidade de biodegradação da espuma de controle de incêndio - AFFF e do diesel S10.

[084] Na Figura 6 pode se observar o resultado do teste para a cepa *B. subtilis* na presença da espuma de controle de incêndio - AFFF ou diesel S10 (1% (v/v)).

[085] Nota-se que, após o período de incubação de 48 horas, os tubos E e F, que contém *B. subtilis* e um dos contaminantes (espuma – tubo E e diesel S10 – tubo F) como fonte de carbono, apresentam descoloração, sendo mais evidente a descoloração no tubo contendo diesel (tubo F).

[086] As porcentagens de descoloração nos testes contendo *B. subtilis* e em presença dos contaminantes como fonte de carbono foram de, 13,5% para a espuma e de 17,7% para o diesel. As menores porcentagens de descoloração após 48 horas foram

observadas nos controles, apresentando valores de 5,9% para espuma + DCPIP em BH, 4,1% para diesel + DCPIP em BH, e 4,7% para *B. subtilis* sem fonte de carbono (Figura 7).

[087] Na Figura 8 é possível observar os resultados do teste colorimétrico para a cepa *B. licheniformis* na presença da espuma AFFF (tubo E) ou diesel S10 (tubo F).

[088] Observando a Figura 8 é possível notar que, após o período de incubação de 48 horas, os tubos E e F, que contém *B. licheniformis* e um dos contaminantes como fonte de carbono, carecem de coloração, tanto no tubo contendo AFFF como diesel. *B. licheniformis* apresenta melhor capacidade para reduzir o DCPIP após o período de incubação de 48 horas.

[089] A porcentagem de descoloração da cepa em presença dos contaminantes como fonte de carbono foi de 26,5% para a espuma e 11,4% para o diesel (Figura 9).

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

[091] Em relação ao diesel, apesar do meio ter ficado incolor (Figura 8, tubo F), a porcentagem de descoloração calculada a partir da absorbância a 600nm foi mais baixa do que o esperado. Este fato pode ser explicado pelo aumento da turbidez do meio devido ao aumento da biomassa bacteriana, capaz de biodegradar o diesel, o que influenciou na leitura da densidade ótica.

[092] A respirometria é uma técnica que permite o acompanhamento indireto das atividades metabólicas realizadas pelos micro-organismos, através da determinação do consumo de oxigênio ou produção de dióxido de carbono, por unidade de volume e de tempo

[093] Entre as técnicas, a respirometria de Bartha e Pramer é uma das mais amplamente utilizada para avaliar processos de degradação de poluentes por micro-organismos, em solos. Essa técnica mede a liberação de CO_2 por meio da sua captura por uma substância alcalina (Hidróxido de Potássio – KOH ou Hidróxido de Sódio), tendo sido amplamente utilizada em trabalhos da comunidade científica brasileira que avaliaram a biodegradação de derivados de petróleo biodiesel e compostos fenólicos.

[094] Os experimentos de biodegradação foram realizados em triplicata (3 respirômetros) para cada tratamento. Em cada respirômetro (Figura 10) foram colocados 50g de sedimento não esterilizado e água destilada estéril, no volume determinado pela capacidade de campo. No total foram avaliados 32 tratamentos, totalizando 96 amostras. Cada grupo de tratamentos está detalhado nos itens a seguir.

[095] Nos tratamentos que receberam inóculos, *B. subtilis* e/ou *B. licheniformis* foram acrescentados aos respirômetros a uma concentração final de 10%.

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

[097] Durante a coleta de sedimento foi determinada a temperatura, salinidade e pH do ponto de coleta utilizando sonda multiparâmetro. Foram realizados testes de capacidade de campo, granulometria, matéria orgânica, carbono orgânico, nitrogênio orgânico, teor de fósforo e qualidade microbiológica do sedimento.

[098] O sedimento coletado foi classificando como predominantemente composto por areia fina e muito fina (Tabela 4).

[099] Tabela 4: Classificação textural do sedimento.

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

[100] A granulometria do sedimento interfere na distribuição da matéria orgânica presente, nas concentrações de hidrocarbonetos presentes pela contaminação e na distribuição e atividade da comunidade microbiana, incluindo bactérias.

[101] Sedimentos arenosos são considerados mais adequados para a atividade de micro-organismos, pois permitem uma melhor permeação da água e do ar, fatores necessários para o crescimento de bactérias.

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

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

Sedimento Itaguaré							
OD (mg/L) "*in loco*"	Temp. (ºC) "*in loco*"	pH	Salinidade	MO (g/kg) – (%)	CO (g/kg)	P (g/kg)	NO (g/kg)
7,05	20,6	7,2	2,4	2,67 - 0,267	1,43	0,013	1,05

[104] Embora a temperatura do sedimento no momento da coleta tenha sido de 20,6ºC, os experimentos em laboratório foram conduzidos a uma temperatura de 28±2ºC, mais adequada ao crescimento bacteriano.

[105] Considerando que, os parâmetros físico-químicos dos sedimentos no local da coleta são altamente variáveis, os resultados obtidos sugerem que a temperatura tenha tido efeito positivo nos processos de biodegradação.

[106] No momento da coleta o pH do sedimento apresentou valores neutros (pH=7,2). A neutralidade dos sedimentos evita a perda de nutrientes pelo solo (que ocorre em solos ácidos), garantindo a disponibilidade de elementos essenciais para o metabolismo microbiano na degradação dos contaminantes.

[107] Ambas as espécies não sofreram influência da salinidade presente no sedimento, em seu crescimento.

[108] A concentração de carbono presente no sedimento pode ser considerada baixa, o que é esperado para sedimentos arenosos e sugere que não houve contaminação previa por hidrocarbonetos nem por outros compostos orgânicos nos sedimentos.

[109] Apesar dos baixos valores de carbono e matéria orgânica presentes nos sedimentos, estas concentrações não foram limitantes para o crescimento de *B. subtilis* e *B. licheniformis* nos testes realizados, uma vez que os contaminantes orgânicos adicionados supriram as necessidades de carbono para os micro-organismos.

[110] Embora o sedimento utilizado tenha sido considerado pobre, pois solos ricos são os que apresentam concentrações de nitrogênio e fósforo maiores que 2,22 g/kg e 0,03 g/kg, respectivamente, não apresentou limitação aparente para a realização dos testes de biodegradação – Respirometria de Bartha. Possivelmente devido ao inóculo e os contaminantes adicionados forneceram carbono, nitrogênio e fósforo.

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

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

[113] Tabela 6: Porcentagem de ocorrência em cada categoria e qualificação anual, segundo Relatório Qualidade das Praias Litorâneas no Estado de São Paulo. 2018.

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

[114] A concentração de carbono biodegradado nos testes foi avaliada comparando os tratamentos com sedimento contaminado com AFFF em diferentes concentrações (1,5%, 3%, 4,5% e 6%), em presença da bactéria *B. subtilis,* na presença de *B. licheniformis* e em consórcio de ambas, com controles de sedimento puro e sedimento com contaminante (Figura 11). Em todos os tratamentos foi utilizado o sedimento coletado no Rio Itaguaré. O CO total biodegradado (µmol) foi mensurado ao longo dos 120 dias do experimento para cada tratamento e cada respirômetro (OECD 307, 2002) (Figuras 12A, 12B, 12C e 12D).

[115] Os resultados dos testes de biodegradação da AFFF, por cepa/consórcio estão representados nas Figura 13 (*B. subtilis*), Figura 14 (*B. licheniformis*) e Figura 15 (*B. subtilis* e *B. licheniformis)*.

[116] *B. subtilis* apresentou o melhor desempenho ao longo do tempo para a concentração 1,5% de AFFF. Para as concentrações 3% (comercial) e 4,5% apresentou melhor desempenho no início do teste, diminuindo a partir do 50º dia (aproximadamente). Para AFFF 6% (comercial) apresentou baixo desempenho, permanecendo abaixo da curva de degradação natural do composto (como mencionado anteriormente) (Figura 13).

[117] *B. licheniformis* apresentou o melhor desempenho ao longo do tempo para a concentração 6% (comercial) de AFFF, porém apresentou bom desempenho também para as concentrações 3% (comercial) e 4,5%.

[118] Analogamente, *B. subtilis* apresentou melhor desempenho no início do teste, diminuindo a partir do 70º dia (aproximadamente). Para [AFFF 1,5%] apresentou pior desempenho, aproximando-se às curvas das outras concentrações só a partir do 90º dia (Figura 14).

[119] O consórcio apresentou desempenho similar em todas as concentrações da AFFF as quais foi exposto (Figura 15).

[120] Nos tratamentos realizados com diesel S10, foram avaliadas três diferentes concentrações: 2,5%, 5% e 7,5%, sendo 5% a comumente utilizada em testes de biodegradação. Os respirômetros com as diferentes concentrações foram inoculados com *B. subtilis, B. licheniformis* ou com consórcio de ambas cepas (Figura 16).

[121] Os valores médios de C biodegradados de Diesel S10 encontram-se representados na Figura 17 (A: [2,5%], B: [5%], C [7,5%]). As cepas de *B. subtilis,* de *B. licheniformis* e do consórcio apresentaram o mesmo comportamento de biodegradação nas três concentrações de diesel S10 analisadas (2,5%, 5% e 7,5%) em relação aos controles.

[122] Os testes de biodegradação de diesel S10 contendo espécie única ou consórcio, apresentaram comportamentos semelhantes ao longo de todo o experimento de

respirometria e em todas as concentrações de diesel S10 analisadas (*B. subtilis*: Figura 18, *B. licheniformis:* Figura 19, Consórcio: Figura 20).

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

[124] Quando comparadas diferentes concentrações de contaminante para *B subtilis* (Figura 18), foi possível observar que a bactéria apresentou melhor desempenho nas concentrações 5% e 7,5% de diesel S10. Na concentração de 2,5% de diesel S10 a biodegradação pouco inferior.

[125] Em relação a *B. licheniformis*, as curvas foram muito semelhantes para todas as concentrações (Figura 19), com um desempenho melhor e muito similar para as concentrações de 2,5% e 5% de diesel S10, e um desempenho inferior, porém bom, para a concentração 7,5%.

[126] O consócio apresentou bom desempenho para todas as concentrações de diesel testadas (Figura 20), porém seu desempenho foi levemente inferior que o de *B. licheniformis* para as concentrações de 5% e 7,5%.

[127] Ao comparar a degradação natural dos contaminantes com a biodegradação na presença do consórcio (Figura 21), é possível observar que a produção de CO_2 no ensaio com diesel S10 foi maior comparativamente a produção nos ensaios com espumas, nos quais a degradação dos contaminantes foi consideravelmente superior.

[128] Ao comparar a degradação natural dos contaminantes com a biodegradação na presença do consórcio no 20º dia, observa se que o fator de degradação com o consórcio é 10X maior do que a degradação do diesel com sedimento. Já com a espuma esse fator de 10X é existente apenas para as concentrações de 1,5% e 3%, nas demais concentrações o fator é menor, mas existente.

[129] De fato, o uso de consórcios de micro-organismos é mais eficaz em processos de biorremediação, devido à complexidade dos processos metabólicos necessários. O uso de bactérias de gêneros e espécies diferentes age com complementaridade a ação em

degradar uma ou várias frações de hidrocarbonetos. O consórcio microbiano tem uma capacidade para agir na degradação de compostos complexos.

[130] A diferença observada provavelmente se deve ao fato que as formulações comerciais da espuma incluem um conjunto de substâncias químicas, como solventes, diferentes classes de surfactantes fluorados e compostos aditivos, o quais podem ser mais ou menos refratários à biodegradação.

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

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

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

Bacillus subtilis	***Bacillus licheniformis***
3,90E+09 (UFC/ml)	3,85E+09 (UFC/ml)

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

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

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

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

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

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

[139] De fato, micro-organismos que tiveram contato prévio com contaminantes, possuem capacidade e resistência metabólica suficiente para sobreviver e crescer na presença destes poluentes.

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

[141] Esses resultados são coerentes com as curvas dos testes de biodegradação obtidos. Deste modo, conforme o butil-carbitol da composição é degradado, só restam compostos como solventes, surfactantes fluorados e compostos aditivos, junto com

produtos da biotransformação da espuma no meio, podendo resultar tóxicos para essa espécie.

[142] Os resultados obtidos para o diesel, apontam que os valores de densidade de bactérias totais foram maiores nos ensaios com contaminante do que no sedimento controle. As bactérias testadas apresentam maior adaptabilidade e maior facilidade em degradar contaminantes de PAH (hidrocarbonetos poliaromáticos), comparativamente à degradação da AFFF. Os micro-organismos do gênero *Bacillus* sp. são os mais resistentes e mais adaptáveis a presença de petróleo.

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

[144] Foram realizadas CG-MS das amostras de sedimento contaminado com diesel no início dos testes de biodegradação de Bartha e após os 120 dias de iniciados os ensaios para cada tratamento (inóculo com *B. subtilis*, inóculo com *B. licheniformis*, inóculo com o consórcio e sem inóculo), totalizando 15 ensaios conforme tabela 9.

[145] Tabela 9: Composição dos ensaios de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) para o diesel S10 nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% com sedimentos antes e após teste de biodegradação por respirometria de Bartha, com os diferentes inóculos.

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

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

[147] As concentrações do diesel S10 no sedimento antes e após a biodegradação, bem como a do diesel puro, foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

[148] Tabela 10: Condições utilizadas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa nos ensaios para verificar as concentrações dos compostos do óleo diesel S10 antes e após a biodegradação. Programa de temperatura, tem: Taxa de aquecimento (ºC/min); Temperatura (ºC) e tempo de permanência na temperatura (min).

