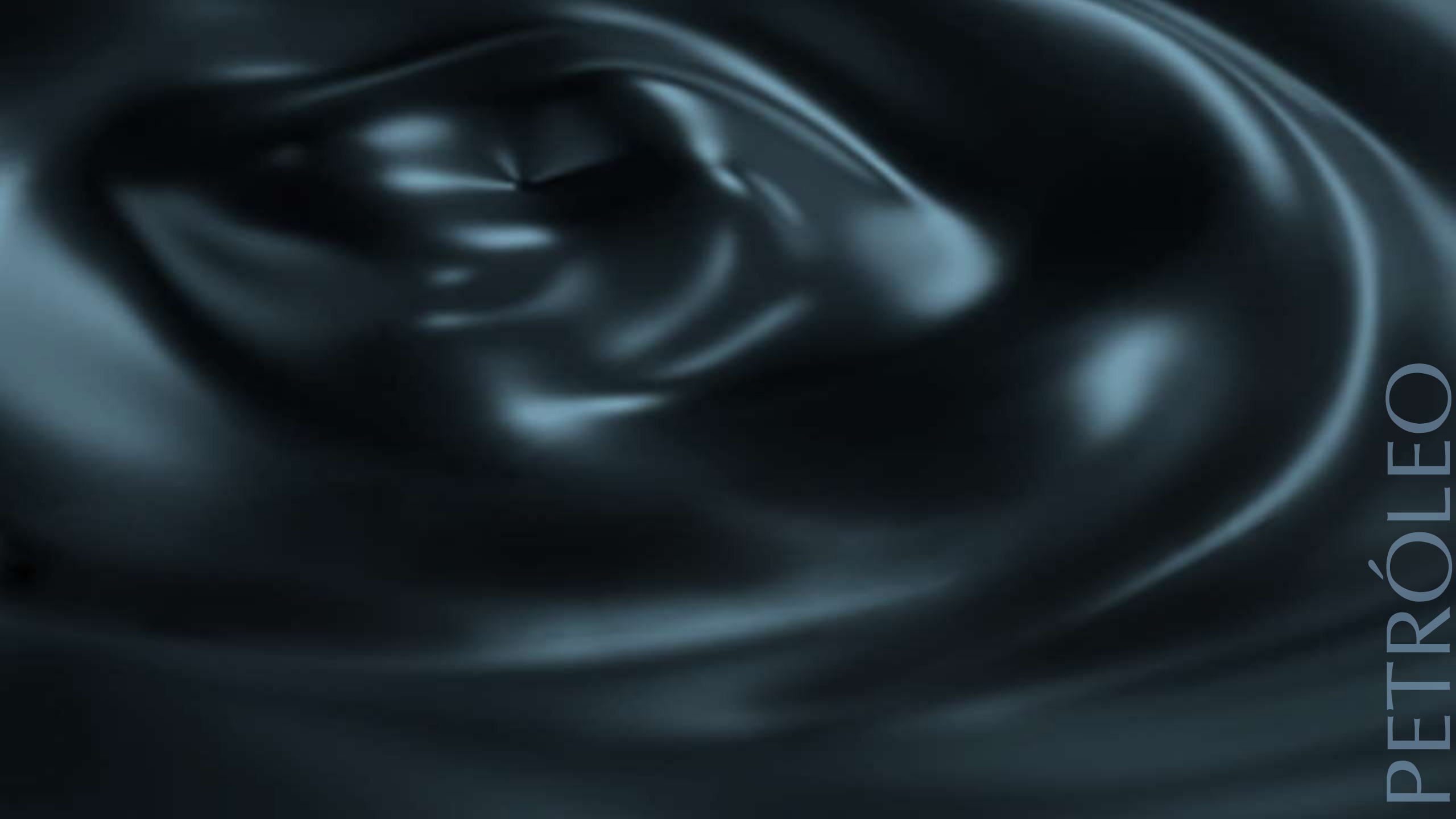


Enzimas Microbianas na Biorremediação do Petróleo

Lab Bioinovar
Unidade de Biocatálise, Bioprodutos e Bioenergia
Instituto de Microbiologia - UFRJ

Alane Beatriz Vermelho
abvermelho@micro.ufrj.br
ENZITEC 2016



PETRÓLEO

- Decomposição da matéria orgânica proveniente de animais e plantas
- 280 a 245 milhões de anos
- Variação na composição ocorre de campo para campo e até entre poços em um mesmo campo.



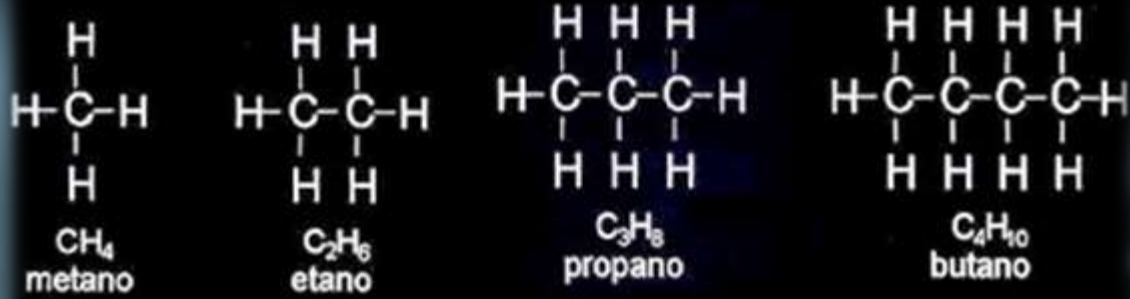
Composição

- carbono (80 a 90% em peso)
- hidrogênio (10 a 15%)
- enxofre (até 5%),
- oxigênio (até 4%),
- nitrogênio (até 2%)
- traços de elementos metálicos

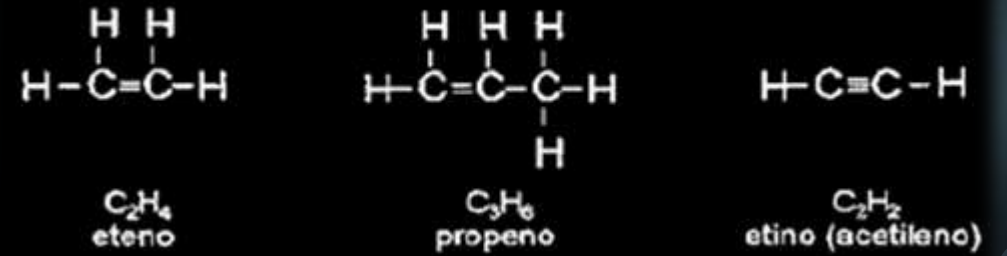
Hidrocarbonetos (HC)



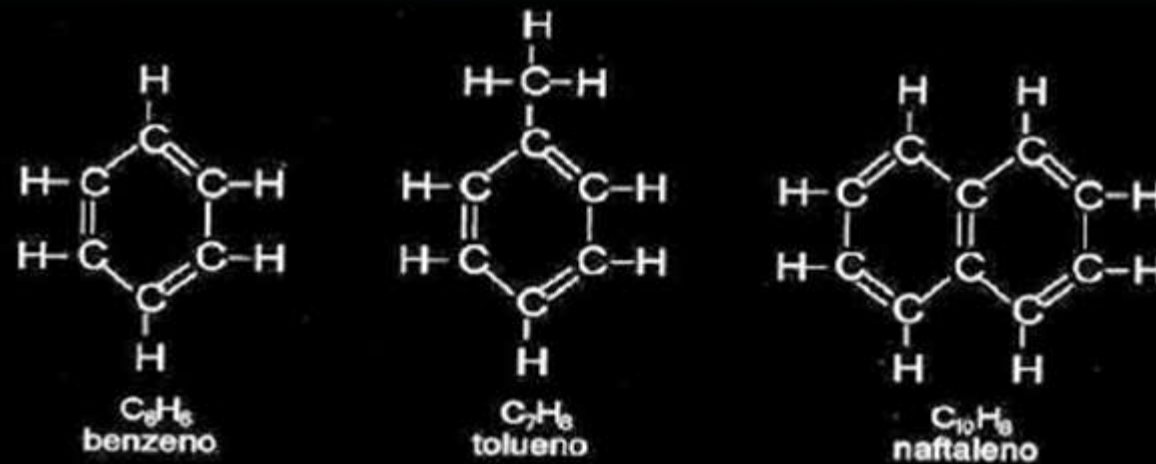
HC n-alcános



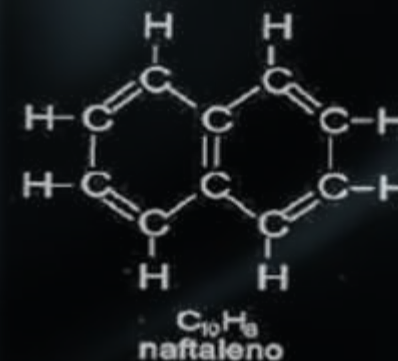
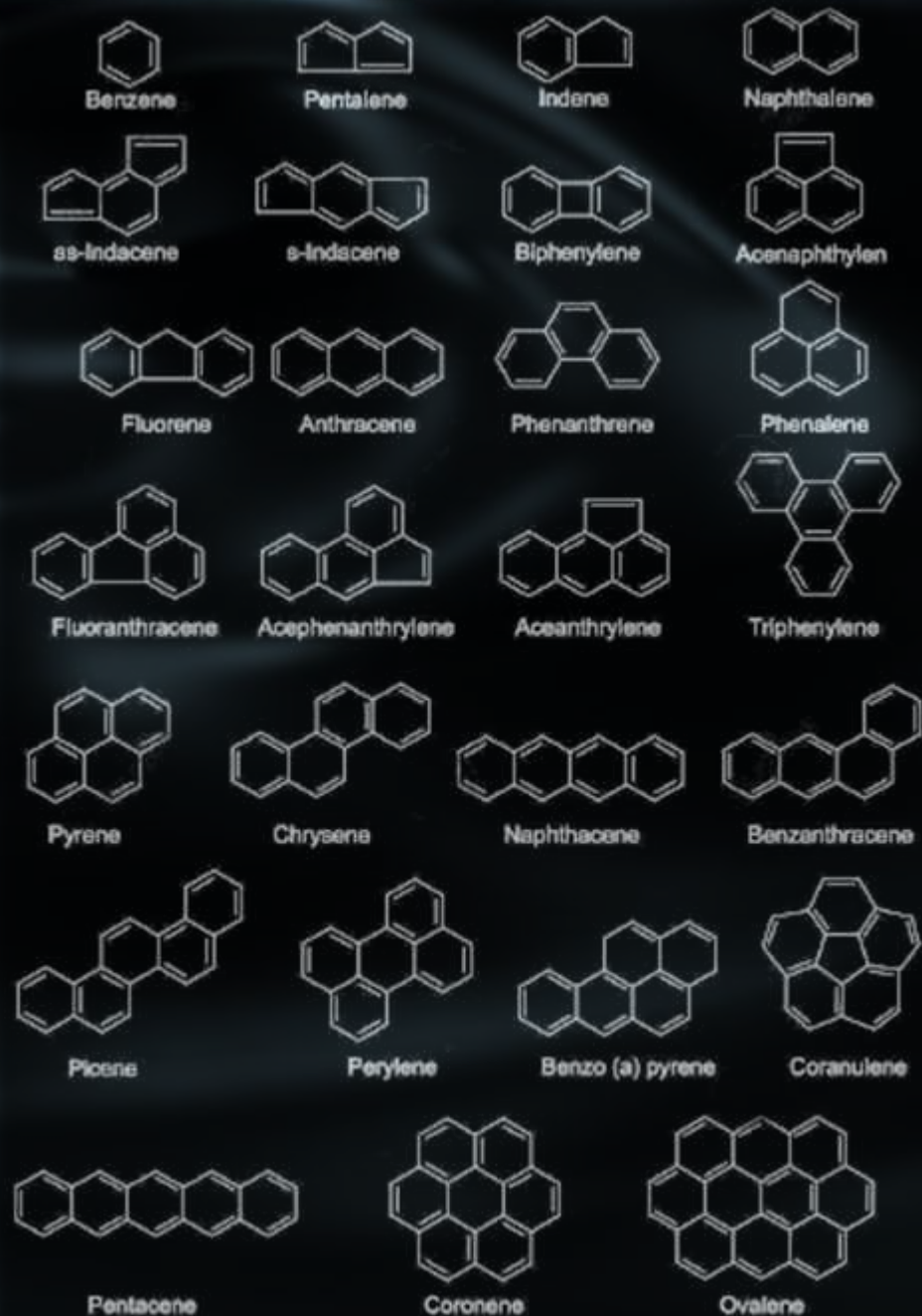
Insaturados - olefinas



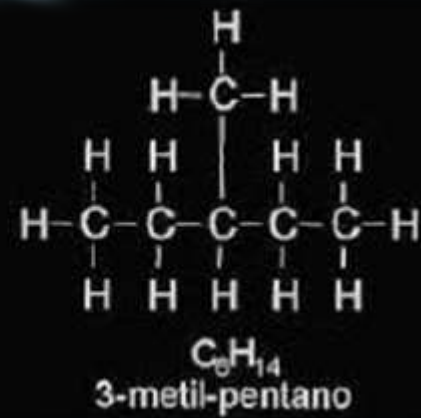
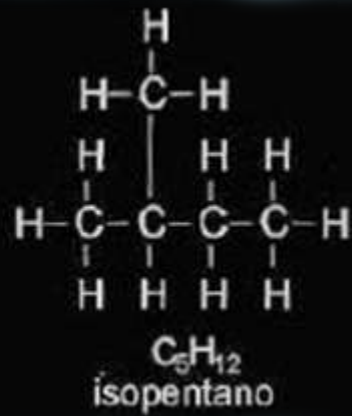
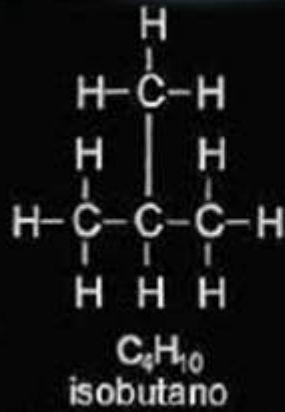
HC Aromáticos ou arenos



