



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

JÚLIA CINTRA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO COM
MICROALGAS EM ÁGUAS MARINHAS CONTAMINADAS POR
PETRÓLEO**

SALVADOR, 2018

JÚLIA CINTRA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO COM
MICROALGAS EM ÁGUAS MARINHAS CONTAMINADAS POR
PETRÓLEO**

Monografia apresentada ao Curso Graduação em Oceanografia, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia.

Orientadora: Profa. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Ícaro Thiago Andrade Moreira

SALVADOR, 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

JÚLIA CINTRA ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO COM MICROALGAS EM ÁGUAS MARINHAS CONTAMINADAS POR PETRÓLEO

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 13 de dezembro de 2018.

Banca Examinadora:

Ícaro Thiago Andrade Moreira – Coorientador

Doutor em Geologia Ambiental e dos Recursos Hídricos pela Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

Isadora Machado Marques

Engenheira Ambiental pela Universidade Salvador, Salvador, Brasil.

Mailena Silva Dourado

Mestre em Engenharia Industrial pela Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

AGRADECIMENTOS

A meu pai e à minha mãe por serem os melhores pais e por sempre acreditarem em mim, me incentivando e me apoiando em todas as decisões. Obrigada por tudo. Essa conquista é tão minha quanto de vocês.

A meu irmão Lucas pelos inúmeros momentos de risadas e pela paciência que sempre teve comigo, principalmente ao tirar minhas dúvidas.

A minhas primas Dihka e Mel por todo o incentivo dado ao longo desses anos (mesmo que à distância) e por todos os conselhos

A minhas amigas Laysla, Mariana e Maria pelo apoio e pelos momentos de descontração, e Milena por me aturar tanto tempo e aguentar as minhas crises, incertezas e dramas. Obrigada pela amizade durante (e após) essa caminhada.

À professora Olívia, pessoa que tanto admiro e tenho enorme respeito. Obrigada pela confiança, pela oportunidade e pela orientação.

A Ícaro, por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho, pela ajuda durante meus projetos de IC, pela confiança e pela orientação.

A toda a equipe técnica do LEPETRO, principalmente Gi, Juci, Lili, Regina, Sarinha e Marcão, pelo apoio e suporte durante as análises laboratoriais.

Ao Grupo de Pesquisa em Ciências e Tecnologias Ambientais (GTA/UNIFACS) pelo aprendizado compartilhado. Larinha, Gui, Mari, Lessa e Isa, obrigada pela ajuda e companhia nesses últimos meses e por deixarem a rotina laboratorial mais leve.

Ao professor Emerson Sales, por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Bioenergia e Catálise (LABEC) e as cepas de microalgas para a realização do experimento, e Camila e Rodrigo pela ajuda.

Aos professores e colegas do curso de Oceanografia pela troca de conhecimento e experiências durante a minha formação.

Aos membros da Banca Examinadora por terem aceitado o convite para participar da avaliação deste trabalho.

Ao PIBIC, pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

Enfim, a todos que, de alguma forma, me ajudaram a concluir essa etapa da minha vida, muito obrigada!

"The presence of the ocean touches every living thing no matter where it lives. The air we breathe and the water we consume are ultimately linked to the seas... Nowhere is more powerful and unforgiving, yet more beautiful and endlessly fascinating".

(David Attenborough)

RESUMO

A ocorrência de acidentes no ambiente marinho causa impactos à biota e à saúde humana, uma vez que o óleo pode chegar à zona costeira. Os poluentes orgânicos podem ser degradados por alguns organismos, mas a maioria dos estudos está relacionada ao papel das bactérias e dos fungos nesse processo. Portanto, é importante avaliar a possibilidade de utilizar outros organismos, como as microalgas, na degradação destes poluentes. Considerando a vulnerabilidade do ambiente marinho, este trabalho tem como objetivo avaliar a biodegradação do petróleo em águas marinhas contaminadas por petróleo utilizando a *Nannochloropsis oculata*. O experimento foi realizado utilizando reatores de 1L e dividido em quatro tempos. Cada reator continha 800mL de água marinha natural e 80mL de cepas microalgais, variando a concentração de óleo. As análises dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) foram realizadas através da extração líquido-líquido, enquanto que a estimativa da densidade celular foi feita através da câmara de Neubauer. Os valores de HTP variaram de 5.932 a 9.881mg L⁻¹ para C1 e entre 11.226 e 17.888mg L⁻¹ para C2. Os valores para ambas as concentrações diminuíram ao longo do tempo, o que indica que a capacidade de degradação da microalga. Os valores de MCNR variaram de 2.334 a 4.986mg L⁻¹ e de 5.591 a 9.641mg L⁻¹ para C1 e C2, respectivamente. A redução nos valores de MCNR pode indicar que as microalgas possuem rotas metabólicas mais complexas em comparação às bactérias, sendo capazes de degradar compostos não-resolvidos. Os valores de pristano, fitano e da razão pristano/fitano diminuíram e as razões P/n-C₁₇ e F/n-C₁₈ apresentaram valores menores que 1, indicando a ocorrência de óleo degradado. Para a curva C0 (água marinha natural e microalga), o número de células variou entre 2,83 x 10⁴ e 6,87 x 10⁴ cél mL⁻¹. Para C1, os valores variaram entre 2,7 x 10⁴ e 7,1 x 10⁴; e para C2, os valores variaram entre 1,5 x 10⁴ e 5,6 x 10⁴ cél mL⁻¹. O experimento com concentração C1 apresentou os maiores valores de células de microalgas, enquanto que o crescimento com concentração C2 apresentou os menores valores no início. Portanto, a microalga mostrou-se capaz de degradar alguns compostos do petróleo e de crescer na presença do petróleo. Por ser um trabalho pioneiro, este estudo é relevante nesse segmento e pode auxiliar como base para trabalhos futuros.

Palavras chave: Microalgas. Biorremediação. Petróleo.

ABSTRACT

The occurrence of accidents on marine environment causes impacts to both biota and human health, since the oil can reach the coastal zone. Organic pollutants can be degraded by some organisms but the majority of studies are focused on the function of bacteria and fungi in this process. Therefore, it is important to assess the possibility of using other organisms, like microalgae, to degrade pollutants. Considering the vulnerability of marine environments to the occurrence of oil spills, this work aims to evaluate the biodegradation of petroleum in contaminated marine waters using *Nannochloropsis oculata*. The experiment was performed in 1L reactors and divided into four times. Each reactor contained 800mL of natural seawater and 80mL of microalgal strain, varying the concentration of oil. Analysis for total petroleum hydrocarbons (TPH) were done by liquid-liquid extraction, while the estimative of cell density was done using Neubauer chamber. TPH values ranged from 5,932 to 9,881mg L⁻¹ for C1 and between 11,226 and 17,888mg L⁻¹ for C2. Values for both concentrations decreased over time, which indicates that the microalgae are capable to degrade hydrocarbons. UCM values ranged from 2,334 to 4,986 mg L⁻¹ and from 5,591 to 9,641mg L⁻¹ to C1 and C2, respectively. The decrease in values for UCM can indicate that microalgae have more complex metabolic routes when compared with bacteria, being able to biodegrade unresolved and recalcitrant compounds. In general, values for pristane and phytane and for the pristane/phytane ratio decreased. The P/n-C₁₇ and F/n-C₁₈ ratios were generally lower than 1, indicating the occurrence of degraded oil. For curve C0 (natural seawater and microalgae), the cell values ranged from 2,83 x 10⁴ e 6,87 x 10⁴ cells per mL. For curve C1, the values varied between 2,7 x 10⁴ e 7,1 x 10⁴; and for curve C2 values ranged from 1,5 x 10⁴ e 5,6 x 10⁴ cells per mL. In general, the experiment with C1 concentration presented the highest value of microalgae cells, while growth in the experiment with C2 concentration presented the lowest value at the beginning. It can be concluded that the microalga presented the ability to degrade some of the petroleum compounds and was able to develop even in the presence of petroleum. For being a pioneer work, this study is relevant in this area and can serve as a basis for future studies.

Keywords: Microalgae. Bioremediation. Petroleum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processos intempéricos sofridos pelo petróleo no ambiente aquático.....	23
Figura 2 - Desenho experimental.	36
Figura 3 - Coleta de água salina.....	37
Figura 4 - Filtração da água salina em laboratório.....	38
Figura 5 - Adição das cepas de microalgas em erlenmeyer com petróleo e água salina.	39
Figura 6 - Estante com os fotobiorreatores do experimento.	40
Figura 7 - Concentrações médias de HTP (mg L^{-1}) do experimento controle.....	43
Figura 8 - Concentrações médias de MCNR (mg L^{-1}) do experimento controle.	43
Figura 9 - Concentrações médias de HTP (mg L^{-1}) para as concentrações C1 e C2.....	46
Figura 10 - Concentrações médias de MCNR (mg L^{-1}) para as concentrações C1 e C2.....	47
Figura 11 - Concentrações de n-alcenos de baixo peso molecular (BPM) no início e final do experimento para as concentrações C1 e C2 em mg L^{-1}	50
Figura 12 - Concentrações de n-alcenos de alto peso molecular (APM) no início e final do experimento para as concentrações C1 e C2 em mg L^{-1}	50
Figura 13 - Degradação de n-alcenos totais (%) para as concentrações C1 e C2.....	51
Figura 14 - Valores da contagem de células utilizando câmara de Neubauer.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos utilizando microalgas para biorremediação e/ou biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo.....	32
Tabela 2 - Valores de pristano, fitano e razões pristano/fitano, pristano/n-C ₁₇ e fitano/n-C ₁₈ para CT1 em mg L ⁻¹	45
Tabela 3 - Valores de pristano, fitano e razões pristano/fitano, pristano/n-C ₁₇ e fitano/n-C ₁₈ para CT2 em mg L ⁻¹	45
Tabela 4 - Valores médios de pristano, fitano e razões pristano/fitano, pristano/n-C ₁₇ e fitano/n-C ₁₈ para C1 em mg L ⁻¹	48
Tabela 5 - Valores médios de pristano, fitano e razões pristano/fitano, pristano/n-C ₁₇ e fitano/n-C ₁₈ para C2 em mg L ⁻¹	48

LISTA DE ABREVIATURAS

APM	Alto Peso Molecular
BPM	Baixo Peso Molecular
HTP	Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
MCNR	Mistura Complexa Não-Resolvida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	CARACTERÍSTICAS DO PETRÓLEO	17
2.2	ACIDENTES COM PETRÓLEO EM AMBIENTES COSTEIROS	19
2.3	REMEDIAÇÃO E ALGUMAS TÉCNICAS CLÁSSICAS	23
2.4	BIORREMEDIAÇÃO	24
2.5	MICROALGAS	27
2.6	CULTIVO EM LARGA ESCALA E FOTOBIOREACTORES	29
3	JUSTIFICATIVAS	31
4	OBJETIVOS	34
4.1	GERAL	34
4.2	ESPECÍFICOS	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	PROPAGAÇÃO DAS MICROALGAS	35
5.2	EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO	35
5.2.1	Coleta, filtração e esterilização da água salina	36
5.2.2	Adição do petróleo e das microalgas	38
5.2.3	Procedimentos de amostragem e monitoramento	40
5.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	41
5.3.1	Determinação de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP)	41
5.3.2	Densidade celular	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1	HIDROCARBONETOS TOTAIS DO PETRÓLEO	43
6.2	DEGRADAÇÃO DE n-ALCANOS	49
6.3	DENSIDADE CELULAR	52
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é um combustível fóssil formado a partir da matéria orgânica, de microrganismos e vegetais, que sedimentou no fundo dos oceanos, sendo essa matéria orgânica recoberta por camadas sedimentares. De forma geral, é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, possui cheiro característico e é considerada a principal fonte de energia do mundo (MARTINS et al., 2015). Seu processo de formação depende de condições geológicas como a existência de rocha geradora, trapas, rocha reservatório e rocha selante (MILANI et al., 2001).

A demanda por produtos petroquímicos cresceu rapidamente e dominou o mercado global de produtos químicos nos últimos 10 anos (HASSANI et al., 2013). Como resultado, o setor petrolífero e petroquímico continuou a crescer (HASSANI et al., 2013) e, segundo Singh et al. (2011), os combustíveis fósseis representam 88% do consumo global de energia primária. Atualmente, a indústria petrolífera é considerada a principal matriz energética mundial e exerce grande influência na economia global.