Parâmetros	**Condições GC/MS para óleo diesel S10**
Modo de injeção	Split - razão 1:16
Temperatura do injetor	250 ^{0}C
Volume injetado	100µL
Fase móvel	Hélio
Vazão da fase móvel	3 mL/min de He
Programa de temperatura	34 ^{0}C (2 min)* 7 ^{0}C/min - 200 ^{0}C (1 min)* 8 ^{0}C/min - 230 ^{0}C (5 min)*
Tempo de corrida	30 min
Taxa de varredura	35,9 cm/sec
Temperatura do detector	250 ^{0}C

[149] Para a detecção por espectrometria de massas utilizou-se um detector com fonte ionizada por elétrons (EI -70 eV) e um analisador de massas quadrupolo. O analisador foi operado no modo de varredura (SCAN) para identificação dos compostos e, no modo "*Total Ion Current*" (TIC), para quantificação dos mesmos. O detector foi mantido a 250 ºC de temperatura e a fonte de íons a 200 ºC.

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

[151] O perfil cromatográfico do diesel S10 puro (Figura 22), foi utilizado como referência para comparação com os perfis cromatográficos realizados após os testes

de biodegradação, com a finalidade de verificar se houve degradação dos componentes presentes do diesel S10.

[152] Ao comparar o perfil do diesel puro com os perfis do diesel nas concentrações 2,5%, 5% e 7,5% (Figura 23), observa-se que os picos principais, as intensidades de resposta e os tempos de retenção são muito semelhantes tanto para o diesel puro, quanto para qualquer uma das concentrações, evidenciando que a presença de sedimentos não alterou a composição do diesel.

[153] Para avaliar possível degradação do diesel [2,5%] presente nos sedimentos ao longo dos 120 dias do ensaio de respirometria, foram comparados os perfis cromatográficos ao início (Figura 24A) e após finalizado o teste (Figura 24B).

[154] Os perfis cromatográficos foram avaliados visualmente buscando picos que tenham surgido, diminuído ou aumentado em comparação do perfil cromatográfico antes dos testes de biodegradação. A mudança do perfil dos picos (diminuição, mudança no tempo de retenção, presença de UCM (mistura complexa não resolvida), indica uma degradação das substâncias presentes no diesel S10).

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

[156] Comparando o perfil da amostra sem inóculo com os perfis das amostras inoculadas com *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou com o consórcio (Figura 25), foi possível observar nitidamente uma mudança nos perfis que foram inoculados com bactérias, com o desaparecimento dos picos de intensidade relativa. Essas mudanças nos perfis demostraram a degradação do diesel por ação das bactérias inoculadas no sedimento utilizado para os testes de biodegradação. Ao comparar os 3 perfis dos sedimentos contaminados com diesel S10 [2,5%] inoculados com as cepas, observa-se que os perfis de *B. subtilis* e do consórcio são bastante semelhantes. Já o perfil do inóculo com *B. licheniformis* é diferente e apresenta uma mistura complexa não resolvida (UCM), que corresponde a uma fração mais pesada do óleo constituída por

hidrocarbonetos ramificados e cíclicos, que nem sempre são resolvidos em coluna capilar.

[157] Para avaliar possível degradação do diesel [5%] presente nos sedimentos ao longo dos 120 dias do ensaio de respirometria, foram comparados os perfis cromatográficos ao início (Figura 26A) e após finalizado o teste (Figura 26B).

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

[159] Para avaliar a possível degradação do diesel [7,5%] presente nos sedimentos ao longo dos 120 dias do ensaio de respirometria, foram comparados os perfis cromatográficos ao início (Figura 28A) e após finalizado o teste (Figura 28B).

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

[161] Quando comparado o perfil da amostra sem inóculo com os perfis das amostras inoculadas com *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou o consórcio (Figura 29), foi possível observar mudanças sutis nos perfis que foram inoculados com as cepas ou com o consórcio. Os picos permanecem com intensidades semelhantes ao da amostra sem inóculo.

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

[163] O perfil com *B. licheniformis* apresentou picos semelhantes em posição e intensidade ao perfil de *B. subtilis*, sendo possível identificar uma UCM. Já para o

consórcio, embora os picos tenham sido mantidos, os tempos de retenção diminuíram, resultando em um perfil semelhante ao perfil do diesel no início dos ensaios.

[164] As mudanças nos perfis evidenciam ação das cepas em todos os tratamentos, mas a presença de picos de intensidades muito semelhantes aos do perfil da amostra inicial.

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

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

[167] A perda de alcanos lineares e o aumento na complexidade da fração de hidrocarbonetos alifáticos, leva ao aparecimento de UCM, no perfil cromatográfico das amostras. A presença de UCM na amostra indica frações mais biodegradadas ou intemperizadas de hidrocarbonetos presentes na amostra, dos quais não foi possível caracterizar por cromatografia gasosa. Deste modo o perfil cromatográfico de concentração [7,5%] apresenta ação das cepas no processo de degradação do diesel, no entanto não tão eficaz quanto para a concentração de [2,5%].

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

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

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

REIVINDICAÇÕES

1. **PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO POR BIOAUMENTAÇÃO**, para obtenção de produtos para uso em situações de contaminação ambiental por combustíveis fósseis, como Diesel S10 e Espuma de controle de incêndio (AFFF), **caracterizado pelo** dito processo compreender:

- Expor as cepas ambientais de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* ao contato prévio dos contaminantes (Diesel S10 e espuma de controle de incêndio (AFFF));
- Isolamento e identificação (molecularmente) das cepas contaminadas;
- Congelamento em ultra-freezer a uma temperatura de -80°C pelo método de congelamento de médio prazo, em que as culturas bacterianas ativas de cada espécie devem ser repicadas em microtubo de 2 ml contendo 1 ml de ágar nutriente inclinado, incubar os tubos a 35°C até o aparecimento do crescimento celular, então completar os tubos com óleo mineral (glicerol) esterilizado;
- Reativação das cepas congeladas a -80°C inoculadas em *Erlenmeyers* de 250 ml, com 100 ml de meio de cultura caldo nutriente, preparado com água do mar estéril, e então os frascos *Erlenmyers* foram então incubados em uma plataforma agitadora sob agitação contínua de 180 rpm, a 35ºC, overnight (18h).

2. **USO DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO POR BIOAUMENTAÇÃO**, **caracterizado pela** utilização em sedimentos de origem marinha tais como solos, sedimento costeiro (arenoso) incluindo os de ambientes costeiros.

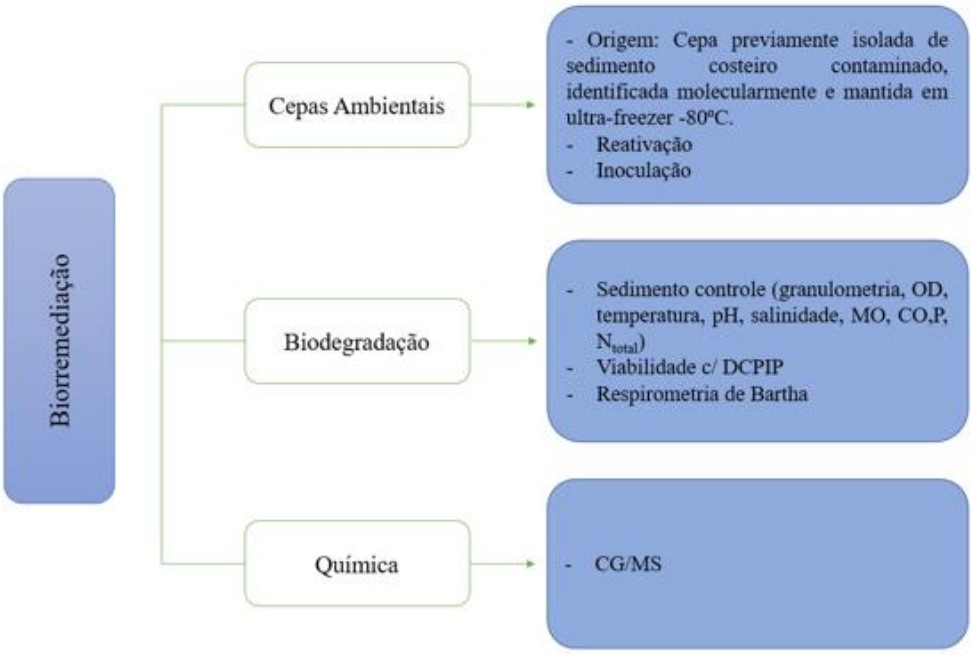

Biorremediação
Cepas Ambientais
- Origem: Cepa previamente isolada de sedimento costeiro contaminado, identificada molecularmente e mantida em ultra-freezer -80ºC.
- Reativação
- Inoculação
Biodegradação
- Sedimento controle (granulometria, OD, temperatura, pH, salinidade, MO, CO,P, N_{total})
- Viabilidade c/ DCPIP
- Respirometria de Bartha
Química
- CG/MS

FIGURA 1

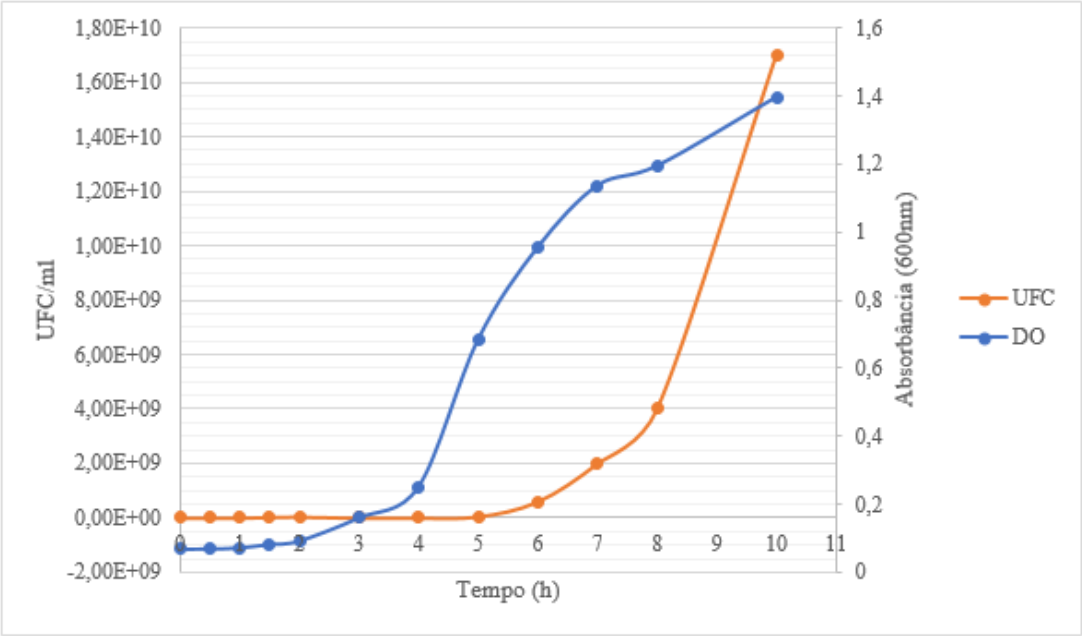

1,80E+10
1,60E+10
1,40E+10
1,20E+10
1,00E+10
8,00E+09
6,00E+09
4,00E+09
2,00E+09
0,00E+00
-2,00E+09
UFC/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Tempo (h)
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbância (600nm)
UFC
DO

FIGURA 2

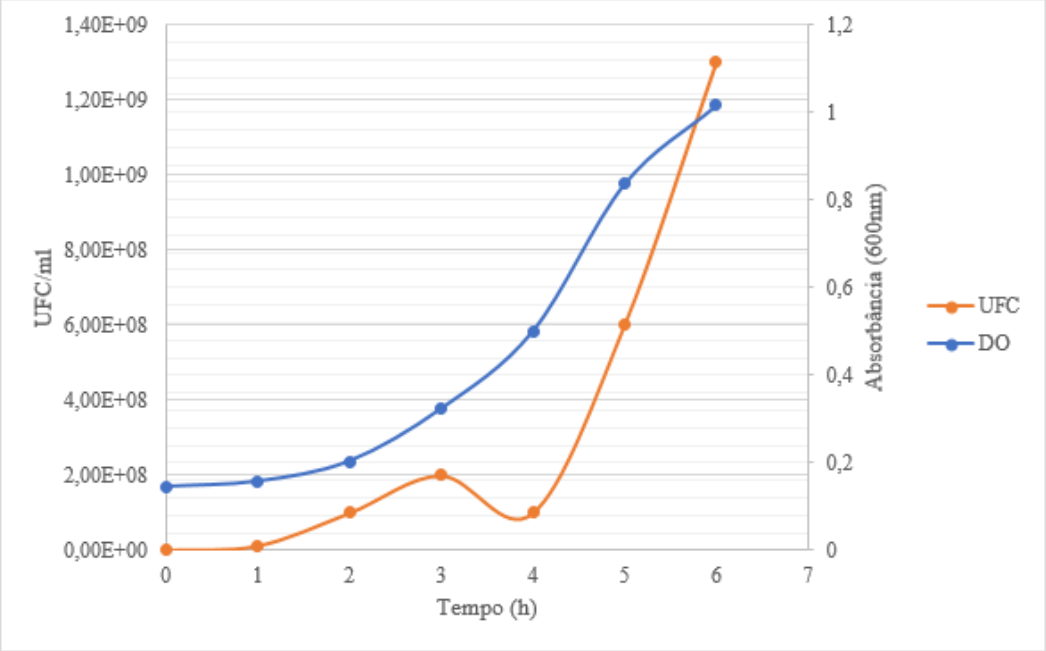

1,40E+09
1,20E+09
1,00E+09
8,00E+08
6,00E+08
4,00E+08
2,00E+08
0,00E+00
UFC/ml
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbância (600nm)
0
1
2
3
4
5
6
7
Tempo (h)
UFC
DO