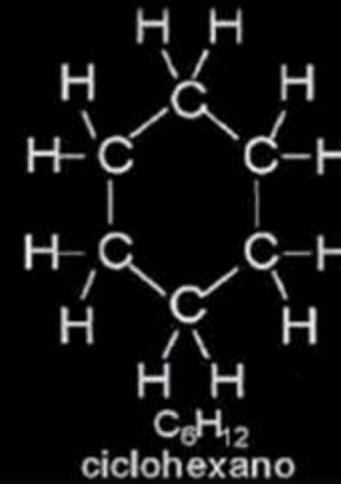
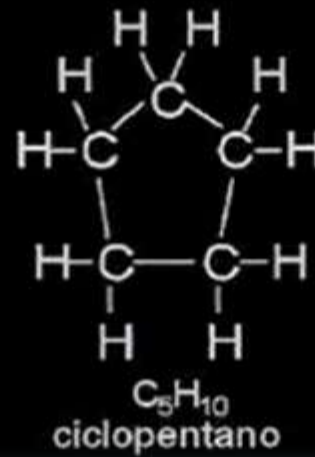
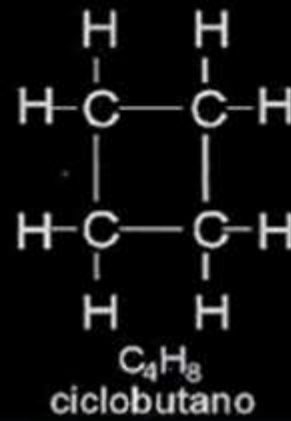
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)



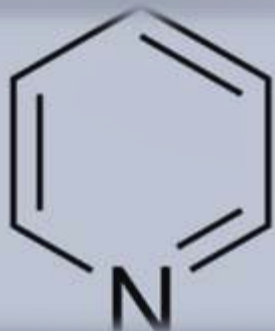
HC - Isoalcanos ramificados



HC- Cicloalcanos

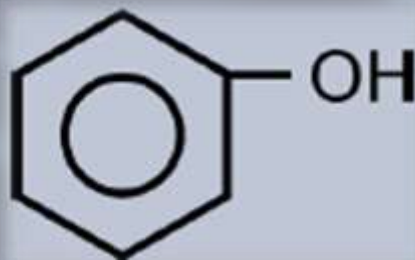


Outros compostos



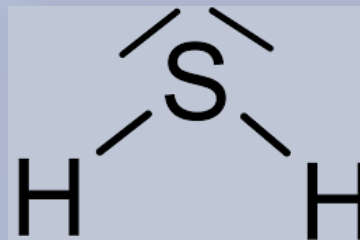
Nitrogenados

de piridina, quinolinas, pirróis, indóis, porfirinas e compostos policíclicos com enxofre, oxigênio e metais.



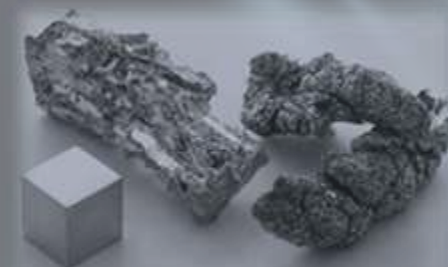
Oxigenados

Em forma complexa, como ácidos carboxílicos, fenóis, cresóis, ésteres, amidas, cetonas e benzofuranos



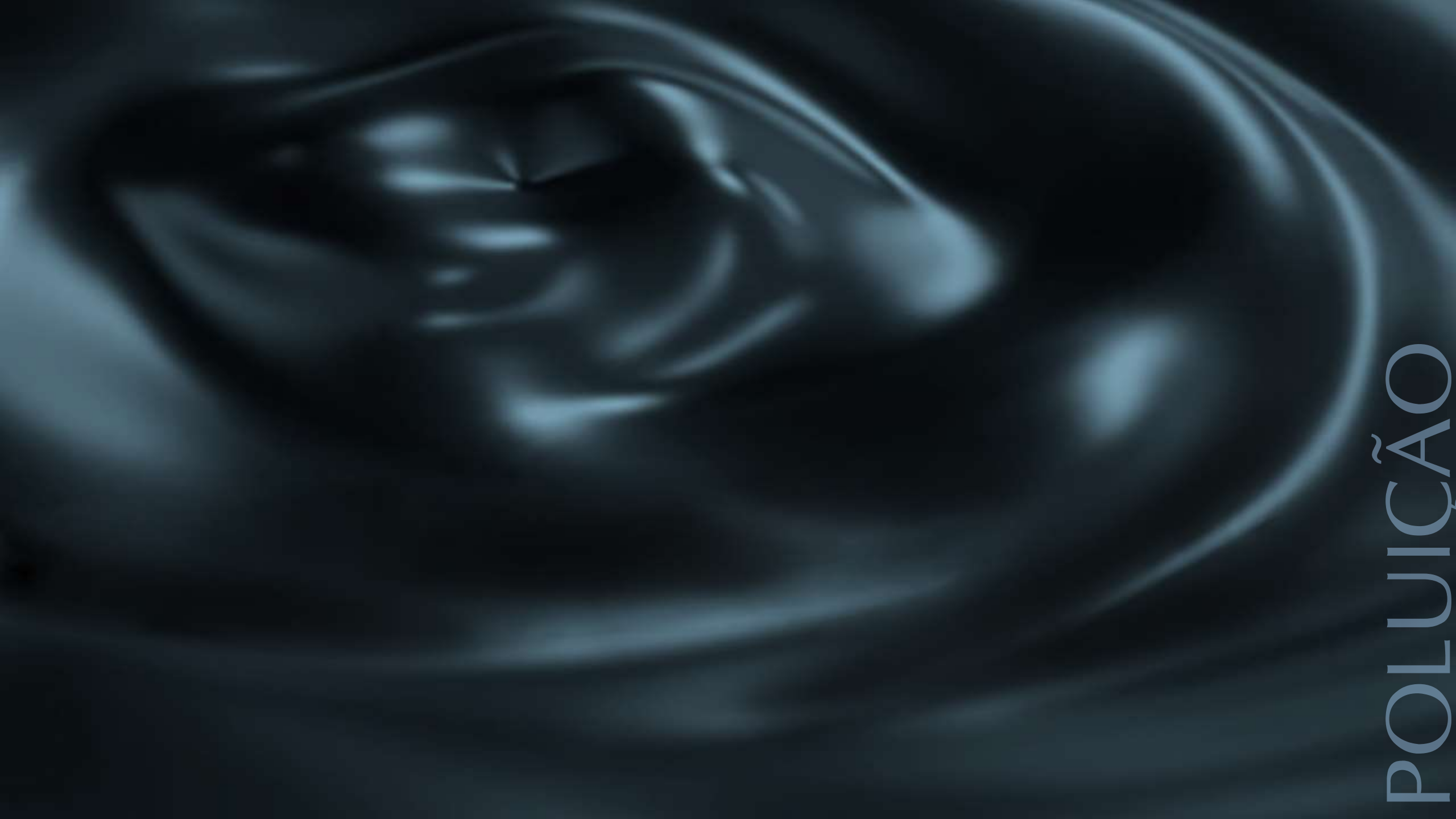
Sulfurados

sulfetos, polissulfetos, benzotiofenos e derivados moléculas policíclicas com nitrogênio e oxigênio, gás sulfídrico, dissulfeto de carbono, sulfeto de carbonila e enxofre elementar.



Metálicos

Sais orgânicos dissolvidos na água emulsionada ao petróleo compostos organometálicos complexos, Zn, Fe, Cu, Pb, Mo, Co, As, Mn, Cr, Na, Ni e V.



POLUIÇÃO

- Vazamentos e derramamentos → transporte, produção, exploração, refino e armazenagem de petróleo e seus derivados.
- Petróleo no mar → média 600 mil toneladas por ano
- Poluente causa morte, mutação e danos para a biodiversidade
- Compostos aromáticos → mesmo em baixa concentração bloqueiam a quimiorrecepção de organismos marinhos
- Alguns compostos aromático são resistentes → vão para a cadeia alimentar

Contaminação por Petróleo

Guerra do Golfo/Kuwait
240 milhões de galões
de petróleo bruto

1991



2000

Bacia do Rio Iguaçu
(PR)
Um milhão de galões

Golfo do México
206 milhões de galões
de petróleo

2010



2016

Rio Cubatão
contaminado
por petróleo após
vazamento na Transpetro





Derramamento
de óleo no
Golfo

17.000
empregos
perdidos

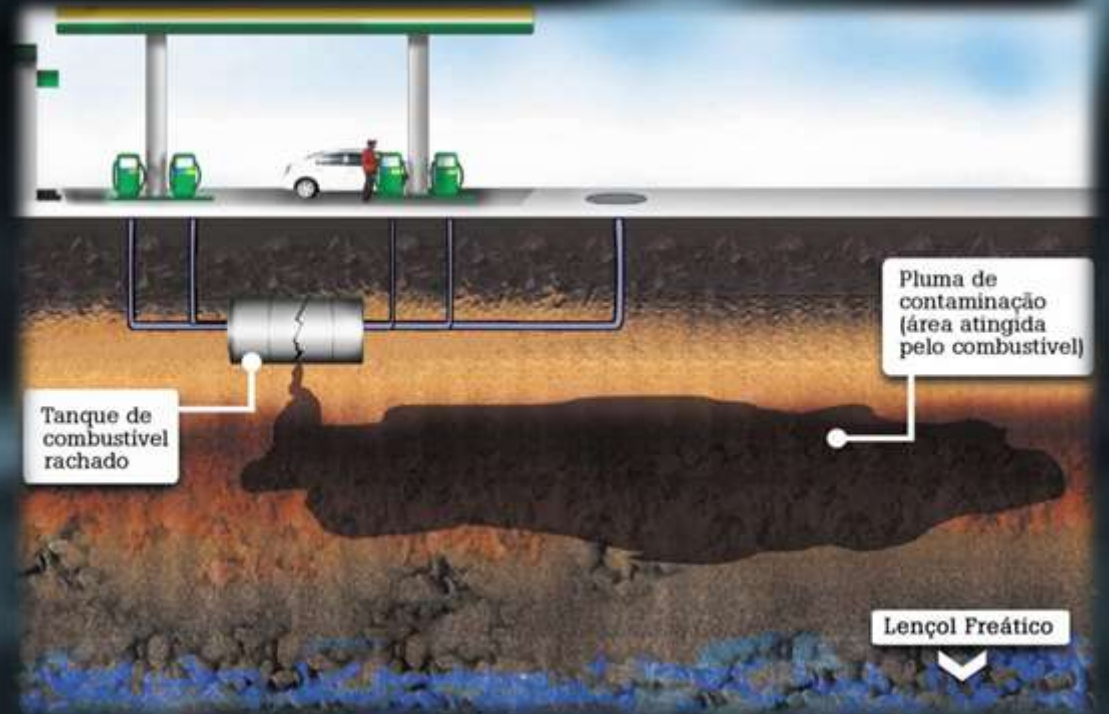
150 tartarugas
marinhas e 326
aves mortas

Tipos de Poluição

- Hidrocarbonetos do Petróleo nos Ambientes Aquáticos
- Hidrocarbonetos do Petróleo no Solo
- Hidrocarbonetos do Petróleo no Ar

Veja como ocorrem os vazamentos subterrâneos

>>



POLUIÇÃO

Medidas de segurança

- **CONAMA 398/08**

Dispõe sobre o conteúdo mínimo do Plano de Emergência Individual para incidentes de poluição por óleo em águas sob jurisdição nacional, originados em portos organizados, instalações portuárias, terminais, dutos, sondas terrestres, plataformas e suas instalações de apoio, refinarias, estaleiros, marinas, clubes náuticos e instalações similares, e orienta a sua elaboração.

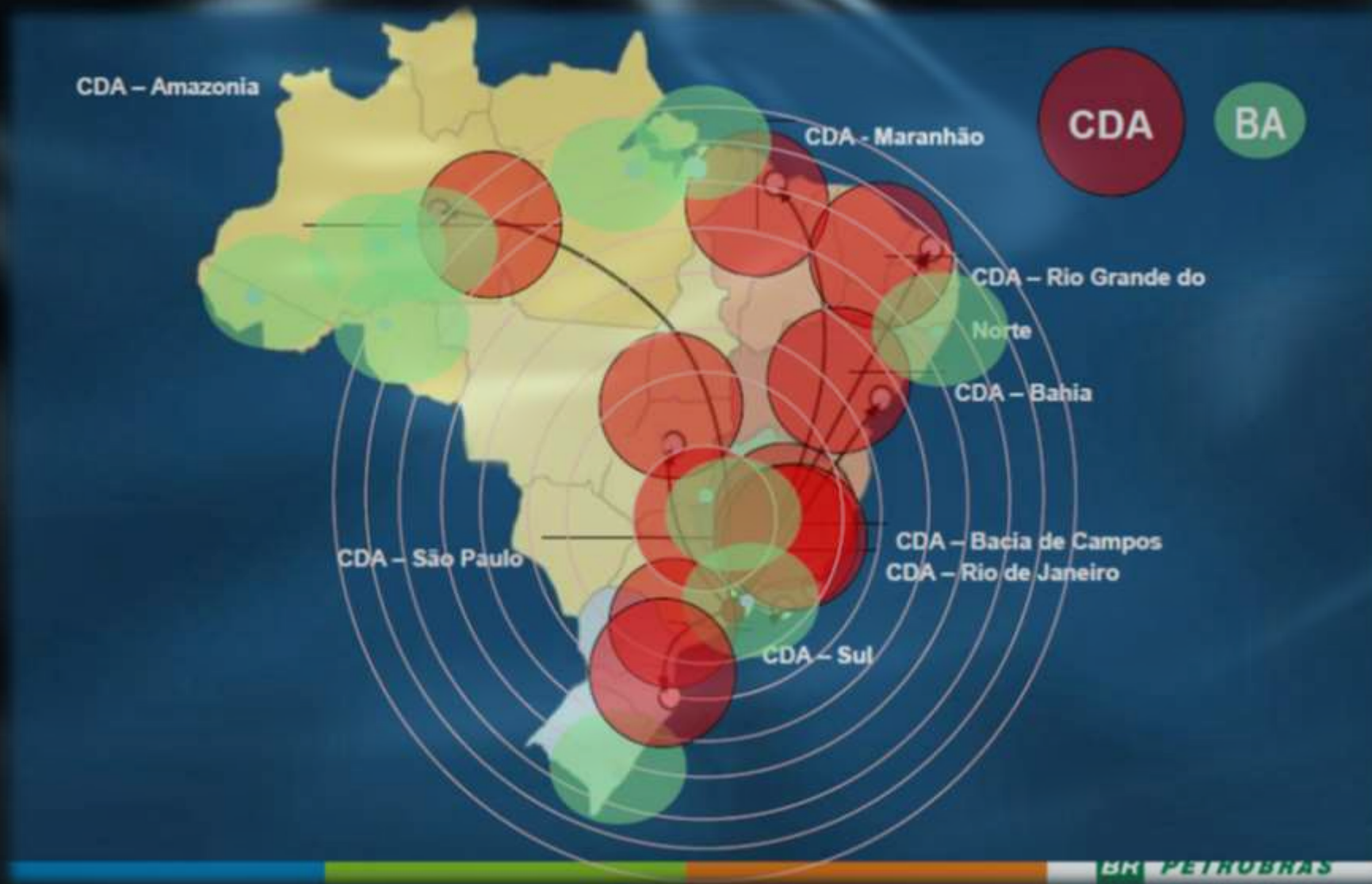
- **PETROBRAS CDAs - Centros de Defesa Ambiental**

