



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NAZARETH ZIMIANI DE PAULA

**Isolamento de bactérias hidrocarbonoclásticas de
sedimento de manguezal contaminado com petróleo**

RECIFE

2022

NAZARETH ZIMIANI DE PAULA

**Isolamento de bactérias hidrocarbonoclásticas de
sedimento de manguezal contaminado com petróleo**

Monografia apresentada ao Curso de
Licenciatura em Ciências
Biológicas/UFRPE como requisito
parcial para obtenção do grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio
Barbosa de Lima.

RECIFE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D278i de Paula, Nazareth Zimiani
Isolamento de bactérias hidrocarbonoclasticas de sedimento de manguezal contaminado com petróleo /
Nazareth Zimiani de Paula. - 2022.
41 f. : il.

Orientador: Marcos Antonio Barbosa de Lima.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

1. Contaminação. 2. Biorremediação . 3. Mangue. 4. Micro-organismos. 5. Petroderivados. I. Lima,
Marcos Antonio Barbosa de, orient. II. Título

CDD 574

NAZARETH ZIMIANI DE PAULA

**Isolamento de bactérias hidrocarbonoclasticas de sedimento de manguezal
contaminado com petróleo**

Comissão Avaliadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio Barbosa de Lima – UFRPE

Orientador

Prof^a Dr^a Luciana de Oliveira Franco – UFRPE

Titular

Prof. Dr. Éder Galinari Ferreira – UFRPE

Titular

Prof^a Dr^a Flávia Carolina Lins da Silva – UFRPE

Suplente

RECIFE

2022

AGRADECIMENTOS

Durante essa longa jornada que foi a graduação, várias pessoas fizeram parte da rede de apoio que tive, portanto, não poderia deixar de agradecer às pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, a chegar até aqui.

Gostaria de agradecer às minhas filhas Giovanna e Bianca pela paciência e compreensão durante todo o tempo em que não pude estar com elas, várias noites estudando, fazendo trabalhos e pesquisas. Elas contribuíram com seu amor e carinho, aceitando essa relativa ausência, demonstrando uma maturidade além da esperada para suas faixas etárias.

Ao meu irmão Wellington pelo apoio financeiro que nunca faltou, mesmo nos momentos mais difíceis, sendo de extrema importância para a segurança e o bem estar da minha família.

Aos meus amigos Júlio e Bárbara, pelas conversas, desabafos e momentos de descontração e felicidade.

Ao pai das minhas filhas, Vitor Hugo, pelo apoio importantíssimo que recebi durante toda a minha graduação, sempre me ajudando em tudo que precisei. Esse agradecimento é pouco para descrever a importância que ele teve na minha vida acadêmica.

Nessa trajetória tive o prazer de conhecer vários professores maravilhosos, inteligentes e dedicados que pretendo leva-los comigo por toda a vida, em especial, o Prof. Marcos Antonio e a Prof^a Luciana Franco, por terem me dado a oportunidade de assumir um projeto de iniciação científica, acreditando que eu seria capaz de desempenhar um bom trabalho. Obrigada por toda confiança e por ter me apoiado em um momento difícil, pelo apoio financeiro, psicológico e principalmente por sempre estarem dispostos a me orientar e ensinar, tanto nas questões acadêmicas quanto na vida.

Sou infinitamente grata a todos.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às minhas filhas, Giovanna e Bianca.

RESUMO

Em agosto de 2019 ocorreu um derramamento de petróleo que atingiu a costa de 11 estados do Nordeste e Sudeste, afetando diversos ecossistemas costeiros principalmente estuários e manguezais, além de expor espécies costeiras já ameaçadas. Os manguezais são ecossistemas costeiros muito sensíveis a contaminação por hidrocarbonetos. Portanto, a presente proposta objetivou o isolamento e caracterização das bactérias hidrocarbonoclásticas com potencial de degradação de hidrocarbonetos em sedimento do manguezal contaminado por petróleo, do Cabo de Santo Agostinho. Para isso, amostras de sedimentos superficiais do mangue contaminado foram coletadas e submetidas aos ensaios de quantificação das bactérias heterotróficas totais, determinação das bactérias hidrocarbonoclásticas, seleção dos isolados degradadores de petróleo e derivados. Os parâmetros físico-químicos pH, temperatura, salinidade e condutividade também foram determinados no sedimento. Não foi observado variação expressiva nos parâmetros físico-químicos entre os pontos analisados. Por outro lado, obtivemos um total de 30 isolados bacterianos, 15 de bactérias heterotróficas e 15 hidrocarbonoclásticas. Bacilos Gram negativos predominaram entre as bactérias heterotróficas e hidrocarbonoclásticas. Dois isolados se destacaram no grupo das bactérias heterotróficas (isolados 1 e 4) por apresentarem maior frequência relativa, representando juntos 64% do total de isolados. Em relação aos 15 isolados de bactérias hidrocarbonoclásticas, 13 delas, foram obtidas no meio com óleo diesel como fonte de carbono. Dos 15 isolados de bactérias hidrocarbonoclásticas avaliadas, 10 exibiram potencial de degradação de óleo diesel, gasolina e querosene. O isolado 7 destacou-se por ter obtido o melhor resultado na degradação dos 3 combustíveis.

Palavras-chave: Contaminação. Biorremediação. Mangue. Micro-organismos. Petroderivados.

ABSTRACT

In August of 2019, there was a petrol leakage which hit the shore of 11 states of the northeast and southeast of Brazil. This leakage affected several coastal ecosystems mainly estuary and mangrove forests, besides exposing coastal species already under threat. Mangrove forests are ecosystems extremely sensitive to contamination by hydrocarbons. Therefore, this present proposal has aimed at isolating and featuring hydrocarbonclastic bacteria with degradation potential in sediment of mangrove, contaminated by petrol, in Cabo de Santo Agostinho. To do so, samples of superficial sediments of mangrove which were contaminated, those were collected and submitted to the tests of quantification of total heterotrophic bacteria, assertiveness of hydrocarbonclastic bacteria, selection of isolated decomposers of petrol and by-products. The physical- chemical pH parameters, temperature, salinity, and conductivity were also measured in the sediment. It was not observed significant variation in the physical-chemical parameters among the variables analysed. On the other hand, It was obtained a total of 30 bacterial isolates, 15 heterotrophic and 15 hydrocarbonclastic bacteria. Negative Gram bacilli were predominant among heterotrophic and hydrocarbonclastic bacteria. Two isolated ones, the group of heterotrophic bacteria stood out. (isolated 1 & 4) due to showing more relative frequency, making up of 64 % of total isolated together. With regards to the 15 isolate hydrocarbonclastic bacteria, 13 of those, were obtained in the diesel oil environment as source for carbon. Of 15 isolate hydrocarbonclastic bacteria assessed, 10 displayed potential for decomposition of diesel oil, gasoline and kerosene. The isolate 7 was prominent as it achieved the best decomposition results of the 3 fuels analysed.

Keywords: Contamination. Bioremediation. Mangrove. Microorganisms. Petroderivative.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Coordenadas das amostras de sedimentos retirados em cada ponto..... | 23 |
| Tabela 2. Parâmetros físico-químicos das amostras dos sedimentos coletados nos pontos escolhidos..... | 27 |
| Tabela 3. Características microscópicas, densidade e frequência relativa dos isolados de bactérias heterotróficas obtidas do sedimento do manguezal do Cabo de Santo Agostinho contaminado por petróleo..... | 28 |
| Tabela 4. Características microscópicas dos isolados de bactérias hidrocarbonoclásticas do sedimento do manguezal de acordo com a fonte de carbono (Gasolina, óleo diesel e petróleo bruto)..... | 31 |
| Tabela 5. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias isoladas de sedimento de mangue contaminado de acordo com a fonte de carbono..... | 33 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 . Localização da área - imagem do Google Earth (A); boias de contenção, próximas a área de coleta, utilizadas para evitar o avanço do óleo (B); voluntários retirando petróleo do mangue em Suape, no Cabo de Santo Agostinho (C) - Fonte: matéria do G1 PE/T TV Globo (Foto: Beatriz Castro/TV Globo).22
- Figura 2 . Pontos de coleta - imagem do Google Earth (A); Coleta do sedimento (B).23
- Figura 3. Amostras compostas de sedimento do mangue contaminado com petróleo sendo adicionadas ao meio BH (Buschnell Haas) para isolamento das bactérias hidrocarbonoclásticas.....25
- Figura 4. Colônias bacterianas isoladas de amostra de sedimento de mangue na diluição 10^{-4} . Diversidade de colônias bacterianas visualizadas em placa de Petri sobre um contador de colônias (A); Colônias purificadas do isolado 1 com apresentando cor bege, tamanho pequeno, forma circular, bordos lisos, de aspecto leitoso e opaco. .27
- Figura 5. Morfologia e coloração de Gram dos isolados de bactérias mais frequentes. Isolado 1 - bacilo Gram negativo (A). Isolado 4 - bacilo Gram negativo (B). Ampliação: 2000 X (A) e (B).29
- Figura 6. Determinação das bactérias hidrocarbonoclásticas de sedimento de mangue em meio BH contendo petróleo, gasolina e óleo diesel. Aspecto macroscópico dos Erlenmeyers prontos para incubação em shaker a 180 rpm e 28 °C (A) e após 8 dias de incubação (B).30
- Figura 7. Colônias de micro-organismos hidrocarbonoclásticos de amostras do meio de enriquecimento na diluição 10^{-2} . Placas com meio BH suplementadas com óleo diesel (A), gasolina (B) e petróleo bruto (C) como únicas fontes de carbono.....30
- Figura 8. Aparência dos tubos após o período de 6 dias de incubação tendo o óleo diesel como fonte de carbono. Isolados de 1 a 6 (A) e isolados de 7 a 15, seguidos dos controles negativo e positivo (B).....33

