

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE RESÍDUO
DE INDÚSTRIA PETROQUÍMICA**

Dissertação de Mestrado

Marcia Rodrigues Sandri

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE RESÍDUO
DE INDÚSTRIA PETROQUÍMICA**

Marcia Rodrigues Sandri

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2010

**Este trabalho foi realizado na Bioplus
Desenvolvimento Biotecnológico Ltda. da
Incubadora de Empresas do Centro de
Biotecnologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.**

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sydney Mitidieri Silveira e à Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, incentivo e por tudo que aprendi durante estes anos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Marilene Henning Vainstein pela confiança e apoio em tudo que foi necessário.

Às professoras Dra. Tânia Mara Pizzolato e Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba e à mestranda Raquel Wielens Becker pela ajuda e disponibilidade nos experimentos de cromatografia gasosa.

À Prof. Dra. Irene Shrank e aos alunos do laboratório 222 em especial à mestranda Franciele Maboni, pela ajuda na identificação dos microrganismos e pela amizade.

Aos estagiários da Bioplus, Leini Souza, Henrique Biehl e Daniela Gorziza, que mesmo no curto período de estágio contribuíram com a realização deste trabalho.

À estagiária Emilly Schlee Villodre, pelo companheirismo e pela ajuda na parte de experimental do trabalho no segundo ano de mestrado.

A todos os colegas que passaram ou que ainda trabalham na Bioplus, pelo trabalho em equipe e ajuda no que foi preciso. Em especial a Carine Lampert, Daiane Leão Ferreira, Fabrício Ferreira Luz, Marcos Marquardt, Roger Kirst e Sara Allebrandt, pela amizade, sugestões e apoio no desenvolvimento deste trabalho. Também à Doutora Sabrina Salomoni pela ajuda na fase final do trabalho.

À Indústria Petroquímica do Sul pelo interesse e parceria, em especial ao técnico químico Humberto Kunde.

À Projeconsult Engenharia Ltda. e ao eng. químico Carlos Eduardo John, pela parceria realizada, informações sobre contaminações de postos de combustível e amostras fornecidas.

Aos meus queridos amigos, aos que estão perto e aos que estão longe, que são parte essencial da minha vida, pelos momentos de descontração, pela torcida e pelas palavras de incentivo.

Aos meus pais, Luiz e Cláudia, pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. A indústria do petróleo e as contaminações ambientais	12
1.2. Técnicas de descontaminação e biorremediação	14
1.2.1. Principais técnicas de remediação utilizadas	14
1.2.2. Estratégias de Biorremediação	16
1.2.3. Limitações da utilização de biorremediação	23
1.3. Biodegradação de Hidrocarbonetos	24
1.4. Biosurfactantes	28
1.4.1. Importância da produção de biosurfactante na biodegradação de hidrocarbonetos	28
1.4.2. Métodos para a detecção da atividade de biosurfactantes	32
1.4.3. Potenciais aplicações de biosurfactantes	35
1.5. A indústria de rerrefino de óleo lubrificante.....	36
1.6. Contaminações ambientais por vazamentos em postos de combustíveis	39
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo Geral.....	40
2.2. Objetivos Específicos	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Isolamento de microrganismos existentes no efluente de indústria de rerrefino de óleo lubrificante	41
3.2. Isolamento de microrganismos provenientes do trato intestinal de invertebrados marinhos e de areia provenientes de praia com histórico de contaminação por petróleo	41
3.3. Identificação dos microrganismos.....	42
3.4. Seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes	43