PETROBRAS CDAs

- *Centros de Defesa Ambiental* -

- Resposta a vazamentos de nível 1, 2 e 3;
- 24 horas de prontidão;
- Tempo de Resposta: 2 horas para uma distância de 20 km;
8 horas para uma distância de 400km; 24 horas para qualquer distância
- Treinamento e manutenção de todo equipamento da Petrobras;
- Planos de Contingência;
- Análise de Risco para vazamentos de óleo;
- Centros contam com mais de 200 pessoas treinadas e 2000 trabalhadores treinando

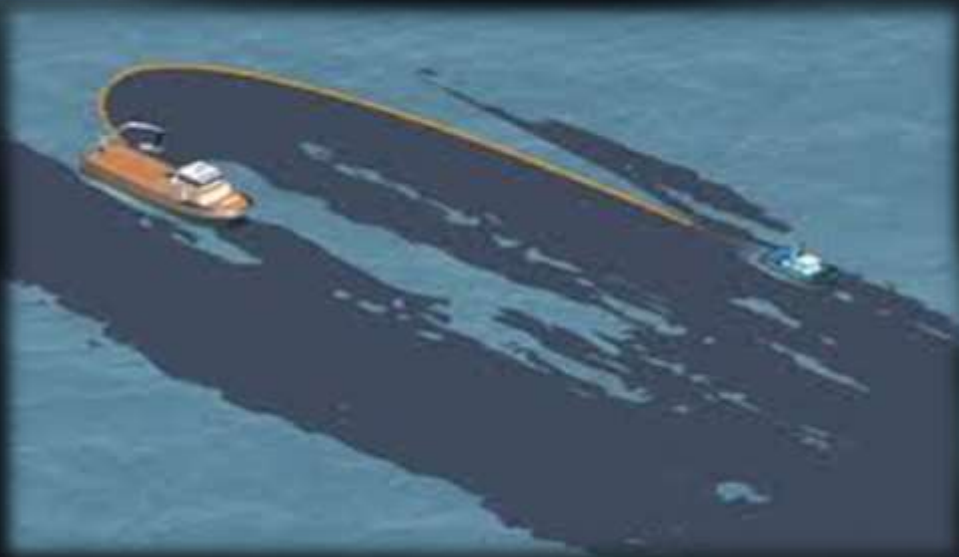
CDA - *Centros de Defesa Ambiental*



Equipamentos

- Barreiras de contenção de diversos tamanhos e para quaisquer aplicações
- Barreiras absorventes
- Mantas Absorventes
- Biorremediadores
- Recolhedores de óleo portáteis, montados em embarcações e para quaisquer tipos de óleos
- Tanques infláveis
- Embarcações de serviço e recolhedoras de óleo
- Bombas para hidrocarbonetos
- Barcos recolhedores de hidrocarbonetos
- Material de limpeza de áreas atingidas para 3000 pessoas.
- Equipamentos de Comunicação para 200 pessoas.
- Sistemas para Aplicação de dispersantes
- Dispersantes Químicos

Barreiras de contenção



Remoção mecânica



Austrália



Cubatão



Remoção manual. Vazamento em oleoduto,
São Sebastião, SP. Banco de imagens da CETESB.

<<

Remoção mecânica

Barcos recolhedores de óleo



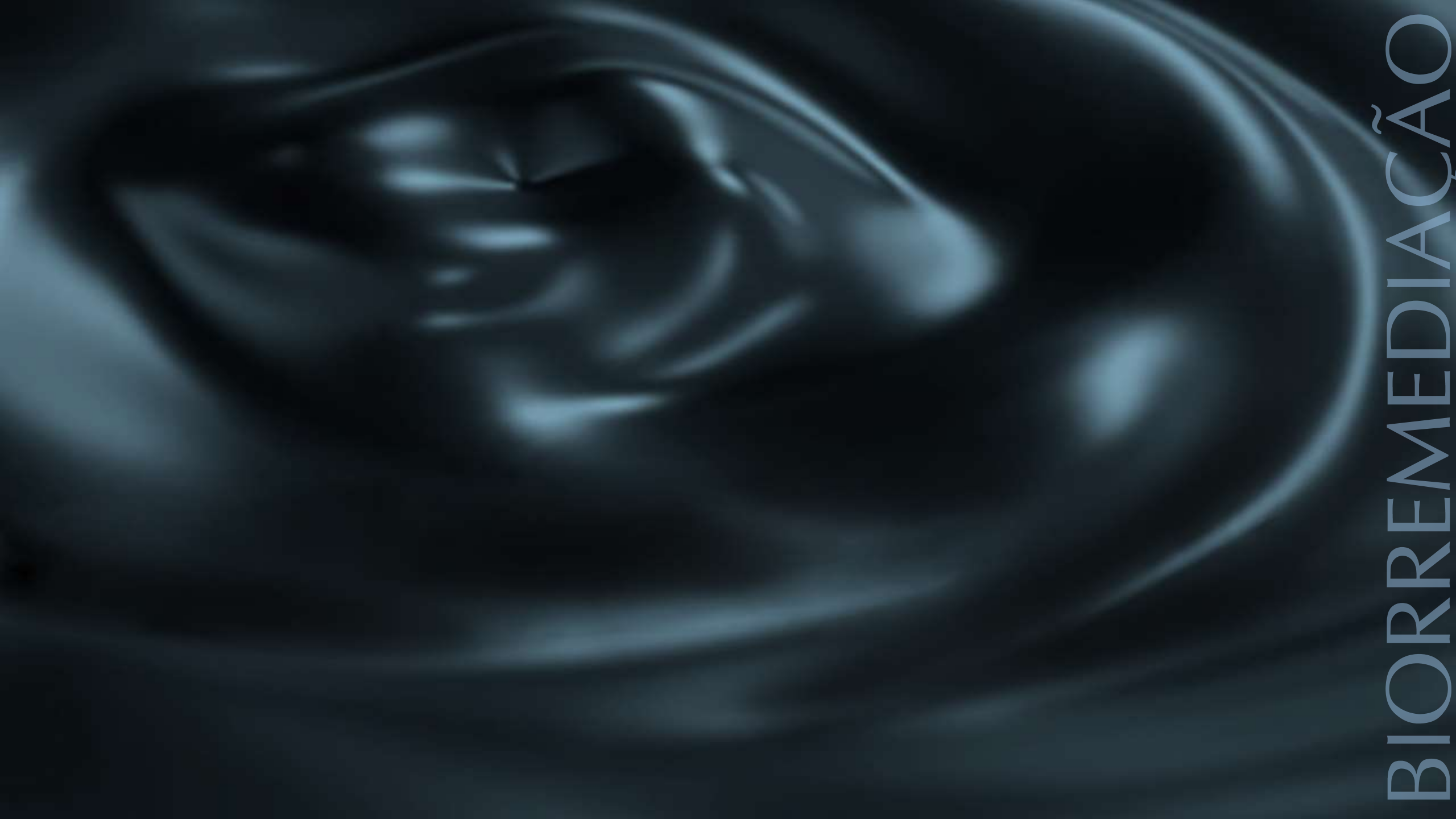
Oil Skimmer
tipo vertedouro, preparado para
bombear até 250m³/h (máx) de
óleo.

Características físico-químicas influentes na Contaminação Ambiental

Depende do poluente

Solubilidade em água
Volatilidade
Densidade
Viscosidade
Ponto de orvalho

Ambiente: temperatura, nutrientes, salinidade, pressão, oxigênio



BIORREMEDIAÇÃO

Biorremediação – Microrganismos

- Biorremediação *in situ*

- Uso de microrganismos - preferência: autóctones. Cepas nativas >

- uso: solos, áreas marinhas

- cepas introduzidas: modificadas geneticamente

- biodisponibilidade, aeração, temperatura e nutrientes (N, P, K, etc.) nas áreas contaminadas

- baixo custo

- pode levar a parcial ou completa mineralização:  CO₂, água, compostos inorgânicos

- Bioestimulação

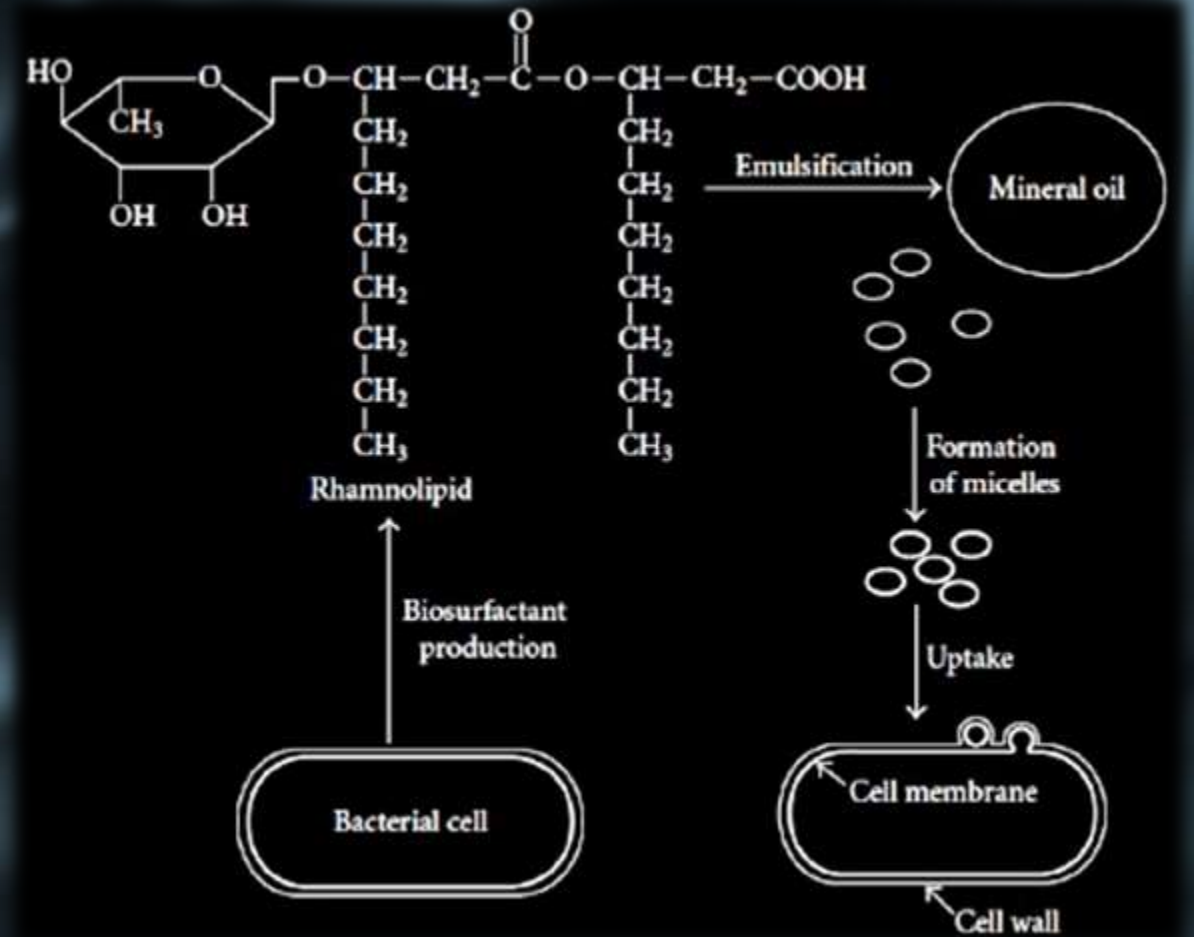
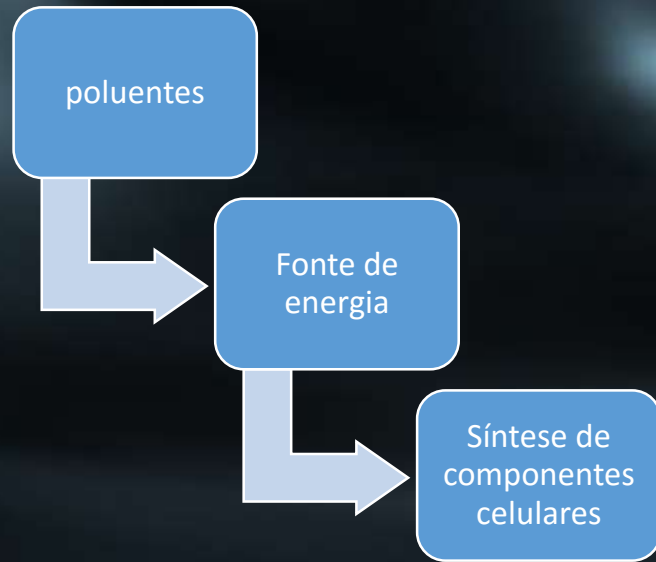
Na bioestimulação, nutrientes são adicionados e as condições ambientais otimizadas visando o desenvolvimento de populações nativas de microrganismos.

Nutrientes: carbono, oxigênio, etc.

- **Bioaugmentação**

São adicionados microrganismos capazes de degradar os contaminantes específicos.

Degradação de HC pode ser aumentada aplicando surfactantes.