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 14 |
| 2.1 Estudo de casos de derramamentos de petróleo | 14 |
| 2.2 Intemperismo do petróleo | 15 |
| 2.3 Manguezais | 17 |
| 2.4 Microbiota de Manguezal | 18 |
| 2.5 Técnicas de remediação | 19 |
| 2.6 Técnicas de biorremediação | 20 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 Descrição do local de coleta | 21 |
| 3.2 Coleta de Sedimento | 22 |
| 3.3 Análises físico-químicas do sedimento | 23 |
| 3.4 Contagem das Bactérias Heterotróficas Totais | 24 |
| 3.5 Determinação das Bactérias Hidrocarbonoclásticas | 24 |
| 3.6 Caracterização macro e micromorfológica das Bactérias | 25 |
| 3.7 Meio de manutenção das bactérias | 25 |
| 3.8 Preparo dos microrganismos para os ensaios | 25 |
| 3.9 Ensaio de degradação com óleo diesel, gasolina e querosene | 26 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 26 |
| 4.1 Análise físico-química do sedimento | 26 |
| 4.2 Densidade e análise morfológica das bactérias heterotróficas | 27 |
| 4.3 Determinação e análise morfológica das bactérias hidrocarbonoclásticas | 29 |
| 4.4 Potencial de degradação | 32 |
| 5 CONCLUSÃO | 34 |
| 6 REFERÊNCIAS | 34 |

1 INTRODUÇÃO

As áreas costeiras sofrem com poluentes oriundos do mar, predominantemente petróleo bruto da navegação ou da extração em alto mar e da terra, principalmente por meio de práticas agrícolas, esgoto urbano e atividades industriais. Quando introduzidos no meio ambiente, os compostos do petróleo, afetam os elementos abióticos e bióticos, incluindo micro-organismos, plantas, animais e humanos (Ziółkowska and Wyszowski, 2010; Duran *et al.*, 2015). O Petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos, aromáticos cíclicos e compostos contendo oxigênio, nitrogênio, enxofre e metais pesados com diferentes propriedades físicas, químicas e tóxicas. Os hidrocarbonetos aromáticos consistem em monocíclicos e policíclicos (HAP's), os quais compõem juntos cerca de 15 % do total de compostos do petróleo. Os mais tóxicos são os compostos aromáticos principalmente os HAP's, os quais são altamente mutagênicos e carcinogênicos. Os HAP's são pouco móveis no solo, dificilmente solúveis em água e resistente à degradação física, química ou biológica (Kennish, 1997; Ziółkowska and Wyszowski, 2010).

Entre os ecossistemas costeiros, os manguezais são os mais sensíveis a derrames de petroderivados, pois apresentam menor atividade hidrodinâmica em relação às áreas expostas as ondas, e dentro do mangue o sedimento é o ambiente mais susceptível a contaminação, porque suas finas partículas podem adsorver os HAP's e metais do petróleo. Assim, nos manguezais os HAP's tendem a agregar e adsorver em particulados e matéria orgânica porque são moléculas hidrofóbicas estáveis com baixa solubilidade e volatilidade. Como consequência eles acumulam na cadeia alimentar e podem persistir, apresentando um potencial carcinogênico a longo prazo para populações humanas locais (Saifullah *et al.*, 2002; Ziółkowska e Wyszowski, 2010; Duran e Cravo-Laureau, 2016; Pena *et al.*, 2020).

Por sua vez, os sedimentos de manguezal são a base das florestas de mangue e de todos os seres vivos que vivem neles. Esses sedimentos apresentam uma comunidade microbiana com alta diversidade que correspondem a 1,2 % da massa total de detritos, sendo que os fungos e bactérias representam cerca de 91 % da biomassa microbiana total. Essa comunidade microbiana desempenha papel chave

na decomposição da matéria orgânica do sedimento e ciclagem de nutrientes mantendo uma enorme cadeia alimentar (Ghizelini *et al.*, 2012; Duran *et al.*, 2015; Duran e Cravo-Laureau, 2016; ICMBIO, 2018).

A biodegradação por populações microbianas nativas consiste em um mecanismo primário pelo qual hidrocarbonetos do petróleo podem ser removidos do ambiente, sendo assim, a base da biorremediação, que são técnicas não invasivas e mais baratas do que outras técnicas de remediação. No entanto, o sucesso da biorremediação de derramamentos de óleo depende da presença de micro-organismos nativos com habilidades metabólicas apropriadas (arsenal enzimático e biossurfactantes) a este tipo de poluente. Portanto, a implementação de estratégias eficientes de biorremediação depende da compreensão dos micro-organismos envolvidos, sua ecologia, genética, mecanismos bioquímicos, suas interações e seu funcionamento em condições ambientais com múltiplos fatores variáveis (Das e Chandran, 2011; Ghizelini *et al.*, 2012; Duran *et al.*, 2015; Duran e Cravo-Laureau, 2016, Rocha *et al.* 2016).

Em agosto de 2019 ocorreu um derramamento de centenas de toneladas de petróleo, cuja origem ainda é desconhecida, que atingiu uma faixa de 4.334 km da costa brasileira abrangendo 9 estados do Nordeste e 2 estados do Sudeste, 120 municípios, 724 localidades e mais de 40 unidades de conservação sendo considerado o maior derrame de óleo bruto da história do país e um dos mais extensos do mundo, uma vez que mais de 5.000 toneladas de resíduos de óleo foram removidas das áreas atingidas. Diversos ecossistemas tropicais foram afetados como bancos de rodólitos, bancos de gramas marinhas, praias, recifes de corais e em maior extensão os manguezais e estuários, os quais exercem importantes serviços ecossistêmicos como geração de alimento, captura de carbono, regulação do clima, manutenção da biodiversidade e controle de poluição (Brum *et al.*, 2020; Pena *et al.*, 2020; Soares *et al.*, 2020a, Soares *et al.*, 2020b; Ladle, 2020; Magris e Giarrizzo, 2020).

Tendo em vista a extensão do desastre de origem desconhecida, as características físico-químicas do petróleo e seu potencial de causar danos aos ecossistemas costeiros e a saúde humana, é urgente a realização de pesquisas que visem a mitigação dos impactos negativos deste evento. Assim sendo, o isolamento e caracterização de bactérias hidrocarbonoclásticas do sedimento de manguezais

fornece informações cruciais ao entendimento do comportamento da microbiota bacteriana frente a contaminação por petróleo e assim subsidiar a implementação eficiente e segura das técnicas de biorremediação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Estudo de casos de derramamentos de petróleo

A demanda global por combustíveis fósseis, faz com que as empresas do ramo petrolífero aumentem seus investimentos na criação de novos produtos e tecnologias que garantam a extração de petróleo em maior volume e com mais rapidez. Com isso, aumentam também os processos logísticos como carga e descarga, armazenamento, manuseio e transporte, elevando consideravelmente os riscos de acidentes durante esses processos. Já vimos, ao longo da história, vários acidentes com plataformas petrolíferas, navios petroleiros, vazamentos em tubulações e perfurações que resultaram em derramamentos de petróleo e derivados (óleo, diesel e gasolina) nos mares de todo o mundo.

Podemos citar alguns dos maiores derramamentos de petróleo da história, como a explosão e afundamento da plataforma *Deepwater Horizon* em 20 de abril de 2010, no golfo do México. Quase 5 milhões de barris de petróleo foram despejados no oceano. Pallardy (2022).

Exxon Valdez em 23 de março de 1989, que entrou para história como um dos acidentes mais graves e repercutidos. A embarcação americana contaminou aproximadamente 1.300 milhas da costa de um litoral intocado, matando milhares de aves e animais marinhos. Editores, History.com (2018)

No Brasil, tivemos alguns acidentes envolvendo derramamento petróleo que são de grande relevância por seu forte impacto ambiental, na vida humana, na economia e etc. Temos como primeiro registro o acidente com o navio *Sinclair Petrolore* em 6 de dezembro de 1960, onde estima-se que o vazamento foi de 60 milhões de litros de óleo cru, logo depois de ter explodido e afundado próximo da Ilha

de Trindade (ES). Não existem dados sobre o comportamento da mancha de óleo nem sobre áreas afetadas. Zacharias e Fornaro (2020).