3.4.1. Ensaio em <i>Microplaca</i>	43
3.4.2. Ensaio em proveta: <i>Emulsão água em óleo e emulsão óleo em água</i>	44
3.5. Seleção de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos contidos em petróleo ou derivados	44
3.5.1. <i>Crescimento em efluente de indústria petroquímica</i>	44
3.5.2. <i>Crescimento em meio mineral com 1% de óleo diesel</i>	45
3.6. Análise da degradação de hidrocarbonetos lineares presentes no efluente líquido ..	45
3.7. Cultivo microbiano em meio padrão	46
3.8. Consórcio dos microrganismos selecionados	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Isolamento de microrganismos	48
4.2. Seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes	50
4.2.1. <i>Teste da Microplaca – redução da tensão superficial</i>	50
4.2.2. <i>Ensaio em proveta - Medida da emulsão água em óleo</i>	51
4.2.3. <i>Ensaio em proveta – Medida da emulsão óleo em água</i>	55
4.3. Seleção de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos.....	59
4.3.1. <i>Cultivo da população em efluente de indústria petroquímica</i>	59
4.3.2. <i>Cultivo em meio mineral com 1% de óleo diesel</i>	63
4.3.3. <i>Caracterização do efluente utilizado</i>	65
4.3.4. <i>Degradação dos hidrocarbonetos presentes em efluente de indústria petroquímica</i>	69
4.4. Crescimento microbiano em meio de cultura padrão	75
4.5. Consórcio dos microrganismos selecionados	78
5. CONCLUSÕES.....	82
6. PERSPECTIVAS	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C.....	Graus Celsius
16S rDNA.....	gene que codifica a subunidade 16S do ribossomo
CETESB.....	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA....	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTAB.....	<i>cetyl trimethylammonium bromide</i>
DNA.....	ácido desoxiribonucleico
DNTP.....	desoxiribonucleotídeo
DO.....	densidade ótica em absorbância em comprimento de onda de 600nm
EDTA.....	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA.....	<i>U. S. Environmental Protection Agency</i> – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América
g.....	grama
GC-FID.....	cromatografia gasosa com detector ionizador de chama
GLP.....	gás liquefeito de petróleo – gás de cozinha
h.....	hora
HPA.....	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IPS.....	Indústria Petroquímica do Sul
L.....	litro
LB.....	Luria-Bertani (meio de cultivo)
LFSM.....	Laboratório de Fisiologia e Sistemática Microbiana da UNICAMP
M.....	molar
Mg.....	miligrama
mM.....	milimolar
mL.....	mililitro
µL.....	microlitro
mm.....	milímetro
min.....	minuto
nm.....	nanômetro
ORC.....	<i>oxygen release compound</i> – compostos liberadores de oxigênio
PCB.....	<i>polychlorinated biphenyls</i> – bifenilas policloradas
PCR.....	<i>polimerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
Pb.....	pares de bases nucleotídicas
pH.....	potencial hidrogeniônico
pmol.....	picomol
RNA.....	ácido ribonucleico
rpm.....	rotações por minuto
SDS.....	dodecilsulfato de sódio
SMEWW.....	<i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i>
TE.....	Tampão Tris-EDTA
TPH.....	<i>total petroleum hydrocarbon</i> – hidrocarbonetos totais de petróleo
TPH-GRO....	<i>total petroleum hydrocarbon gasoline organic range</i> – carbonos C5 a C10
UFC.....	unidade formadora de colônia
UV.....	ultravioleta
VOC.....	<i>volatile organic compound</i> – composto orgânico volátil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Redução da tensão superficial pelo teste da microplaca para 9 isolados microbianos.....	50
Figura 2	Ensaio em proveta onde foi medida a emulsão água em óleo em mL e a emulsão óleo em água por Absorbância a 610nm em espectrofotômetro.....	52
Figura 3	Atividade emulsionante (emulsão água em óleo) de 20 dos 43 microrganismos testados.....	53
Figura 4	Atividade emulsionante (emulsão água em óleo) de 21 dos 43 microrganismos testados.....	54
Figura 5	Atividade emulsionante (emulsão água em óleo) de 2 dos 43 microrganismos testados.....	54
Figura 6	Atividade emulsionante (emulsão óleo em água) de 20 dos 43 microrganismos testados.....	56
Figura 7	Atividade emulsionante (emulsão óleo em água) de 21 dos 43 microrganismos testados.....	56
Figura 8	Atividade emulsionante (emulsão óleo em água) de 2 dos 43 microrganismos testados.....	57
Figura 9	Crescimento populacional de 4 isolados em efluente de indústria petroquímica (do lote 2) durante 13 dias.....	61
Figura 10	Crescimento populacional de 4 isolados em efluente de indústria petroquímica (do lote 2) durante 9-13 dias.....	61
Figura 11	Crescimento populacional de 2 isolados em efluente de indústria petroquímica (do lote 3) durante 7 dias.....	62
Figura 12	Comportamento populacional de 3 isolados em meio mineral com 1% de óleo diesel.....	63
Figura 13	Comportamento populacional de 3 isolados em meio mineral com 1% de óleo diesel.....	64
Figura 14	Comportamento populacional de 4 isolados em meio mineral com 1% de óleo diesel.....	64
Figura 15	Quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) do efluente do 2º lote tratado com cada um dos 8 microrganismos após 15 dias de incubação.....	70
Figura 16	Quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) do efluente do 3º lote tratado com cada um dos 2 microrganismos após 8 dias de incubação.....	71
Figura 17	Degradação dos hidrocarbonetos lineares pelos três isolados escolhidos para o consórcio em 15 dias de incubação.....	75
Figura 18	Crescimento populacional medido por aumento da DO 600nm.....	77
Figura 19	Crescimento populacional medido por plaqueamentos pelo método de gota.....	78
Figura 20	Degradação de THP-GRO pelo consórcio selecionado.....	79
Figura 21	Degradação de THP-GRO pelo consórcio selecionado.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Microrganismos utilizados neste estudo.....	49
Tabela 2	Resultados do ensaio em microplaca para todos os microrganismos testados.....	51
Tabela 3	Comportamento dos 34 microrganismos inoculados em efluente de indústria petroquímica.....	60
Tabela 4	Comportamento das populações de 10 isolados em meio mineral com 1% de óleo diesel.....	65
Tabela 5	Caracterização do efluente do lote 1.....	67
Tabela 6	Quantificação dos TPHs do efluente do lote 1.....	67
Tabela 7	Caracterização do efluente do lote 2.....	68
Tabela 8	Caracterização do efluente do lote 3.....	68
Tabela 9	Caracterização do efluente do lote 4.....	69
Tabela 10	Razões entre isoprenóides e alcanos.....	74