Com o aumento da industrialização e o desenvolvimento econômico, as necessidades da população vêm crescendo, o que torna o ambiente mais vulnerável a diversos impactos ambientais (NASCIMENTO et al., 2014). Assim, a probabilidade de ocorrência de acidentes durante a exploração, extração, transporte ou refino é maior, visto que as atividades estão se tornando cada vez mais intensas. A contaminação também pode ocorrer através do derramamento de óleo dos navios petroleiros, acidentes em plataformas e vazamentos pontuais em oleodutos, por exemplo (RIOS, 2014).

Caso haja algum acidente, o meio ambiente sofrerá consequências que poderão durar muitos anos e, geralmente, os acidentes que ocorrem no ambiente marinho causam impactos maiores visto que o óleo pode percorrer longas distâncias. Se esse óleo chegar à zona costeira ou em ambientes sensíveis como recifes de corais e manguezais, ele irá contaminar mamíferos, moluscos, algas, peixes e aves marinhas, além de causar danos à saúde humana (PI et al., 2015).

A partir do momento em que o petróleo entra em contato com ecossistemas aquáticos, principalmente o mar, ele está sujeito a uma série de modificações em sua composição. Tais modificações ocorrem devido aos processos químicos, físicos e biológicos que são responsáveis por determinar a taxa de degradação e, conseqüentemente, quanto tempo esse petróleo vai permanecer no ambiente (SPEIGHT et al., 2018). Alguns fatores como temperatura, viscosidade do óleo, quantidade derramada, densidade e hidrodinâmica da região afetada também influenciam na degradação.

A biorremediação é um processo que utiliza microrganismos - plantas, bactérias, fungos e algas - para degradação e remoção de poluentes presentes no solo ou na água (EL-SHEEKH et al., 2013). Essa técnica vem sendo cada vez mais estudada, pois apresenta algumas vantagens em relação às técnicas clássicas de remediação, como grande versatilidade e o baixo custo, por exemplo (NASCIMENTO et al., 2014). Outra vantagem que merece destaque é a não utilização de dispersantes ou produtos químicos, o que a torna ecologicamente correta (HAMOUDA et al., 2016).

O sucesso da biorremediação está associado à capacidade de estabelecer e manter condições que favoreçam as taxas de biodegradação do petróleo (SPEIGHT et al., 2018). Além disso, sua eficiência depende do tipo de microrganismo que está sendo usado e é muito afetada pelas condições ambientais (HAMMED et al., 2016), tais como temperatura, salinidade, luminosidade e pH. Em relação ao óleo, algumas características que devem ser levadas em consideração são a composição, densidade, viscosidade e solubilidade do óleo (MCGENITY et al., 2012). A quantidade de óleo derramada e a área afetada também influenciam na velocidade da biodegradação.

Em ambientes aquáticos, os poluentes orgânicos estão sujeitos à biodegradação através de uma série de organismos que ocorrem naturalmente, porém os estudos estão quase que exclusivamente concentrados no papel das bactérias e fungos nos processos degradativos (SEMPLE et al., 1999). Sendo assim, é importante que sejam desenvolvidos mais estudos para avaliar a possibilidade de

utilização de outros organismos para degradar poluentes. Um bom exemplo são as microalgas, visto que possuem características favoráveis à sua utilização.

As microalgas são organismos unicelulares fotossintéticos difundidos na natureza e importantes produtores primários em sistemas marinhos e de água doce (FARIA et al., 2012). Apresentam rápido desenvolvimento e são mais eficientes fotossinteticamente quando comparadas às plantas na produção de biomassa e tal biomassa pode ser uma fonte de produtos químicos de valor agregado, como pigmentos, antioxidantes, carboidratos e proteínas (BAUMGARDT et al., 2016). Possuem grande flexibilidade quanto às condições de cultivo, não necessitando nem de grandes áreas para reprodução nem de terras férteis, portanto não competem com as plantações (REYIMU et al., 2017).

Esses organismos produzem grandes quantidades de lipídios e são capazes de fixar CO₂, podendo ser utilizados na produção de biocombustíveis e no controle das taxas de CO₂, auxiliando na redução do efeito estufa (SU et al., 2011). Também podem ser aplicadas na purificação de água residual sob condições autotróficas ou mixotróficas, na extração de alimentos com alto valor agregado e produtos farmacêuticos, ou como comida para aquicultura (CONVERTI et al., 2009). Podem, ainda, ser utilizadas para remoção de alguns poluentes (HAMMED et al., 2016) inclusive aqueles resultantes da exploração de petróleo.

O gênero *Nannochloropsis* está amplamente distribuído em oceanos em todo o mundo, desempenhando papéis significativos nos ciclos globais de carbono e minerais (HAMIDI et al., 2014). Por serem consideradas uma excelente fonte de proteínas, carboidratos e vitaminas, também são utilizadas na dieta humana devido ao seu valor nutricional (CARRERA-MARTINEZ et al., 2014), além de despertarem interesse como fonte de ácidos graxos poliinsaturados e na produção de biodiesel (LIU et al., 2017).

A *Nannochloropsis oculata*, microalga marinha da família Eustigmatophyceae, possui altas taxas de crescimento, alta produtividade lipídica, resistência a condições ambientais adversas (RIBEIRO et al., 2016) e com alto conteúdo de ácido eicosapentaenoico (EPA C20:5n3), sendo amplamente utilizada na alimentação de

rotíferos, na alimentação das larvas de peixe (ROCHA et al., 2013), podendo ser ainda aplicada para o consumo humano (LIU et al., 2017).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A composição desse referencial teórico foi feita através do levantamento bibliográfico de informações contidas em livros, artigos científicos, monografias, teses e dissertações sobre a caracterização e impactos do petróleo do meio ambiente, bem como a descrição de algumas técnicas de remediação e a importância das microalgas nesse segmento.

2.1 CARACTERÍSTICAS DO PETRÓLEO

A utilização do petróleo nas suas mais diversas formas teve início no século III a. C., na antiga Babilônia, para a produção de tijolos, impermeabilização de potes cerâmicos, pavimentação de ruas, embalsamento de mortos e atividades bélicas (MARTINS et al., 2015). Nessa época (e durante muito tempo) a população utilizava, principalmente, o óleo de baleia e o carvão como matéria-prima. Com o passar dos anos, veio a descoberta da destilação do petróleo, processo responsável pela produção de querosene. A partir de então, o petróleo passou a ser utilizado com mais frequência, tornando-se comercialmente viável a partir do século XIX, especialmente em motores movidos à gasolina e diesel (THOMAS et al., 2004).

Em 1850, o escocês James Young descobriu que o petróleo poderia ser extraído do xisto betuminoso e do carvão, elaborando alguns processos para a sua produção e, 14 anos depois, os Estados Unidos já contavam com mais de 500 empresas relacionadas ao petróleo (MARTINS et al., 2015).. O início da industrialização e o crescente desenvolvimento econômico proporcionado pela Revolução Industrial resultaram no aumento substancial das demandas de recursos, de produção e de tecnologia (NASCIMENTO et al., 2014).

Com a crescente intensificação do seu uso como fonte de energia, em pouco tempo o petróleo tornou-se uma importante matriz energética para diversos países, o que resultou no aumento de impactos ambientais como poluição atmosférica e aquática, além da diminuição das reservas de óleo. Com isso, a preocupação ambiental se tornou cada vez maior, bem como a quantidade de estudos

relacionados ao controle de impactos ambientais, à recuperação de áreas degradadas e contaminadas e fontes alternativas de energia (NASCIMENTO et al., 2014).

A dependência de fontes não renováveis, a grande quantidade de resíduos gerados - principalmente pelo uso do petróleo e do carvão, e a concentração de depósitos em regiões específicas do mundo são alguns fatores que chamam a atenção para o desenvolvimento de novas políticas energéticas renováveis (FERNANDES, 2009) com o intuito de minimizar a dependência das reservas fósseis, bem como manter a sustentabilidade econômica e ambiental (SINGH et al., 2011).

Embora atualmente existam inúmeras formas de geração de energia limpa e renovável, o petróleo continua sendo a principal matriz energética mundial. A sua enorme utilização traz diversos riscos não só ao meio ambiente, mas também à saúde humana, visto que boa parte dos acidentes envolvendo derramamento de óleo ocorre no ambiente marinho (PI et al., 2015). Os impactos causados afetam a fauna e flora, podendo alcançar as zonas costeiras e, por fim, o homem.

Por definição, o petróleo é um combustível fóssil viscoso, com coloração geralmente escura, formado a partir da matéria orgânica de organismos e vegetais sedimentados que sofreram inúmeras transformações ao longo dos anos. Embora pareça simples, o processo de formação depende da ocorrência simultânea de algumas condições geológicas na bacia sedimentar, tais como a existência de rocha geradora, rocha reservatório e rocha selante (MILANI et al., 2001).

De forma geral, o petróleo é constituído, em sua maior parte, por hidrocarbonetos em quantidades variáveis, enquanto que a parte restante é composta por substâncias mais solúveis. A composição e as características dos hidrocarbonetos dependem da composição da matéria orgânica, das variáveis termodinâmicas e dos processos de biodegradação (FERNANDES, 2009).

Segundo Das et al. (2011), os hidrocarbonetos do petróleo podem ser divididos em quatro classes: saturados, aromáticos, asfaltenos e resinas, sendo as duas primeiras mais leves e as duas últimas mais pesadas. A fração dos compostos

saturados inclui os alcanos e os cicloalcanos; a fração dos aromáticos inclui os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e os hidrocarbonetos monoaromáticos. As frações das resinas e asfaltenos incluem as moléculas polares que possuem nitrogênio, enxofre e oxigênio na sua composição - fenóis, ácidos graxos, ésteres e amidos, respectivamente.

As características químicas do petróleo estão relacionadas à sua estrutura e composição química. De forma geral, o petróleo consiste em uma mistura de: (1) hidrocarbonetos; (2) compostos de nitrogênio; (3) compostos de oxigênio; (4) compostos de enxofre; e (5) compostos metálicos (SPEIGHT et al., 2018). Por serem geralmente substâncias apolares, os compostos orgânicos do petróleo são, em grande parte, hidrofóbicos, o que diminui sua capacidade de solubilização (RIOS, 2014). Consequentemente, quando lançados no ambiente aquático, os hidrocarbonetos tendem a se acumular nos organismos e no sedimento, o que aumenta a sua persistência e o impacto no ambiente.

As propriedades físicas do óleo são volatilidade (facilidade da substância de passar do estado líquido ao estado gasoso e está relacionada à capacidade de destilação do óleo), viscosidade (resistência da substância ao escoamento e dependente da temperatura e da quantidade de frações leves), ponto de fluidez (temperatura abaixo da qual o óleo não irá flui), tensão superficial (força de atração entre as moléculas superficiais), ponto de ignição (temperatura mínima para ocorrência da combustão) e solubilidade (capacidade de uma substância se dissolver em um dado solvente) (SZEWCZYK, 2006).

2.2 ACIDENTES COM PETRÓLEO EM AMBIENTES COSTEIROS

O aumento da demanda energética global tem resultado no aumento da extração e transporte do óleo bruto no mar, tornando os ambientes marinhos especialmente susceptíveis ao risco cada vez maior de derramamentos de óleo (PI et al., 2015). Logo, grandes volumes de óleo e produtos do petróleo podem ser lançados nos oceanos, causando sérios danos à vida marinha - e, conseqüentemente, à saúde humana.

Segundo Carrera-Martinez et al. (2011), a contaminação aquática é uma importante causa da crise na biodiversidade e, nesse sentido, esses derrames acidentais são um dos problemas ambientais mais preocupantes. De acordo com Jacques et al. (2007), as atividades de produção de carvão vegetal, de extração e gaseificação do carvão mineral e a cadeia de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados são também responsáveis pela introdução de grandes quantidades de HPAs no ambiente.

A poluição ambiental é uma das principais ameaças ao homem e os derramamentos de óleo representam uma séria preocupação no mundo de hoje (HAMOUDA et al., 2016). A degradação desse óleo em ecossistemas naturais ainda é complicada e a utilização de técnicas químicas, físicas (ou mecânicas) e biológicas vem sendo realizada com o intuito de promover a limpeza da área contaminada.