No ano 2000 o rompimento do oleoduto na Baía da Guanabara, entre a Refinaria Duque de Caxias e o Terminal da Ilha d'Água, vazando cerca 1.300 m³ de óleo combustível marítimo, contaminando praias, costões, manguezais e unidades de conservação. Houve uma grande perda da biodiversidade local e impactos negativos nas atividades de pesca e turismo. Leite (2019).

De acordo com a ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e biocombustíveis), em 15 de março de 2001, a plataforma P-36, que operava no campo de Roncador, na Bacia de Campos, sofreu duas explosões causando a morte de 11 trabalhadores que faziam parte da brigada de incêndio da unidade. Na época do acidente, a plataforma P-36 tinha estocado cerca de 1.200 m³ de óleo diesel e 350 m³ de petróleo bruto. Com o afundamento da mesma, esses fluidos vazaram no oceano, a aproximadamente 150 km da costa.

Em agosto de 2019, a costa brasileira foi afetada por um derramamento de óleo que atingiu, até março de 2020, segundo o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), um total de 1.009 localidades em 130 municípios, numa área que vai do Maranhão até o litoral norte do Rio de Janeiro. Estima-se que o volume derramado foi entre 5 e 12,5 milhões de litros de óleo.

2.2 Intemperismo do petróleo

Quando o petróleo e seus derivados são lançados no mar, ele sofre imediatamente intemperismo por ações físicas, químicas e biológicas que combinadas, alteram as características originais do produto derramado. A velocidade desse processo varia de acordo o tipo de contaminante, das correntes marítimas e as condições climáticas do local.

De acordo com a Marinha do Brasil, IBAMA e CETESB, o processo de intemperismo está dividido em oito etapas:

- **Espalhamento** - fase inicial logo após o derramamento que dá origem à mancha de óleo. Viscosidade e tensão superficial são fatores que influenciam no processo assim como as condições ambientais. O espalhamento é um processo físico que precede a ocorrência dos outros processos, que irão promover a dissipação da mancha oleosa.
- **Evaporação** - passagem dos compostos leves e médios do óleo da fase líquida para a atmosfera, auxiliada pela taxa de espalhamento, volatilidade do óleo, por condições marítimas e do clima. Essa fase ocorre imediatamente após os primeiros dias de um derrame.
- **Dispersão** - quando a mancha de óleo se torna muito fina, fragmenta-se em manchas menores que permanecem suspensas na coluna d'água disponíveis para que outros processos naturais ocorram. Depois da evaporação, é o processo mais contribui para o desaparecimento de uma mancha.
- **Emulsificação** – também conhecida como “*mousse*” é o processo de mistura de dois fluídos imiscíveis (óleo e água), ela ocorre pela mistura física causada pela agitação na superfície do mar fazendo com que gotas de água fiquem suspensas no óleo. É normalmente muito viscosa e mais persistente do que o produto original. Além de dificultar a ação de outros processos intempéricos ela também aumenta a permanência da mancha de óleo e causa um aumento expressivo no seu volume.
- **Dissolução** – separação de substâncias presentes no óleo entre as fases oleosa e aquosa. Esta fase depende da composição do óleo, temperatura, composição química da água, do grau de espalhamento da mancha e a taxa de dispersão. É um dos processos de menor relevância, pois os poucos compostos que são solúveis em água tendem a evaporar antes de se dissolverem.
- **Oxidação** - A fase da oxidação depende principalmente da composição inicial do petróleo e de reações influenciadas pela exposição à luz solar (reações fotoquímicas). Os produtos da oxidação são mais solúveis em água e tendem a ser mais tóxicos que os presentes no óleo cru. A

formação de resíduos como as bolas de piche encontradas nas praias são exemplos típicos deste processo.

- **Afundamento ou sedimentação** - O processo de sedimentação depende da adesão do óleo ao material particulado em suspensão. Como poucos derivados do petróleo possuem densidade maior que a da água do mar (de 1,017 g/cm³ até 1,030 g/cm³), poucos compostos sedimentariam de forma natural sem que estivessem aderidos ao material suspenso.
- **Biodegradação** - consiste na degradação do óleo pela ação de bactérias e outros organismos presentes no ambiente, principalmente na interface óleo-água. Fatores como o tipo de produto derramado, solubilidade em água, temperatura, teor de oxigênio e disponibilidade de nutrientes, serão determinantes para o sucesso da biodegradação.

2.3 Manguezais

Manguezais são ecossistemas costeiros localizados em regiões tropicais e subtropicais, os quais desempenham papéis importantes na ciclagem de nutrientes e energia, exportação de matéria orgânica para estuários e formações costeiras, refúgio para animais marinhos e terrestres, bem como abrigo e viveiro natural para numerosos organismos aquáticos. Essa característica tem garantido seu uso na pesca e no cultivo de espécies economicamente importantes (Ghizelini *et al.*, 2012; ICMBIO, 2018). O valor estimado dos serviços e bens ecossistêmicos proporcionados pelos manguezais, nos países em desenvolvimento, varia entre 33.000 e 57.000 dólares por ha/ano, com variações entre regiões e tipos de serviços (ICMBIO, 2018).

As florestas de manguezais desempenham um papel importante para o ecossistema como filtros biológicos, absorvendo parte dos nutrientes dos esgotos que são lançados nos rios, diminuindo o volume de matéria orgânica no mesmo. Movimenta a economia local da população que sobrevive da pesca e coleta dos animais que vivem ali como caranguejos, camarões e peixes. Várias espécies de animais passam seus primeiros estágios de vida nos manguezais que servem como

berçários para muitas espécies de crustáceos, peixes, aves e mamíferos por oferecerem condições ideais e alimento. É um ótimo indicador do aquecimento global por absorver carbono da atmosfera e também protege as áreas costeiras da erosão (ICMBIO, 2018).

Além do impacto humano sobre os manguezais como poluição por esgotos, resíduos sólidos, perda e fragmentação da cobertura vegetal para construções irregulares, os manguezais também são fortemente impactados por derramamentos de petróleo e derivados. Esse tipo de contaminante pode causar morte, alterações genéticas e fisiológicas em animais e plantas pertencentes a esse ecossistema, a depender do tipo de contaminante e do tempo de exposição (Haider *et al.*, 2021).

Os impactos causados pelos derramamentos de poluentes nos mares e mangues de todo o mundo causam grandes prejuízos aos animais e plantas que vivem nesses ecossistemas. Embora hoje em dia tenhamos acesso a informações relevantes sobre os efeitos toxicológicos dos componentes individuais do petróleo, ainda há uma carência de informações sobre as interações entre hidrocarbonetos e outras classes de poluentes e qual o impacto deles sobre as plantas, os animais e as pessoas que se alimentam deles.

Sabemos que os manguezais são poluídos por esgotos, metais pesados, plásticos e outros resíduos orgânicos, dessa forma, não temos um referencial de mangue saudável, despoluído.

2.4 Microbiota de Manguezal

Em vários ecossistemas existem comunidades de micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos, os quais são denominados de micro-organismos hidrocarbonoclásticos. Em ecossistemas não impactados pela presença de hidrocarbonetos, os microrganismos hidrocarbonoclásticos constituem menos de 1% da comunidade microbiana, mas, em ecossistemas impactados, podem chegar a constituir 100% da comunidade, mostrando que a quantidade de micro-organismos

que utilizam hidrocarbonetos como fonte de carbono é proporcional a disponibilidade deste recurso no ambiente (Machado *et al.*, 2016).

Dentre os micro-organismos presentes no sedimento de mangue, as bactérias ocupam uma variedade maior de nichos, sendo fundamentais para os ciclos biogeoquímicos e transformações de muitos nutrientes. Sendo assim, o papel chave no fluxo de carbono e nitrogênio, bem como na detoxificação do sedimento de mangue, o que torna as bactérias excelentes candidatas para biorremediação de hidrocarbonetos (Ghizelini *et al.* 2012; Abatenh *et al.* 2017).

As bactérias presentes nos manguezais têm despertado o interesse da comunidade científica pelo seu grande potencial biotecnológico. Algumas delas podem degradar vários tipos de contaminantes diferentes e produzir enzimas como amilases e proteases. Essas enzimas tem uma grande aplicabilidade nos setores econômicos como as indústrias, por aumentarem a velocidade das reações químicas de interesse (Dias *et al.*, 2009).

No ambiente marinho, podemos destacar algumas bactérias com potencial para a degradação de petróleo como a *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Corineformes*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *actinomicetos*, *Nocardia*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*.

Além disso, algumas espécies de fungos, incluindo *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* e *Penicilium* também são microrganismos que degradam petróleo. São amplamente distribuídas em ambientes terrestres, costeiros e oceânicos, podendo degradar vários poluentes ambientais, incluindo alcanos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos dentre outros. Xue, *et al.*, (2015).