RESUMO

Contaminações do ambiente por petróleo e seus derivados são bastante frequentes devido a acidentes e vazamentos nos processos de transferência, transporte e estocagem dos produtos. Em postos de combustível são comuns tanques em mau estado de conservação, o que pode acabar contaminando solos e lençóis freáticos. Processos industriais como o rerrefino de óleo lubrificante, geram resíduos e efluentes contendo hidrocarbonetos que devem ser adequadamente tratados. Por serem moléculas hidrofóbicas, os hidrocarbonetos se tornam persistentes nos ambientes, pois não estão disponíveis para a biodegradação. Para isto, uma das estratégias dos microrganismos é produzir surfactantes para dispersar as moléculas hidrofóbicas permitindo um melhor acesso a este substrato. Neste trabalho foram selecionados microrganismos capazes de produzir biosurfactantes e degradar hidrocarbonetos para compor um consórcio para remediação de águas contaminadas objetivando desenvolver um produto comercial. Quarenta e três isolados foram estudados quanto à produção de biosurfactantes e crescimento em efluente de indústria petroquímica. Quarenta isolados apresentaram produção de biosurfactantes, mas somente oito foram capazes de aumentar a população no efluente. Três isolados não-patogênicos foram selecionados para compor um consórcio de microrganismos: *Brevundimonas diminuta*, *Bacillus sphaericus* e *Candida lipolytica*. Estes isolados produzem surfactantes extracelulares que estabilizam emulsões de água em óleo. Quando cultivados separadamente, eles degradaram entre 83 e 92% dos hidrocarbonetos lineares do efluente em 15 dias, tendo consumido preferencialmente as cadeias mais curtas. Quando inoculados em consórcio foram capazes de degradar cerca de 70% dos TPH-GRO (hidrocarbonetos da fração leve do petróleo: C5 a C10 – *total petroleum hydrocarbons gasoline range organics*) presentes no efluente em apenas 3 dias. O consórcio também foi efetivo em tratar água subterrânea contaminada com combustível, degradando cerca de 80% dos TPH-GRO. Estes resultados levam a crer que um produto comercial formulado com este consórcio é efetivo em tratamento de águas contaminadas com hidrocarbonetos.