Os derramamentos de óleo em ambientes aquáticos podem ocorrer por meio da descarga de petróleo bruto, de seus derivados - gasolina, querosene, diesel ou óleo de navios tanque ou de combustíveis mais pesados utilizados por grandes embarcações; de alguma falha ocorrida em plataformas de exploração offshore; de acidentes em dutos ou durante processos de produção, além do derramamento de efluentes que contenham óleo como água de produção e água de lastro, por exemplo (SPEIGHT et al., 2018).

O destino do petróleo bruto derramado no mar depende tanto do clima predominante quanto da composição do óleo, mas seu impacto ambiental é mais severo ao atingir o litoral, especialmente em habitats de baixa energia, como lagoas e restingas (MCGENITY et al., 2012). Além disso, o impacto dos hidrocarbonetos (especialmente os HPAs) na vida selvagem e no pescado pode durar muito tempo.

Quando o petróleo ou seus produtos são liberados no ecossistema, eles estão sujeitos a uma série de processos químicos, físicos ou biológicos que ocorrem naturalmente e que modificam sua composição, suas propriedades físicas e, conseqüentemente, a velocidade na qual ocorrerá a biodegradação e sua persistência no meio (SPEIGHT et al., 2018). Essas alterações, conhecidas como intemperismo, são influenciadas por fatores como características do óleo,

hidrodinâmica e temperatura do local afetado, incidência solar, disponibilidade de nutrientes, comunidade microbiana, entre outros.

Os processos de intemperismo mais importantes são:

- **Espalhamento:** movimento horizontal do óleo na superfície da água devido à gravidade específica, fricção, viscosidade e tensão superficial. É, provavelmente, o processo mais importante após um derrame, pois a medida que o óleo se espalha, ele aumenta a sua área de superfície do derramamento e diminui a sua espessura, facilitando a evaporação e dissolução (SPEIGHT et al., 2018).
- **Evaporação:** é, geralmente, o processo mais importante durante as primeiras 48 horas após o derrame, visto que ocorre a volatilização de compostos de baixo e médio peso molecular. Depende de fatores como composição do óleo, área de superfície e propriedades físicas, velocidade do vento, temperatura do ar e do mar, turbulência e intensidade da radiação solar. Pode durar até 2 semanas e estima-se que 1 a 2/3 do óleo sejam eliminados durante este período (SPEIGHT et al., 2018).
- **Dissolução:** ocorre durante as primeiras 24 horas e é o processo no qual os hidrocarbonetos de baixo peso molecular são perdidos do óleo para a coluna d'água. A sua importância está relacionada às frações ligeiramente solúveis em água (como benzeno e tolueno) uma vez que são tóxicas para os organismos marinhos. A extensão da dissolução depende da solubilidade do óleo, das condições climáticas e das características do local do derramamento (SPEIGHT et al., 2018).
- **Foto-oxidação:** na presença de oxigênio, a luz solar pode transformar alguns hidrocarbonetos do petróleo em compostos de oxigênio - como aldeídos e cetonas, e, finalmente, em ácidos carboxílicos de baixo peso molecular, alterando a solubilidade do óleo derramado. Essas

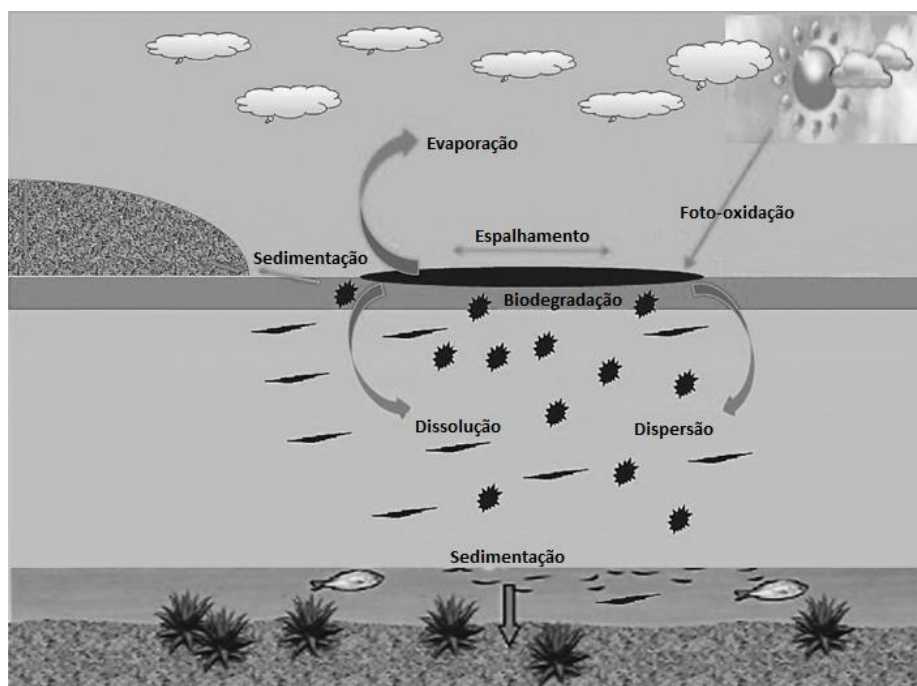
transformações podem resultar em compostos mais solúveis e mais resistentes à degradação, embora esse processo ocorra enquanto tiver óleo derramado (SPEIGHT et al., 2018).

- **Emulsificação:** processo onde ocorre a incorporação de água no óleo, resultando no espessamento e no aumento do volume de poluentes, além de poder reduzir outros processos intempéricos. O maior volume de emulsões é normalmente formado na primeira semana do derramamento. A formação e estabilidade das emulsões estão relacionadas à composição química dos óleos (SPEIGHT et al., 2018).
- **Dispersão natural:** é o segundo processo mais importante e mais significativo durante as primeiras 10 horas após o derrame. Através da ação das ondas, a mancha de óleo superficial se quebra em gotículas, que se misturam e se espalham na coluna d'água, aumentando a área de contato óleo-água. Pode influenciar as taxas de biotransformação do óleo aumentando o contato entre o óleo e os microrganismos e/ou aumentando as taxas de dissolução dos componentes mais solúveis (SPEIGHT et al., 2018).
- **Biodegradação:** consiste na degradação do óleo através de microrganismos, tais como bactérias, fungos e algas e inclui a ingestão pelo zooplâncton, a absorção por animais aquáticos e a bioturbação. A taxa de biodegradação depende das características físico-químicas do óleo (estrutura e peso molecular, por exemplo), da biota e de condições ambientais como temperatura, disponibilidade de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo), disponibilidade de oxigênio e a área de superfície na interface óleo-água (SPEIGHT et al., 2018).
- **Sedimentação:** esse processo está relacionado à associação do óleo com o material particulado em suspensão presente na coluna d'água, geralmente em regiões mais próximas à costa. Após a associação,

esses agregados podem afundar e sedimentar no fundo marinho. Características como tipo e tamanho do sedimento, salinidade, teor de matéria orgânica e a hidrodinâmica do ambiente afetam a taxa de adsorção-dessorção do petróleo sobre o material particulado, influenciando a taxa de sedimentação (SPEIGHT et al., 2018).

Como foi dito anteriormente, os processos de espalhamento, evaporação, dissolução, emulsificação e dispersão natural são os mais importantes nos primeiros dias após a ocorrência do derrame, enquanto que a foto-oxidação, a biodegradação e a sedimentação são processos de longo prazo. Os processos intempéricos estão ilustrados na figura 1.

Figura 1 - Processos intempéricos sofridos pelo petróleo no ambiente aquático.



Fonte: adaptado de Speight et al. (2018).

2.3 REMEDIAÇÃO E ALGUMAS TÉCNICAS CLÁSSICAS

A escolha do melhor método de limpeza depende de fatores como a magnitude do derramamento ou nível de contaminação, das características do petróleo

(principalmente a viscosidade, pois esta vai influenciar a taxa de espalhamento da mancha), do tipo de substrato e da sensibilidade dos organismos existentes no local afetado, a fim de evitar o agravamento dos impactos tanto para o ambiente quanto para os organismos (RIOS, 2014). Além desses fatores, a questão financeira também deve ser levada em conta no momento da escolha.

Os métodos físicos ou mecânicos incluem a remoção manual do poluente, o uso de materiais absorventes, o uso de barreiras de contenção (a fim de evitar o espalhamento da mancha, confinando-o ou direcionando a mancha de petróleo para locais mais favoráveis à degradação ou menos vulneráveis), bombeamento a vácuo e uso de skimmers (equipamentos que retiram o petróleo da superfície da água através da sucção) (SZEWCZYK, 2006).

Os métodos químicos envolvem a utilização de dispersantes químicos, produtos responsáveis por "quebrar" o petróleo em partículas menores, facilitando a taxa de degradação do poluente (RIOS, 2014). Por outro lado, a utilização desses dispersantes pode aumentar a toxicidade do petróleo, resultando em efeitos mais graves sobre a fauna marinha (HODSON et al., 2018).

2.4 BIORREMEDIAÇÃO

Dentre os métodos biológicos, destacam-se a fitorremediação e a biorremediação. O primeiro baseia-se no uso de plantas e organismos associados para a limpeza de áreas contaminadas (MOREIRA, 2011). Tais microrganismos absorvem e/ou transformam os poluentes em compostos menos perigosos para o ambiente, além de reduzir seu potencial de migração para outras localidades (JACQUES et al., 2009).

O segundo consiste na utilização de microrganismos para remoção ou metabolização de substâncias tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas em compostos não tóxicos (HAMMED et al., 2016). Quando comparada aos métodos clássicos, a biorremediação vem sendo reconhecida como uma fonte alternativa para a remoção de poluentes (principalmente os derivados do petróleo) por ser economicamente

viável e por reduzir os impactos causados (PI et al., 2015), além de ser ambientalmente correta.

O sucesso da biorremediação de uma área impactada após o derramamento depende do estabelecimento e manutenção de condições favoráveis à biodegradação do petróleo no ambiente marinho (DAS et al., 2011). Além da existência de microrganismos óleo-degradadores, fatores como condições ambientais (disponibilidade de oxigênio e de nutrientes, pH, temperatura, luminosidade, salinidade, fontes de C e N), características físicas e químicas do petróleo, área de superfície e disponibilidade do poluente irão influenciar as taxas de degradação e, conseqüentemente, o sucesso da biorremediação (HARITASH et al., 2009; DAS et al., 2011; PI et al., 2015; VARJANI et al., 2017).

Além dos fatores citados acima, a escolha do microrganismo que poderá ser utilizado na biorremediação da área contaminada deve levar em consideração a sua capacidade de degradação do poluente e o tempo para que esse processo ocorra (NASCIMENTO et al., 2014). A propensão à degradação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos segue, geralmente, tal ordem: alcanos lineares, alcanos ramificados, aromáticos pequenos e alcanos cíclicos (DAS et al., 2011).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, conhecidos pelos seus efeitos carcinogênico e mutagênico, são considerados altamente tóxicos (HAMOUDA et al., 2016) e a sua inserção no meio ambiente está associada à atividade antrópica, principalmente através das atividades petrolíferas (JACQUES et al., 2007). Devido à sua complexa estrutura química e baixa solubilidade em água, os HPAs não são degradados pela maioria dos microrganismos (JOHNSEN et al., 2005), principalmente os de alto peso molecular (DAS et al., 2011), tornando-se persistentes no ambiente.

A biodegradação de poluentes ambientais vem sendo estudada ao longo dos anos e, de acordo com Semple et al. (1999), no ambiente aquático, os poluentes orgânicos podem ser biodegradados por uma série de organismos, porém os estudos se concentram, quase que exclusivamente, no papel dos fungos e bactérias. Ainda assim, por serem organismos bastante adaptáveis, as microalgas e as

cianobactérias vêm sendo estudadas devido à sua capacidade de crescimento na presença desses poluentes, podendo ser utilizadas na biodegradação e biotransformação desses compostos (HAMOUDA et al., 2016).

A ficorremediação é uma técnica de remediação que consiste na utilização de algas ou microalgas na remoção ou biotransformação de poluentes. Em relação a outros organismos, as microalgas são capazes de utilizar carbono orgânico e inorgânico como substrato para realizar a fotossíntese (HAMMED et al., 2016), além de ser um ciclo autossustentável.