2.5 Técnicas de remediação

Diante de desastres com derramamentos de petróleo e derivados, as técnicas de limpeza usadas inicialmente consistem da remoção manual da substância por agentes de limpeza e voluntários, uso de tratores e outros veículos pesados para

facilitar na remoção e transporte dessas substâncias, dispositivos mecânicos como bombas, sistemas de vácuo, cilindros rotatórios que, combinados a um sistema de contenção, promovem o controle e a remoção da mancha, a absorção e adsorção do óleo com o uso de absorventes que podem se apresentar na forma granulada ou envolvida em tecidos porosos, boias de contenção para evitar o espalhamento da mancha de óleo e conduzi-la à locais específicos onde não causem tantos danos. Existe também os dispersantes químicos, a queima *in situ*, o jateamento de costões rochosos, corte de vegetação, dentre vários outros métodos. O que definirá a técnica a ser utilizada ou o conjunto delas, será o tipo de contaminante, o ambiente afetado, o tempo de contaminação, etc. (Lopes, 2007).

2.6 Técnicas de biorremediação

A transformação química abiótica envolve reações que não são iniciadas por microrganismos, diminuem as concentrações de contaminantes ao degradar os produtos químicos em produtos mais simples, já a transformação química biótica envolve biodegradação e biotransformação. Os processos químicos podem ocorrer em condições anaeróbicas e aeróbicas. A maior parte da degradação dos contaminantes de hidrocarbonetos de petróleo é iniciada em condições aeróbicas quimiotróficas, tendo na atividade intracelular inicial uma reação oxidativa catalisada por enzimas como oxigenases e peroxidases, onde as vias de degradação convertem os contaminantes de hidrocarbonetos de petróleo em produtos intermediários (Maletic *et al.*, 2011).

Métodos de remediação biológica tem sido amplamente utilizados por serem capazes de remediar ou degradar hidrocarbonetos de petróleo e diversos contaminantes orgânicos. Este é um método fácil, barato e sustentável para restauração e limpeza de contaminantes nos ecossistemas. O processo a ser utilizado irá depender de uma análise prévia da área e do tipo de contaminante ali presente.

Bioatenuação é uma biorremediação que usa processos naturais, incluindo uma variedade de processos físico-químicos para neutralizar e reduzir a massa, volume e toxicidade do contaminante (Santos *et al.*, 2008).

Bioestimulação é a adição de quaisquer materiais estimuladores, aditivos de nutrientes, biossurfactantes de liberação lenta para aumentar e apoiar o crescimento microbiano e as atividades enzimáticas dos microrganismos no local contaminado onde irá ocorrer a remediação (Rocha e Alves, 2013).

Bioaumentação é o processo que envolve a introdução de culturas microbianas selecionadas, cultivadas e adaptadas ao poluente alvo com atividade catabólica específica que se adaptam e degradam o contaminante ou aumentam a sua taxa de degradação (Cruz, 2017).

Nos processos de biotransformação estão envolvidas várias modificações estruturais nos componentes químicos auxiliados por bactérias, fungos e leveduras, que através dos processos de oxidação, redução e condensações, transformam compostos orgânicos em substâncias menos tóxicas ao meio ambiente (Ossai *et al.*, 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição do local de coleta

A área selecionada para a coleta foi a Praia de Suape, situada a aproximadamente 48 km do Recife, no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. Localização do Google Earth 8°21'21.4"S34°57'20.1"W, folha SC.25-V-A-III-3-NO (SUDENE, 2010). Fica entre a Praia do Paraíso e o Rio Massangana (figura 1A), próximo ao complexo industrial Portuário de Suape e por trás do hotel vila galé. É cercada por mata nativa preservada e possui uma extensa área de mangue e restinga. Esta área foi bastante atingida pelo derramamento de petróleo bruto ocorrido em 2019 nas praias do Nordeste, figura 1B e 1C.



Figura 1 . Localização da área - imagem do Google Earth (A); boias de contenção, próximas a área de coleta, utilizadas para evitar o avanço do óleo (B); voluntários retirando petróleo do mangue em Suape, no Cabo de Santo Agostinho (C) - Fonte: matéria do G1 PE/T TV Globo (Foto: Beatriz Castro/TV Globo).

3.2 Coleta de Sedimento

Na área escolhida para coleta, foram selecionados 5 pontos aleatórios, denominados P1, P2, P3, P4 e P5 (figura 2A), com coordenadas determinadas por meio de GPS e especificadas na tabela 1. De cada ponto foram retiradas amostras de aproximadamente 200g de sedimento, com 5 cm de profundidade, em maré baixa, período seco, do manguezal contaminado com petróleo bruto (figura 2B). As amostras de sedimento foram armazenadas em frascos de vidro, previamente esterilizados, e estocados em caixa de isopor com gelo e transportados ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental – LAMAA do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As análises microbiológicas foram realizadas dentro de 48h após a coleta. Os parâmetros físico-químicos pH, temperatura, salinidade e condutividade também foram determinados no sedimento.



Figura 2. Pontos de coleta - imagem do Google Earth (A); Coleta do sedimento (B).

Tabela 1. Coordenadas das amostras de sedimentos retirados em cada ponto.

| Amostra | Coordenadas |
|---------|------------------------|
| P1 | 8°21'37''S 34°57'42''W |
| P2 | 8°21'37''S 34°57'42''W |
| P3 | 8°21'36''S 34°57'42''W |
| P4 | 8°21'36''S 34°57'43''W |
| P5 | 8°21'36''S 34°57'44''W |

3.3 Análises físico-químicas do sedimento

A temperatura foi aferida *in situ* usando termômetro de solo. Para a determinação do pH, 10 g do sedimento foi diluído em água destilada na proporção 1:2,5 e agitado vigorosamente por 1 minuto e em seguida a mistura ficou em repouso por mais 30 minutos. Logo depois o pH foi determinado em um pHmetro de bancada *ORION* 310. Da mesma forma, na determinação da condutividade, 10 g do sedimento foi diluído em água deionizada na proporção 1:2,5 e agitado vigorosamente por 1 minuto e em seguida a mistura foi deixada em repouso por 30 minutos. Logo após o sobrenadante foi filtrado e a condutividade/salinidade foi aferida em condutímetro de bancada *JENWAY* modelo 4520.

3.4 Contagem das Bactérias Heterotróficas Totais

A contagem das bactérias heterotróficas totais foi determinada pela técnica *spread plate* de acordo com Chikere *et al.*, (2009), Vieira e Nahas (2000) e Li *et al.*, (2000) modificado. Assim, 10 g de uma amostra composta de sedimento (formada por subamostras dos 5 pontos coletados) foi adicionado em 90 ml de água destilada estéril e agitada por 1 minuto, seguida de diluição seriada até a diluição 10^{-6} . Em seguida, as diluições foram inoculadas em duplicata em meio de cultura ágar nutriente (AN) e incubadas a 30 °C por 24 h a 48 h para contagem de bactérias heterotróficas totais.

3.5 Determinação das Bactérias Hidrocarbonoclasticas

A determinação das bactérias hidrocarbonoclasticas foram realizadas de acordo com Chaerun *et al.*, (2004) e Fioravanti *et al.*, (2012) modificado. Em três frascos *Erlenmeyer* de 250 ml contendo 99 ml de meio mineral BH (*Buschnell Haas*), foram adicionados 10 g de uma amostra composta (mistura de sedimento dos 5 pontos coletados), seguida de 1 % de petróleo, óleo diesel e gasolina como única fonte de carbono e energia para crescimento das bactérias (figura 3). Para o controle foi utilizado um frasco sem adição da fonte de carbono durante o período de enriquecimento. Os frascos foram submetidos à agitação em *shaker* rotativo a 180 rpm e 28 °C. Após 8 dias de enriquecimento uma alíquota de 1 ml da amostra foi semeada, em duplicata, em placas de petri com meio BH sólido. As fontes de carbono e energia (petróleo, gasolina e diesel) foram adicionadas sobre a amostra semeada, com exceção da gasolina que foi adicionada na tampa da placa. Em seguida foram incubadas a 30 °C durante 4 dias para o crescimento das bactérias hidrocarbonoclasticas. O controle correspondeu a placas sem a adição das fontes de carbono. Após o período de crescimento nas placas de BH sólido, os microrganismos com características semelhantes às bactérias foram transferidos para placas contendo meio TSA (*Tryptic Soy Agar*).



Figura 3. Amostras compostas de sedimento do mangue contaminado com petróleo sendo adicionadas ao meio BH (Buschnell Haas) para isolamento das bactérias hidrocarbonoclásticas.