Palavras-chave: biorremediação, consórcio, hidrocarbonetos, águas contaminadas, biosurfactantes

ABSTRACT

Petroleum environmental contaminations are very frequent due to accidents and leakages during the transfer, transportation and storage of those products. In fuel stations, tanks in poor state of repair are very common, which results in contamination of soils and groundwater. Industrial processes, like the used lubricate oil re-refining, generate wastes with hydrocarbons that should be properly treated. As hydrophobic molecules, hydrocarbons persist in environment, because they are not available for biodegradation. To settle this, one of the strategies adopted by microorganisms is to produce surfactants, which disperse the hydrophobic molecules. The purpose of the present study was to select microorganisms capable of producing biosurfactants and degrading hydrocarbons in order to compound a consortium that effectively treats contaminated waters aiming a commercial product development. We have screened 43 isolates for their capacity of producing biosurfactants and growing in the petrochemical wastewater as the sole source of nutrients. Fourty of them could generate biosurfactant, but only eight were capable of growing in the wastewater. Three non pathogenic microbial isolates were selected to compound a consortium: *Brevundimonas diminuta*, *Bacillus sphaericus* and *Candida lipolytica*. These microorganisms were able to produce extracellular surfactant, which has stabilized the water in oil emulsion. When cultivated separately, they have degraded about 83-92% of the total petroleum hydrocarbon in 15 days, and have consumed preferentially the light aliphatic compounds. When putting together they were capable of degrading about 70% of TPH-GRO (C5-C10) present in wastewater in only 3 days. The use of this consortium was also an effective treatment of fuel contaminated groundwater, degrading about 80% of the TPH-GRO. This results indicate that a commercial product formulated with this consortium can be effective when used to treat wastewater contaminated with hydrocarbons.

Keywords: bioremediation, consortium, hydrocarbons, contaminated wastewater, biosurfactants

1. INTRODUÇÃO

1.1. A indústria do petróleo e as contaminações ambientais

Os produtos derivados de petróleo são amplamente utilizados na sociedade. A crescente demanda por energia gerada pelo consumo dos combustíveis derivados de petróleo resulta na busca incessante por novas jazidas, por tecnologias de melhor aproveitamento destes combustíveis e também na busca por fontes alternativas, já que se sabe que este recurso natural é finito. Além de fonte de energia pela combustão de seus derivados, o petróleo é fonte de diversos insumos utilizados pela indústria petroquímica para a fabricação de inúmeros produtos como plásticos, fibras, tecidos, borrachas, tintas, fertilizantes, resinas, parafinas e asfaltos. Apesar de ser considerado um recurso finito, ou seja, uma fonte não-renovável de energia, derivados de petróleo continuam sendo intensamente utilizados em diversos segmentos industriais sendo indispensáveis na sociedade nos dias de hoje.

Na cadeia produtiva, desde a extração, passando pelo refino até o produto final para o consumidor, o petróleo e seus derivados precisam ser transferidos, transportados e estocados e assim, acidentes e vazamentos são muitas vezes inevitáveis. Principalmente no Brasil, devido à sua grande dimensão geográfica e onde os campos petrolíferos não são necessariamente próximos dos terminais e refinarias, existe uma imensa rede de dutos e também transporte por embarcações e caminhões, portanto maior é a probabilidade de ocorrerem acidentes que liberam petróleo ou derivados como a nafta, gasolina, querosene, GLP, óleo diesel, e óleo combustível (PEDROZO, 2002). Devido ao enorme aumento na escala de produção, o petróleo tem se tornado um dos principais contaminantes de diversos ecossistemas, em especial dos oceanos. Além de acidentes e vazamentos no transporte e estocagem do petróleo e derivados, deve ser considerado também o volume de efluentes e resíduos industriais gerados por indústrias petroquímicas de segunda e terceira gerações. Sendo assim, a contaminação ambiental com hidrocarbonetos do petróleo é freqüente e bastante difundida.