De acordo com Ammar et al. (2018), as microalgas tem se mostrado importantes na remoção de certos agentes químicos (metais pesados e materiais orgânicos complexos) de diferentes tipos de efluentes como águas residuais e efluentes domésticos, por exemplo. Além desses compostos, as microalgas também são capazes de utilizar pesticidas, hidrocarbonetos e cianetos como fontes de nitrogênio e carbono (HAMMED et al., 2016).

A parede celular das microalgas, composta por estruturas de carboidratos que são capazes de bioabsorver agentes tóxicos, torna esses organismos potencialmente adequados na mitigação de diversos compostos, como fósforo, metais pesados e outros compostos poluentes (HAMMED et al., 2016). Portanto, entender o papel das microalgas na biodegradação de hidrocarbonetos auxiliará na tomada de decisões acerca das melhores técnicas de remediação que serão aplicadas em campo (JACQUES et al., 2009).

Experimentos realizados por Walker et al. (1975) com o intuito de verificar a degradação de hidrocarbonetos do petróleo utilizando a alga *Prototheca zopfii* mostraram que entre 38-60% dos hidrocarbonetos saturados alifáticos do petróleo bruto e 12-41% dos compostos aromáticos foram degradados, sugerindo a eficácia dessa espécie na degradação de compostos do petróleo em diferentes níveis (SEMPLE et al., 1999). Cerniglia et al. (1980) observaram, pela primeira vez, a demonstração de que a habilidade de oxidar hidrocarbonetos aromáticos é generalizada no reino das algas. Os estudos realizados por Cao et al. (2013)

mostraram que a taxa de degradação do petróleo bruto pelas microalgas foi superior a 35%.

El-Sheekh et al. (2013) observaram que, além de ambas as espécies de microalgas estudadas serem capazes de crescer sob condições heterotróficas utilizando o petróleo bruto como fonte de carbono, elas também conseguiram degradar n-alcenos e HPAs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos). Mais recentemente, Kalhor et al. (2017) mostraram através de um experimento laboratorial que a *Chlorella vulgaris* apresentou resistência aos poluentes e habilidade na remediação de hidrocarbonetos do petróleo bruto (94% dos compostos leves e 88% dos compostos pesados em 14 dias).

Os resultados, embora tenham sido positivos em escala laboratorial, podem ser significativamente menores em campo, visto que as condições reais não podem ser simuladas (DAS et al, 2011).

2.5 MICROALGAS

As microalgas são organismos unicelulares fotossintéticos, de ocorrência global e que desenvolvem importante papel como produtores primários em sistemas marinhos e de água doce (FARIA et al., 2012). De acordo com Converti et al. (2009), esses organismos utilizam a energia luminosa e o dióxido de carbono de forma mais eficaz do que as plantas para a produção de biomassa. Por serem organismos resilientes, conseguem sobreviver em condições adversas por meio da aclimação física, porém quando o estresse ambiental excede seus limites fisiológicos, sua sobrevivência depende exclusivamente da adaptação evolutiva (CARRERA-MARTINEZ et al., 2011).

Apresentam ciclos de vida curtos, além de acumular grandes quantidades de lipídios (quando submetidos a condições adequadas de crescimento) e não necessitar de terras férteis para o seu cultivo, o que torna viável a sua utilização na tentativa de suprir a demanda mundial por alimento, ração e novas formas de

energia (BAUMGARDT et al., 2015). Também são importantes na remoção do CO₂ antropogênico, visto que o utilizam como fonte de carbono para o seu crescimento.

De forma geral, o estudo das microalgas vem chamando bastante atenção devido à versatilidade em relação à aplicação desses organismos (VALDÉS et al., 2012) para produção de biocombustíveis, fertilizantes, ração animal, pigmentos, fármacos, cosméticos, purificação de águas residuais, entre outras (SOSTARIC et al., 2012). São consideradas uma excelente fonte de proteínas, carboidratos e vitaminas, sendo utilizadas na dieta humana devido ao seu valor nutricional (CARRERA-MARTINEZ et al., 2011).

O crescimento de uma população de microalgas depende de fatores biológicos (taxas metabólicas da espécie em questão, presença de organismos contaminantes e ciclo de vida) e físico-químicos (luminosidade, pH, salinidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes) (OHSE et al., 2008). Tais fatores também influenciam a composição bioquímica da microalga e, conseqüentemente, as biomoléculas com valor agregado também podem sofrer alterações (SCHULZE et al., 2016).

A tolerância apresentada pelas microalgas no que diz respeito à contaminação humana é extremamente relevante, uma vez que esses organismos são considerados os produtores primários do ecossistema aquático (CARRERA-MARTINEZ et al., 2011). Nesse sentido, os efeitos do petróleo e de seus compostos vêm sendo estudados amplamente e os resultados são variáveis. Sob condições laboratoriais, as microalgas marinhas demonstram ter capacidade de acumular altos níveis de petróleo bruto, mesmo quando a concentração é baixa (GARR et al., 2014) e, segundo El-Sheekh et al. (2013), a capacidade de degradação de poluentes orgânicos pelas algas justifica o seu crescimento na presença desses poluentes.

Ainda de acordo com Garr et al. (2014), as espécies de microalgas reagem de formas distintas, estando sujeitas a efeitos mais severos e os impactos causados pelo petróleo (e pelos dispersantes, caso sejam utilizados) nos níveis tróficos inferiores são mais duradouros, podendo afetar o pescado e, conseqüentemente, a saúde humana. Tais resultados, segundo Carrera-Martinez et al. (2011), dependem

das características do petróleo, do tipo de ecossistema impactado, da influência dos dispersantes, da hidrodinâmica local, entre outros.

2.6 CULTIVO EM LARGA ESCALA E FOTOBIOREATORES

No que diz respeito à produção de microalgas em larga escala, o problema mais crucial está associado aos altos custos de produção tanto em relação à implantação quanto à produção de biomassa (energia, mão de obra, nutrientes, etc.), além do risco de contaminação dos cultivos (OHSE et al., 2008). Uma das alternativas para tentar reduzir os custos está na utilização de resíduos (efluentes domésticos e industriais e água de produção, por exemplo) como meios de cultivo (REYIMU et al., 2017), visto que são efluentes ricos em matéria orgânica e nutrientes.

Além dos problemas citados acima, vale ressaltar que, para o cultivo em larga escala, além de desenvolver sistemas sustentáveis e competitivos, é necessário escolher espécies de microalgas que influenciem de forma positiva qualquer fase do processo global de produção, desde a produção de biomassa até a extração de lipídios e, posteriormente, a valorização como biocombustível (VAN VOOREN et al., 2012). A produção em larga escala de microalgas do gênero *Nannochloropsis* em diversos tipos de fotobiorreatores fechados vem sendo estudada a fim de definir as condições ótimas de cultivo desse microrganismo (SPOLAORE et al., 2006) que, até então, não foram claramente definidas.

O fotobiorreator é um sistema que utiliza a luz para cultivo de organismos em pequena ou larga escala e confeccionado em materiais transparentes para permitir a penetração de luz, condição fundamental para o crescimento das microalgas. Dentre as vantagens desse sistema, estão: (i) menor risco de contaminação por organismos nocivos; (ii) taxa de crescimento das microalgas é mais elevada quando comparada aos sistemas abertos; (iii) microalgas podem ser cultivadas ao longo do ano implantando sistemas de aquecimento, resfriamento e iluminação artificial; e (iv) variáveis como temperatura, luminosidade, pH e CO₂ são mais fáceis de serem controladas (GUIMARÃES, 2012).

Atualmente, existem diversos tipos de fotobiorreatores - tubulares, de placas planas, airlift, e a escolha do modelo necessário deve levar em consideração fatores como as propriedades intrínsecas da espécie cultivada, condições climáticas (temperatura, luminosidade e pH) e o custo envolvido (GUIMARÃES, 2012). Neste trabalho, foram utilizados erlenmeyers com capacidade de 1 litro como fotobiorreatores para simulação do experimento.

3 JUSTIFICATIVAS

O gênero *Nannochloropsis*, distribuído globalmente nos oceanos e pertencente ao picoplâncton marinho (2-5 μm de diâmetro), desenvolve papel importante nos ciclos mineral e do carbono (HAMIDI et al., 2014). De acordo com Liu et al. (2017), as espécies desse gênero, embora não acumulem amido, são ótimas fontes de ácidos graxos poli-insaturados e podem ser utilizadas na produção do ácido eicosapentaenoico para prevenção de doenças humanas e produção de biodiesel. Por ser uma excelente fonte de proteínas, carboidratos e vitaminas, também são reconhecidas na dieta humana.

A *Nannochloropsis oculata*, uma das seis espécies do gênero, é uma pequena alga verde unicelular, fototrófica, esférica ou levemente ovóide, presente em água marinha e doce, com diâmetro entre 2-5 μm e ausência de clorofila b (HAMIDI et al., 2014). Características como altas taxas de crescimento, resistência a condições ambientais adversas (salinidade, temperatura, deficiência de nutrientes e presença de contaminantes) e alta produtividade lipídica a tornam altamente recomendável para cultivos em larga escala e para a produção de biocombustíveis (RIBEIRO et al., 2016).

Essa espécie vem despertando interesse comercial devido ao alto conteúdo de óleo e de ácidos graxos poli-insaturados e, segundo Zhu et al. (2013), o teor de óleo pode variar entre 8 e 50% (maior do que plantas oleaginosas) de acordo com a fase de crescimento, concentração de CO_2 e nitrogênio e temperatura no meio de cultura. Além desses fatores, essa espécie é relativamente fácil de ser cultivada e apresenta elevadas taxas de crescimento celular (RA et al., 2015).

Durante as pesquisas para composição do referencial teórico deste trabalho, observou-se que, na literatura, existem algumas publicações (tabela 1) sobre biorremediação e biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo utilizando microalgas.

Tabela 1 - Trabalhos utilizando microalgas para biorremediação e/ou biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo.

MICROALGA	REFERÊNCIA
<i>Prototheca zopfii</i>	Walker et al., 1975
<i>A. guadruplicatum, Amphora sp., Anabaena sp., Aphanocapsa sp., C. angulosa, C. autotrophica, C. sorokiniana, C. elabens, Cyllindrotheca sp., D. tertiolecta, M. chthonoplastes, Nostoc sp., Oscillatoria sp., P. fascia, P. cruentum e U. fasciata</i>	Cerniglia et al., 1980
<i>Aphanocapsa sp., C. autotrophica, C. elabens, D. tertiolecta, Oscillatoria sp., S. obliquus, S. elongatus e V. aureus</i>	Cao et al., 2013
<i>C. vulgaris e S. obliquus</i>	El-Sheekh et al., 2013
<i>Dicrateria sp., P. tricorutum e S. costatum</i>	Pi et al., 2015
<i>A. oryzae e C. kessleri</i>	Hamouda et al., 2016
<i>Chlorella vulgaris</i>	Kalhor et al., 2017
<i>I. galbana e N. oculata</i>	Ammar et al., 2018

Quando se trata da utilização (de forma geral) da *Nannochloropsis oculata*, a quantidade de material disponível é ainda menor. Dentre as publicações disponíveis, menos de um terço são relacionados ao petróleo – por exemplo, para produção de biodiesel (CONVERTI et al., 2009; FARIA et al., 2012; LIU et al., 2017), tratamento de efluentes (GALINDRO et al., 2015) e cultivo em água residual e em água de produção (AMMAR et al., 2018; SIRIN et al., 2015).

Considerando a vulnerabilidade dos ambientes marinhos à ocorrência de derrames de petróleo anteriormente explanado e o aumento no interesse de técnicas de biorremediação, esse trabalho se mostra relevante nesse segmento para uma melhor compreensão do comportamento dessa espécie na presença do petróleo e, caso necessário, possíveis utilizações da *Nannochloropsis oculata* na biorremediação de áreas impactadas. Além disso, este trabalho pode ser

considerado pioneiro nessa área, visto que não existe material na literatura utilizando essa espécie de microalga para a finalidade aqui proposta.

Se tratando da remediação do petróleo em águas, é importante destacar que o ideal seria utilizar fotobiorreatores com água residual, uma vez que é possível se ter um maior controle das microalgas utilizadas. Além disso, a biomassa gerada ao longo do tratamento pode ser reaproveitada para produção de biodiesel ou para extração de compostos de alto valor agregado.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da microalga *Nannochloropsis oculata* na biodegradação de petróleo proveniente da Bacia de Campos em águas marinhas por meio de um experimento em escala laboratorial.