3.6 Caracterização macro e micromorfológica das Bactérias

Logo após o isolamento, as colônias das bactérias heterotróficas em AN e das hidrocarbonoclásticas em BH sólido, foram submetidas a análise macro e micromorfológica. Os aspectos macromorfológicos tamanho, cor, forma, estrutura, borda, elevação e brilho das colônias crescidas foram analisados, e uma colônia de cada um dos morfotipos diferentes foi selecionada. As colônias selecionadas foram isoladas e purificadas através de repicagens sucessivas por meio da técnica de esgotamento. Em seguida, foram submetidas ao teste de coloração de Gram, para determinação da morfologia, arranjo e tipo de coloração - Gram positiva ou negativa.

3.7 Meio de manutenção das bactérias

Os isolados foram mantidos em tubos contendo meio TSA (*trypticase soy agar*) a 4 °C, e repicados a cada 30 dias.

3.8 Preparo dos microrganismos para os ensaios

Antes dos ensaios, foram feitos repiques estriados dos isolados em placas de Petri contendo meio TSA, 24 horas antes dos procedimentos e mantidas a 30 °C, para que ativassem seu metabolismo.

3.9 Ensaio de degradação com óleo diesel, gasolina e querosene

O ensaio de seleção para verificar o potencial de degradação dos derivados de petróleo (gasolina, diesel e querosene) pelas bactérias hidrocarbonoclasticas isoladas, foi realizado utilizando-se o indicador redox 2,6- diclorofenol indofenol – DCPIP, segundo Hanson *et al.* (1993) modificado. O teste foi realizado em tubos de ensaio, em triplicata, contendo 4,0 ml de meio de cultivo BH, 80 µl do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol, 40 µl de gasolina, querosene e óleo diesel estéril respectivamente, 200 µl de suspensão bacteriana padronizada em 0,5 da escala de MacFarland ($\lambda = 625 \text{ nm}$). Os tubos de ensaio foram mantidos a 30 °C e 180 rpm e observados por um período de 6 dias para o diesel e 9 dias para a gasolina e o querosene. Como controles foram usados dois tubos, um com todos os componentes e sem a suspensão bacteriana e outro com glicose a 2 % substituindo o óleo diesel, a gasolina e o querosene. As leituras foram feitas utilizando espectrofotômetro ($\lambda = 600 \text{ nm}$) ao final do experimento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise físico-química do sedimento

Os resultados dos parâmetros físico-químicos mensurados em cada amostra coletada dos 5 pontos são expressos na tabela 2. Pode-se observar uma pequena variação de temperatura da água intersticial entre os 5 pontos. Já o pH permaneceu próximo da neutralidade variando de 6,77 a 7,74 e a salinidade apresentou variação de 4 a 5,4 ‰. Os valores de pH do sedimento situam-se entre 7 e 8 nas profundidades de 0 a 5 cm, tendendo a alcalinidade com o aumento da profundidade (Berrêdo, 2003).

Berrêdo *et al.* 2008, relataram variação de pH de 5,74 a 7,9. Já a temperatura está diretamente relacionada a temperatura da água sendo compatível com o tempo na data da coleta. Berrêdo *et al.* 2008, observaram valores de temperatura da água intersticial de 29 °C no período seco, sendo muito próximo do valor obtido neste trabalho. Por outro lado, a salinidade está bem abaixo dos valores obtidos por Bernini

et al. (2006) que relataram uma variação de 9 a 30 ‰. No entanto, Berrêdo *et al.* 2008, obtiveram variação de salinidade de 2,5 a 29 ‰.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos das amostras dos sedimentos coletados nos pontos escolhidos.

| Amostra | Temperatura (°C) | pH | Salinidade (‰) |
|---------|------------------|------|----------------|
| P1 | 29 | 7,74 | 4,0 |
| P2 | 28 | 7,55 | 5,3 |
| P3 | 29 | 6,77 | 4,3 |
| P4 | 30 | 7,17 | 5,4 |
| P5 | 30 | 7,73 | 4,9 |

4.2 Densidade e análise morfológica das bactérias heterotróficas

Após o período de incubação, obtivemos na diluição 10^{-4} , um total de 64 colônias, as quais foram agrupadas em 15 isolados diferentes com base nas suas características macroscópicas (figura 4A). O isolado 1, mais frequente, apresentou cor bege, tamanho pequeno, forma circular, bordos lisos, de aspecto leitoso e opaco. (figura 4B).

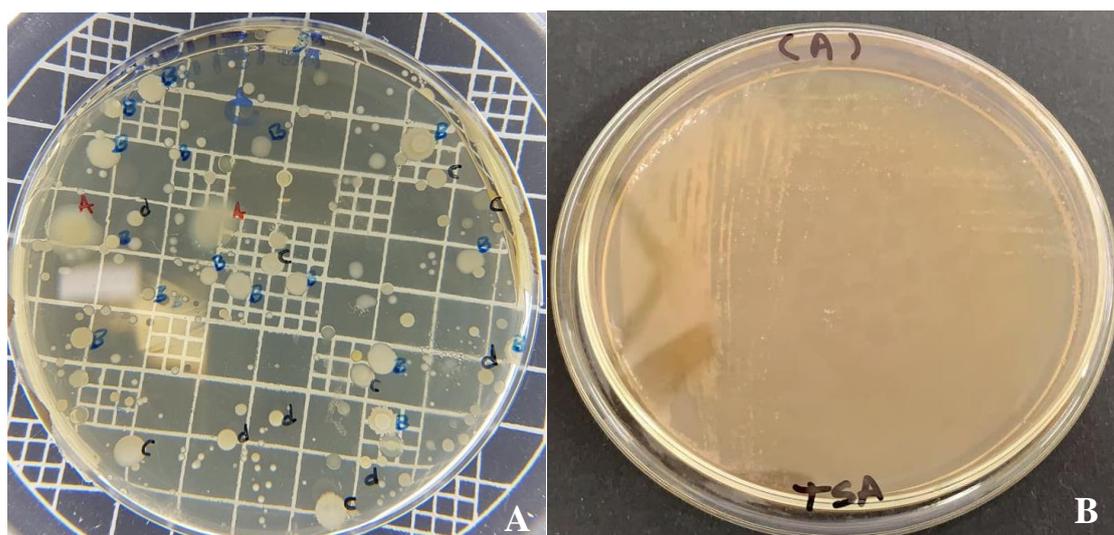


Figura 4. Diversidade de colônias bacterianas visualizadas em placa de Petri sobre um contador de colônias (A); Colônias purificadas do isolado 1 com apresentando cor bege, tamanho pequeno, forma circular, bordos lisos, de aspecto leitoso e opaco (B).

Por outro lado, as características microscópicas e quantitativas dos 15 isolados obtidos do sedimento contaminado por petróleo são apresentadas na tabela 3. Pode-se observar que o isolado 1 foi o mais frequente, seguido do isolado 4, representando 40,6 % e 23,4 % do total de isolados obtidos, respectivamente. Destaca-se ainda que a morfologia e o tipo de coloração de Gram prevalente entre os isolados foi o bacilo Gram negativo (figura 5).

Chinellato (2017), relatou maior densidade total de bactérias heterotróficas, com média total de $1,34 \times 10^4$ UFC/g, em mangue do estuário de Santos, contaminado por hidrocarbonetos e espumas para controle de incêndio. Todos os isolados de bactérias heterotróficas, obtidos neste trabalho, apresentaram maior densidade. A presença de poluentes orgânicos pode aumentar a densidade e ou diversidade, ou causar um efeito contrário, devido a um efeito tóxico, causar a diminuição da densidade e ou diversidade bacteriana heterotrófica.

Ramsay *et al.* (2000) observaram que em sedimentos de manguezais contaminados ocorria um aumento na densidade de bactérias de 10^3 para $10^4 - 10^6$ UFC/g. Assim, as densidades de bactérias heterotróficas observadas neste estudo sugerem a presença de contaminantes orgânicos. Todavia, seria necessário a detecção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) no sedimento para estabelecer uma relação de causa e efeito. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de a poluição por esgoto ter influenciado nestes resultados.