FIGURA 3

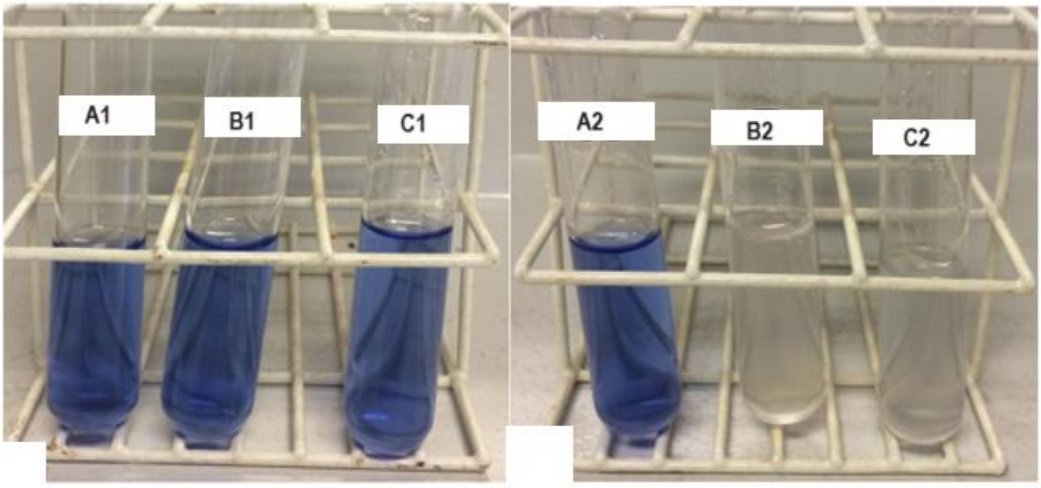


FIGURA 4

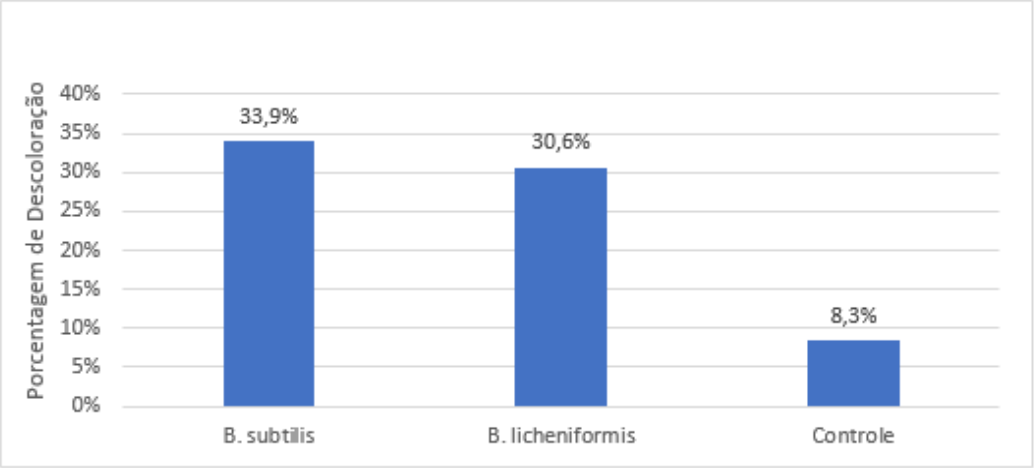

Porcentagem de Descoloração
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
33,9%
30,6%
8,3%
B. subtilis
B. licheniformis
Controle

FIGURA 5

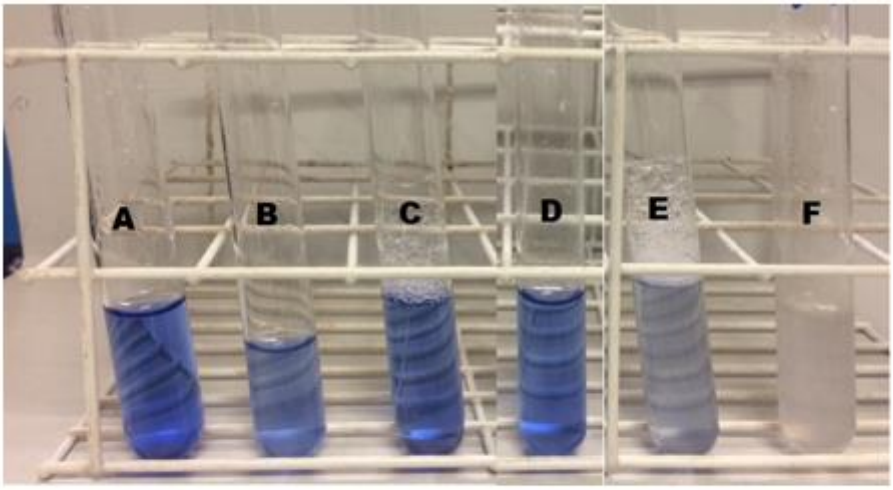


FIGURA 6

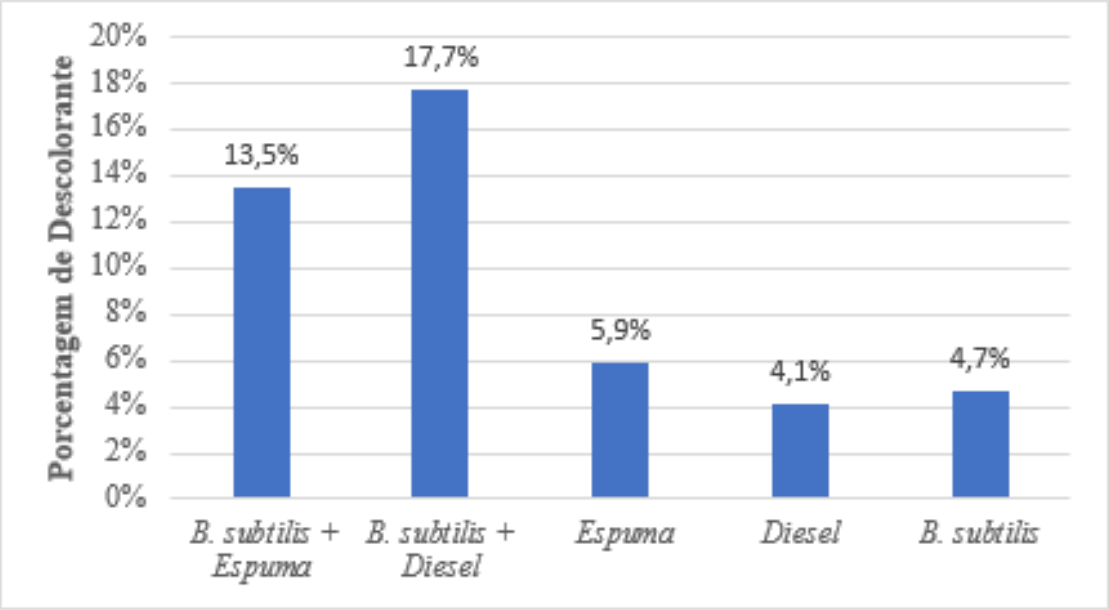

Porcentagem de Descolorante
20%
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
13,5%
17,7%
5,9%
4,1%
4,7%
B. subtilis + Espuma
B. subtilis + Diesel
Espuma
Diesel
B. subtilis

FIGURA 7

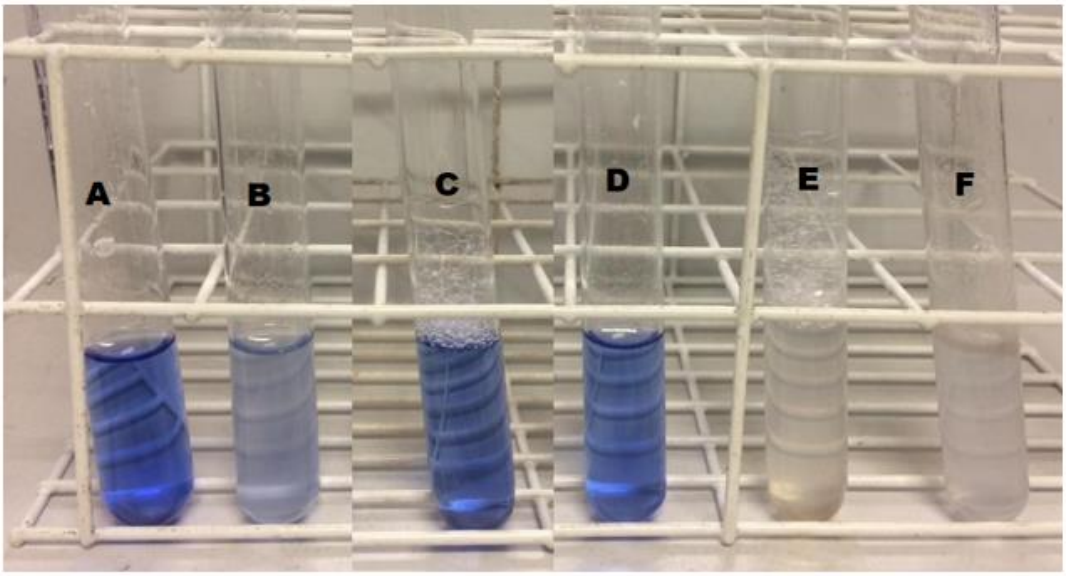


FIGURA 8

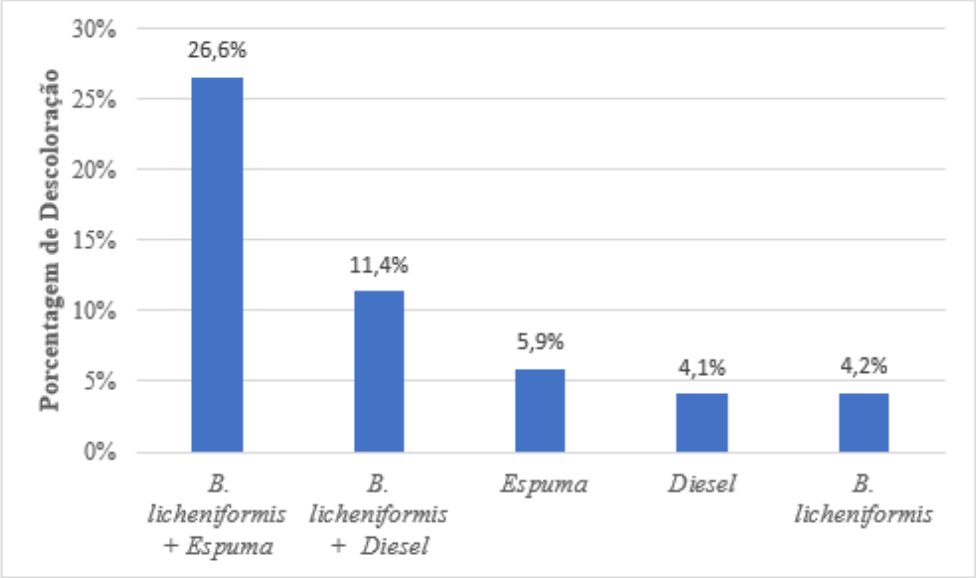

Porcentagem de Descoloração
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
26,6%
11,4%
5,9%
4,1%
4,2%
B. licheniformis + Espuma
B. licheniformis + Diesel
Espuma
Diesel
B. licheniformis

FIGURA 9



FIGURA 10

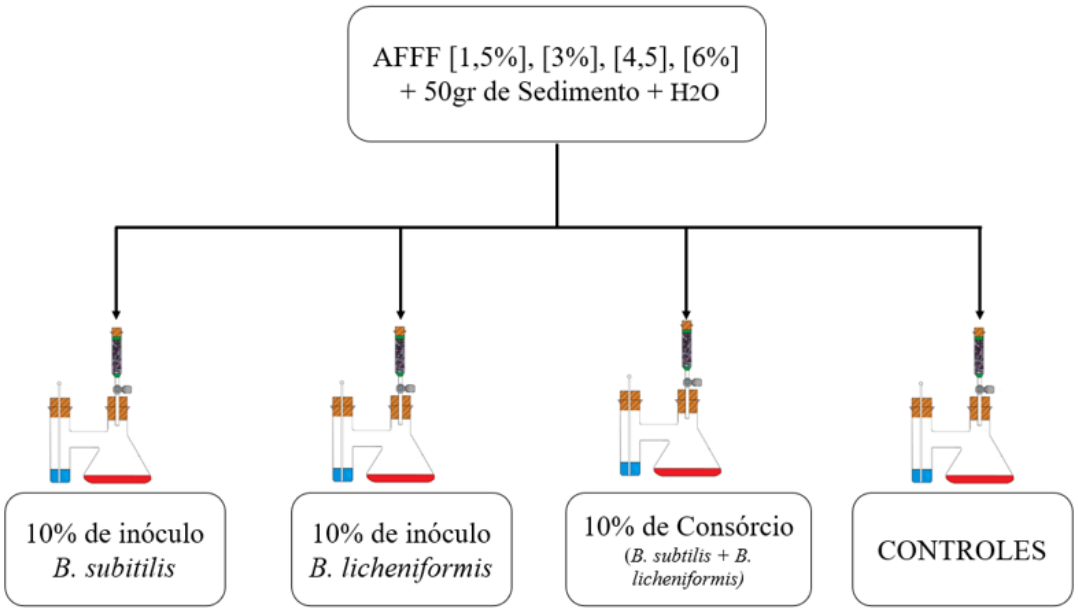

AFFF [1,5%], [3%], [4,5], [6%]
+ 50gr de Sedimento + H2O
10% de inóculo
B. subitilis
10% de inóculo
B. licheniformis
10% de Consórcio
(B. subtilis + B.
licheniformis)
CONTROLES