Acidentes durante a extração ou o transporte de petróleo ou derivados ocorrem frequentemente nos oceanos, mas há também vazamentos que contaminam solos e lençóis freáticos. As refinarias obedecem a rigorosos sistemas de controle de contaminação,

tratamento de efluentes, monitoramento ambiental, seguindo as legislações específicas para esta atividade. Sendo assim, as principais fontes de contaminação do ambiente com petróleo e seus derivados são através de acidentes durante a carga, descarga, transporte ou produção de subprodutos.

O vazamento de petróleo, ou seus derivados, pode afetar a biota aquática e terrestre e o seu efeito no ambiente dependerá da velocidade com que os contaminantes se difundem, assim como da sua concentração. Como o petróleo contém compostos como benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos e naftaleno a contaminação do ambiente pode ser danosa à saúde de plantas, animais e humanos (BARATHI & VASUDEVAN, 2001; ZHANG et al., 2004; SARKAR et al., 2005). Quando contamina a água, em geral, os óleos derramados tendem a se espalhar na superfície formando um filme de espessura de 0,1mm e águas mais quentes favorecem o espalhamento do óleo pela diminuição da tensão superficial da água. Conforme os componentes mais voláteis do contaminante são evaporados, a densidade tende a aumentar e os óleos mais pesados podem afundar formando “bolas de asfalto” interagindo com rochas e sedimentos no fundo do corpo d’água (PEDROZO, 2002). Portanto, este tipo de contaminante pode afetar tanto organismos planctônicos, como nectônicos e bentônicos. Em oceanos, peixes e baleias podem nadar para longe das manchas de contaminação, porém a contaminação atinge mais gravemente organismos sésseis como os corais ou aqueles que vivem em recifes ou enseadas, como tartarugas e golfinhos que podem se alimentar de presas contaminadas com óleo (EPA, 1999).

As vias de contaminação dos peixes são principalmente pelo contato direto com as guelras, absorção de compostos tóxicos pelas larvas e ovos e ingestão de alimento contaminado, resultando em diversas alterações bioquímicas, celulares, reprodutivas e comportamentais, tais como alterações cardíacas, respiratórias, hepatomegalia, redução no crescimento, carcinomas e anomalias genéticas (PEDROZO, 2002). Aves e mamíferos também são afetados principalmente por contato físico direto, exposição aos vapores de substâncias tóxicas, ingestão dos contaminantes, destruição do habitat ou fontes de alimento e problemas reprodutivos. Especialmente para as aves, o contato com o óleo aumenta o risco de afogamento e congelamento pela perda das propriedades hidrofóbica e isolante das penas, o que acaba prejudicando o vôo. Mesmo a limpeza destes animais contaminados muitas vezes pode prejudicá-los através de infecções secundárias por fungos

e bactérias após a captura e transporte. Sobre a vegetação, os efeitos do óleo podem ser derivados da cobertura das superfícies foliares, reduzindo a transpiração, respiração, e a fotossíntese podendo levar à morte. Se o petróleo ou os contaminantes cobrem a superfície do solo, acabam restringindo a movimentação de oxigênio, destruindo membranas da raiz e afetando a seletividade iônica. O impacto sobre a vegetação pode ser também de origem química, dependendo da composição do óleo e da sensibilidade da espécie. Os processos de limpeza do contaminante podem ser prejudiciais às populações vegetais quando incluem remoção de indivíduos e de grandes porções do solo ou podem favorecer a penetração dos contaminantes no sedimento, aumentando o impacto ambiental (PEDROZO, 2002).