Tabela 3. Características microscópicas, densidade e frequência relativa dos isolados de bactérias heterotróficas obtidas do sedimento do manguezal do Cabo de Santo Agostinho contaminado por petróleo.

| Isolados | Gram/Arranjo/Morfologia | UFC/g | Frequência relativa |
|-----------------|--------------------------------|-------------------|----------------------------|
| Isolado 1 | Bacilo Gram Negativo | $2,6 \times 10^6$ | 40,6% |
| Isolado 2 | Bacilo Gram negativo | 3×10^5 | 4,6% |
| Isolado 3 | Bacilo Gram negativo | 5×10^5 | 7,8% |
| Isolado 4 | Bacilo Gram negativo | $1,5 \times 10^6$ | 23,4% |
| Isolado 5 | Bacilo Gram negativo | 2×10^5 | 3,1% |
| Isolado 6 | Bacilo Gram negativo | 2×10^5 | 3,1% |
| Isolado 7 | Bacilo Gram negativo | 1×10^5 | 1,5% |

| | | | |
|------------|------------------------------|-----------------|------|
| Isolado 8 | Bacilo Gram negativo | 1×10^5 | 1,5% |
| Isolado 9 | Estreptobacilo Gram Negativo | 1×10^5 | 1,5% |
| Isolado 10 | Estreptobacilo Gram Negativo | 1×10^5 | 1,5% |
| Isolado 11 | Diplobacilo Gram Negativo | 1×10^5 | 1,5% |
| Isolado 12 | Bacilo Gram Negativo | 1×10^5 | 1,5% |
| Isolado 13 | Bacilo Gram negativo | 1×10^5 | 1,5% |
| Isolado 14 | Coco Gram Negativo | 2×10^5 | 3,1% |
| Isolado 15 | Bacilo Gram negativo | 2×10^5 | 3,1% |

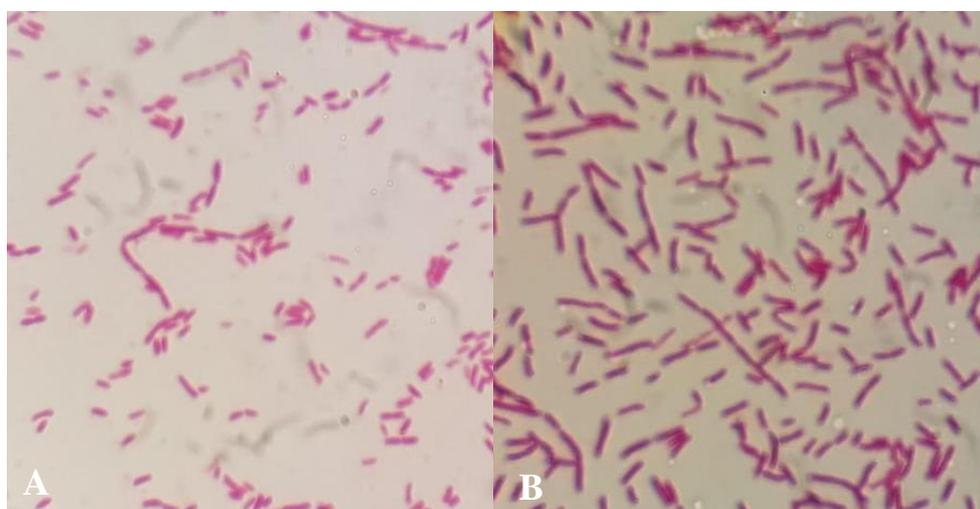


Figura 5. Morfologia e coloração de Gram dos isolados de bactérias mais frequentes. Isolado 1 - bacilo Gram negativo (A). Isolado 4 - bacilo Gram negativo (B). Ampliação: 2000 X (A) e (B).

4.3 Determinação e análise morfológica das bactérias hidrocarbonoclásticas

Após o término do período de incubação foram observadas mudanças no aspecto macroscópico do meio de enriquecimento. Todos os frascos estavam homogêneos, porém apresentando coloração marrom um pouco mais clara que a inicial. Além disso, foi observado o crescimento de microrganismos que aderiram a parede do *Erlenmeyer* com gasolina e no frasco com óleo diesel pode-se observar a formação de uma bola de micélio (figura 6).



Figura 6. Determinação das bactérias hidrocarbonoclásticas de sedimento de mangue em meio BH contendo petróleo, gasolina e óleo diesel. Aspecto macroscópico dos frascos Erlenmeyer prontos para incubação em *shaker* a 180 rpm e 28 °C (A) e após 8 dias de incubação (B).

Com o plaqueamento do meio de enriquecimento na diluição 10^{-2} , em meio BH sólido, foi observado crescimento de micro-organismos com características de bactérias/leveduras e fungos filamentosos conforme a fonte de carbono (figura 7). A placa com óleo diesel (figura 7A) apresentou grande densidade de crescimento microbiano com aspecto pastoso característico de crescimento bacteriano e ou leveduriforme. Adicionalmente, na placa com gasolina (figura 7B), foram observadas incontáveis colônias de aspecto pastoso característico de bactérias e ou leveduras, bem como colônias maiores com características de fungos filamentosos. Por outro lado, na placa com petróleo (figura 7C) foi observado maior número de colônias de fungos filamentosos e menor número de colônias características de bactérias e leveduras.

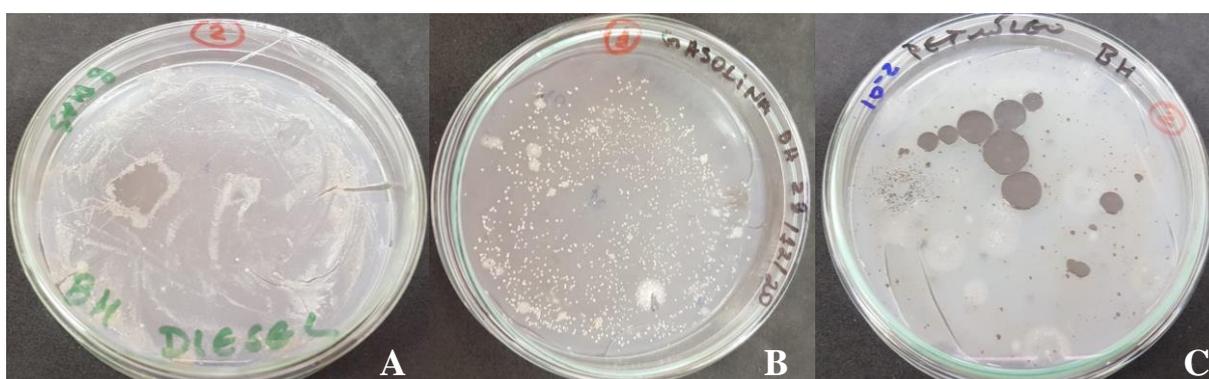


Figura 7. Colônias de micro-organismos hidrocarbonoclásticos de amostras do meio de enriquecimento na diluição 10^{-2} . Placas com meio BH suplementadas com óleo diesel (A), gasolina (B) e petróleo bruto (C) como únicas fontes de carbono.

Por sua vez, após o isolamento das colônias obtidas no meio BH com óleo diesel foram obtidos 13 isolados diferentes de bactérias com base nas suas características macroscópicas. Por sua vez, nas placas com BH suplementado com petróleo foram obtidos apenas 2 isolados de bactérias e na gasolina não foi observado nenhum isolado de bactéria. As colônias crescidas na gasolina foram todas de leveduras e fungos filamentosos que não são objeto deste estudo. Em relação as características microscópicas obtivemos 7 bacilos Gram-negativos, 2 estreptobacilos Gram-negativos, 5 bacilos Gram-positivos e 1 estreptobacilo Gram-positivo. (Tabela 4).

Pereira *et al* (2005), observou em seu estudo com solo de mangue contaminado por *diesel*, que o processo adaptativo é importante para que os microrganismos obtenham sucesso biologicamente, quando expostos aos poluentes. Nestas condições, sobressaíram-se as bactérias Gram-negativas e entre elas o gênero *Pseudomonas*, que conseguiram degradar o óleo e sobreviver às competitividades.

Dorta *et al.* (2020), isolaram 17 cocobacilos Gram negativos de sedimento de Mangue em Santos – SP. Já Catter *et al.* (2007) isolaram 32 cepas, sendo 16 de mangue contaminado com petróleo e 16 de mangue não contaminado sendo 24 Gram negativas e oito Gram positivas, incluindo bastonetes e cocos.

Tabela 4. Características microscópicas dos isolados de bactérias hidrocarbonoclasticas do sedimento do manguezal de acordo com a fonte de carbono (Gasolina, óleo diesel e petróleo bruto).

| Isolados | Gasolina | Diesel | Petróleo | Gram/Arranjo/Morfologia |
|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|--------------------------------|
| Isolado 1 | - | X | - | Bacilo Gram Negativo |
| Isolado 2 | - | X | - | Bacilo Gram Negativo |
| Isolado 3 | - | X | - | Bacilo Gram Negativo |
| Isolado 4 | - | X | - | Estreptobacilo Gram Negativo |
| Isolado 5 | - | X | - | Bacilo Gram Positivo |
| Isolado 6 | - | X | - | Bacilo Gram Negativo |
| Isolado 7 | - | X | - | Estreptobacilo Gram Negativo |
| Isolado 8 | - | X | - | Bacilo Gram Negativo |
| Isolado 9 | - | X | - | Bacilo Gram Negativo |

| | | | | |
|------------|---|---|---|------------------------------|
| Isolado10 | - | X | - | Estreptobacilo Gram Positivo |
| Isolado 11 | - | X | - | Bacilo Gram Positivo |
| Isolado 12 | - | X | - | Bacilo Gram Positivo |
| Isolado 13 | - | X | - | Bacilo Gram Positivo |
| Isolado 14 | - | - | X | Bacilo Gram Positivo |
| Isolado 15 | - | - | X | Bacilo Gram Negativo |

(x) Positivo (-) Negativo

4.4 Potencial de degradação

No teste de potencialidade para degradação, com o uso de óleo diesel, gasolina e querosene a 1 % como fonte de carbono, foram testados os 15 isolados dentre os quais todos eles demonstraram potencial para degradar tais combustíveis.