FIGURA 11

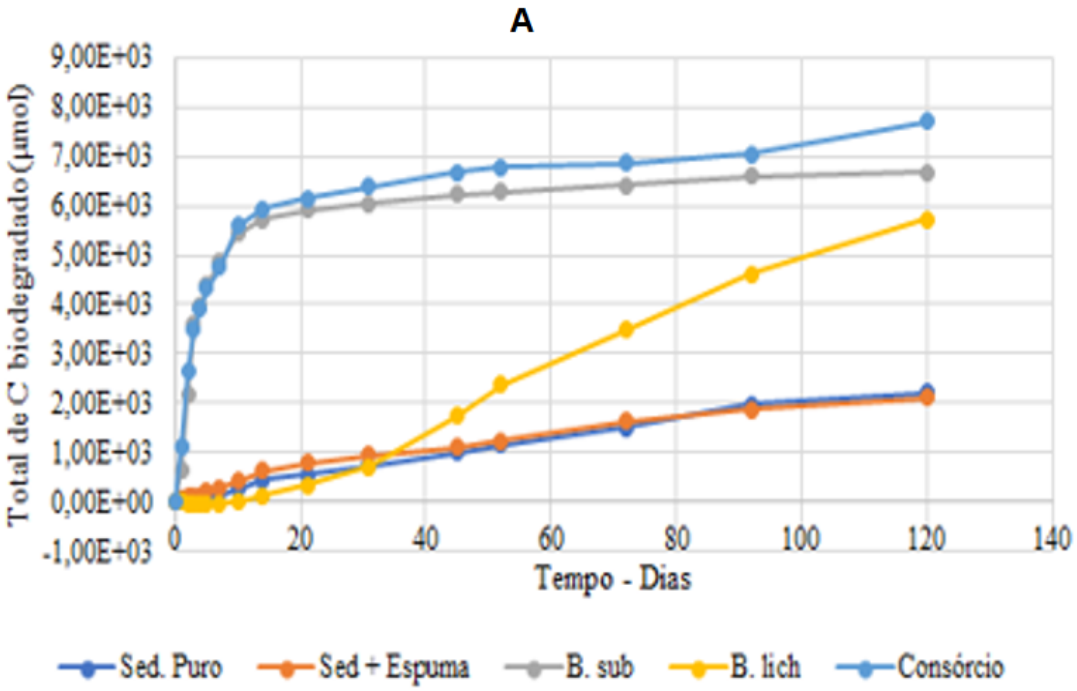

A
9,00E+03
8,00E+03
7,00E+03
6,00E+03
5,00E+03
4,00E+03
3,00E+03
2,00E+03
1,00E+03
0,00E+00
-1,00E+03
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
140
Tempo - Dias
Sed. Puro
Sed + Espuma
B. sub
B. lich
Consórcio

FIGURA 12A

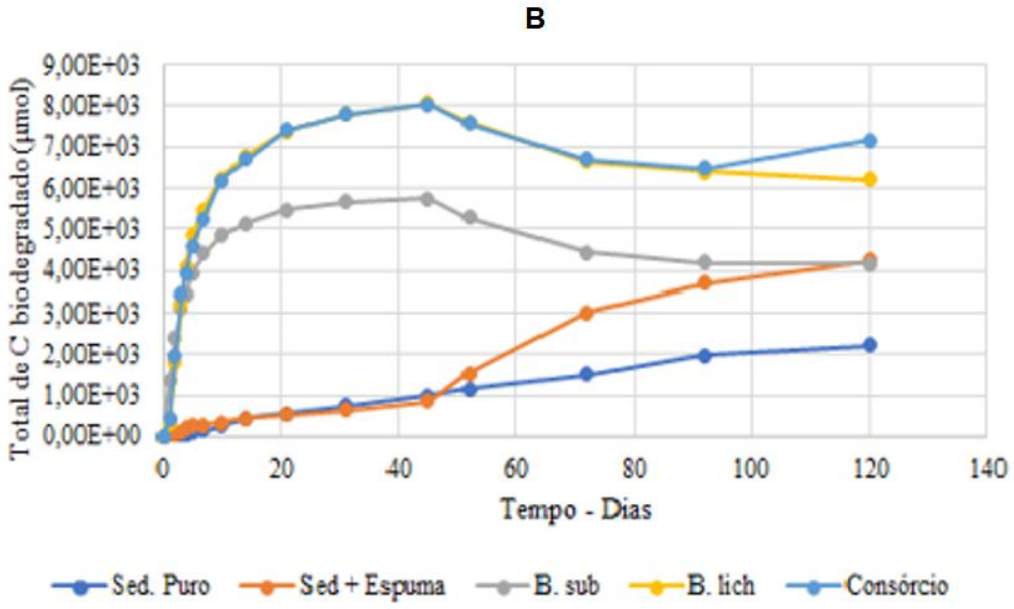

B
9,00E+03
8,00E+03
7,00E+03
6,00E+03
5,00E+03
4,00E+03
3,00E+03
2,00E+03
1,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
140
Tempo - Dias
Sed. Puro
Sed + Espuma
B. sub
B. lich
Consórcio

FIGURA 12B

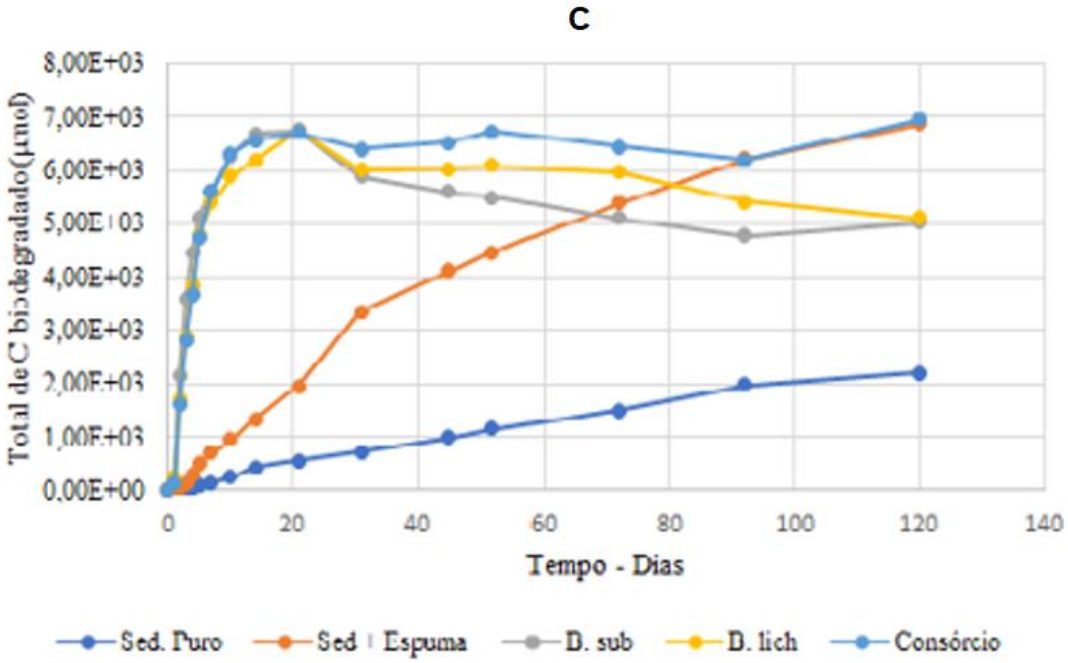

C
8,00E+03
7,00E+03
6,00E+03
5,00E+03
4,00E+03
3,00E+03
2,00E+03
1,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado(µmol)
0
20
40
60
80
100
120
140
Tempo - Dias
Sed. Puro
Sed + Espuma
D. sub
D. lich
Consórcio

FIGURA 12C

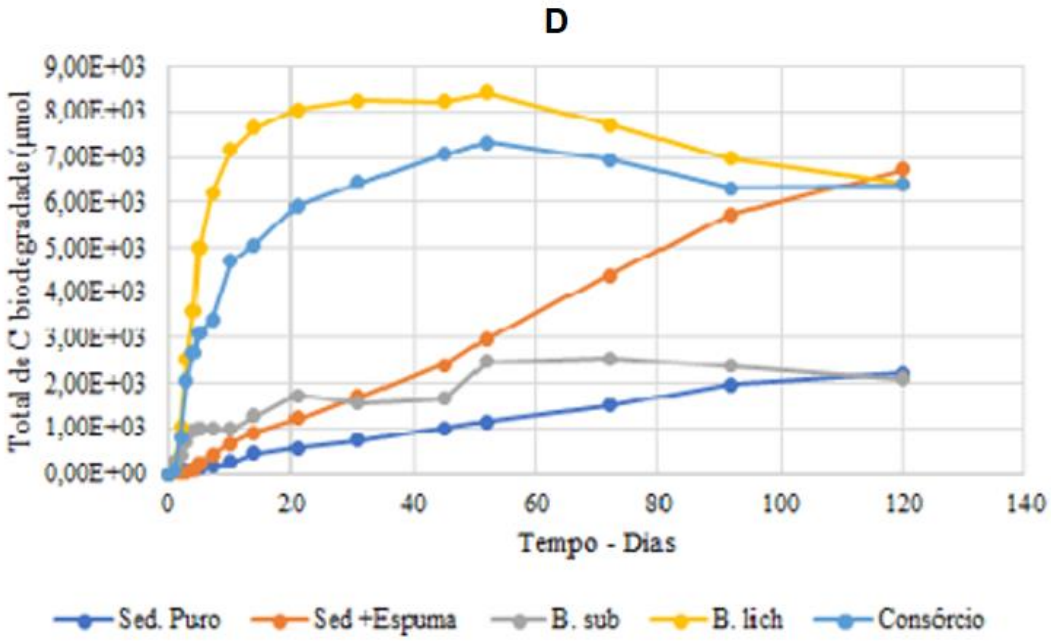

D
9,00E+03
8,00E+03
7,00E+03
6,00E+03
5,00E+03
4,00E+03
3,00E+03
2,00E+03
1,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado (µmol
0
20
40
60
80
100
120
140
Tempo - Dias
Sed. Puro
Sed +Espuma
B. sub
B. lich
Consórcio

FIGURA 12D

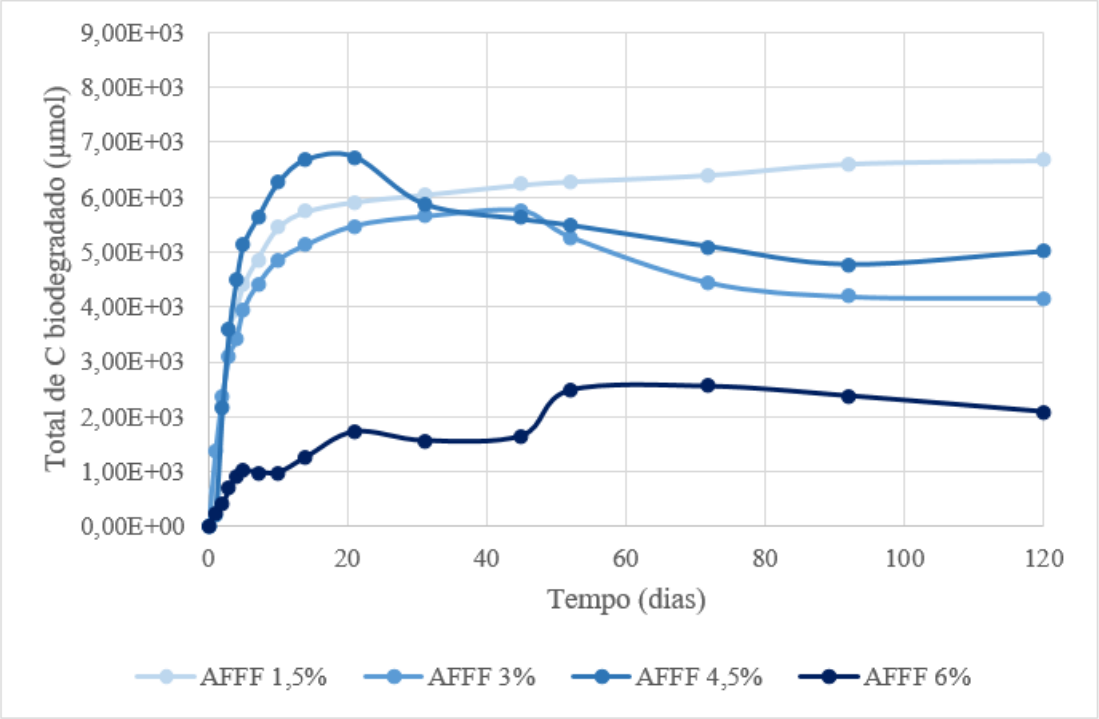

9,00E+03
8,00E+03
7,00E+03
6,00E+03
5,00E+03
4,00E+03
3,00E+03
2,00E+03
1,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
Tempo (dias)
AFFF 1,5%
AFFF 3%
AFFF 4,5%
AFFF 6%