4.2 ESPECÍFICOS

- Monitorar temporalmente a capacidade de microalgas em biodegradar petróleo em águas marinhas;

- Avaliar a cinética de crescimento temporal de células da *Nannochloropsis oculata* em águas marinhas;

- Avaliar o conteúdo de hidrocarbonetos totais de petróleo em amostras de águas marinhas dos experimentos mediante a análise de cromatografia líquida em coluna aberta e gasosa (CG-FID).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PROPAGAÇÃO DAS MICROALGAS

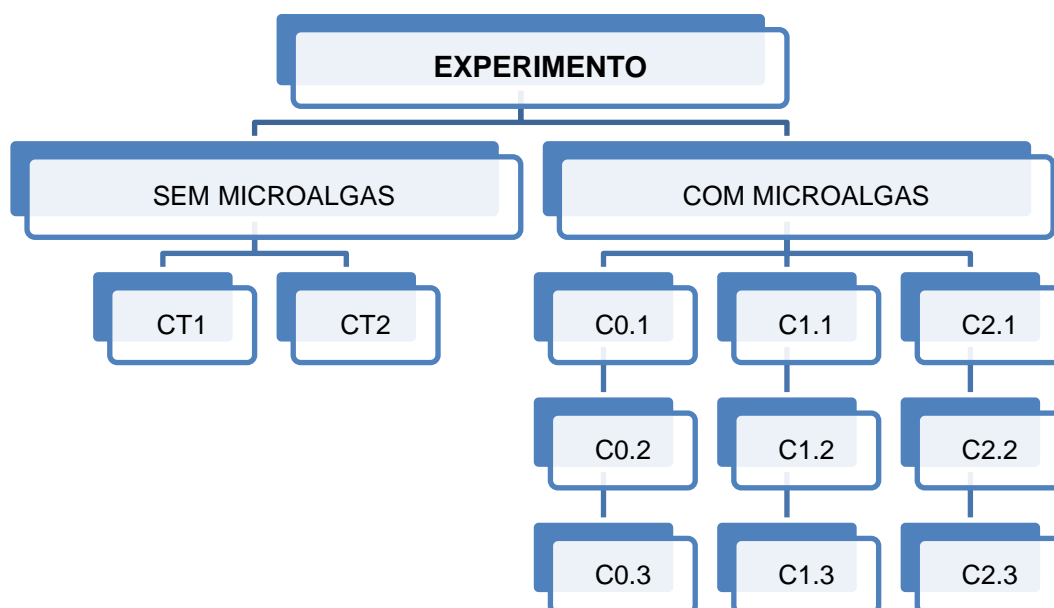
A fim de obter um volume suficiente para a realização do experimento, as células microalgais foram cultivadas durante 10 dias no Laboratório de Bioenergia e Catálise (LABEC/UFBA). Utilizando uma pipeta graduada, cerca de 100 ml de cepas de microalgas foram transferidos para um erlenmeyer com meio de cultivo Conway (Walne, 1979). Em seguida, o erlenmeyer foi submetido à aeração e luminosidade constantes durante o período de crescimento (10 dias).

5.2 EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO

A montagem do experimento foi dividida em duas etapas. A primeira etapa consistiu nos procedimentos laboratoriais (adição das microalgas, do petróleo e do sistema de mangueiras), realizados na Unidade de Microbiologia do LEPETRO (NEA/UFBA) na câmara de fluxo laminar. A segunda etapa, ou seja, a finalização da montagem (organização na estante e instalação dos compressores de ar), assim como o biomonitoramento, foi realizada no Greenlab, situado no Prédio de Aulas 1 da Universidade Salvador (Unifacs).

O experimento para avaliar a biodegradação do petróleo foi realizado em reatores de 1L, onde cada reator continha 800 mL de água salina natural e 80 mL de cepa microalgal, variando apenas o volume de petróleo utilizado – C0 indica 0 μ L, C1 indica 45 μ L e C2 indica 90 μ L de petróleo.

Os reatores CT1 e CT2 foram considerados controles, pois continha apenas água salina natural e petróleo (C1 e C2). Os reatores C0 continham água salina natural e microalgas; os reatores C1 continham água salina natural, microalgas e 45 μ L de petróleo; e os reatores C2 continham água salina natural, microalgas e 90 μ L de petróleo (Figura 2). Os reatores C0, C1 e C2 foram feitos em triplicatas e as amostragens foram realizadas em quatro tempos (T0, T8, T15 e T22).

Figura 2 - Desenho experimental.

5.2.1 Coleta, filtração e esterilização da água salina

Para a coleta da água salina natural (Figura 3), realizada na manhã do dia 21 de junho de 2018 na praia do Porto da Barra, foram utilizadas garrafas âmbar de 4 litros cada. Após a coleta, as garrafas foram transportadas para o Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO/NEA/UFBA) e mantidas em temperatura ambiente até a esterilização.

Figura 3 - Coleta de água salina.



Fonte: autor (2018).

Antes da montagem do experimento, a água salina foi filtrada utilizando um sistema de filtração à vácuo e filtros de fibra de vidro (Whatman, 47 mm de diâmetro e porosidade de 1,6 μm) (Figura 4). Em seguida, cerca de 800 mL desta água salina filtrada foram transferidos para cada um dos 11 erlenmeyers, que foram vedados e colocados na autoclave vertical (marca Prismatec e capacidade interna de 137 litros) durante 20 minutos a 120°C para esterilização. Por fim, o material foi transportado à Unidade de Microbiologia do LEPETRO até atingir a temperatura ambiente posterior montagem dos experimentos.

Figura 4 - Filtração da água salina em laboratório.



Fonte: autor (2018).

5.2.2 Adição do petróleo e das microalgas

A montagem do experimento foi concluída no dia 26 de junho de 2018 e os procedimentos restantes (adição do petróleo, das cepas e do sistema de mangueiras e vedação do sistema, além da amostragem para contagem celular e espectrofotometria) foram realizados dentro da câmara de fluxo laminar a fim de evitar contaminação.

O petróleo utilizado no experimento foi o da Bacia de Campos devido à sua importância para o Brasil, uma vez que representa o principal combustível fóssil produzido e refinado no país, além de possuir menor viscosidade relativa aos outros petróleos disponíveis. Esse petróleo possui densidade de $0,881423 \text{ g cm}^{-3}$ (RIOS, 2014) e as massas utilizadas foram de 0,04g (C1) e 0,08g (C2). Através da relação $v = m/d$ (v =volume, m =massa, d =densidade), foi possível determinar o volume de petróleo (a saber, $45\mu\text{L}$ e $90\mu\text{L}$) que foi adicionado com o auxílio de uma micropipeta automática.

Após a adição do petróleo, os fotobiorreatores foram levemente agitados a fim de melhorar a dispersão do petróleo e, em seguida, foram adicionadas as microalgas (Figura 5). O sistema de mangueiras e filtros foi acoplado em cada erlenmeyer para promover a aeração do sistema e, por fim, os erlenmeyers foram vedados e transportados para o Greenlab (Unifacs) para conclusão da montagem.

Figura 5 - Adição das cepas de microalgas em erlenmeyer com petróleo e água salina.



Fonte: autor (2018).

No Greenlab (Unifacs), os erlenmeyers foram dispostos em uma estante com iluminação artificial acoplada, de forma que todos estivessem submetidos a um fotoperíodo integral e a mesma intensidade luminosa. Por fim, o sistema de mangueiras foi acoplado a um compressor com fluxo de ar constante de 3 L min^{-1} , finalizando a montagem do experimento (Figura 6).

Figura 6 - Estante com os fotobiorreatores do experimento.



Fonte: autor (2018).

5.2.3 Procedimentos de amostragem e monitoramento

O monitoramento foi realizado diariamente, avaliando as condições de luminosidade e temperatura do laboratório, além de observar a ocorrência de

qualquer anormalidade. Também foi realizada a agitação manual de todos os fotobiorreatores ao menos uma vez por dia para homogeneização da coluna d'água.

No dia da montagem do experimento (ou seja, T0), com auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram retiradas alíquotas de cada erlenmeyer controle para quantificar os hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) no início do experimento. As alíquotas foram acondicionadas em garrafas âmbar e congeladas até o momento da extração. Também foram retiradas alíquotas dos fotobiorreatores C0.1, C1.1 e C2.1 para estimativa da densidade celular e posterior leitura no espectrofotômetro.

Para estimar a densidade celular e realizar a leitura no espectrofotômetro, a amostragem foi realizada diariamente nos fotobiorreatores C0.1, C1.1 e C2.1. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, cerca de 1,5 mL de amostra foi coletada, acondicionada em eppendorfs e congeladas (caso a estimativa não pudesse ser feita no mesmo dia) até a realização da contagem.

Para determinação dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP), a amostragem foi realizada em quatro tempos: T0, T8, T15 e T22. Utilizando uma pipeta de Pasteur, uma alíquota de 50 mL foi retirada e acondicionada em garrafas âmbar. A pipeta foi lavada três vezes com diclorometano (DCM) para garantir a transferência total da amostra e, em seguida, a amostra foi congelada até o momento da extração.

5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.3.1 Determinação de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP)

As análises dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) geralmente são utilizadas para avaliar o grau de contaminação de uma área. A quantificação desses hidrocarbonetos em meio aquoso foi feita através da extração do tipo líquido-líquido a partir da metodologia de Moreira et al. (2015). Após a obtenção das amostras, os extratos foram lidos em cromatógrafo a gás Agilent, modelo 7890B, equipado com coluna capilar DB-1 (comprimento 15 m, 0,25 milímetro ID, espessura do filme 0,25

μm) e detector de ionização de chama (GC-FID). As condições cromatográficas foram: temperatura do detector de 300°C , temperatura inicial do forno a 40°C (por 2 minutos) numa rampa de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 300°C por 12 minutos. O gás de arraste utilizado foi o Hidrogênio a uma vazão de $1,0\text{ml min}^{-1}$ e uma razão de split de 20:1.

5.3.2 Densidade celular

Durante todo o experimento, uma alíquota de 1,5mL foi retirada dos erlenmeyers C0.1, C1.1 e C2.1 para estimativa da densidade celular. A contagem de células foi realizada no Laboratório de Bioenergia e Catálise (LABEC/UFBA) através de microscopia (microscópio Binocular AxioStar Plus, Zeiss) com auxílio de uma Câmara de Neubauer Dupla Espelhada. Após a contagem, as alíquotas foram transferidas para uma cubeta para determinação no espectrofotômetro. Ambos os resultados foram utilizados para confecção da curva de crescimento da microalga.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 HIDROCARBONETOS TOTAIS DO PETRÓLEO

Os resultados encontrados para HTP e MCNR para os experimentos controle (água salina e petróleo) CT1 e CT2 são mostrados nas figuras 7 e 8.

Figura 7 - Concentrações médias de HTP (mg L^{-1}) do experimento controle.