Biorremediação *ex situ* → *solo*

- O solo é removido e tratado em uma estação de tratamento separada
- Métodos incluem a compostagem, biorreatores e landfarming
- Espalhamento da camada superficial do solo contaminado escavado (não mais que 1,5 metros) promovendo a atividade microbiana aeróbia
- Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo podem ser adicionadas

Landfarming



Mais degradado



Menos degradado

N-alcanos

Alcanos
Ramificados

Aromáticos de
baixo peso
molecular

Cicloalcanos

Hidrocarbonetos
Poliaromáticos

Fatores que afetam a biodegradação

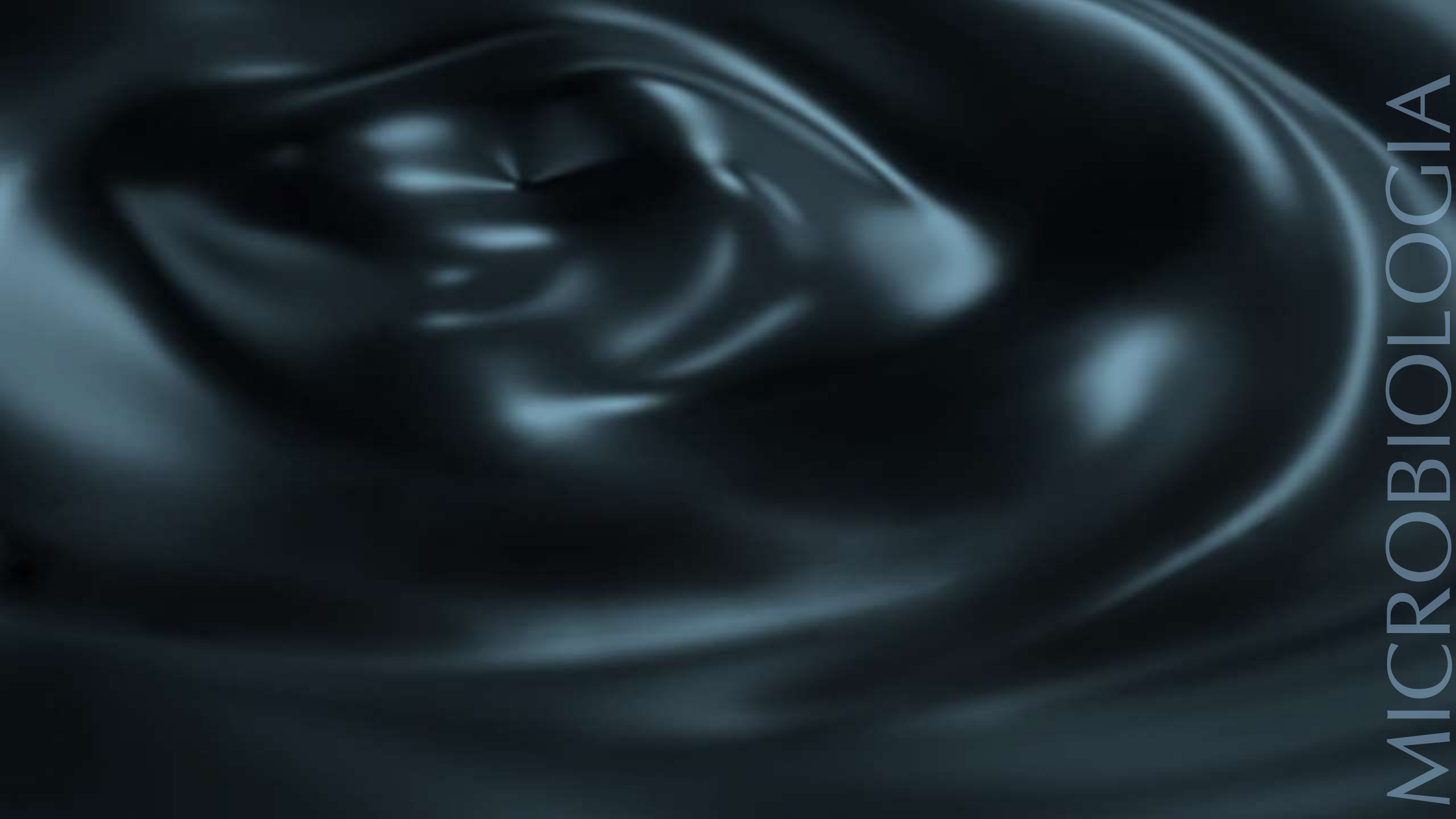


Fatores que afetam a biodegradação



Outros fatores





MICROBIOLOGIA

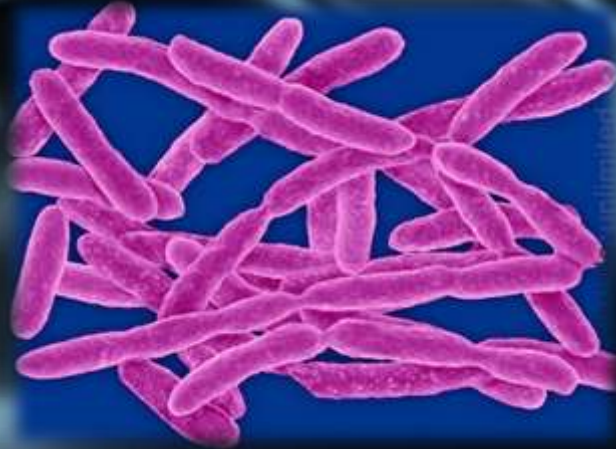
Microorganismos encontrados no petróleo e derivados



Degradadores de hidrocarburos

Gram-negativos

- *Vibrio*
- *Flavobacterium*
- *Serratia*
- *Acinetobacter*
- *Pseudomonas*
- *Haemophilus*
- *Marinobacter*
hydrocarbonoclasticus



Flavobacterium



Acinetobacter

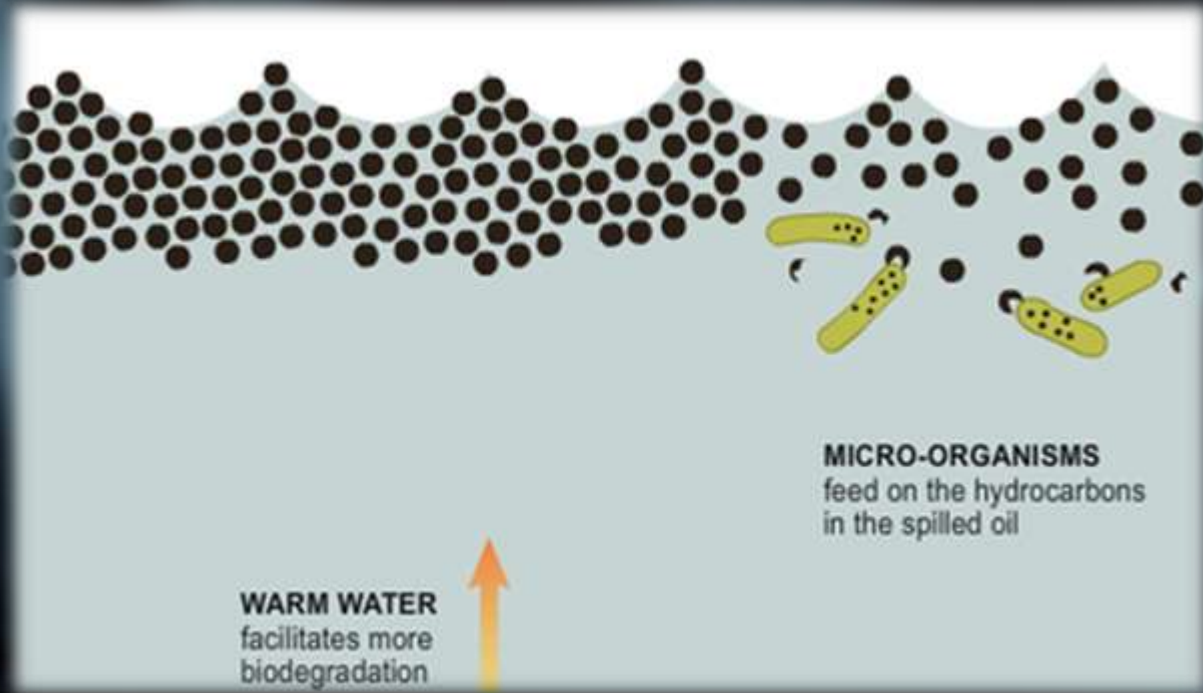


Vibrio



Pseudomonas

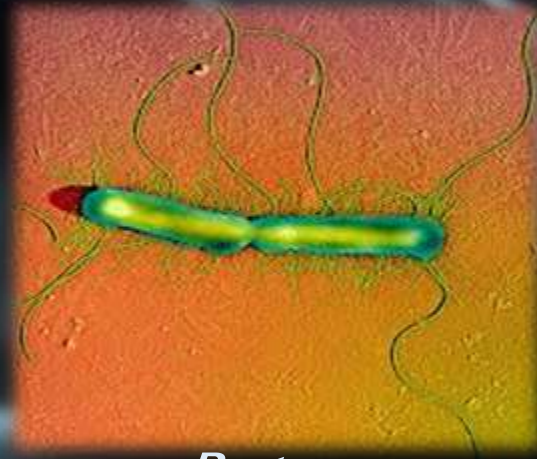
Biodegradação usando *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*



Degradadores de hidrocarburos

Gram-negativos

- *Alcanivorax borkumensis*
- *Flexibacter*
- *Cytophaga*
- *Bacteroides*
- *Achromobacter*
- *Proteus*
- *Spirillum*



Proteus



Achromobacter

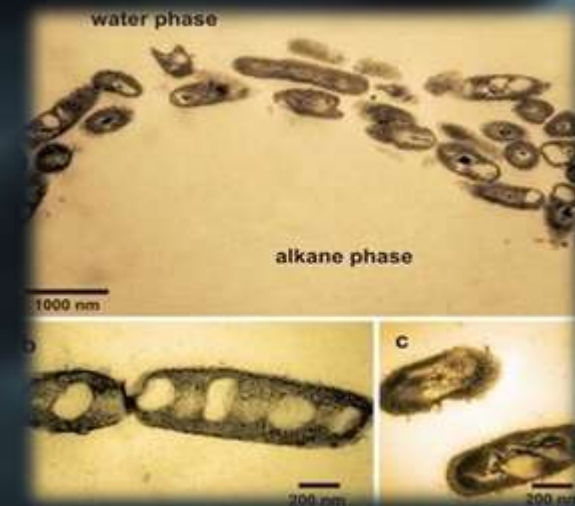
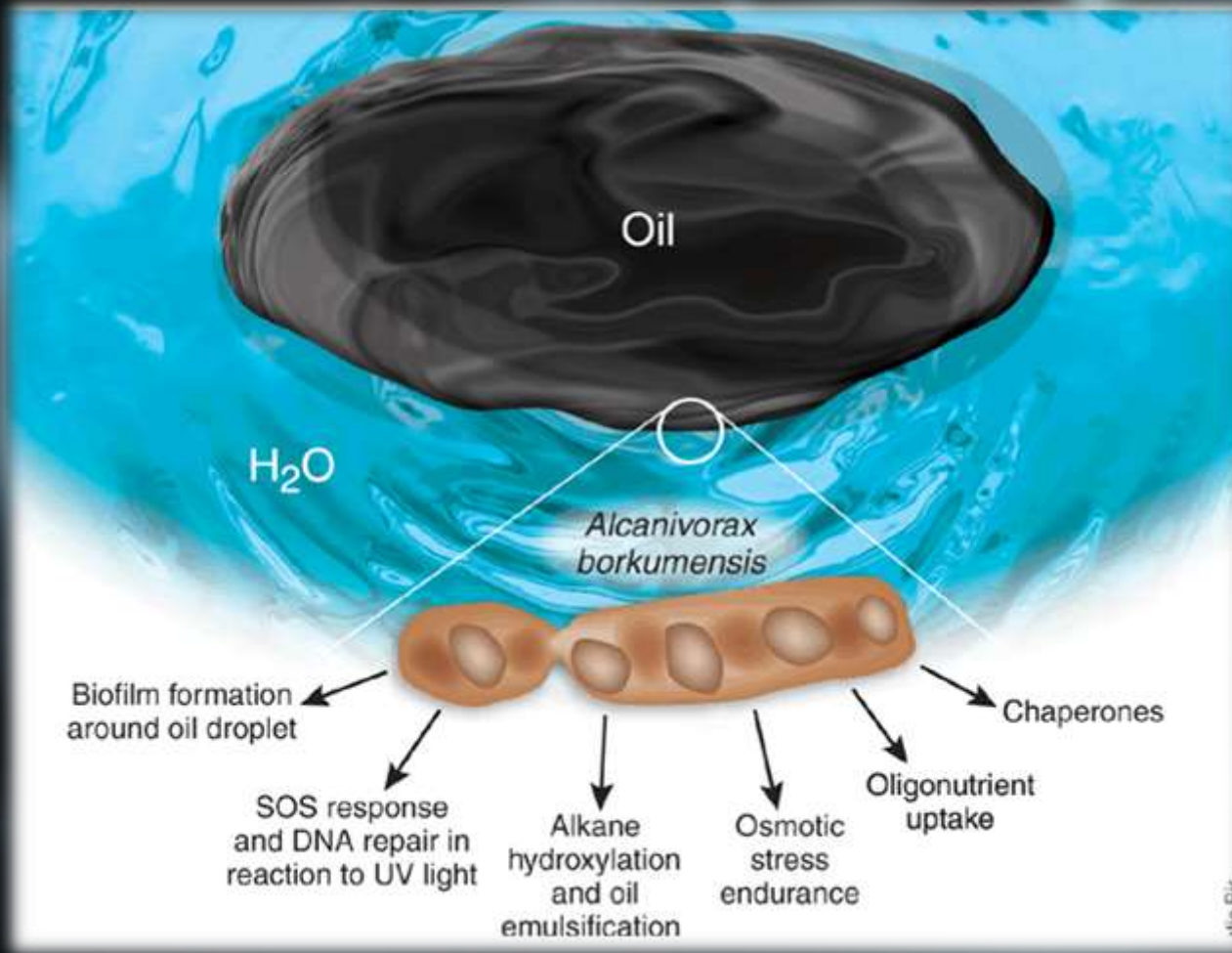


Bacterioides



Spirillum

Biodegradação usando *Alcanivorax borkumensis*



Degradadores de hidrocarbonetos

Gram-positivos

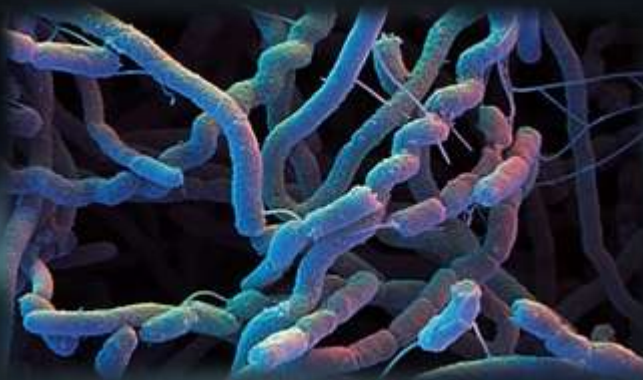
- *Nocardia*,
- *Rhodococcus*
- *Paenibacillus*
- *Bacillus*
- *Streptomyces*
- *Micrococcus*
- *Brevibacterium*
- *Anthrobacter*
- *Sarcina*