FIGURA 13

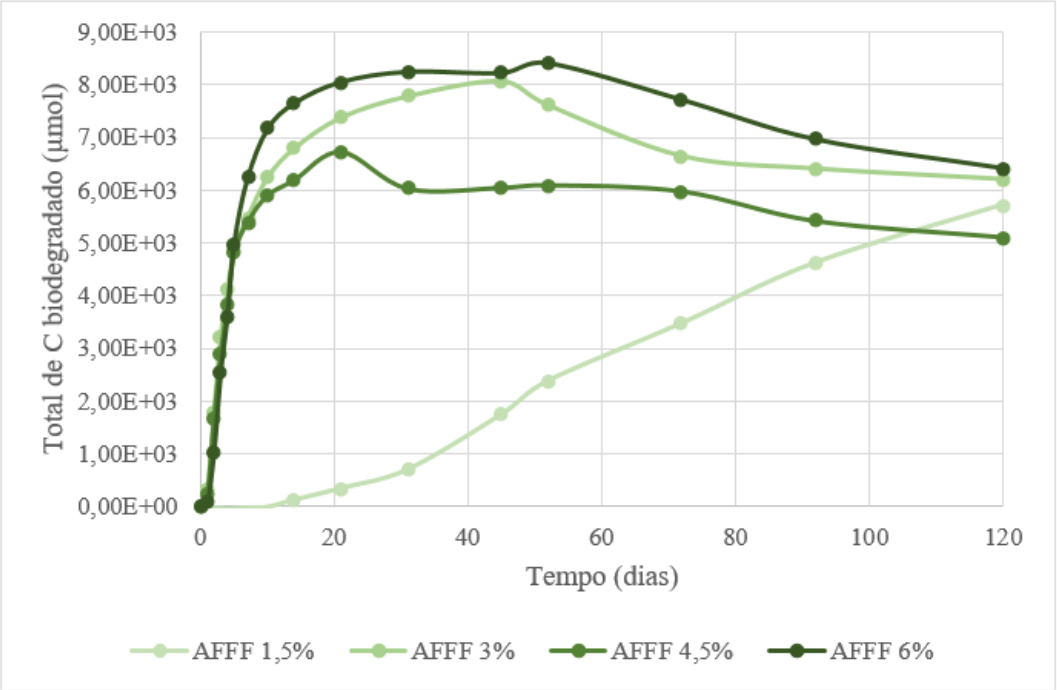

9,00E+03
8,00E+03
7,00E+03
6,00E+03
5,00E+03
4,00E+03
3,00E+03
2,00E+03
1,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
Tempo (dias)
AFFF 1,5%
AFFF 3%
AFFF 4,5%
AFFF 6%

FIGURA 14

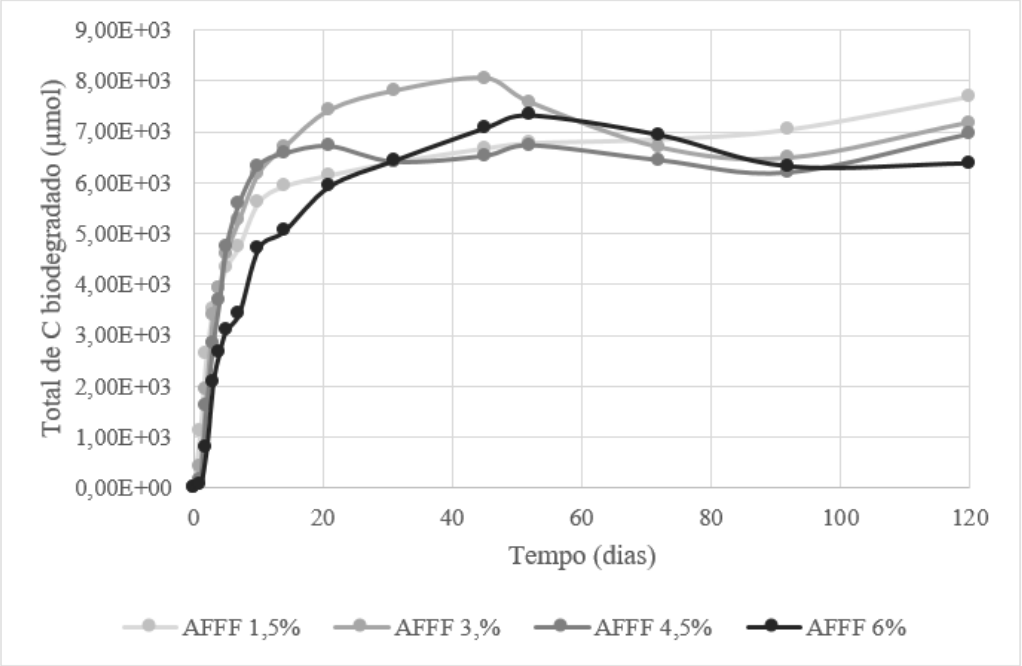

9,00E+03
8,00E+03
7,00E+03
6,00E+03
5,00E+03
4,00E+03
3,00E+03
2,00E+03
1,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
Tempo (dias)
AFFF 1,5%
AFFF 3,%
AFFF 4,5%
AFFF 6%

FIGURA 15

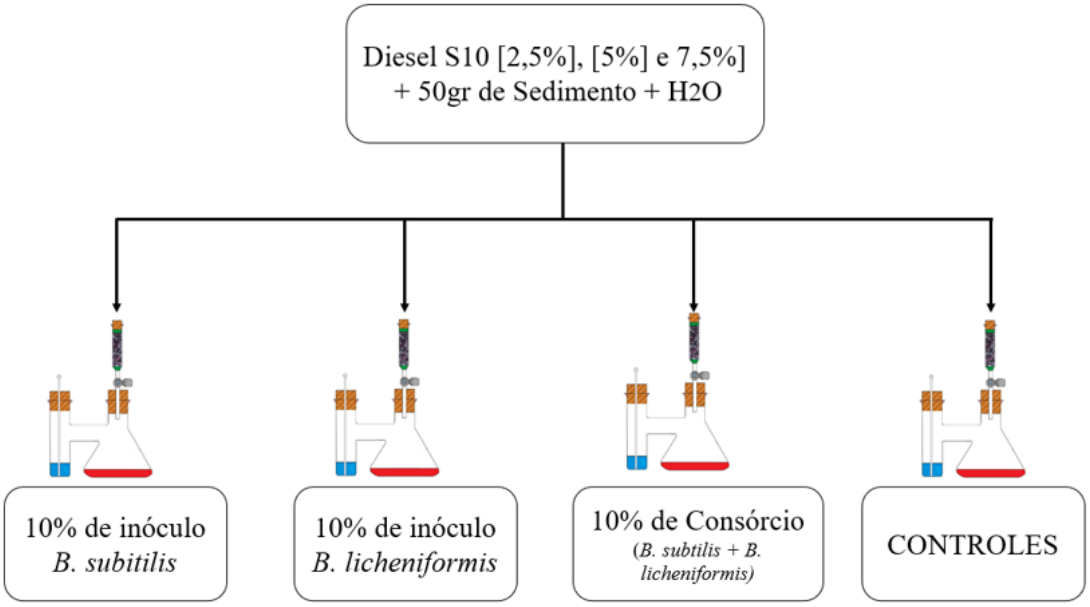

Diesel S10 [2,5%], [5%] e 7,5%]
+ 50gr de Sedimento + H2O
10% de inóculo
B. subitilis
10% de inóculo
B. licheniformis
10% de Consórcio
(B. subtilis + B.
licheniformis)
CONTROLES

FIGURA 16

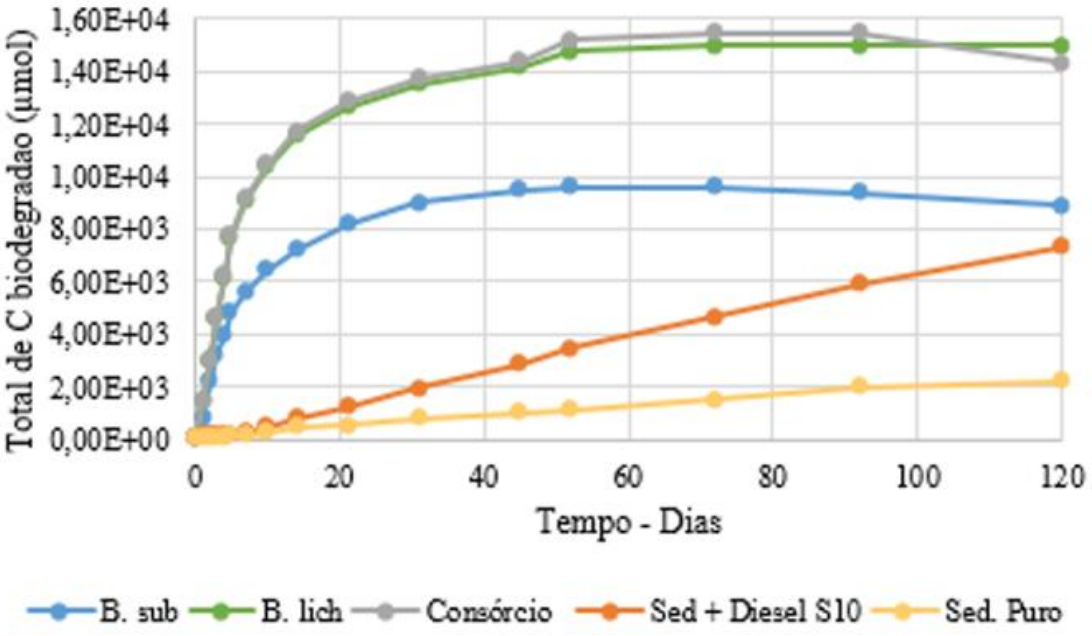

Total de C biodegradao (µmol)
1,60E+04
1,40E+04
1,20E+04
1,00E+04
8,00E+03
6,00E+03
4,00E+03
2,00E+03
0,00E+00
0
20
40
60
80
100
120
Tempo - Dias
B. sub
B. lich
Consórcio
Sed + Diesel S10
Sed. Puro

FIGURA 17A

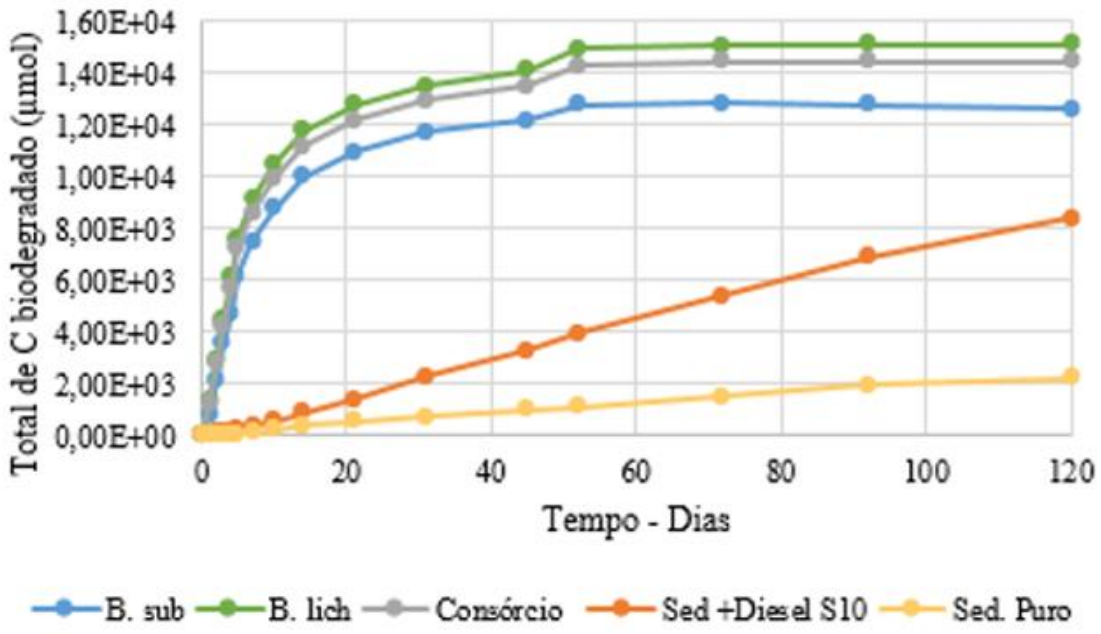

Total de C biodegradado (µmol)
1,60E+04
1,40E+04
1,20E+04
1,00E+04
8,00E+03
6,00E+03
4,00E+03
2,00E+03
0,00E+00
0
20
40
60
80
100
120
Tempo - Dias
B. sub
B. lich
Consórcio
Sed +Diesel S10
Sed. Puro