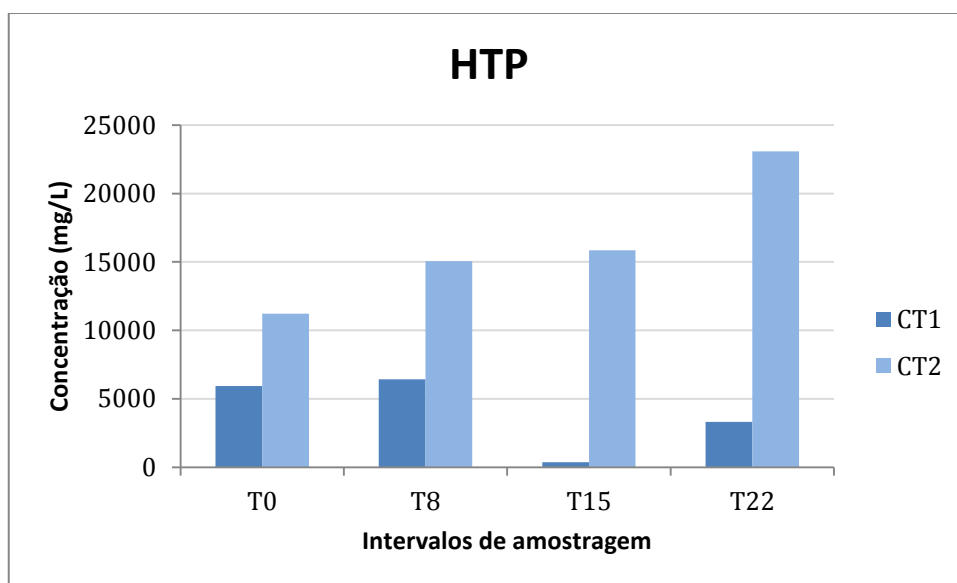
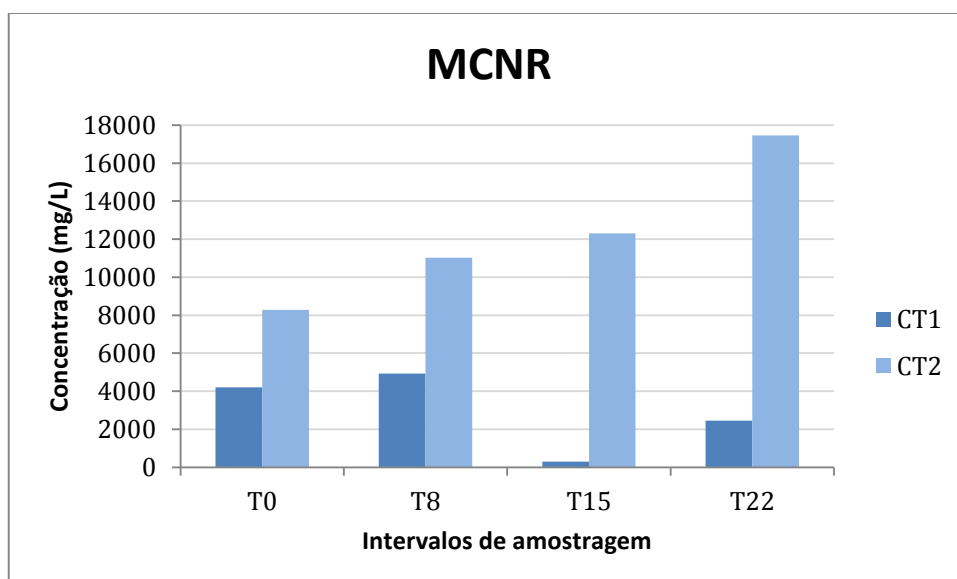


Figura 8 - Concentrações médias de MCNR (mg L^{-1}) do experimento controle.



Os valores de HTP variaram entre 364 e 6.421mg L⁻¹ para CT1 e entre 11.226 e 23.081mg L⁻¹ para CT2. Os valores de MCNR variaram entre 303 e 4.922mg L⁻¹ e entre 8.273 e 17.450mg L⁻¹ para CT1 e CT2, respectivamente.

Em experimentos para avaliar a degradação do petróleo, espera-se que haja uma diminuição na concentração de HTP e aumento nos valores de MCNR. Caso isso ocorra, pode-se afirmar que os compostos mais leves estão sendo degradados – e como a MCNR pode ser utilizada para avaliar a degradação, observa-se o seu aumento.

No controle CT1, observa-se o aumento e a diminuição nos valores de HTP e MCNR ao longo do experimento, o que pode caracterizar a degradação de alguns compostos ou, segundo Okpokwasili e Amanchukwu (1988), pode ser resultado da evaporação desses compostos ou de outros fatores que não estejam relacionados ao ataque e degradação microbianos.

Para o controle CT2, os valores de HTP e MCNR aumentam com o passar do tempo. Como nesse experimento a concentração de óleo é maior, também é necessário mais tempo para que a solubilidade do óleo aumente e se torne mais disponível aos processos degradativos, o que justifica o aumento das concentrações de HTP.

É importante ressaltar que, embora os valores encontrados no tempo 15 para o experimento CT1 tenham sido muito pequenos, não se pode afirmar que houve tamanha degradação, uma vez que podem ter ocorrido erros durante a amostragem ou no processo de extração – tal suposição não pode ser confirmada, pois não houve triplicata do experimento controle.

Como as simulações não estavam submetidas à aeração, as mudanças nesses valores ao longo dos dias pode ter sido causada pela ação dos íons dissolvidos da própria água salina, que aumentou a solubilidade do petróleo com o tempo.

As tabelas 2 e 3 mostram as concentrações dos isoprenóides pristano e fitano e das razões pristano/fitano, pristano/n-C₁₇ e fitano/n-C₁₈ do experimento controle (água salina natural e petróleo).

Tabela 2 - Valores de pristano, fitano e razões pristano/fitano, pristano/n-C₁₇ e fitano/n-C₁₈ para CT1 em mg L⁻¹.

Intervalos	Pristano	Fitano	Pristano/ Fitano	Pristano/ n-C ₁₇	Fitano/ n-C ₁₈
T0	58	37	1,57	0,87	0,54
T8	68	42	1,62	0,86	0,54
T15	<LQM	<LQM	NA	NA	NA
T22	14	14	1,00	0,80	0,80

Tabela 3 - Valores de pristano, fitano e razões pristano/fitano, pristano/n-C₁₇ e fitano/n-C₁₈ para CT2 em mg L⁻¹.

Intervalos	Pristano	Fitano	Pristano/ Fitano	Pristano/ n-C ₁₇	Fitano/ n-C ₁₈
T0	99	59	1,67	0,74	0,51
T8	144	97	1,48	0,77	0,56
T15	136	78	1,74	0,76	0,51
T22	226	129	NA	NA	0,51

Para CT1, os valores de pristano e fitano aumentam e diminuem, enquanto que para CT2 os valores oscilam, apresentando os maiores valores ao final do experimento.

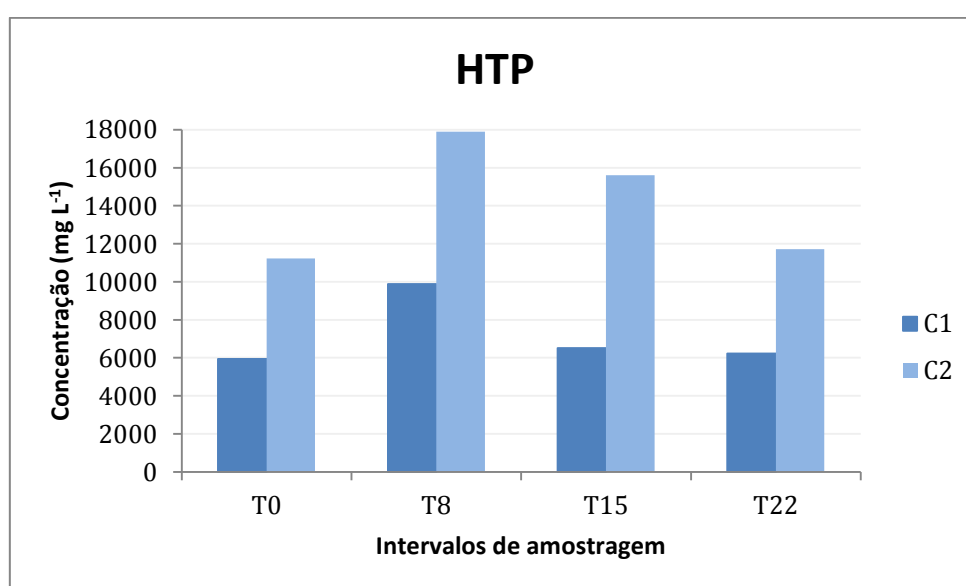
A razão pristano/fitano pode ser aplicada como indicador da origem dos hidrocarbonetos no meio. Para isso, valores acima de 1 (geralmente entre 3 e 5) indicam predomínio de fonte biogênica (STEINHAUER E BOEHM, 1992), enquanto que valores abaixo ou próximos a 1 indicam possível contaminação por petróleo. Embora os valores encontrados tenham sido superiores a 1, pode-se afirmar que houve contribuição petrogênica, visto que não haviam microrganismos em ambos os sistemas.

As razões pristano/n-C₁₇ e fitano/n-C₁₈ são utilizadas para estimar o grau de degradação do petróleo no ambiente – valores inferiores a 1 indicam presença de petróleo degradado e valores superiores a 1 indicam petróleo recente/não degradado (STEINHAUER E BOEHM, 1992). Para ambas as concentrações, os valores dessas razões foram menores que 1, podendo-se afirmar que houve

degradação do petróleo – fato comprovado pelo aumento nas concentrações de HTP e da MCNR.

Os resultados encontrados para HTP para ambas as concentrações (C1 - 45uL e C2 - 90uL) são mostrados na figura 9. Os valores de HTP variaram entre 5.932 e 9.881mg L⁻¹ para C1 e entre 11.226 e 17.888mg L⁻¹ para C2.

Figura 9 - Concentrações médias de HTP (mg L⁻¹) para as concentrações C1 e C2.

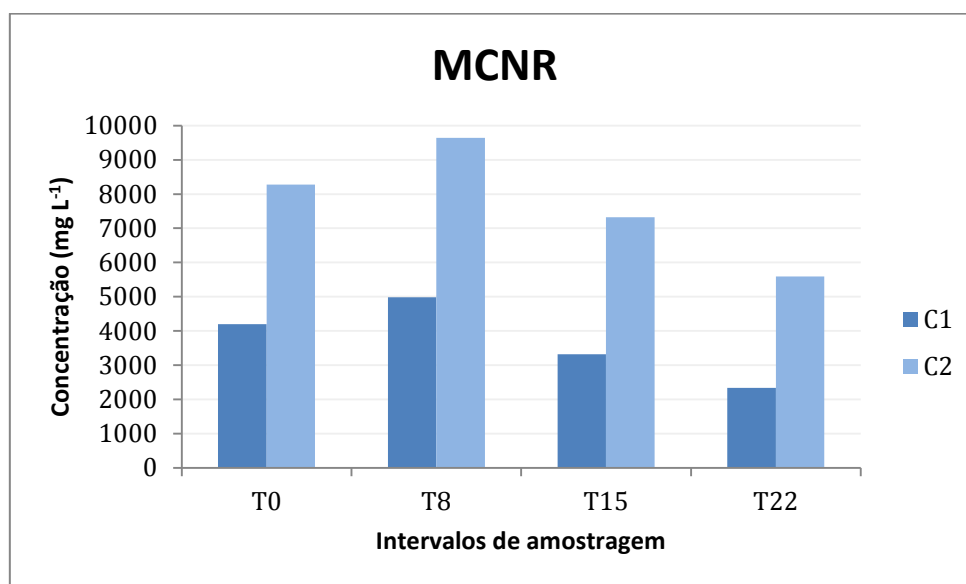


Walker et al. (1975) observaram que a microalga *Prototheca zopfii* era capaz de degradar cerca de 40% do petróleo bruto quando submetidas a condições apropriadas, degradando uma maior porcentagem de hidrocarbonetos saturados em relação aos aromáticos. Cao et al. (2013) observaram, através de experimento laboratorial, uma taxa de degradação do petróleo bruto de 29,5%, 22,4% e 18% utilizando *Scenedesmus obliquus*, *Oscillatoria sp.* e *Dunaliella tertiolecta*, respectivamente.

Analisando o gráfico de HTP do experimento com microalgas, observa-se o mesmo comportamento para ambas as concentrações. Nos primeiros 8 dias de experimento, o aumento nas concentrações se deve ao aumento da solubilidade do petróleo na água, enquanto que a redução observada nos tempos 15 e 22 se deve ao processo de degradação pelas microalgas.

Os resultados encontrados para a MCNR (mistura complexa não-resolvida) para as concentrações C1 (45 μ L) e C2 (90 μ L) são mostrados na figura 10. Os valores de MCNR variaram entre 2.334 e 4.986mg L⁻¹ e entre 5.591 e 9.641mg L⁻¹ para C1 e C2, respectivamente.

Figura 10 - Concentrações médias de MCNR (mg L⁻¹) para as concentrações C1 e C2.



Os resultados da MCNR seguem o mesmo padrão que os de HTP: aumento das concentrações nos dias iniciais e diminuição nos tempos finais. Embora o esperado seja o aumento na concentração da MCNR, a diminuição encontrada durante o experimento pode indicar que as microalgas possuem rotas metabólicas mais complexas quando comparadas com bactérias. Sendo assim, esses microrganismos podem biodegradar compostos não-resolvidos e recalcitrantes, corroborando com os resultados encontrados por Cao et al. (2013).