Sarcina



Anthrobacter



Streptomyces



Rhodococcus

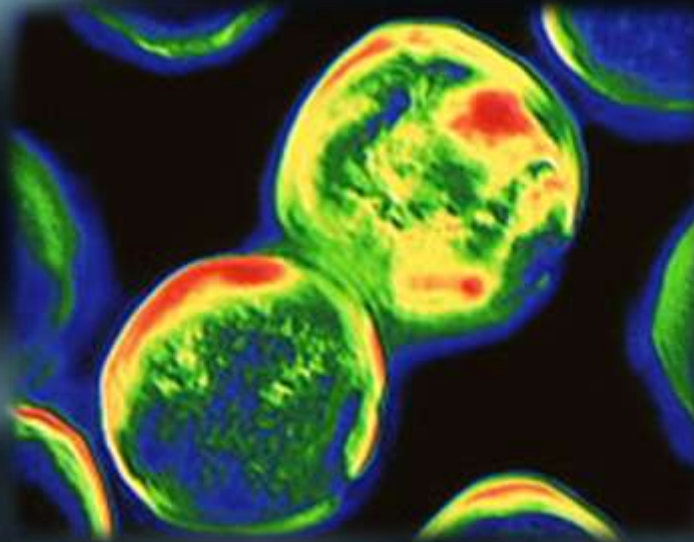
Degradadores de hidrocarbonetos

Archaea

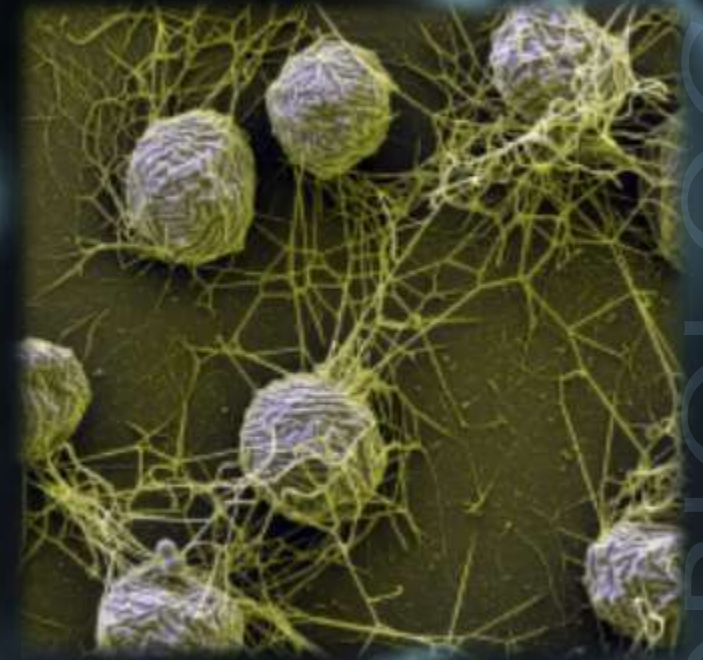
- *Thermococcus celer* G-
- *Pyrococcus lithotrophicus* G+
- *Archaeoglobus fulgidus* G-

Coloração de Ziehl-Neelsen

- *Mycobacterium*



Archaeoglobus



Pyrococcus

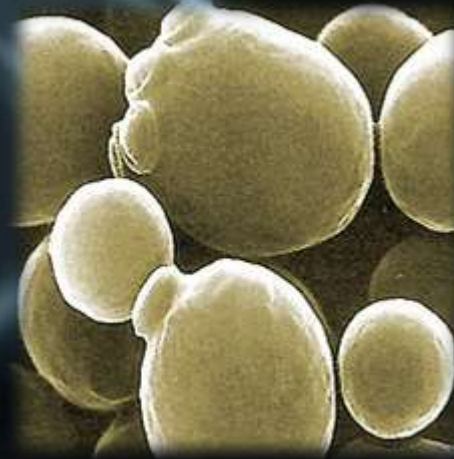
Degradadores de hidrocarbonetos

Leveduras - unicelulares

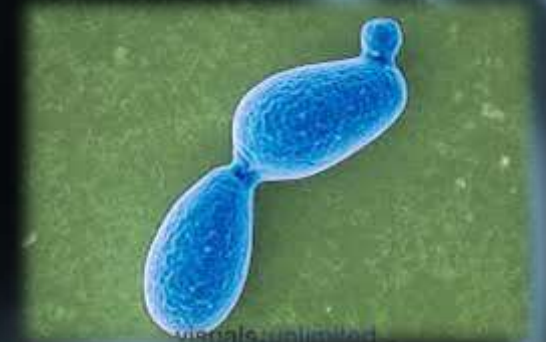
- *Candida*
- *Rhodotorula*
- *Saccharomyces*
- *Sporobolomyces*
- *Trichosporon*
- *Torulopsis*
- *Debaryomyces*
- *Sporobolomyces*
- *Yarrowia*
- *Pichia*



Sporobolomyces



Debaryomyces



Torulopsis



Trichosporon



Sporobolomyces

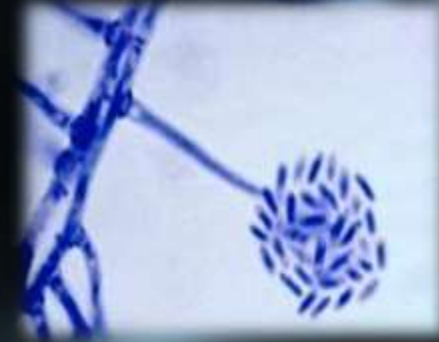
Degradadores de hidrocarbonetos

Fungos - Multicelulares

Acremonium, Aspergillus, Aureobasidium (Yeast-like), Beauveria, Botrytis, Chrysosporium, Cladosporium, Cochliobolus, Cylindrocarpon, Fusarium, Geotrichum (fitopatogeno) Glicocladium, Graphium (fitopatogeno)



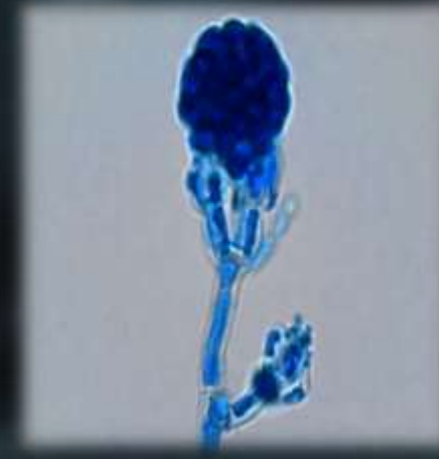
Cochliobolus



Acremonium



Fitopatogeno Botrytis



Glicocladium

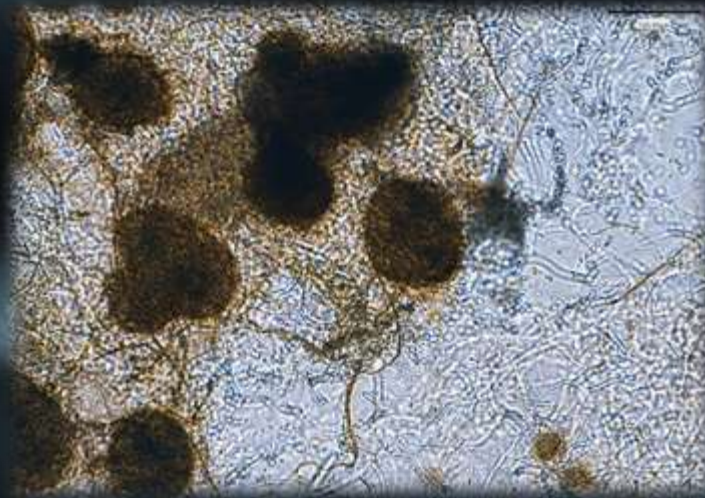
Degradadores de hidrocarbonetos

Fungos - Multicelulares

Humicola,
Mortierella (solo),
Paecilomyces (saprofita solo) *Penicillium, Phoma (solo)* *Scolecobasidium (endofítico), Sprotrichum, Spicaria (fungo marinho)* *Tolypocladium, Trichoderma, Verticillium.*



Penicillium



Phoma

Microalgas

CIANOBACTERIAS

- Oscillatoria* sp.
- Microcoleus* sp.
- Anabaena* sp.
- Agmenellum* sp.
- Coccochloris* sp.
- Nostoc* sp.
- Aphanocapsa* sp.



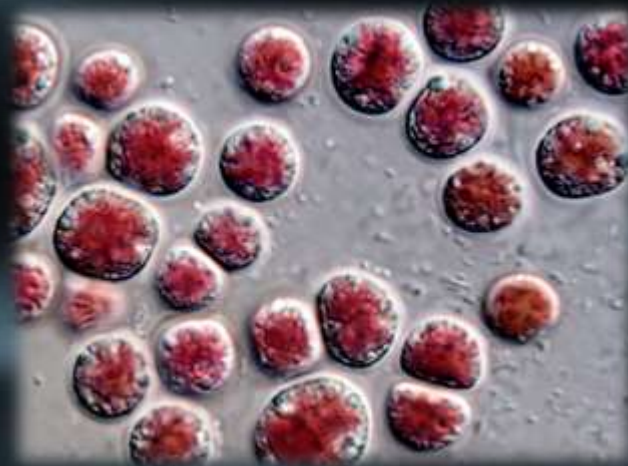
Cylindrotheca sp.



Microcoleus sp.

DIATOMACEAS

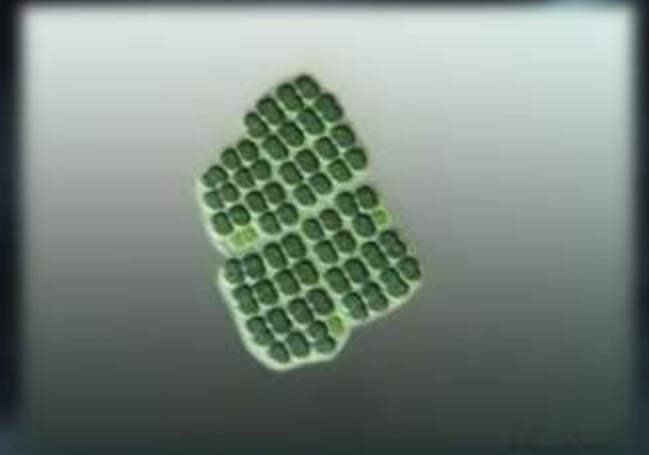
- Cylindrotheca* sp.
- Amphora* sp.



Porphyridium sp.

CHLOROPHYTA

- Chlorella* sp.
- Dunaliella* sp.
- Chlamydomonas* sp.



Agmenellum sp.

RODOPHYTA

- Porphyridium* sp.

Ambientes hipersalinos

(30% de sal)

- Lagos naturais
- Efluentes industriais
- Água produzida

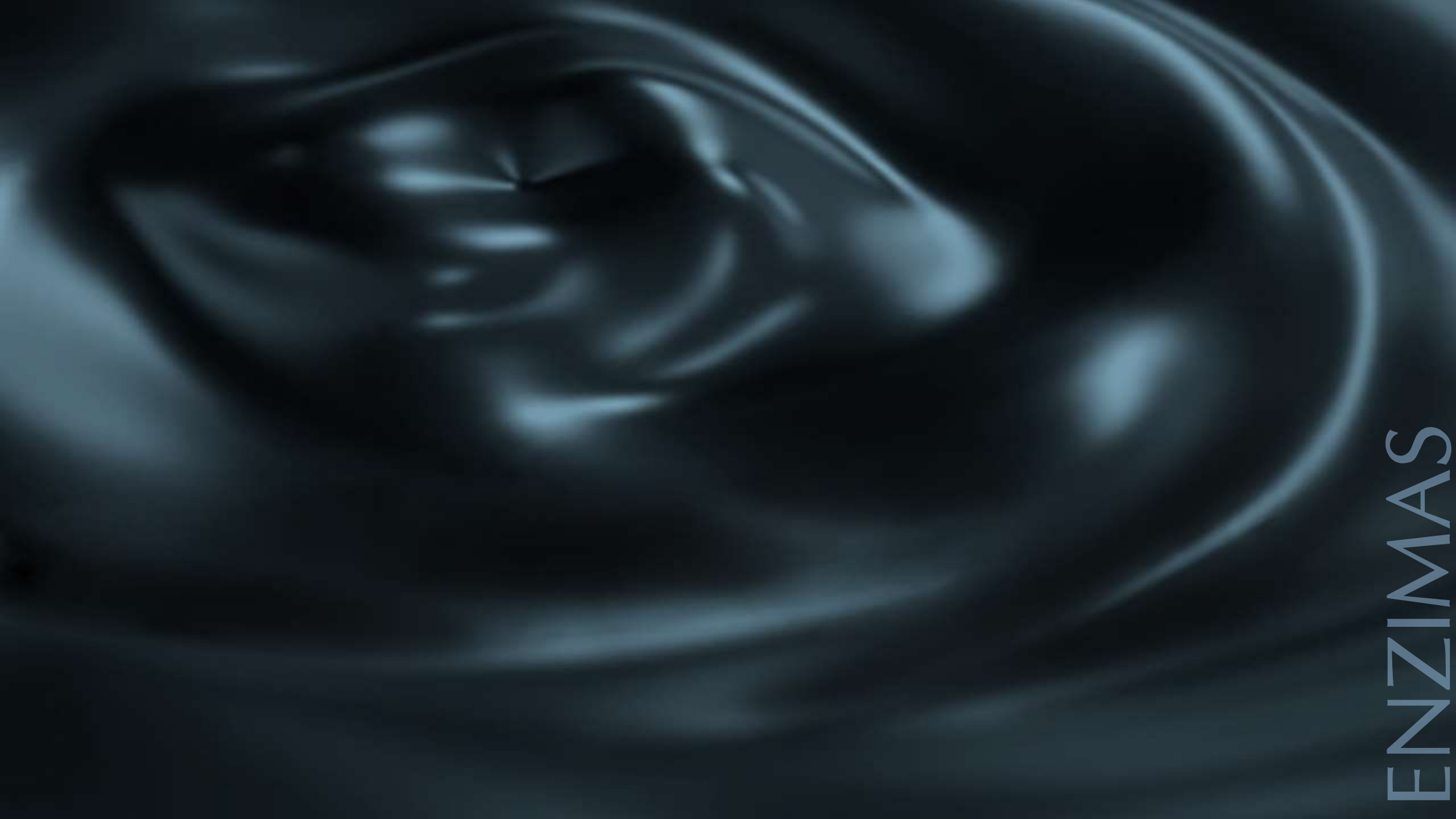


África

Bactérias extremófilas e tolerantes ao sal

Halófilos

Microorganism	Target substrate
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Multiple HCs
<i>Arhodomonas rozel</i>	Benzene, toluene
<i>Marinobacter antarcticus</i>	-
<i>Thalassobacillus devorans</i>	Various aromatic HCs, phenol
<i>Arthrobacter halodurans</i>	-
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	C ₁₄ -C ₁₅ n-alkanes
<i>Acinetobacter venetianus</i>	n-alkanes
<i>Oceanobacter kriegii</i>	Petroleum
<i>Marinobacter vinifirmus</i>	PAH, naphthalene, phenanthrene, pyrene.
<i>Stappia aggregate</i>	
<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i>	
<i>Thalassospira lucentensis</i>	
<i>Kaistia adipata</i>	
<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	



ENZIMAS

Tipos

Classes:

Oxidoreductases (E.C.1)

- catalisam reações de oxidação/redução.