Verificamos que com 48h após a incubação, já havia mudança na coloração do indicador 2,6 diclorofenol indofenol – DCPIP, tendo o diesel como fonte de carbono.

Após 6 dias o diesel foi degradado completamente, com o DCPIP mudando da cor azul para incolor, conforme a figura 8. No querosene e na gasolina a degradação foi mais lenta, permaneceram em observação por um período de 9 dias, mas não obtiveram resultados tão expressivos. O isolado 15 teve uma melhor degradação no diesel, os isolados 3 e 8 degradaram melhor o querosene e o isolado 7 teve um bom desempenho nas 3 fontes de carbono. Os isolados 1, 2, 8, 9 e 12 não degradaram a gasolina (tabela 5).

No trabalho de Almeida (2012), foi observado que, utilizando a mesma técnica com 2,6 – DCPIP, quatro das cinco linhagens de bactérias testadas em tubos de ensaio, apresentaram mudança na coloração após 2 dias de incubação, incluindo o controle positivo.

Leite (2015), ao testar o crescimento e o potencial de degradação de 18 bactérias isoladas do solo contaminado por petróleo, tendo o diesel como fonte de carbono, obteve resultado positivo em todas elas.

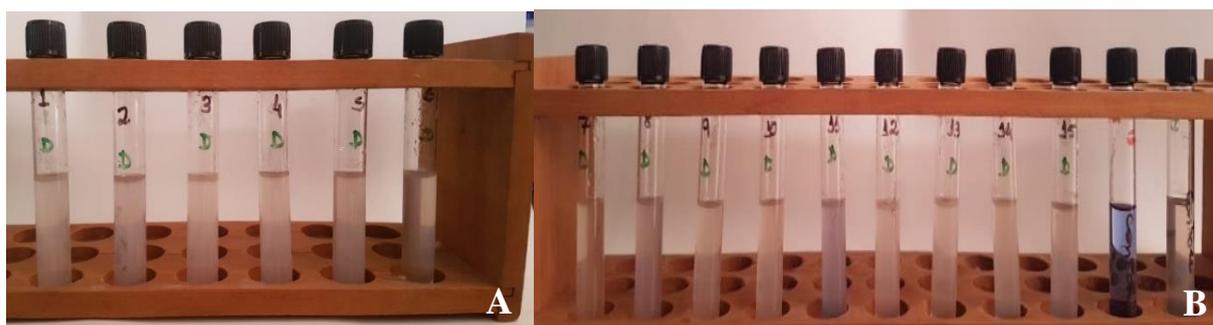


Figura 8. Aparência dos tubos após o período de 6 dias de incubação tendo o óleo diesel como fonte de carbono. Isolados de 1 a 6 (A) e isolados de 7 a 15, seguidos dos controles negativo e positivo (B).

Tabela 5. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias isoladas de sedimento de mangue contaminado de acordo com a fonte de carbono.

| ISOLADOS | DEGRADAÇÃO DIESEL (%) | DEGRADAÇÃO QUEROSENE (%) | DEGRADAÇÃO GASOLINA (%) |
|------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Isolado 1 | 80,58 | 7,6 | 0 |
| Isolado 2 | 67,74 | 5,4 | 0 |
| Isolado 3 | 83,65 | 18 | 8,72 |
| Isolado 4 | 91,25 | 11,6 | 14,17 |
| Isolado 5 | 90,22 | 13 | 22,89 |
| Isolado 6 | 97,38 | 14 | 10,9 |
| Isolado 7 | 96,21 | 12,4 | 38,7 |
| Isolado 8 | 76,50 | 18 | 0 |
| Isolado 9 | 92,85 | 7 | 0 |
| Isolado 10 | 89,93 | 3 | 6 |
| Isolado 11 | 79,28 | 13,4 | 17,44 |
| Isolado 12 | 81,03 | 16,2 | 0 |
| Isolado 13 | 69,64 | 4,6 | 14,99 |
| Isolado 14 | 92,85 | 15,4 | 6,82 |
| Isolado 15 | 98,98 | 3,4 | 28,62 |

5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a maioria dos isolados bacterianos obtidos são de um mesmo grupo morfológico e estrutural, muito incomum, indicando baixa

diversidade. 10 dos 15 isolados hidrocarbonoclásticos foram capazes de degradar óleo diesel, gasolina e querosene, porém apresentaram uma maior afinidade pelo diesel, o que pode indicar uma contaminação por esse combustível na área estudada, sabendo-se que a presença das bactérias hidrocarbonoclásticas estão proporcionalmente ligadas a presença do contaminante. No entanto, em estudos posteriores seria fundamental a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) do sedimento do mangue para confirmação da presença do contaminante e sua influência na densidade e diversidade de bactérias heterotróficas e hidrocarbonoclásticas do sedimento. Outro fator importante a ser levado em consideração é o fato de o mangue estar situado em uma área vulnerável, sujeito a contaminação por diversas substâncias químicas, oriundas das atividades portuárias nessa região.

6 REFERÊNCIAS

- ABATENH E, Gizaw B, Tsegaye Z, Wassie M (2017) The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. **Open J Environ Biol** 2(1): 038-046.
- ALMEIDA, T.C.M. Degradação de óleo diesel e produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de ambientes contaminados por petróleo. 2012. 60 f. Monografia (Ciências biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- BEMFICA, Douglas Alves. Centro de instrução almirante Graça Aranha - ciaga escola de formação de oficiais da marinha mercante - EFOMM. p. 37.
- BERNINI, E.; SILVA, M.M.B; CARMO, T.M.S; CUZZUOL, G.R.F. Composição química do sedimento e de folhas das espécies do manguezal do estuário do Rio São Mateus, Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, V.29, n.4, p.689-699, 2006.
- BERRÊDO, J.F; COSTA, M.L; PROGENE, M.P.S. Efeitos das variações sazonais do clima tropical úmido sobre as águas e sedimentos de manguezais do estuário do rio Marapanim, costa nordeste do Estado do Pará. **Acta Amazonica**, 38(3) 2008: 473 – 482.
- BRADDOCK, J.F e Catterall, P.H. A simple method for enumerating gasoline- and diesel degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, v.3, n.2, p. 81-84, 1999.
- BRUM, H.D., Campo-Silva, J.V., Oliveira, E.G., 2020. Brazil oil spill response: government inaction. **Science**, 367, 155–156.

BUENO, Silvia Messias. BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES: ISOLAMENTO, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO NUM SISTEMA MODELO. p. 99.

BURNS, Kathryn A.; CODI, Susan. Contrasting impacts of localised versus catastrophic oil spills in mangrove sediments. **Mangroves and Salt Marshes**, v. 2, n. 2, p. 63–74, 1998.

CATTER, K. M., *et al.* *Geochim. Brasil.*, 21(1)140 - 150, 2007.

CERQUEIRA, Walter Ramos Pinto; BATISTA, Rayssa Nascimento; SANTOS, Valéria Oliveira dos; *et al.* Registro de petróleo em poríferos e cnidários durante o impacto agudo de derramamento no Nordeste brasileiro em 2019. **Scientia Plena**, v. 16, n. 8, 2020. Disponível em: <<https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/5520>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

COUNCIL, National Research. **Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects**. [s.l.: s.n.], 1985. Disponível em: <<https://nap.nationalacademies.org/catalog/314/oil-in-the-sea-inputs-fates-and-effects>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

CHAERUN, S. K; Tazaki, K; Asada, R; Kogure, K. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria. **Environment International**, v. 30, p. 911-922, 2004.

CHINELLATO, R.A.M, (2017). Diversidade e sucessão bacteriana em sedimentos contaminados por hidrocarbonetos, derivados e por dispersão de espumas para controle de incêndio (AFFF), no Estuário de Santos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências, Brasil.

CHIKERE, C.B., Okpokwasili, G.C. and Chikere, B.O (2009). Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. **African Journal of Biotechnology**, 8, 9: 2535- 2540.

Das, N. and Chandran, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, Article ID 941810, 2011. doi:10.4061/2011/941810.

CRUZ, Geórgia Gomes da. **Tratamento biológico de óleo diesel por consórcio fúngico**. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/28012>>. Acesso em: 28 abr. 2022.

DIAS, Armando C. F.; ANDREOTE, Fernando Dini; DINI-ANDREOTE, Francisco; *et al.* Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305–1311, 2009.

DISNER, Geonildo Rodrigo; TORRES, Mariana. The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 7, n. 15, p. 241–256, 2020.

DORTA, D. G.; Gomes, R. P.; Vieira, M. M.; Vieira, J. D. G. Bactérias isoladas de sedimento de manguezal com potencial de biorremediação de contaminações causadas por produtos derivados de petróleo. **Centro científico conhecer – jandaia-go**, v.17 n.34; p. 68 2020.