A degradação de compostos aromáticos foi observada, pela primeira vez, no estudo realizado por Cerniglia et al. (1980), onde os autores observaram que a capacidade de oxidação de hidrocarbonetos aromáticos é generalizada no reino das algas. Posteriormente, outros pesquisadores descobriram que as algas são capazes de oxidar diversos tipos de hidrocarbonetos (não só os aromáticos) em componentes menos prejudiciais, sugerindo seu potencial para degradação do petróleo pesado (CAO et al., 2013).

Vale ressaltar que a diversidade nas características desses organismos influencia nas suas capacidades de crescimento, adaptação e reprodução, podendo influenciar também nas taxas de biorremediação do óleo (CAO et al., 2013). Portanto, é importante analisar detalhadamente as características dos organismos que serão utilizados a fim de aperfeiçoar os processos citados acima.

Os valores de fitano e pristano e das razões pristano/fitano, pristano/n-C₁₇ e fitano/n-C₁₈ para ambas as concentrações são mostrados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Valores médios de pristano, fitano e razões pristano/fitano, pristano/n-C₁₇ e fitano/n-C₁₈ para C1 em mg L⁻¹.

Intervalos	Pristano	Fitano	Pristano/ Fitano	Pristano/ n-C ₁₇	Fitano/ n-C ₁₈
T0	58	37	1,57	0,87	0,54
T8	23	14	2,57	1,26	0,35
T15	6	9	0,61	0,38	0,38
T22	5	8	0,60	0,45	0,40

Tabela 5 - Valores médios de pristano, fitano e razões pristano/fitano, pristano/n-C₁₇ e fitano/n-C₁₈ para C2 em mg L⁻¹.

Intervalos	Pristano	Fitano	Pristano/ Fitano	Pristano/ n-C ₁₇	Fitano/ n-C ₁₈
T0	99	59	1,67	0,74	0,51
T8	49	42	1,18	0,69	0,42
T15	35	34	1,02	0,69	0,45
T22	22	25	0,87	0,66	0,44

Nas duas simulações, observa-se a diminuição nos valores de pristano e fitano com o tempo. A razão pristano/fitano, utilizada para avaliar a contribuição biogênica, apresentou aumento no tempo 8 e, logo em seguida, voltou a diminuir no experimento C1, enquanto que em C2 nota-se apenas o decréscimo dos valores médios.

As razões pristano/n-C₁₇ e fitano/n-C₁₈ apresentaram, de forma geral, valores inferiores a 1, indicando a ocorrência de petróleo degradado, porém não é indicado que, nesse experimento, essas razões sejam utilizadas como indicadores de

biodegradação. De acordo com Gassmann (1981), o fitol é um dos constituintes da clorofila e sua degradação, segundo Figueiredo (1999), produz diversos alcanos isoprenóides acíclicos, dentre eles o pristano (reações de oxidação) e o fitano (reações de desidratação).

6.2 DEGRADAÇÃO DE n-ALCANOS

Para calcular a degradação dos n-alcanos foi necessário separar esses compostos de acordo com os seus pontos de ebulição (PE). Sendo assim, os n-alcanos de baixo peso molecular (BPM) são aqueles que possuem PE inferior a 350°C, enquanto que os n-alcanos de alto peso molecular (APM) são aqueles com PE superior a 350°C. Os resultados de n-alcanos de baixo e alto peso molecular encontrados para ambas as concentrações C1 e C2 são mostrados nas figuras 11 e 12.

Os valores dos n-alcanos de baixo peso molecular variaram entre 74 e 430mg L⁻¹ para C1 e entre 219 e 745mg L⁻¹ para C2. Para os n-alcanos de alto peso molecular, os resultados variaram entre 315 e 794mg L⁻¹ para C1 e entre 384 e 905mg L⁻¹ para C2.

Figura 11 - Concentrações de n-alcenos de baixo peso molecular (BPM) no início e final do experimento para as concentrações C1 e C2 em mg L^{-1} .

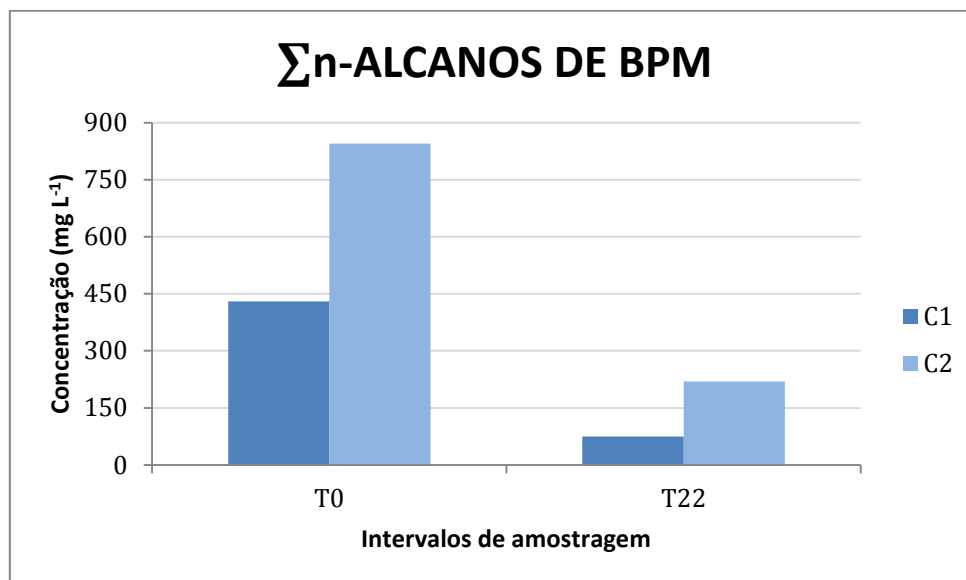
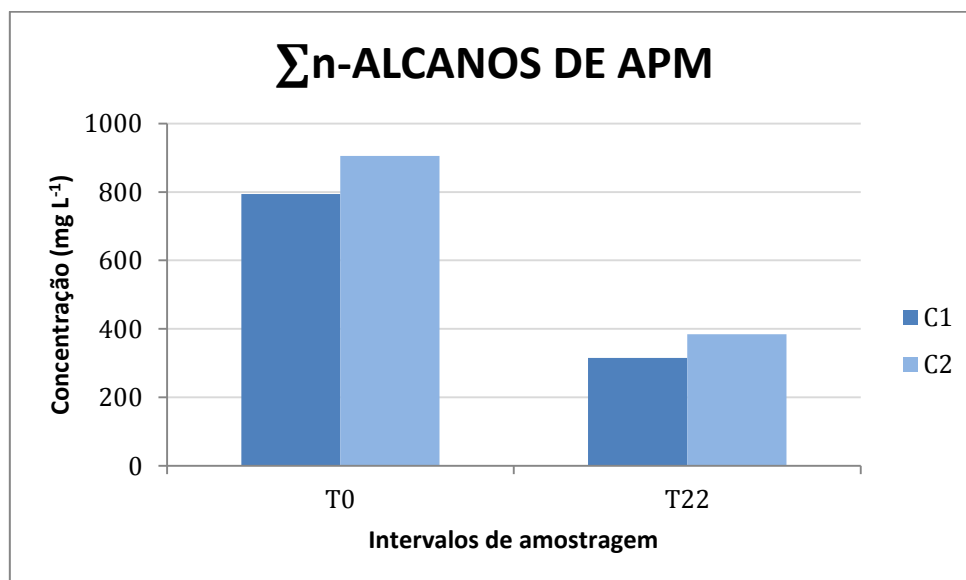


Figura 12 - Concentrações de n-alcenos de alto peso molecular (APM) no início e final do experimento para as concentrações C1 e C2 em mg L^{-1} .



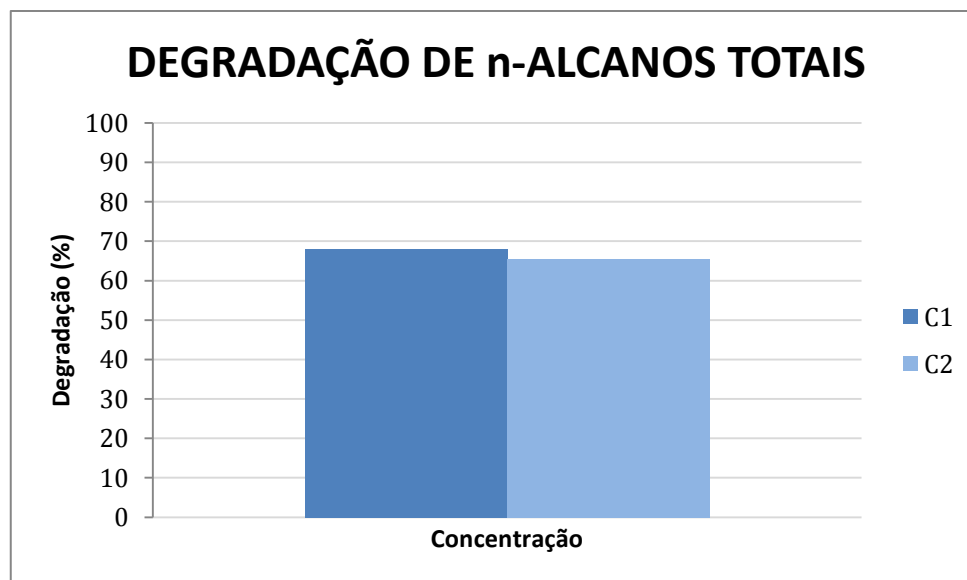
Utilizando esses valores, foi possível calcular a degradação desses compostos através de uma regra de três simples. Sendo assim, os valores encontrados para degradação do experimento com concentração C1 foram de 83% e 60% para os n-

alcanos de baixo e alto peso molecular, respectivamente. Para o experimento com concentração C2, os cálculos mostraram que a degradação variou entre 74% (para os n-alcanos de baixo peso molecular) e 58% (para os n-alcanos de alto peso molecular).

A diferença observada entre a degradação dos n-alcanos de BPM e APM pode estar relacionada à quantidade de óleo que foi adicionada em cada experimento. De acordo com Kalhor et al.(2017), a elevada concentração de alguns compostos do petróleo pode ser inibitória aos microrganismos, reduzindo suas taxas metabólicas e, conseqüentemente, influenciando a taxa de degradação.

A partir do somatório de n-alcanos para ambas as concentrações foi possível calcular a degradação para cada simulação (figura 13). O valor obtido para a degradação no experimento C1 foi de 68%, enquanto que para C2 o valor encontrado foi de 65%.

Figura 13 - Degradação de n-alcanos totais (%) para as concentrações C1 e C2.



Embora os resultados tenham apresentados valores próximos, observa-se que a concentração inicial de petróleo pode apresentar um efeito negativo sobre a taxa de remoção (ou degradação) conforme reportado por Del'Arco e de França (2001) e Ferreira (2012). Como a concentração C2 era praticamente o dobro de C1, a proximidade entre as taxas de degradação justificam-se pela necessidade de um

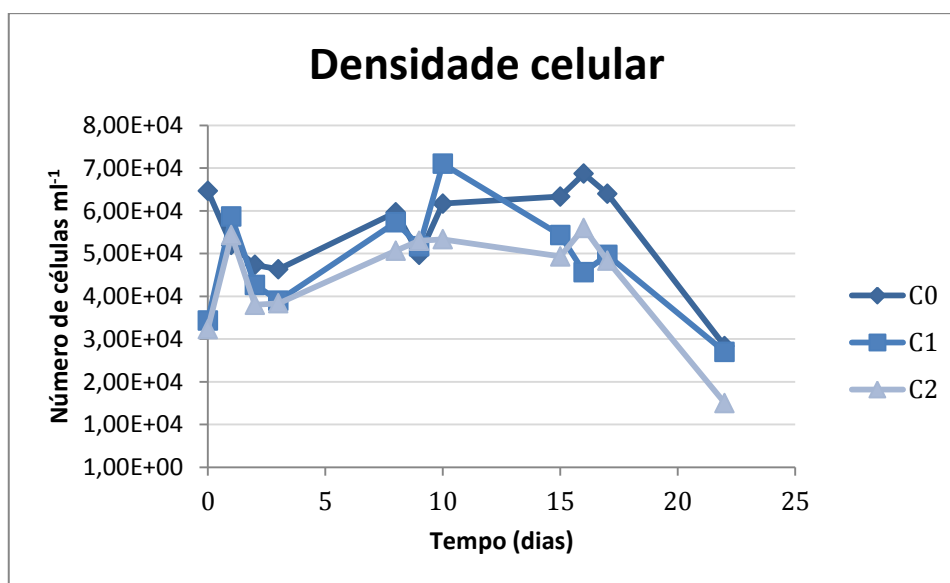
período de tempo maior para que o óleo se tornasse mais disponível aos processos degradativos. Ainda assim, os resultados aqui apresentados mostram a eficácia dessa microalga na degradação de compostos do petróleo.