Reações redox

- síntese de compostos orgânicos
- oxigenases, oxidases, desidrogenases,
peroxidases, redutases

Subclasse:

Oxigenases (EC 1.1.3, -1.1.4)

- catalisam uma reação de oxidação transferindo oxigênio (O_2) para o substrato

- Monooxigenases

Flavina- dependente (NADP,NADPH).contendo HEME- P450,CYP153 sMMO, Alcano hidroxilases (AlkB)

- Dioxigenases Rieske (2Fe 2S)

Subclasse

Peroxidases (EC 1.11.1)

- Lignina peroxidase (LiP)

Oxida tendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como co- substrato

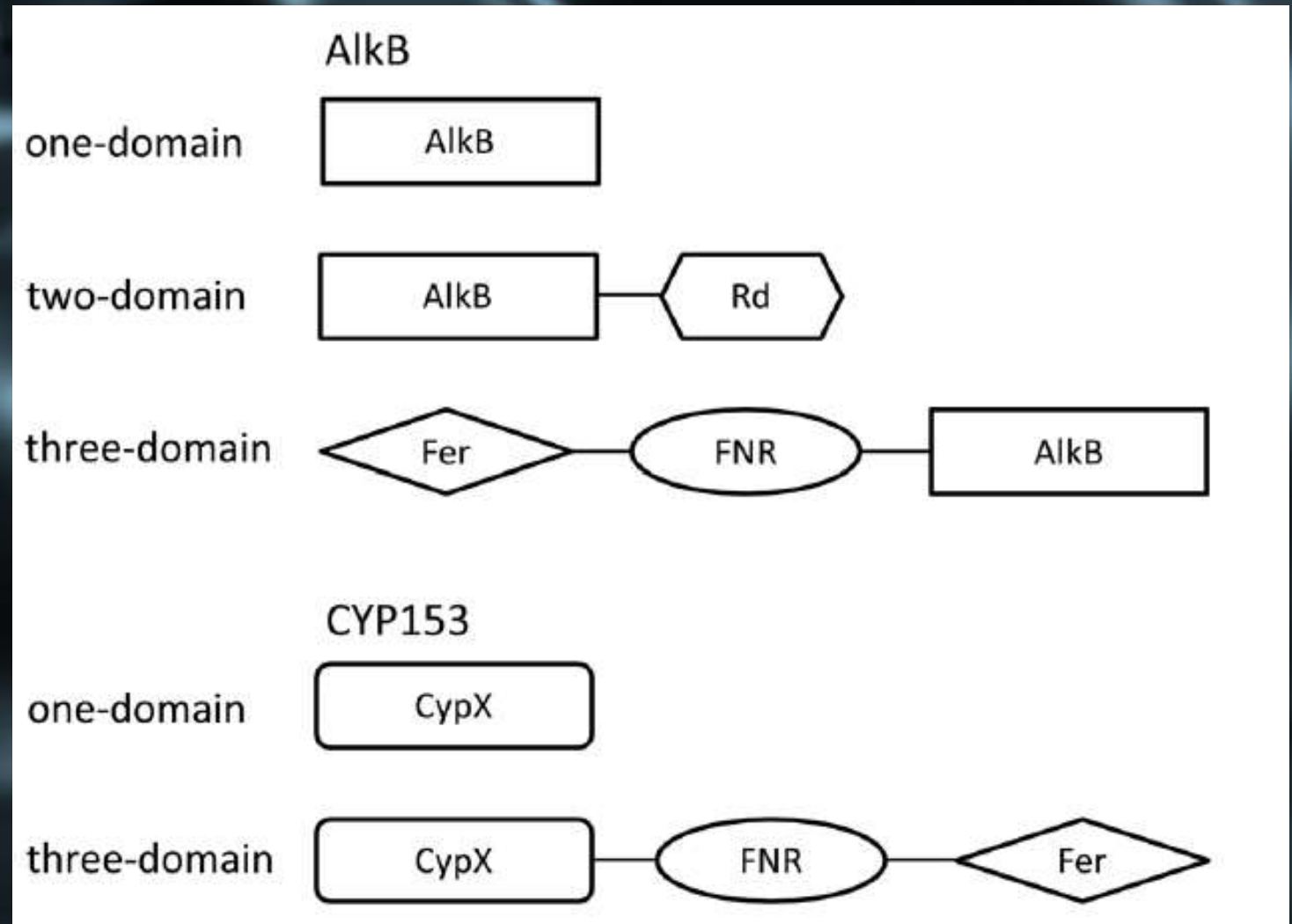
- Manganês peroxidase (MnP)

$Mn^{2+} - Mn^{+3}$

Monoxigenases: alceno hidroxilases

Rd- Rubredoxina
FNR- ferredoxina
redutase
Fer- ferredoxina
CYPX- Citocromo
P450

Transferência de
elétrons



Tipos

Classes:

Oxidoreductases (E.C.1)

- catalisam reações de oxidação/redução.

Reações redox

- síntese de compostos orgânicos
- oxidases, desidrogenases, peroxidases, , oxigenases, reductases

Subclasse:

Lacase (EC 1.10)

- Oxidases contendo cobre
 - Atuam em fenóis, PAHs e moléculas semelhantes
- Aldeido desidrogenase
 - Oxidam aldeídos a ácidos carboxílicos
 - NAD NADP
 - Alquil aldeídos – intermediários na degradação de alcanos

Glicil radical enzimas (GRE)

1. Grupo das X-succinato sintetase (BSS → Benzil succinato sintetase → ligase)
2. Classe III nucleotídeo redutase
 - classe III somente e microrganismos anaeróbicos
 - é uma oxiredutase
3. Piruvato formato liase (PFL) liase
4. Glicerol desidratase (GDH) liase
5. 4-hidroxifenilacetato descarboxilase (HPAD) classe = liase

Liases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações C-C, C-O, C-N, entre outras, através de hidrólise ou oxidação.

Ligases: catalisam reações de síntese de uma nova molécula a partir da ligação entre duas moléculas.

Formas para iniciar a degradação de HC

Aeróbica

O oxigênio molecular atua como co-substrato para reações envolvendo mono ou dioxigenases em reações de hidroxilação

Anaeróbica

1. Adição de fumarato através de uma enzima "glycyl-radical enzymes"
2. Metilação de aromáticos não substituídos (proposto somente)

tolueno, xileno, etilbenzeno,
metil naftaleno, alcanos

etilbenzeno

1. Hidroxilação com água, através de enzima contendo molibdênio como co-fator e de um substituinte alquil

Benzeno, naftaleno

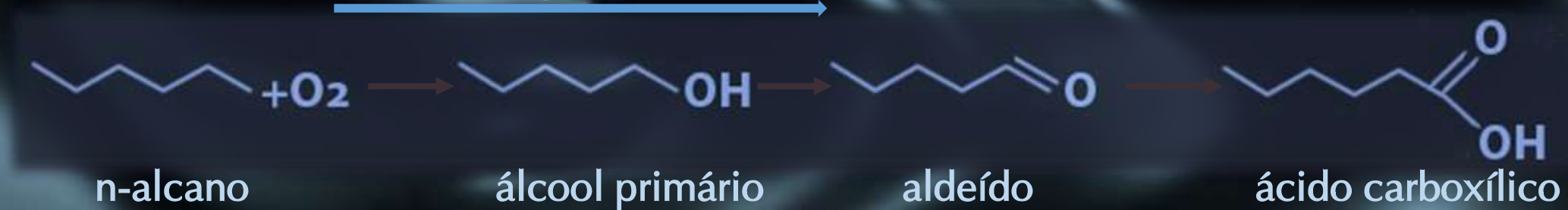
4. Carboxilação por uma enzima ainda não caracterizada

Mechanisms for hydrocarbon activation

	Aerobic	Anaerobic
Short-Chain alkanes C2-C10	<ul style="list-style-type: none"> • Non-heme iron monooxygenase similar to sMMO (C2-C9) • Copper-containing monooxygenase similar to pMMO (C2-C9) • Heme-iron monooxygenases (also referred as soluble Cytochrome P450 (C5-C12)) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fumarate addition
Long-Chain alkanes >C10	<ul style="list-style-type: none"> • Heme-Monooxygenase (P450 type) • [Fe2]-Monooxygenase • Non-heme iron monooxygenase (AlkB-related) (C3-C13 or C10-C20) • Flavin-binding monooxygenase (AlmA) (C20- C36) • Thermophilic flavin-dependent monooxygenase (LadA) (C10-C30) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fumarate addition • Carboxylation
Aromatic hydrocarbons	<ul style="list-style-type: none"> • [Fe]-Dioxygenase • [Fe2]-Monooxygenase • [Flavin]-Monooxygenase 	<ul style="list-style-type: none"> • Fumarate addition • Hydroxylation • Carboxylation

Degradação aeróbica de n-alcenos

Alcano hidroxilases (AHs)- São monooxigenases oxigenases



Alcano monooxigenase integral de membrana (AlkB) → mais conhecida
Degrada alcanos de C10 to C16

Algumas AlkB de actinomicetos degradam alcanos com C32

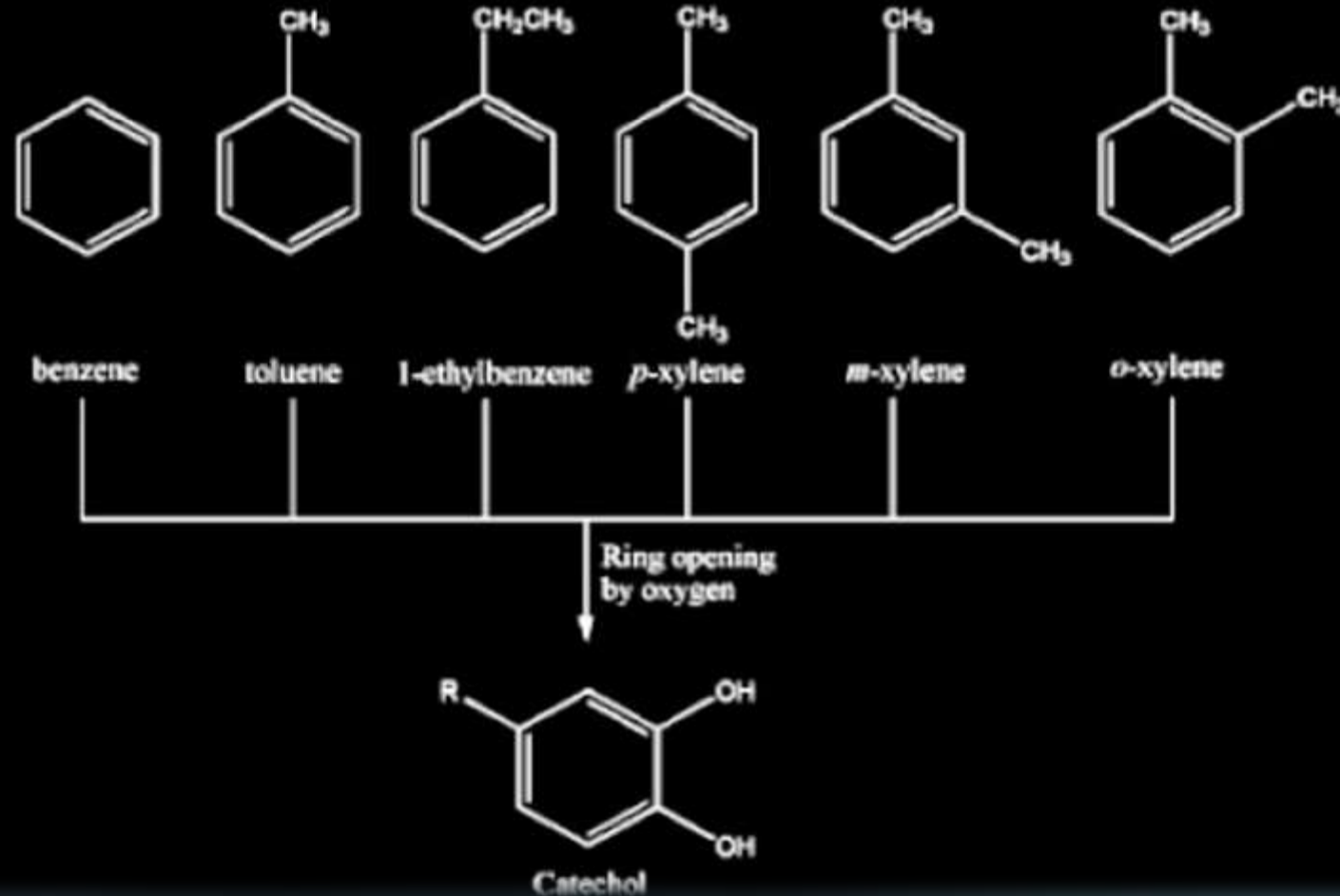
Outra família de alcano hidroxilases : citocromo P450 CYP153 → degradam alcanos de cadeia curta e média. São heme-thiol monooxigenases

Enzima	Substrato	Microrganismo
Metano monooxigenases solúveis (sMMO)	C ¹ -C ⁸ alcanos, alcenos e cicloalcanos	<i>Methylococcus sp.</i> , <i>Methylosinus sp.</i> , <i>Methylocystis sp.</i> , <i>Methylomonas sp.</i> , <i>Methylocella sp.</i>
Metano monooxigenases particuladas (pMMO)	C ¹ -C ⁵ (halogenados) alcanos e cicloalcanos	<i>Methylobacter sp.</i> , <i>Methylococcus sp.</i> , <i>Methylocystis sp.</i>
Alcano hidroxilases relacionadas a AlkB	C ⁵ -C ¹⁶ alcanos, ácidos graxos, alquil benzenos, cicloalcanos	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
P450 oxigenase eucarioto	C ¹⁰ -C ¹⁶ alcanos, ácidos graxos	<i>Candida maltose</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
P450 oxigenase bacteriana	C ⁵ -C ¹⁶ alcanos, cicloalcanos	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Mycobacterium</i>
Dioxigenases	C ¹⁰ -C ³⁰ alcanos	<i>Acinetobacter sp.</i>