FIGURA 17B

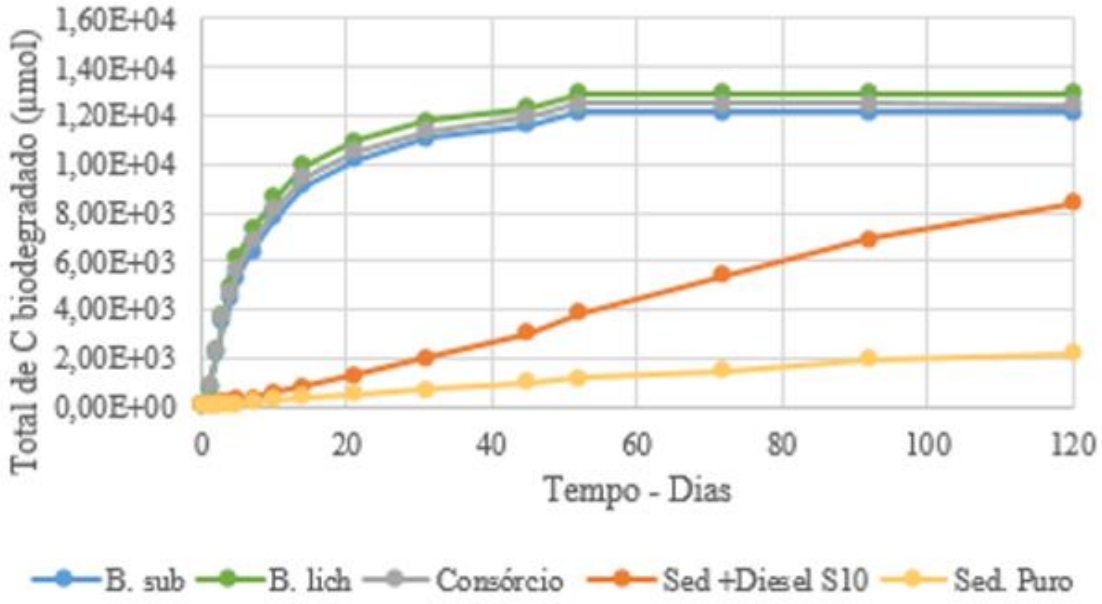

Total de C biodegradado (µmol)
1,60E+04
1,40E+04
1,20E+04
1,00E+04
8,00E+03
6,00E+03
4,00E+03
2,00E+03
0,00E+00
0
20
40
60
80
100
120
Tempo - Dias
B. sub
B. lich
Consórcio
Sed +Diesel S10
Sed. Puro

FIGURA 17C

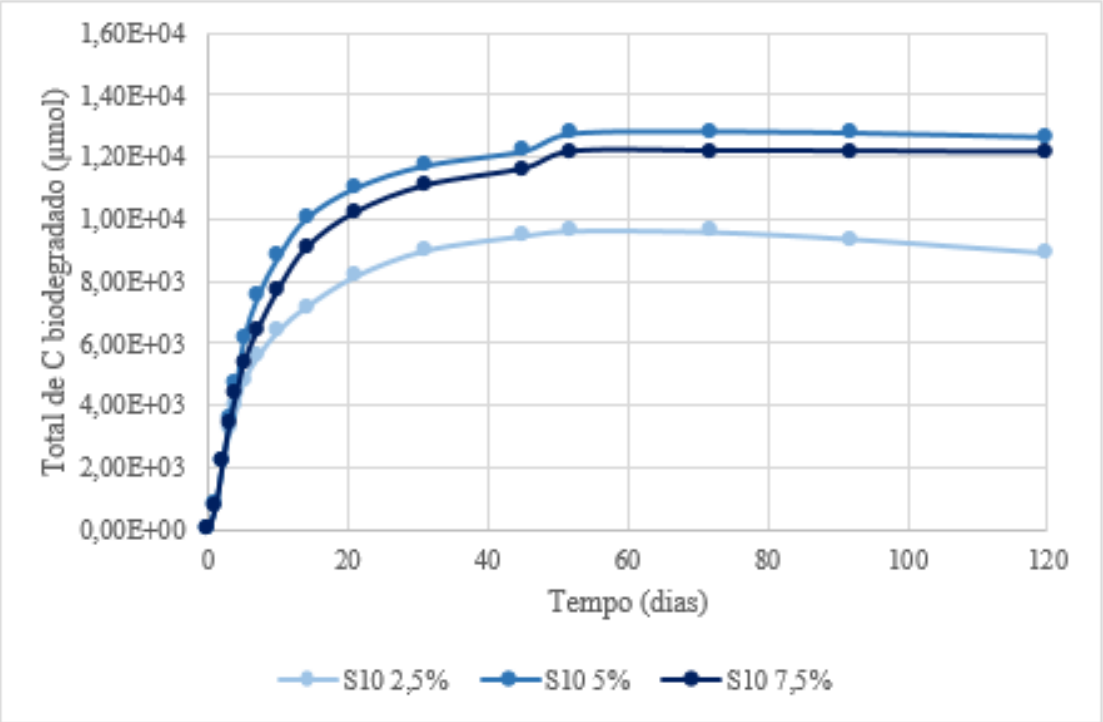

1,60E+04
1,40E+04
1,20E+04
1,00E+04
8,00E+03
6,00E+03
4,00E+03
2,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
Tempo (dias)
S10 2,5%
S10 5%
S10 7,5%

FIGURA18

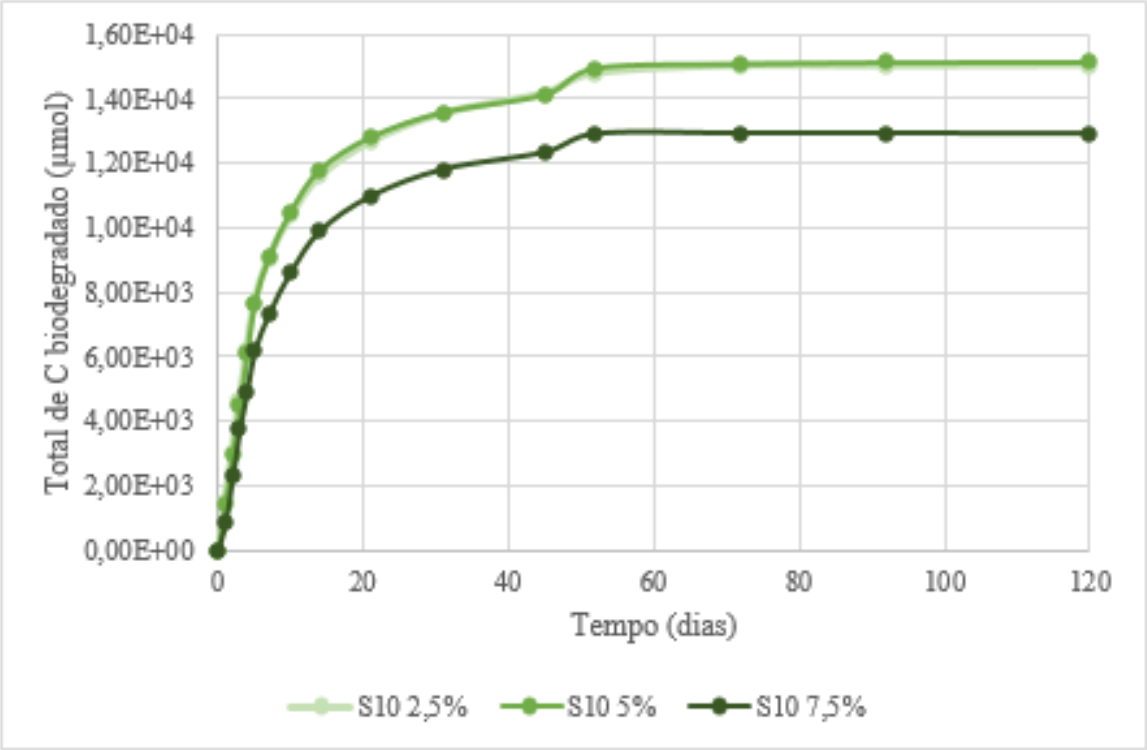

1,60E+04
1,40E+04
1,20E+04
1,00E+04
8,00E+03
6,00E+03
4,00E+03
2,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
Tempo (dias)
S10 2,5%
S10 5%
S10 7,5%

FIGURA 19

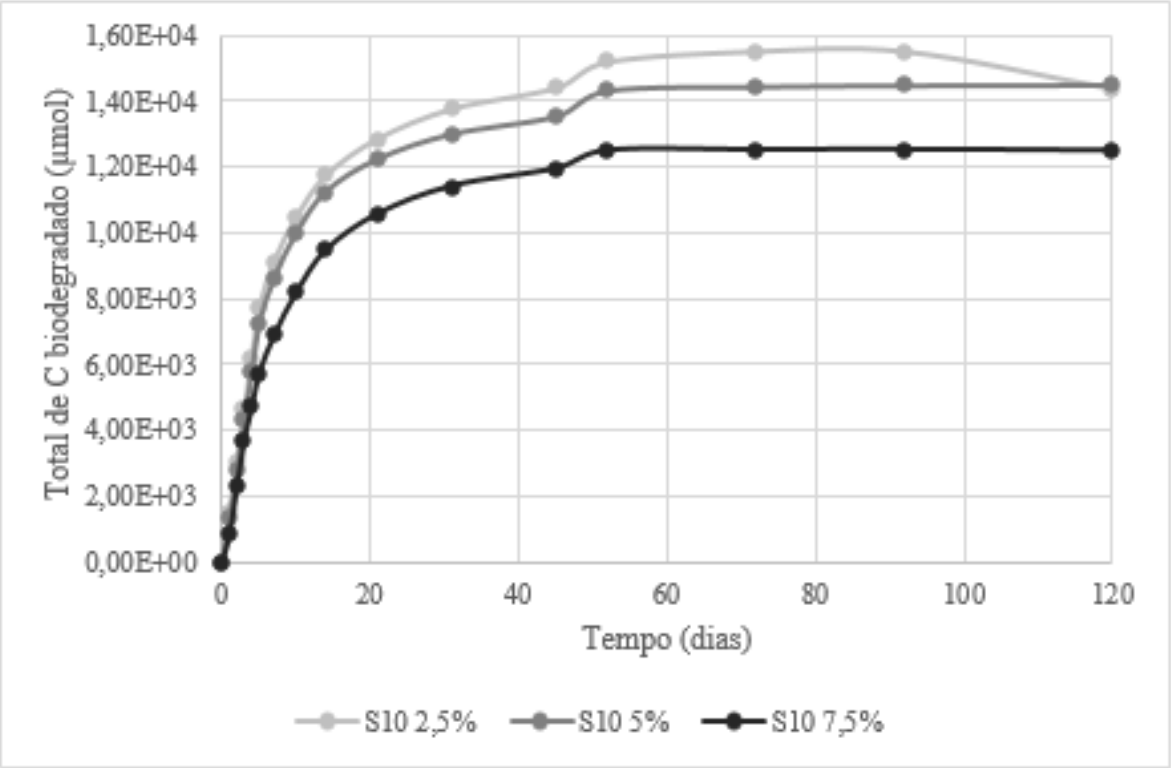

1,60E+04
1,40E+04
1,20E+04
1,00E+04
8,00E+03
6,00E+03
4,00E+03
2,00E+03
0,00E+00
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
Tempo (dias)
S10 2,5%
S10 5%
S10 7,5%

FIGURA 20

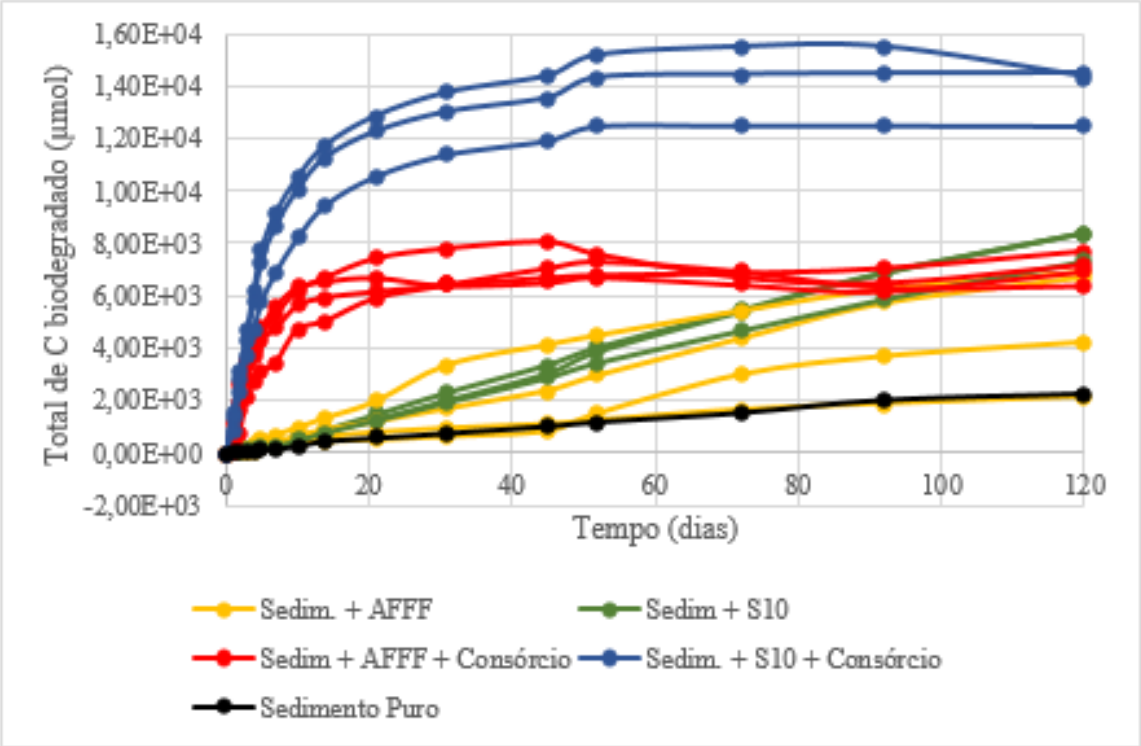

1,60E+04
1,40E+04
1,20E+04
1,00E+04
8,00E+03
6,00E+03
4,00E+03
2,00E+03
0,00E+00
-2,00E+03
Total de C biodegradado (µmol)
0
20
40
60
80
100
120
Tempo (dias)
Sedim. + AFFF
Sedim + S10
Sedim + AFFF + Consórcio
Sedim. + S10 + Consórcio
Sedimento Puro