A poluição de ecossistemas marinhos geralmente envolve petróleo não refinado enquanto que contaminações de ecossistemas terrestres envolvem mais comumente combustíveis derivados de petróleo. Produtos como a gasolina, ou outros derivados leves de petróleo, podem ser tratados por uma variedade de métodos físico-químicos. Já combustíveis pesados como o diesel, que possuem baixa volatilidade, requerem outras técnicas de tratamento (RICHARD & VOGEL, 1999). A escolha da tecnologia de remediação a ser empregada depende da natureza do derramamento e das características do local, tais como a proximidade e riscos à população do entorno, proximidade de mananciais municipais e migração potencial dos vapores. A avaliação de risco deve levar em consideração não só a qualidade e concentração do contaminante, mas também os meios pelos quais ele pode chegar a afetar um potencial alvo, apresentando risco real a um organismo ou ao ambiente (ATLAS & PHILP, 2005). Dependendo da carga de contaminação, do custo do tratamento e da intervenção que necessita ser feita no ambiente, muitas vezes a atenuação natural é a alternativa mais adequada.

1.2. Técnicas de descontaminação e biorremediação

1.2.1. Principais técnicas de remediação utilizadas

As principais tecnologias recomendadas no derramamento de combustíveis, hidrocarbonetos voláteis e outros constituintes do petróleo para solos, sedimentos e lodos são: disposição em biopilhas, *landfarming*, bioventilação, extração de vapores, *air*

sparging, incineração, dessorção térmica, biorremediação *in situ*, atenuação natural e introdução de oxidantes químicos (PEDROZO, 2002).

Biopilhas, *ladfarming*, bioventilação, *air sparging*, atenuação natural e biorremediação serão abordados no item 1.2.2.

A incineração é um dos mais efetivos tratamentos disponíveis, pois pode eliminar completamente os contaminantes. É realizada entre 870 a 1200°C e pode degradar hidrocarbonetos persistentes e halogenados. As desvantagens são que necessita de um cuidadoso tratamento dos resíduos gasosos, o custo pode ser bastante elevado e modifica sensivelmente a condição natural do solo. A dessorção térmica utiliza baixas temperaturas para separar os orgânicos do solo, transferindo-os para uma fase sólida ou gasosa. É eficiente para contaminações com componentes mais pesados como óleo diesel e lubrificantes, porém apresenta custos elevados pela necessidade de transporte do solo ou uma grande área no local para o armazenamento e instalação do equipamento. (RISER-ROBERTS, 1998).

Num estudo de revisão sobre descontaminação de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo, Cantagallo e colaboradores (2007) recomendam vários métodos de tratamento para cada tipo de ambiente costeiro. As opções mais frequentemente utilizadas na limpeza deste tipo de ambiente são: limpeza natural, remoção manual, uso de materiais absorventes, bombeamento a vácuo e “*skimmers*” (equipamento desenvolvido para remover o óleo da superfície da água, utilizando discos giratórios e cordas absorventes). Outras opções que são também bastante utilizadas, com algumas críticas por agredirem ainda mais o ambiente, são: jateamento com água a diferentes pressões, jateamento com areia, corte de vegetação, queima *in situ*, trincheiras, remoção de sedimentos e utilização de produtos dispersantes. Os autores enfatizam que os tratamentos aplicados muitas vezes são escolhidos pelo melhor resultado estético, por pressões sócio-econômicas associadas aos negócios de turismo, lazer e comércio, não levando muito em consideração o resultado ecológico da escolha realizada. Segundo os autores, tratamentos de biorremediação *in situ* não são recomendados porque ainda existe pouca informação no país, havendo necessidade de mais estudos nesta área, tanto utilizando métodos de bioestimulação como de bioaumentação (CANTAGALLO, 2007).