EDITORS, History com. **Exxon Valdez Oil Spill**. HISTORY. Disponível em: <<https://www.history.com/topics/1980s/exxon-valdez-oil-spill>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

EFEITOS, Comitê do Conselho Nacional de Pesquisa (EUA) sobre Petróleo no Mar: Insumos, Destinos e. **Petróleo no Mar III**. [s.l.]: National Academies Press (EUA), 2003.

FERREIRA, Antonio. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. Disponível em: <https://www.academia.edu/5159951/Limpeza_de_ambientes_costeiros_brasileiros_contaminados_por_petr%C3%B3leo_uma_revis%C3%A3o>. Acesso em: 15 abr. 2022.

FIORAVANTI, K.L; Celino, J.J; Rossi-Alva, J.C. Isolamento, seleção e identificação de microorganismos degradadores de petróleo e seus derivados em sedimentos de manguezais contaminados. **Cadernos de Geociências**, v. 9, n. 2, 2012.

FONSECA, Juçara Maria Melo da. Catálogo das cartas topográficas do nordeste do Brasil escala 1:25.000 (partes da Paraíba, Pernambuco e Alagoas)/ Juçara Maria Melo da Fonseca, Vandete Elias da Costa e Zenaide de Souza Chaves Mendes.- Recife: SUDENE, 2010.

GHIZELINI et al., 2012. Microbial diversity in brazilian mangrove sediments – a mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, (2012): 1242-1254.

HAIDER, Fasih Ullah; EJAZ, Mukkaram; CHEEMA, Sardar Alam; *et al.* Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts, and remediation strategies. **Environmental Research**, v. 197, p. 111031, 2021.

HANSON, K.G; Desai, G; Desai, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology techniques**, v. 7, n.10, p. 745-748, 1993.

HARAYAMA, S.; KISHIRA, H.; KASAI, Y.; *et al.* Petroleum biodegradation in marine environments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 63–70, 1999.

JUNIOR, Oswaldo Antunes Pedrosa. - Relatório da Comissão de Investigação ANP / DPC - Julho / 200. p. 24.

KENNISH, M.J., ed. (1997) Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution. Boca Raton, USA: CRC Press: 524 pp.

LEITE, Maria Beatriz Ayello. Principais Acidentes com Petróleo e Derivados no Brasil. Disponível em: <https://ambientes.ambientebrasil.com.br/energia/acidentes_ambientais/principais_acidentes_com_petroleo_e_derivados_no_brasil.html>. Acesso em: 2 maio 2022.

LEITE, Giuseppe Gianini Figueirêdo. Produção de ramnolipídeos e degradação de óleo diesel por bactérias isoladas do solo contaminado por petróleo. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LOPES, Carlos Ferreira. Limpeza de ambientes costeiros atingidos por óleo. p. 6.

LUSTOSA, Mayara A.; LÓPEZ, Jorge A.; SANTOS FREIRE, Karla C.; *et al.* Petroleum hydrocarbon degradation by isolated mangrove bacteria. **Revista peruana de Biología**, v. 25, n. 4, p. 441, 2018.

MACHADO, Kátia Maria Gomes; DO NASCIMENTO, Edileine Aparecida; ARAUJO, João Carlos de Souza Batista. APLICAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO NO ESTADO DE SÃO PAULO. **LEOPOLDIANUM**, v. 42, n. 116–8, p. 18–18, 2016.

MALETIĆ, Snežana P.; DALMACIJA, Božo D.; RONČEVIĆ, Srđan D.; *et al.* Impact of hydrocarbon type, concentration and weathering on its biodegradability in soil. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 46, n. 10, p. 1042–1049, 2011.

MANCERA-LÓPEZ, M. E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; *et al.* Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 151–160, 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON OIL IN THE SEA: INPUTS, Fates. **Biological Effects of Oil Releases**. [s.l.]: National Academies Press (US), 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK220710/>>. Acesso em: 16 abr. 2022.

NOERNBERG, Maurício; LANA, Paulo. A sensibilidade de manguezais e marismas a impactos por óleo: fato ou mito? Uma ferramenta para a avaliação da vulnerabilidade de sistemas costeiros a derrames de óleo. **Geografares**, n. 3, 2002. Disponível em: <https://www.academia.edu/14093682/A_sensibilidade_de_manguezais_e_marismas_a_impactos_por_%C3%B3leo_fato_ou_mito_Uma_ferramenta_para_a_avalia%C3%A7%C3%A3o_da_vulnerabilidade_de_sistemas_costeiros_a_derrames_de_%C3>

%B3leo>. Acesso em: 23 abr. 2022.

NORI, Danubia. **Os piratas e a IMO**. NavalUnivali. Disponível em: <<https://navalunivali.wordpress.com/2012/04/25/os-piratas-e-a-imo/>>. Acesso em: 2 maio 2022.

OSSAI, Innocent Chukwunonso; AHMED, Aziz; HASSAN, Auwalu; *et al.* Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 17, p. 100526, 2020.

PALLARDY, Richard. **Derramamento de óleo Deepwater Horizon | Resumo, Efeitos, Causa, Limpeza e Fatos**. Enciclopédia Britânica. Disponível em: <<https://www.britannica.com/event/Deepwater-Horizon-oil-spill>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

Pereira da Silva Beltrão, Eudinice; Edison Lopes, Carlos. Estudo do impacto do óleo diesel em solo domanguezal de Vila Velha-Itamaracá. 2005. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

PIRÔLLO, Maria Paula Santos. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

REED, Mark; JOHANSEN, Øistein; BRANDVIK, Per Johan; *et al.* Oil Spill Modeling towards the Close of the 20th Century: Overview of the State of the Art. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 5, n. 1, p. 3–16, 1999.

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.

ROCHA, Carla Alina; ALVES, Fabiana. Avaliação dos principais micro-organismos e técnicas utilizados na biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. p. 13.

ROCHA, Lidianne Leal. Estudo de comunidades bacterianas de solos do manguezal da Barra Grande, Icapuí-CE e seleção de cepas com potencial de degradar hidrocarbonetos. p. 88, 2008.

SAIFULLAH, S.M; Khan, S.H; Ismail, S. Distribution of nickel in a polluted mangrove habitat of the Indus Delta. **Marine pollution bulletin**. 2002, Vol 44, n 6, pp 570-576.

SANTOS, Edson; UNGARI, Helio Cesar Nascimento; SANTOS, Matilde Barga Dos. Principais técnicas de remediação e gerenciamento de áreas contaminadas por

hidrocarbonetos no estado de São Paulo. p. 129.

SERRA, José. MANUAL DE ORIENTAÇÃO. p. 120.

SILVA, Thamires Maria Brito da; NASCIMENTO, Ariane Maria do; CIDREIRA-NETO, Ivo Raposo Gonçalves; *et al.* Divulgação Científica sobre o derramamento de óleo no litoral do Brasil. **Revista Brasileira de Extensão Universitária**, v. 13, n. 1, p. 63–77, 2022.

Soil Survey Division Staff. "Soil survey manual.1993. Chapter 3 selected chemical properties.". Soil Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 18.

Vanessa Barbosa. **Os 10 maiores acidentes petrolíferos da história**. Exame. Disponível em: <<https://exame.com/mundo/10-maiores-acidentes-petroliferos-historia-556774/>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

VIEIRA, F.C.S.; Nahas, E. (2000). Quantificação de Bactérias Totais e Esporuladas no Solo. *Scientia Agricola*, v.57, n.3, p.539-545.

WALTER V, Sylatk C, Hausmann R. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. *In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2010.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6189/>

WEIMANN, Guilherme. Explosões e naufrágio da plataforma P-36 completam 20 anos - Sindipetro. Disponível em: <<https://sindipetrosp.org.br/explosoes-e-naufragio-da-plataforma-p-36-completam-20-anos/>>. Acesso em: 2 maio 2022.

XUE, Jianliang; YU, Yang; BAI, Yu; *et al.* Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. **Current Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 220–228, 2015.

ZACHARIAS, Daniel Constantino; FORNARO, Adalgiza. Brazilian offshore oil exploration areas: an overview of hydrocarbon pollution. **Revista Ambiente & Água**, v. 15, 2020. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/ambiagua/a/FRyd9HqDKbmdZ8kZTjcgYGr/?lang=en>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

ZACHARIAS, Daniel Constantino; GAMA, Carine Malagolini; FORNARO, Adalgiza. Mysterious oil spill on Brazilian coast: Analysis and estimates. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, p. 112125, 2021.

ZIÓLKOWSKA, A. and Wyszowski, M. Toxicity of petroleum substances to microorganisms and plants. **Ecological Chemistry and Engineering**. Vol. 17, No. 1, 2010.

As frágeis faces dos manguezais. Disponível em:

[caminhos-da-mancha/>](#). Acesso em: 15 abr. 2022.