FIGURA 21

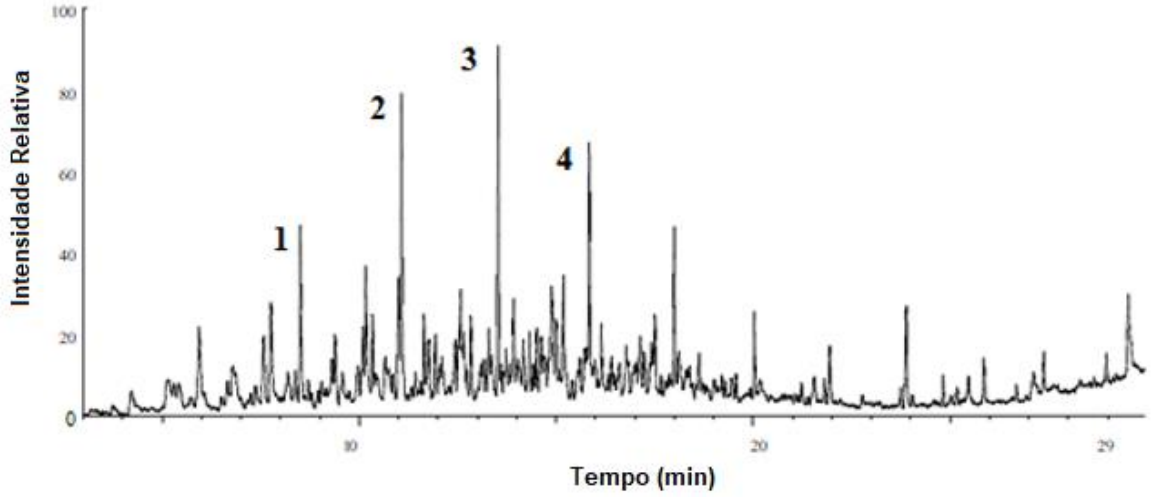


FIGURA 22

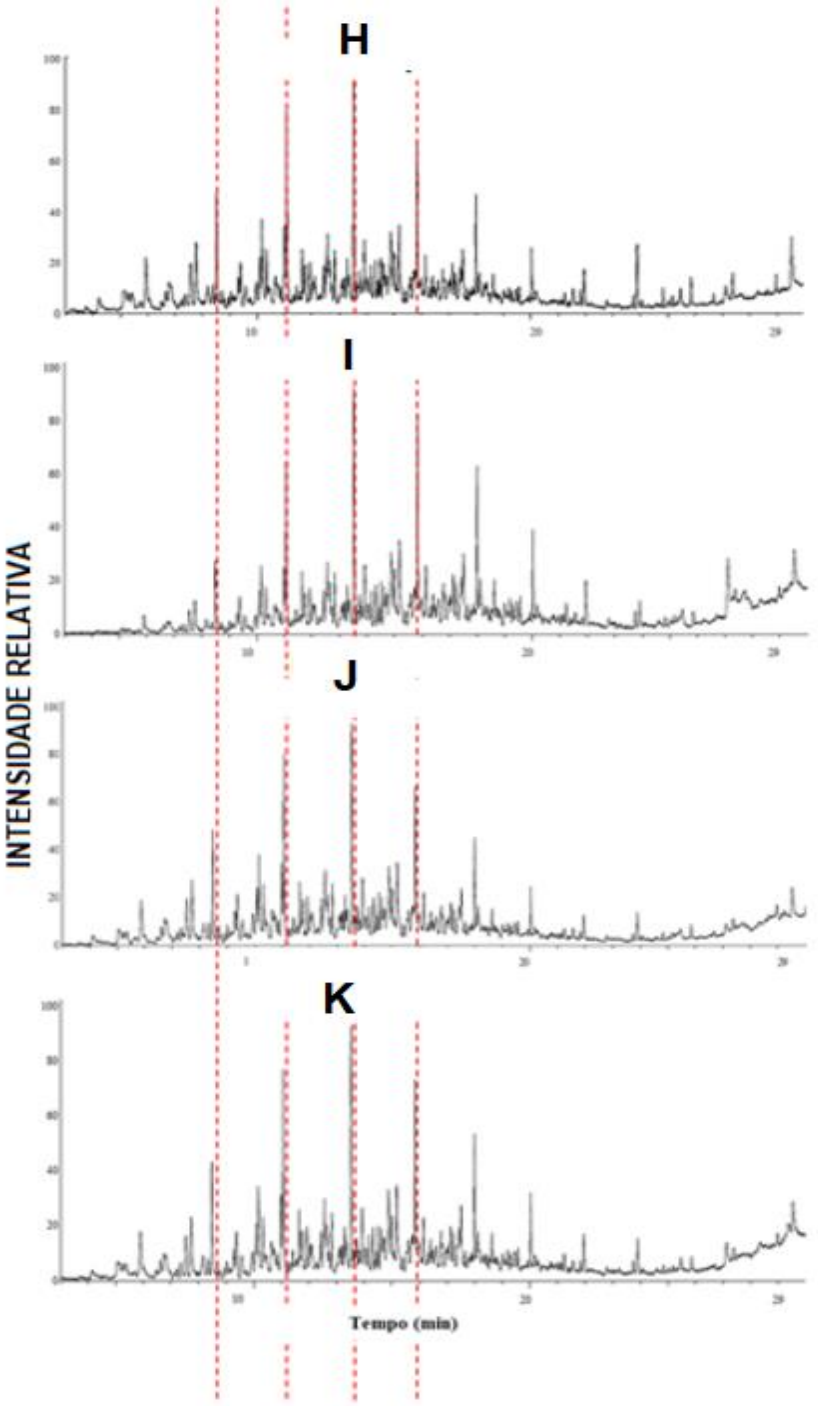


FIGURA 23

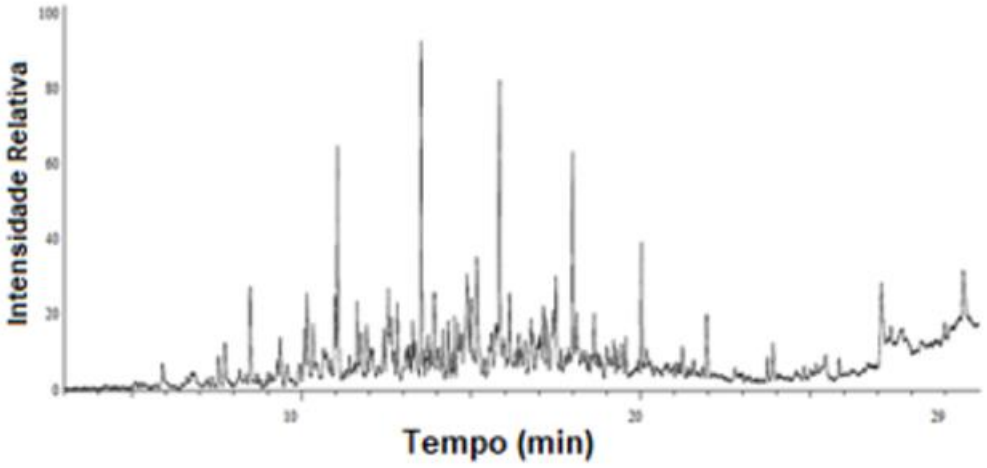


FIGURA 24A

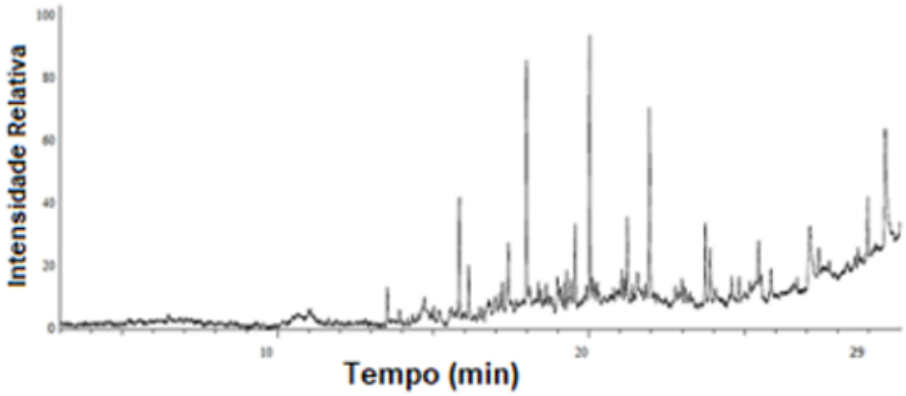


FIGURA 24B

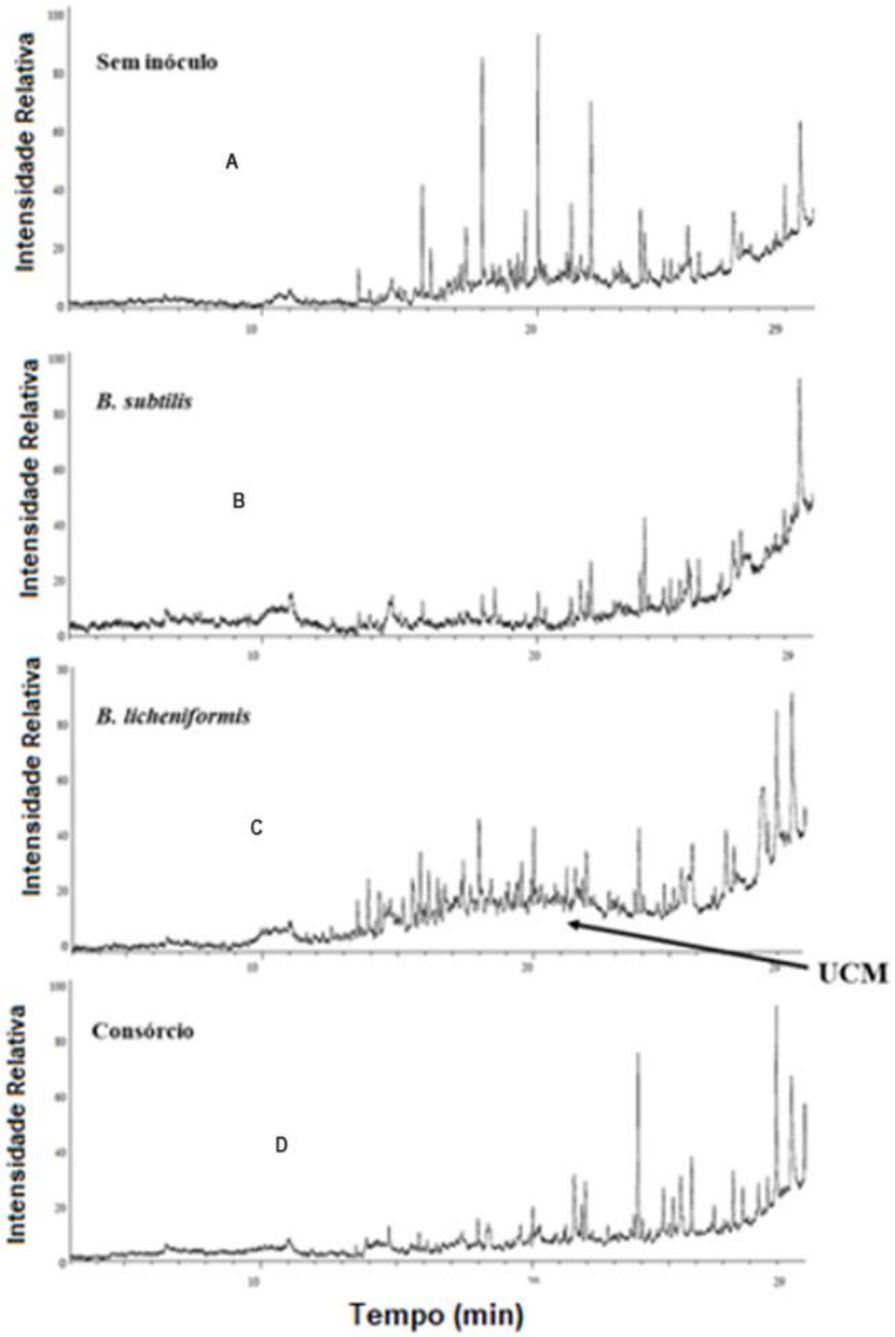

Intensidade Relativa
Sem inóculo
A
Intensidade Relativa
B. subtilis
B
Intensidade Relativa
B. licheniformis
C
UCM
Intensidade Relativa
Consórcio
D
Tempo (min)