Degradação de HC aromáticos - aeróbica

Ativação do anel aromático

oxigenases



Incorporação do oxigênio molecular no anel aromático

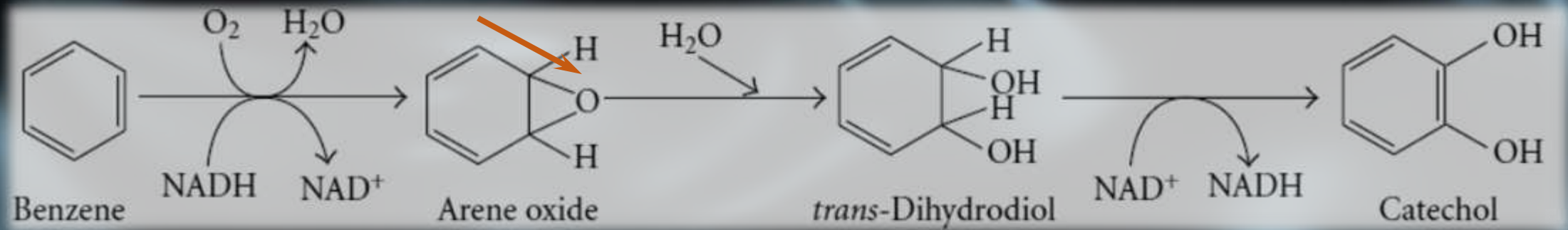


hidroxilação

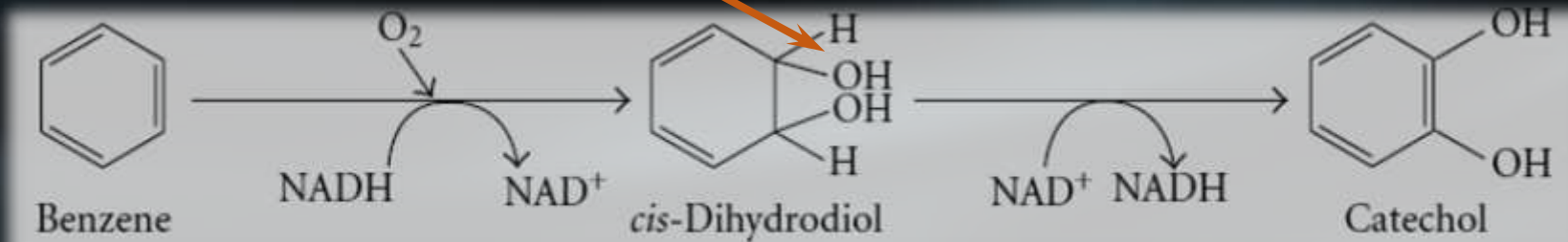
BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene)

Degradação aeróbica dos aromáticos - benzeno

Monooxigenase



Dioxigenase



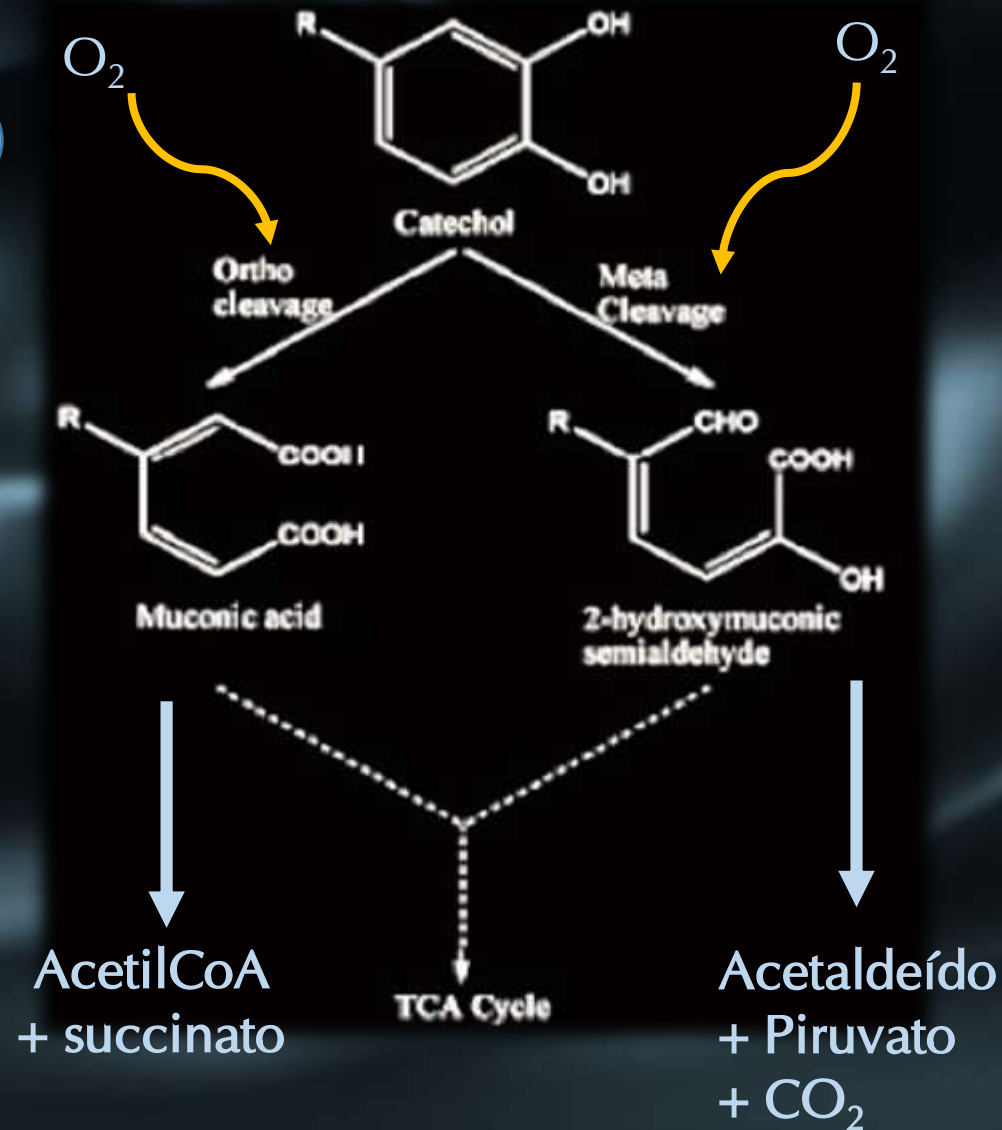
Degradação de HCs aromáticos - aeróbica

Clivagem do anel aromático

monoxigenases

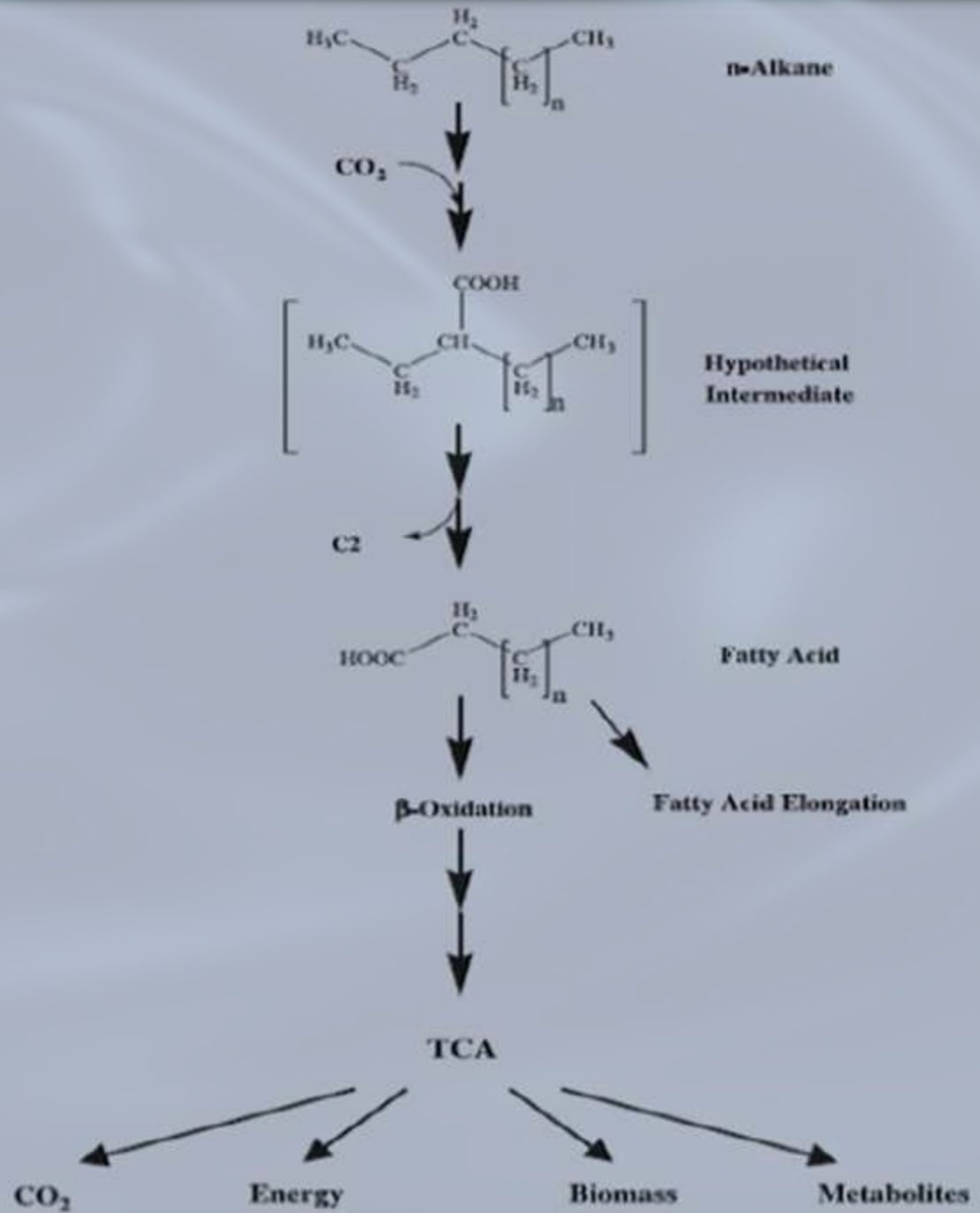
Orto clivagem entre os átomos de carbono hidroxilados