Para águas superficiais, subterrâneas e lixiviados as técnicas mais utilizadas são *air stripping*, extração multifásica, biorremediação, fitorremediação e oxidação UV. O *air stripping* envolve a captação somente dos hidrocarbonetos voláteis da água através de torres ou tanques de aeração e pode levar até 10 anos para uma remediação completa. Uma técnica mais eficiente é a extração multifásica *in situ*, que extrai líquidos e vapores para tratamento. Entretanto, como um grande volume de água é extraído, pode afetar a biota do local. A oxidação UV utiliza adição de oxidantes fortes como ozônio ou peróxido de hidrogênio e irradiação com luz ultravioleta para oxidar os contaminantes orgânicos. Esta técnica é eficaz na mineralização dos compostos e não gera produtos tóxicos, apesar de ser ineficiente em água alcalinas ou que contenham metais pesados e carbonatos. Por serem necessários cuidados com os produtos utilizados e com a possível emissão de ozônio para o ambiente, o custo da oxidação UV pode ser mais elevado. Outra tecnologia existente para o tratamento de água é o sistema de adsorção ao carvão ativado granulado, onde a água é bombeada para um ou mais reatores contendo carvão ativado, o qual retém os hidrocarbonetos. Porém, a presença de partículas em suspensão ou altas concentrações de óleos e gorduras podem obstruir os grânulos, comprometendo a eficiência do processo (PEDROZO, 2002).

Os métodos tradicionais de remediação de locais contaminados incluem técnicas como escavação e incineração do solo contaminado, ou bombeamento e retirada da água subterrânea para tratamento, as quais são técnicas caras e politicamente impopulares. São necessárias novas tecnologias para a solução destes problemas ambientais causados pelas indústrias, sendo a biorremediação uma boa alternativa (CRAWFORD, 2006). Em geral esta é uma técnica menos onerosa, por poder ser realizada *in situ* e sem a utilização de grandes equipamentos, provocando pouca perturbação nas atividades locais, na maioria das vezes não produzindo resíduos que necessitem de disposição (PEDROZO, 2002).

1.2.2. Estratégias de Biorremediação

Biorremediação é o emprego de organismos vivos, mais freqüentemente microrganismos ou plantas, ou ambos, ou produtos originados de organismos vivos (enzimas, biosurfactantes) para detoxificar, ou seqüestrar químicos tóxicos presentes em ambientes aquáticos ou solos (CRAWFORD, 2006).

Além dos métodos físicos e químicos empregados na remediação de ambientes contaminados, diversas técnicas comumente utilizadas se baseiam em estimular a atividade de microrganismos já presentes no local, que sejam capazes de biodegradar ou biotransformar os compostos tóxicos. A biodegradação é a quebra química das moléculas por processos fisiológicos dos organismos e pode ocorrer por catabolismo ou co-metabolismo. Utilizando enzimas específicas, os microrganismos são capazes de quebrar o substrato em moléculas menores, gerando energia, aumentando a biomassa e diminuindo o substrato, o que caracteriza o catabolismo (GOVLEV, 1978). Ocorre a mineralização de um substrato orgânico quando este é completamente quebrado, formando moléculas não orgânicas, no caso dos hidrocarbonetos, água e dióxido de carbono. O co-metabolismo ocorre quando o composto degradado não é a fonte de carbono ou energia principal, mas pode ser metabolizado na presença de um substrato primário (BOOPATHY, 2000). Já a biotransformação consiste somente na transformação das moléculas, não necessariamente envolvendo formação de energia e aumento de biomassa, podendo ser útil para biorremediação quando, por exemplo, ocorre mudança de uma função química muito tóxica para uma função menos tóxica.

Alguns métodos abióticos utilizados para descontaminação são a remoção e incineração de solo, utilização de luz ultravioleta, redutores inorgânicos ou oxidantes químicos. Estes processos abióticos podem ser utilizados juntamente com os processos bióticos, de forma a estimulá-los, melhorando a biodegradação. Por exemplo, o peróxido de hidrogênio pode ser utilizado como fonte de oxigênio, já que ele se decompõe em O_2 e H_2O na presença de Ferro ou biomassa. A aplicação de até 2000 ppm de peróxido de hidrogênio estimula a atividade aeróbica da microbiota presente nos primeiros 5,5 cm de solo. Dois quilos de H_2O_2 fornecem aproximadamente 1 Kg de O_2 o que é suficiente para a degradação de 1 Kg de hidrocarboneto (RISER-ROBERTS, 1998). Abioticamente, pela reação de Fenton, na presença de Fe^{+2} o peróxido de hidrogênio forma radicais hidroxila e íons hidroxila, enquanto oxida o Fe(II) a Fe(III). Os radicais hidroxila são extremamente reativos e podem atacar os compostos auxiliando a descontaminação, pois transformam os contaminantes em compostos que são mais suscetíveis a biodegradação (BÜYÜKSÖNMEZ, 1998; CRAWFORD, 2006). A introdução de oxidantes químicos como o peróxido de hidrogênio pode alterar a química natural do solo e também dos