FIGURA 25

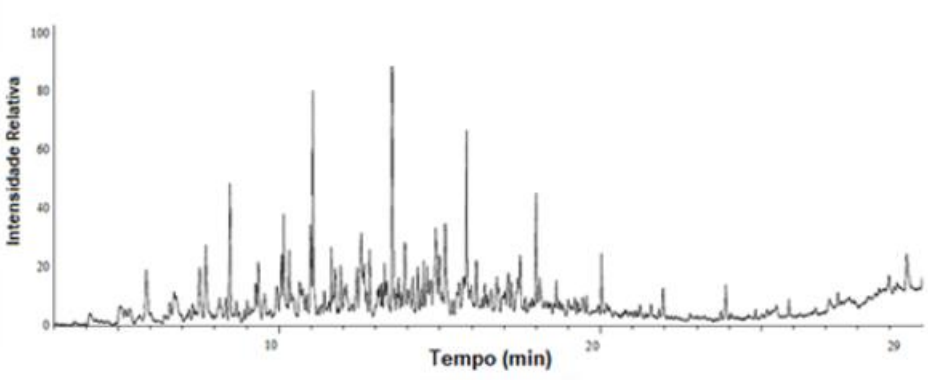


FIGURA 26A

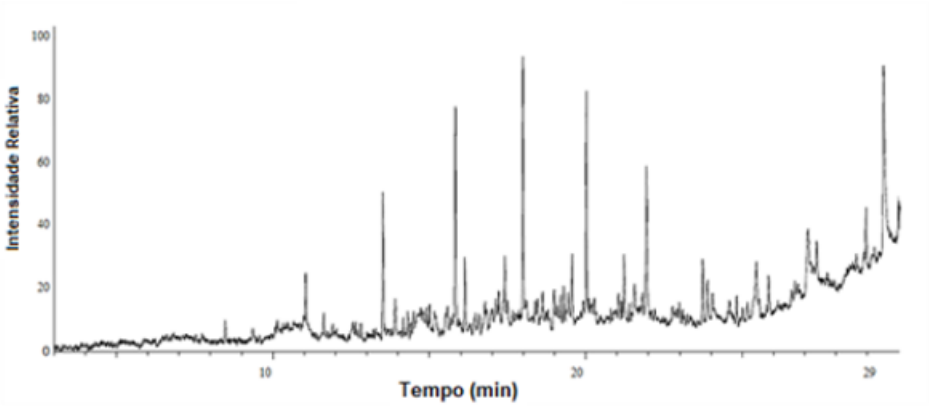


FIGURA 26B

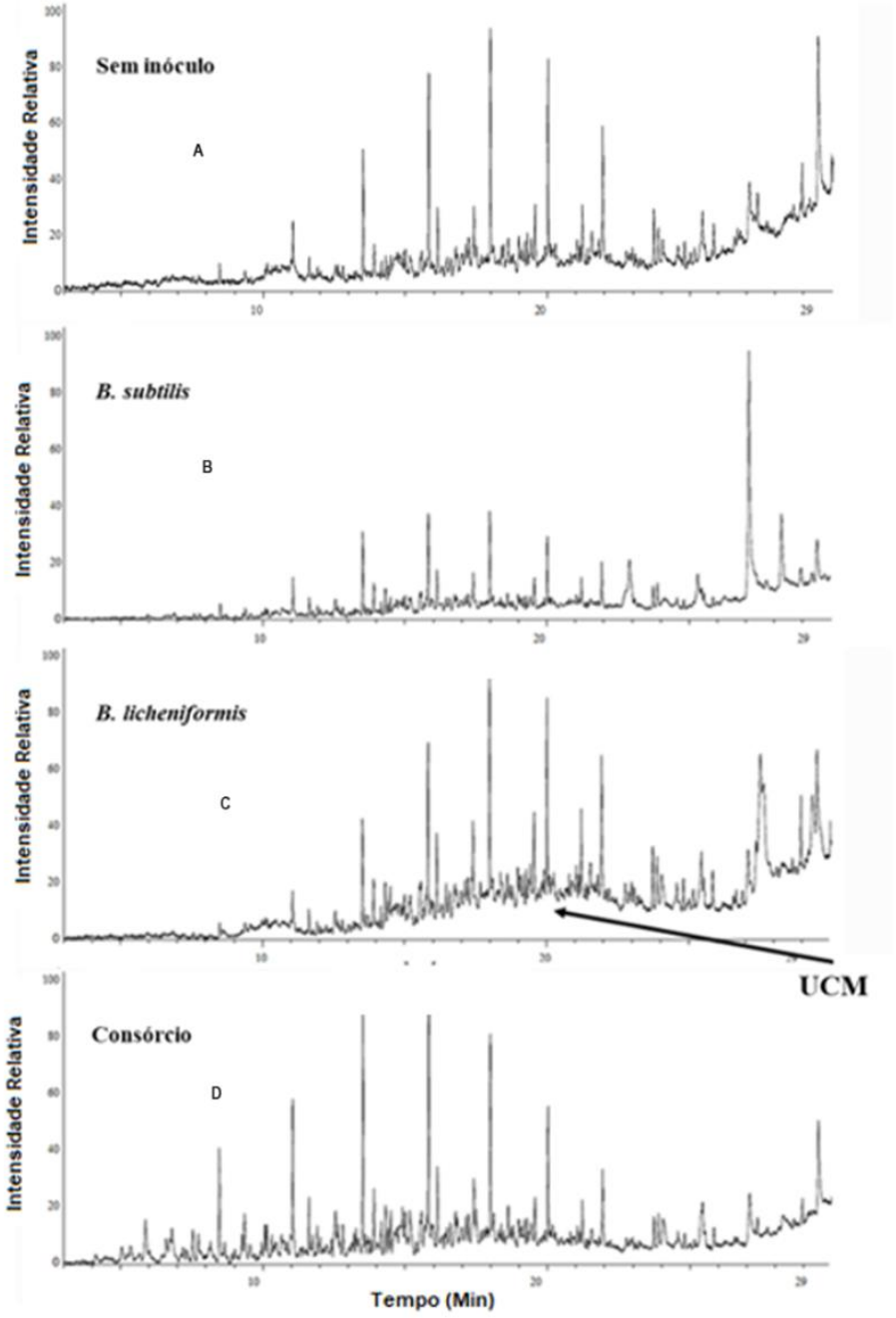

Sem inóculo
A
B. subtilis
B
B. licheniformis
C
UCM
Consórcio
D
Intensidade Relativa
Tempo (Min)

FIGURA 27

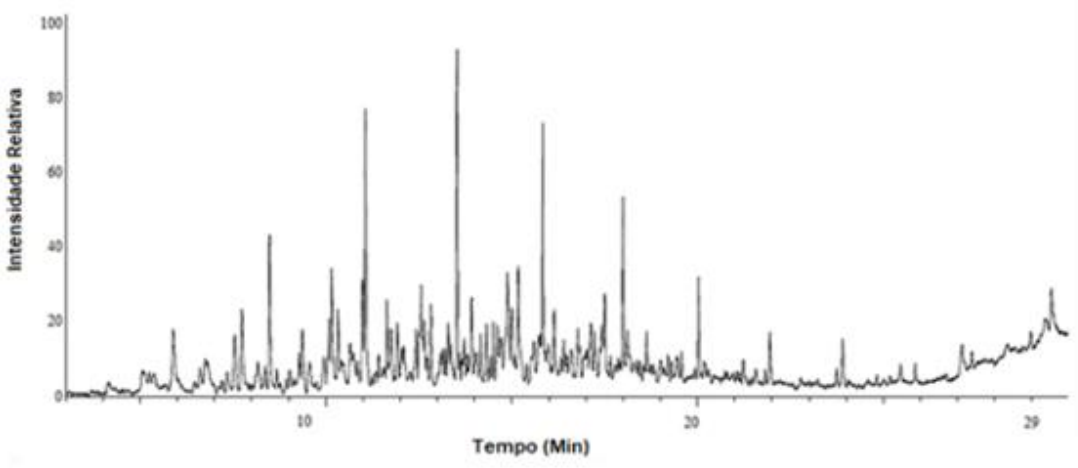


FIGURA 28A

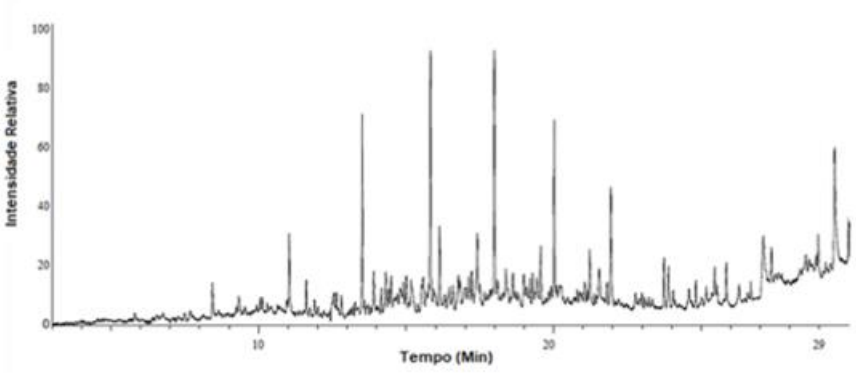


FIGURA 28B

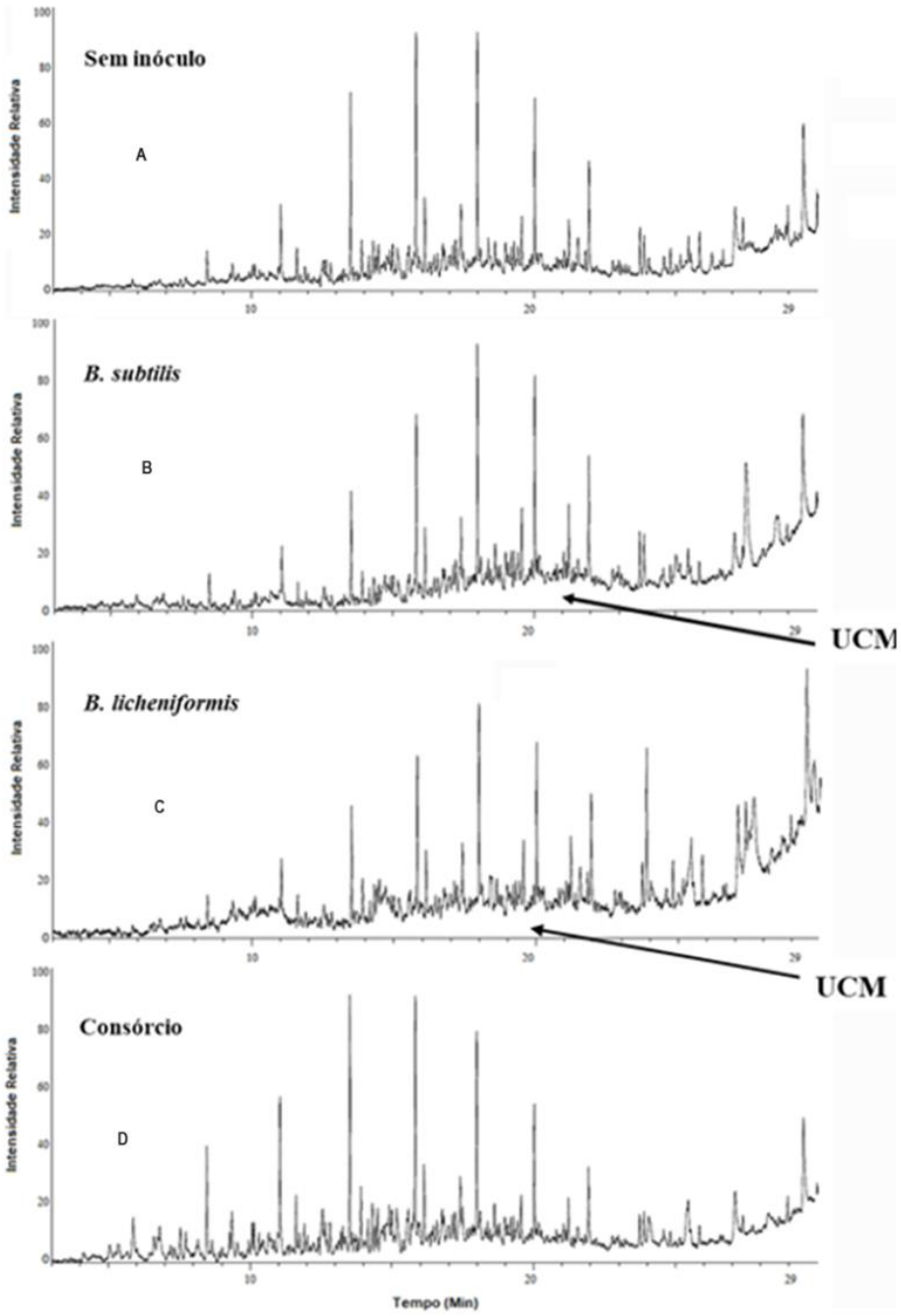

Sem inóculo
A
B. subtilis
B
UCM
B. licheniformis
C
UCM
Consórcio
D
Intensidade Relativa
Tempo (Min)

FIGURA 29

RESUMO

PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO POR BIOAUMENTAÇÃO COM BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AMBIENTAIS

O presente pedido de patente de invenção, pertencendo ao campo do Meio Ambiente, mais especificamente à Biotecnologia para aplicações nas indústrias de petróleo, aeroportos, portos, empresas de transporte e/ou armazenamento de combustíveis e agências públicas ambientais na mitigação dos efeitos de acidentes com contaminação ambiental, descreve um processo de biorremediação por meio da utilização de cepas ambientais (*Bacillus subtilis e Bacillus licheniformis*) para minimizar os danos ao meio ambiente devido a contaminação ambiental com espuma de controle de incêndio (AFFF), combustível (Diesel, Gasolina e Álcool), afetando a biodiversidade.