Meta clivagem entre o átomo de carbono e a hidroxila adjacente



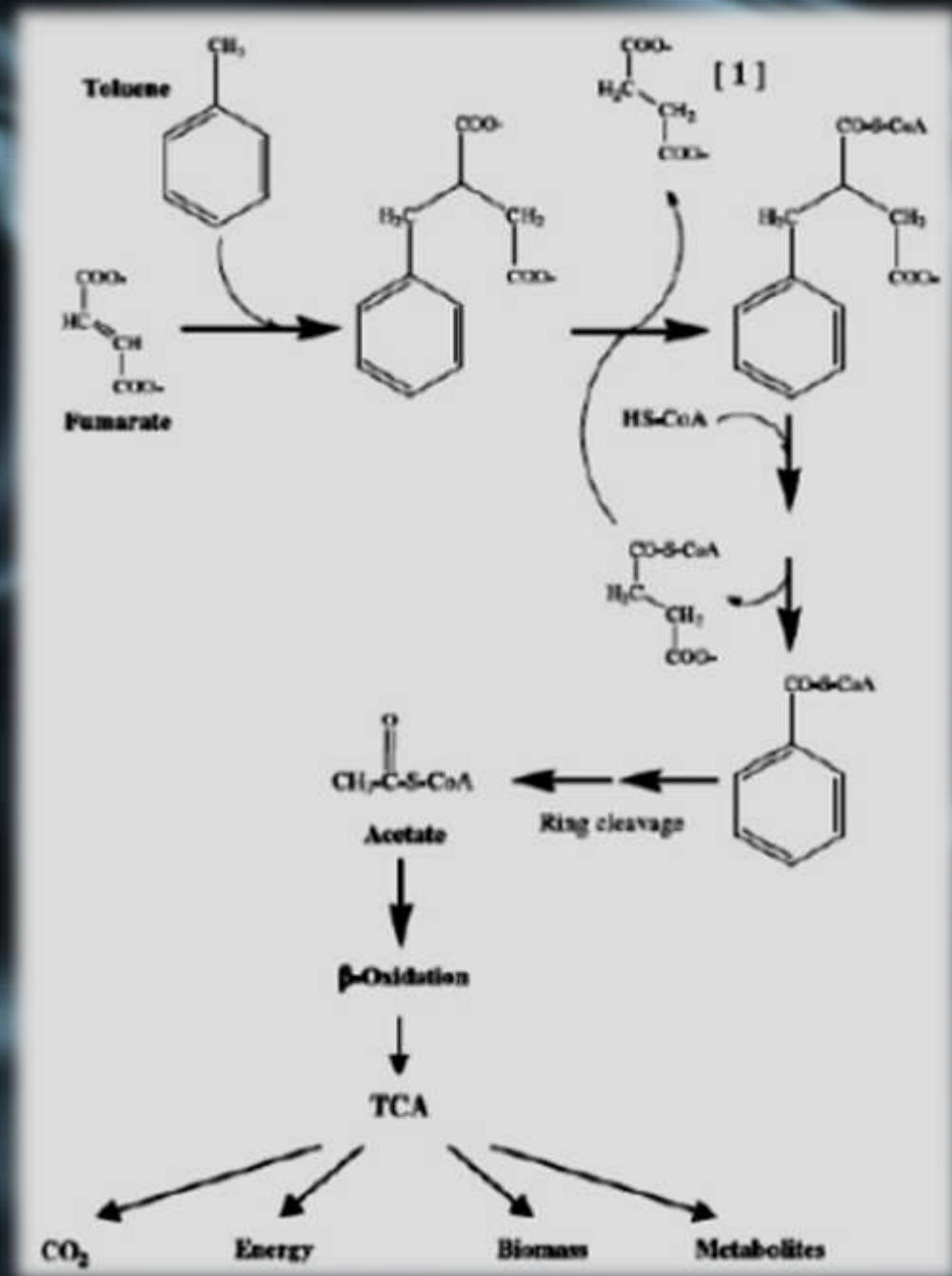
Degradação de HC n-alcano

Anaeróbica

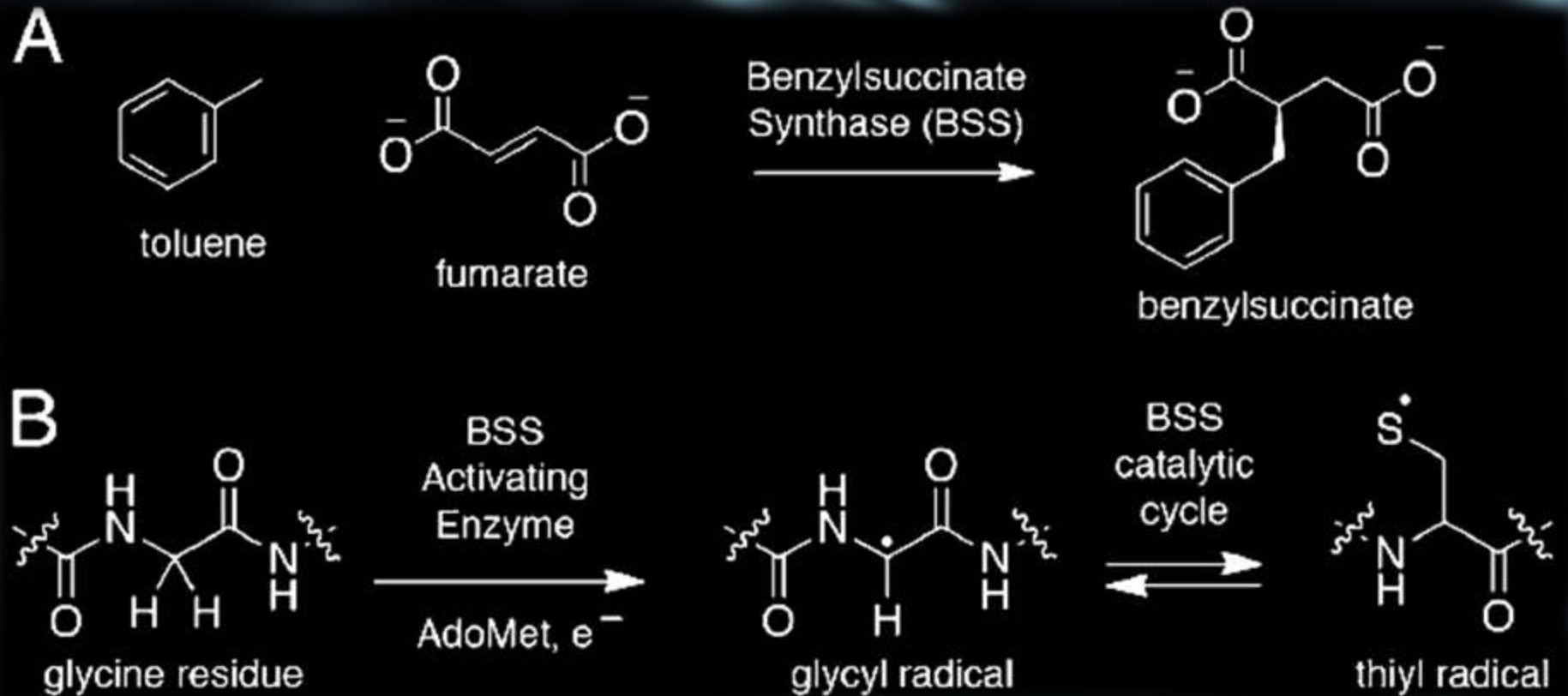


Degradação de HCs aromáticos

Anaeróbica



Degradação anaeróbica do tolueno



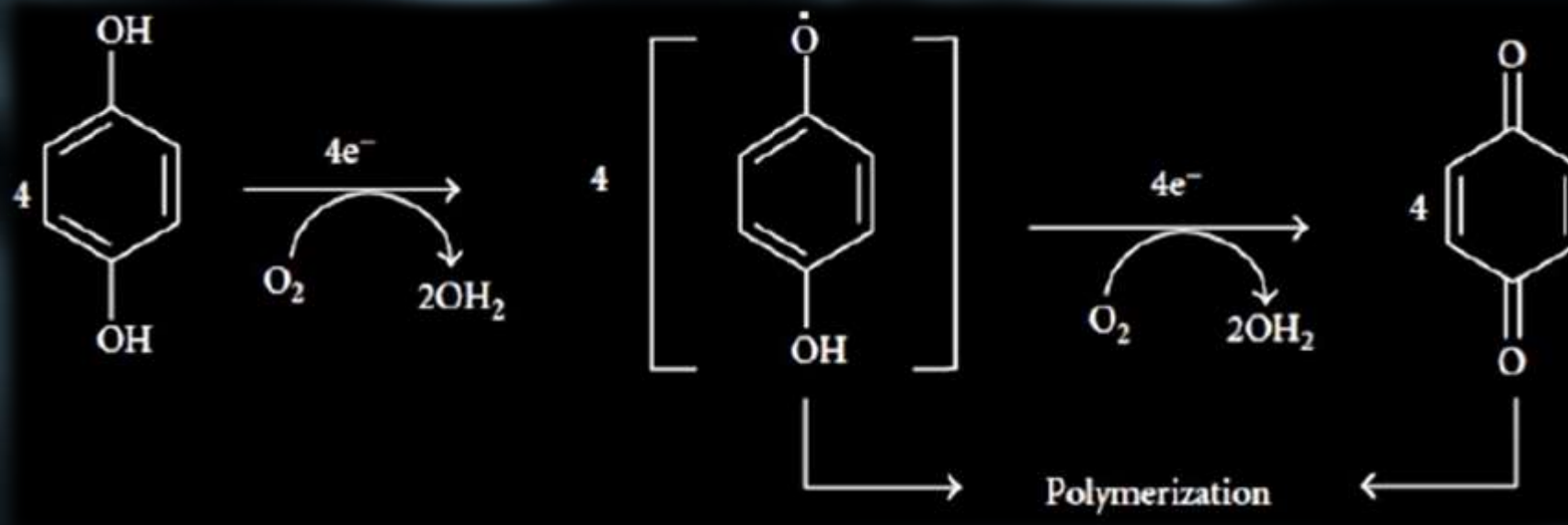
Ativação de uma glicil radical enzima

(A) BSS ativada catalisa a formação da ligação C-C entre tolueno e fumarato.

(B) BSS-AE Gera um Gli radical sobre o BSS

BSS = "glycyl radical enzyme benzylsuccinate synthase"

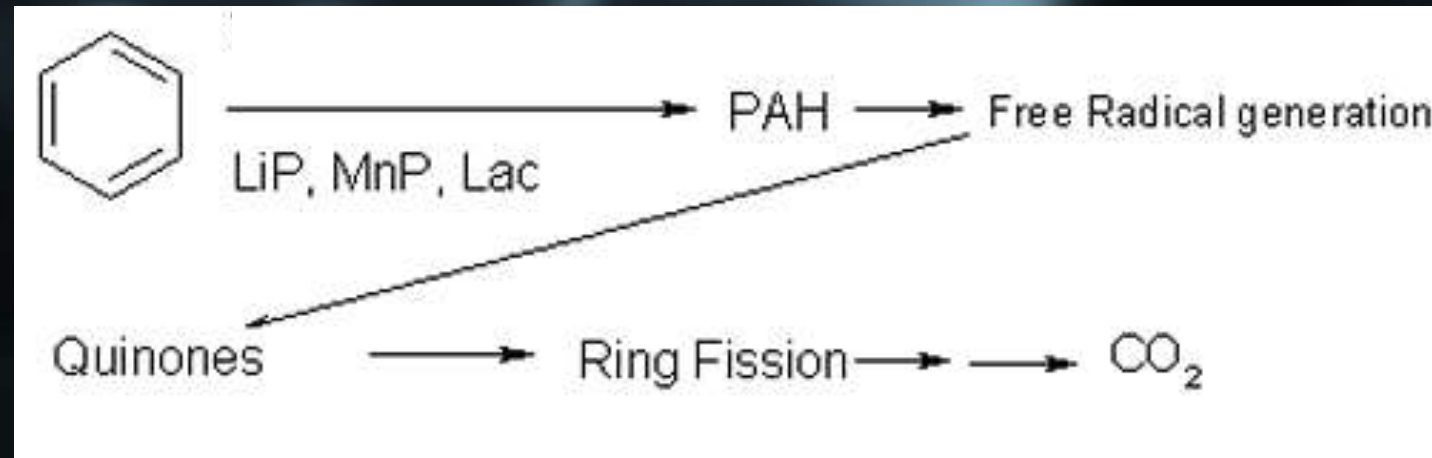
Lacases e aromáticos



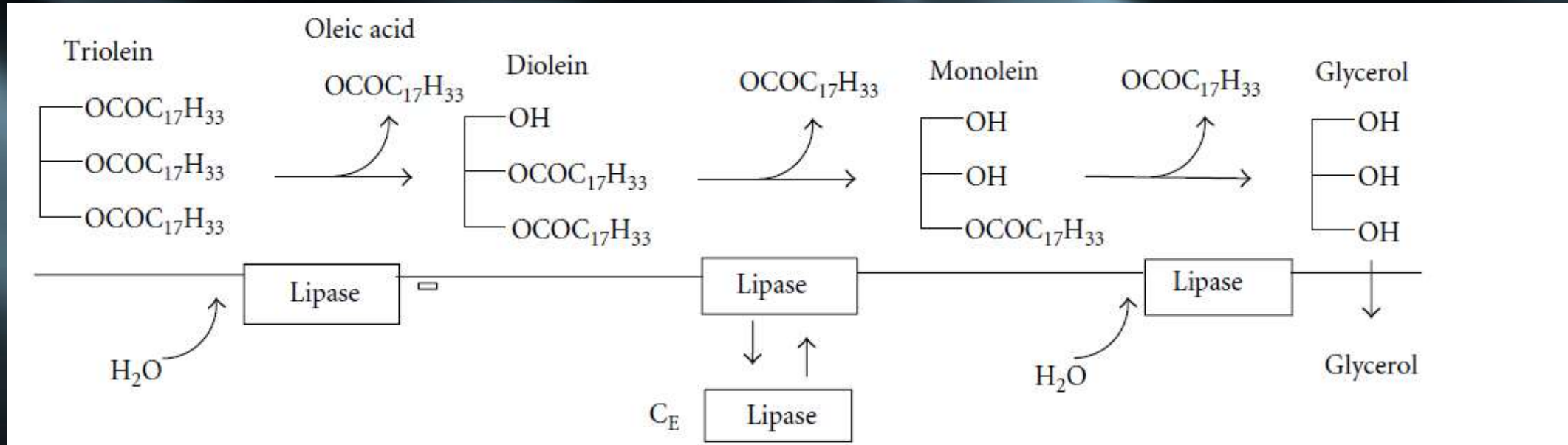
Mecanismo geral da reação para a oxidação de fenol por lacase

Lignina peroxidase – LIP, Manganês peroxidase (MnP)

LIP, MnP-
oxidação
 H_2O_2



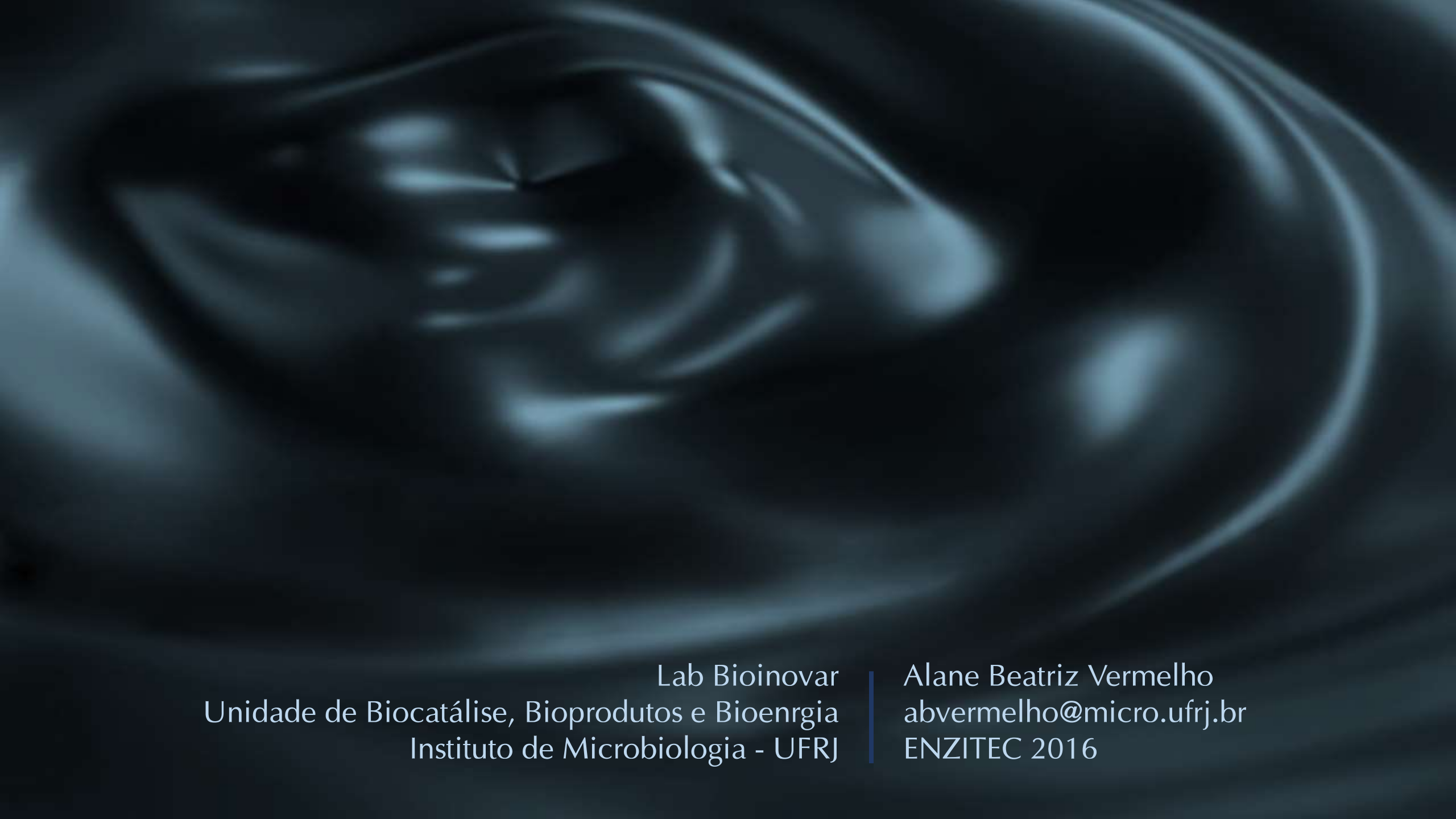
Lipase





OIL SPILL EATER II

Um galão de OSE I para cada galão de petróleo derramado
OSEI Corporation



Lab Bioinovar
Unidade de Biocatálise, Bioprodutos e Bioenergia
Instituto de Microbiologia - UFRJ

Alane Beatriz Vermelho
abvermelho@micro.ufrj.br
ENZITEC 2016