6.3 DENSIDADE CELULAR

Os valores da contagem de células são mostrados na figura 14. A contagem foi realizada em intervalos de 3 em 3 dias e, caso não houvesse condições de realizá-la no mesmo dia, as amostras eram congeladas e contadas no dia seguinte, sem ultrapassar o período de 48h para contagem e leitura no espectrofotômetro.

Para a curva C0 (água marinha natural e microalga), o número de células variou entre $2,83 \times 10^4$ e $6,87 \times 10^4$ cél mL⁻¹. Para C1, os valores variaram entre $2,7 \times 10^4$ e $7,1 \times 10^4$; e para C2, os valores variaram entre $1,5 \times 10^4$ e $5,6 \times 10^4$ cél mL⁻¹.

Figura 14 - Valores da contagem de células utilizando câmara de Neubauer.



De forma geral, o experimento com concentração C1 apresentou o maior valor de células de microalgas, enquanto que o crescimento no experimento com concentração C2 apresentou o menor valor de células.

Analisando a curva de crescimento do fotobiorreator C0.1 (água salina natural e microalgas), o decréscimo observado nos primeiros dias pode estar associado ao estresse causado durante a montagem do experimento ou pelo consumo de nutrientes. O outro decréscimo observado no T9 pode ser explicado pela ausência de aeração no sistema causado por um problema com os compressores de ar.

As curvas dos fotobiorreatores C1 e C2 (45 μ L e 90 μ L de petróleo, respectivamente) mostram um aumento seguido de diminuição nos primeiros dias. Isso pode ter ocorrido devido ao estresse causado pela adição do petróleo, pela possível diminuição dos nutrientes ou pela presença de alguns compostos tóxicos que podem ser inibitórios aos microrganismos, reduzindo a sua taxa metabólica (KALHOR et al., 2017).

Os aumentos e reduções no número de células observado nos dias seguintes podem estar relacionados à relativa adaptação da microalga ao ambiente, característica também observada por Cao et al. (2013). Embora tenha ocorrido o mesmo problema com esses fotobiorreatores, a diminuição no T9 não foi observada, o que pode ser justificado pela melhor adaptação da microalga.

As curvas de crescimento obtidas não apresentaram o comportamento esperado - crescimento ao longo dos dias e, após certo tempo, diminuição devido à morte dos microrganismos. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de as amostragens não terem sido realizadas no mesmo horário ao longo dos dias, bem como a contagem celular. Além disso, os parâmetros físico-químicos não foram monitorados ao longo do experimento, assim como as análises dos íons dissolvidos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo consegue observar que a microalga *Nannochloropsis oculata* foi capaz de se desenvolver mesmo na presença de petróleo, demonstrando sua capacidade adaptativa e sua resistência a condições ambientais adversas (como presença de poluente e limitação de nutrientes). Além disso, a espécie estudada também mostrou ser eficaz na degradação de compostos do petróleo, inclusive compostos não-resolvidos e recalcitrantes, sendo uma descoberta de grande relevância nesse trabalho.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento de outros estudos acerca dessa espécie faz-se necessário a fim de ratificar os resultados aqui apresentados, além de auxiliar na composição de um banco de dados sobre a espécie em questão. A realização de um experimento com maior duração, utilizando outros tipos de petróleo e investigando as rotas metabólicas e das enzimas envolvidas no processo de degradação, por exemplo, além da correção de possíveis erros de amostragem e monitoramento de parâmetros físico-químicos (como temperatura e pH de cada fotobiorreator) e análise de nutrientes, mostra-se viável e pode ser uma alternativa para a obtenção de resultados mais robustos.

REFERÊNCIAS

AMMAR, S. H.; KHADIM, H. J.; MOHAMED, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 132-142, 2018.

BAUMGARDT, F. J. L. et al. Lipid content and fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 89-95, 2016.

CAO, X.; YI, Xiong; LUND, Janelle. The effect of micro-algae characteristics on the bioremediation rate of Deepwater Horizon crude oil. **J. Emerging Invest.** June, v. 17, 2013.

CARRERA-MARTINEZ, D. et al. Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 342-350, 2011.

CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T.; VAN BAALEN, C.. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. **Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 495-500, 1980.

CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, 2009.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology research international**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

DEL'ARCO, J. P.; DE FRANCA, F. P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. **Environmental pollution**, v. 112, n. 3, p. 515-519, 2001.

EL-SHEEKH, M. M.; HAMOUDA, R. A.; NIZAM, A. A. Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic

conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 82, p. 67-72, 2013.

FARIA, G. R. et al. Effects of the availability of CO₂ on growth, nutrient uptake, and chemical composition of the marine microalgae *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata*, two potentially useful strains for biofuel production. **International Research Journal of Biotechnology**. 3, n. 5, p. 65-75, 2012.

FERNANDES, L.; **Petróleo e Gás Natural**. Departamento Nacional de Produção Mineral. 2009. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/outras-publicacoes-1/2-1-petroleo-gas-natural>>. Acesso em: 13 de junho de 2018.

FERREIRA, T. F.; COELHO, M. A. Z.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.. Factors influencing crude oil biodegradation by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 785-791, 2012.

FIGUEIREDO, Luís Henrique Melges. **Investigação das Contribuições Orgânicas Antrópicas e Naturais em Sedimentos Costeiros Utilizando-se Hidrocarbonetos Marcadores**. 1999. 148f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 1999.

GALINDRO, B. M. et al. *Nannochloropsis oculata* D. microalgae growth in a treated effluent from superintensive shrimp cultivation. **Revista Agrogeoambiental**, v. 8, n. 1, 2015.

GARR, A. L.; LARAMORE, S.; KREBS, W. Toxic effects of oil and dispersant on marine microalgae. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 93, n. 6, p. 654-659, 2014.

GASSMANN, G. Chromatographic separation of diastereomeric isoprenoids for the identification of fossil oil contamination. **Marine Pollution Bulletin**, v. 12, n. 3, p. 78-84, 1981.

GUIMARÃES, Luís Pedro Costa. **Projeto e construção de um fotobiorreator para crescimento acelerado de microalgas**. 2012. 138f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia, Universidade do

Minho, 2012.

HAMIDI, N. et al. Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, v. 5, n. 4, p. 279-290, 2014.

HAMMED, A. M. et al. Growth regime and environmental remediation of microalgae. **Algae**, v. 31, n. 3, p. 189-204, 2016.

HAMOUDA, R. A. E. F.; SOROUR, N. M.; YEHEIA, D. S. Biodegradation of crude oil by *Anabaena oryzae*, *Chlorella kessleri* and its consortium under mixotrophic conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 112, p. 128-134, 2016.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal of hazardous materials**, v. 169, n. 1-3, p. 1-15, 2009.

HASSANI, H; SILVA, E. S.; AL KAABI, A. M. The role of innovation and technology in sustaining the petroleum and petrochemical industry. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 119, p. 1-17, 2017.

HODSON, P. V.; ADAMS, J.; BROWN, R. S. Oil Toxicity Test Methods Must Be Improved. **Environmental toxicology and chemistry**, 2018.

JACQUES, N. R.; MCMARTIN, D. W. Evaluation of algal phytoremediation of light extractable petroleum hydrocarbons in subarctic climates. **Remediation Journal: The Journal of Environmental Cleanup Costs, Technologies & Techniques**, v. 20, n. 1, p. 119-132, 2009.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; DE OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, v. 29, n. 1, p. 7-24, 2007.

JOHNSEN, A. R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v.133, n.1, p.71-84, 2005.

KALHOR, A. X. et al. Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**, v. 123, n. 1-2, p. 286-290, 2017.

LIU, J.; SONG, Y.; QIU, W. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: review & analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 154-162, 2017.

MARTINS, S. S. et al. Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. **HOLOS**, v. 6, p. 54-76, 2015.

MCGENITY, T. J. et al. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. **Aquatic Biosystems**, v. 8, n. 1, p. 10, 2012.

MILANI, E.J.; BRANDÃO, J.A.S.L.; ZALÁN, P.V.; GAMBOA, L.A.P. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 18, n. 3, p.351-396, 2001.

MOREIRA, Ícaro Thiago Andrade. **Avaliação da eficiência de modelos de remediação aplicados em sedimentos de manguezal impactados por atividades petrolíferas**. 2011. 221f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2011.

NASCIMENTO, E. M. et al. Protocolo para biorremediação de águas contaminadas por petróleo e derivados. **E-xacta**, v. 7, n. 1, p. 55-63, 2014.

OHSE, S. et al. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7-18, 2008.

OKPOKWASILI, G. C.; AMANCHUKWU, S. C. Petroleum hydrocarbon degradation by *Candida* species. **Environment International**, v. 14, n. 3, p. 243-247, 1988.

PI, Y. et al. Bioremediation of the oil spill polluted marine intertidal zone and its toxicity effect on microalgae. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 4, p. 877-885, 2015.

RA, C. H. et al. Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. **Renewable Energy**, v. 80, p. 117-122, 2015.

REYIMU, Z.; ÖZÇİMEN, D. Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 150, p. 40-46, 2017.

RIBEIRO, D. M. et al. Caracterização da composição química da biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanque aberto tipo raceway. In: **Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 3, 2016, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2016.

RIOS, Mariana Cruz. **Capacidade do sedimento do estuário do Paraguaçu-BA de formar agregado óleo-material particulado em suspensão (OSA)**. 2014. 65 f. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2014.

ROCHA, J. M. S.; GARCIA, J. E. C; HENRIQUES, M. H. F.. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. **Biomolecular engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 237-242, 2003.

SCHULZE, P. S. C. et al. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. **Algal Research**, v. 16, p. 387-398, 2016.

SEMPLE, K. T.; CAIN, R. B.; SCHMIDT, S. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. **FEMS Microbiology letters**, v. 170, n. 2, p. 291-300, 1999.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 10-16, 2011.

ŞIRIN, S.; SILLANPÄÄ, M. Cultivating and harvesting of marine alga *Nannochloropsis oculata* in local municipal wastewater for biodiesel. **Bioresource technology**, v. 191, p. 79-87, 2015.

ŠOŠTARIČ, M. et al. Growth, lipid extraction and thermal degradation of the microalga *Chlorella vulgaris*. **New biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 325-331, 2012.

SPEIGHT, J. G.; EL-GENDY, N. S. Petroleum Composition and Properties. In: **Introduction to Petroleum Biotechnology**. Gulf Professional Publishing, cap 1, p 1-39, 2018.

SPEIGHT, J. G.; EL-GENDY, N. S. Bioremediation of Marine Oil Spill. In: **Introduction to Petroleum Biotechnology**. Gulf Professional Publishing, cap 11, p 419-470, 2018.

SPOLAORE, P. et al. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 81, n. 6, p. 1049-1056, 2006.

STEINHAUER, M. S.; BOEHM P. D. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in nearshore sediments, river sediments, and coastal peat of Alaska Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbons input. **Marine Environmental Research**, 1992. 33 v., 223-253 p.

SU, C. H. et al. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 903-908, 2011.

SZEWCZYK, S. B. O. Processos envolvidos em um derramamento de óleo no mar. In: **Seminário e Workshop em Engenharia Oceânica (SEMENGO)**. 2006.

THOMAS, J. E. et al. **Fundamentos de engenharia de petróleo**. Rio de Janeiro: ed. Interciência, 2004.

VALDÉS, F. J. et al. Estimation of CO₂ stripping/CO₂ microalgae consumption ratios in a bubble column photobioreactor using the analysis of the pH profiles. Application to *Nannochloropsis oculata* microalgae culture. **Bioresource technology**, v. 119, p. 1-6, 2012.

VAN VOOREN, G. et al. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 421-432, 2012.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

WALKER, J. D.; COLWELL, R. R.; PETRAKIS, L. Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 79-81, 1975.

ZHU, Y.; DUNFORD, N. T. Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 6, p. 841-849, 2013.