ambientes aquáticos vizinhos, pois é um oxidante não seletivo, oxidando também a matéria orgânica do solo e podendo ser tóxico para a microbiota quando em alta concentração (RISER-ROBERTS, 1998). Os radicais hidroxila formados são oxidantes poderosos e podem causar danos em biomoléculas importantes como DNA, proteínas e lipídeos de membrana. Contudo, os processos bióticos e abióticos podem coexistir, em parte por causa das defesas naturais que as bactérias possuem contra a toxicidade de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (BÜYÜKSÖNMEZ, 1998).

Alguns tratamentos de biorremediação são chamados atenuação natural ou remediação intrínseca, pois são os processos que ocorrem naturalmente em ambientes contaminados. A remediação intrínseca é o resultado dos efeitos combinados de todos os processos que reduzem a massa, a mobilidade e os riscos dos poluentes sem que seja necessária a intervenção humana. Tais processos naturais incluem: biodegradação ou biotransformação dos contaminantes; adsorção dos contaminantes a matrizes ou compostos minerais, tornando-os indisponíveis para a biota; perda da toxicidade por volatilização ou diluição. Normalmente são realizados monitoramentos periódicos para avaliar se a descontaminação está ocorrendo na medida e tempos esperados. Ocorre que estes processos naturais geralmente se mostram muito lentos quando comparados com biorremediação por bioestimulação ou bioaugmentação. Tendo um local contaminado para ser tratado é necessário realizar uma série de avaliações, como massa e distribuição do contaminante, abundância de microrganismos capazes de biodegradar ou biotransformar os contaminantes, se as condições de pH e temperatura são adequadas para a atividade microbiana, se existem os nutrientes, aceptores e doadores de elétrons necessários, para então escolher uma metodologia a ser aplicada (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993). Portanto, raramente não será necessária nenhuma intervenção, não sendo considerada a remediação intrínseca propriamente um método de tratamento (CRAWFORD, 2006).

Barker e colaboradores (1996), analisando diversos pontos ao redor do foco de contaminação com líquidos condensados originados de uma usina de gás, tiveram fortes evidências de que a biorremediação intrínseca ocorria naquele local, de diversas maneiras. Como os custos de tratamentos de remediação excederiam 10 milhões de dólares, e uma alternativa menos custosa poderia ser a biorremediação, eles investigaram se havia

condições adequadas para a atividade dos microrganismos e se a biorremediação intrínseca realmente estava ocorrendo. Considerando que a contaminação no solo e na água havia iniciado há mais de 20 anos e o espalhamento da contaminação não atingia grandes áreas, era provável que estava ocorrendo um processo natural de descontaminação. Os autores concluíram que a degradação aeróbica poderia estar comprometida pelos baixos níveis de oxigênio e nitrato disponíveis tanto no solo contaminado quanto em solo vizinho não contaminado (área controle). Provavelmente a redução de sulfato era o principal meio de remediação que ocorria neste local, pois enquanto a concentração na área controle era de 230mg/L, na área contaminada as medidas chegavam perto de zero. Além disso Fe(III) aparentemente estava sendo reduzido a Fe(II) nas áreas contaminadas, o que suporta a teoria da ocorrência de biodegradação anaeróbica (BARKER, 1996).

A bioestimulação é o processo mais freqüente de biorremediação, onde a vegetação ou a microbiota indígena são estimuladas pela adição de nutrientes e correção das condições ambientais, o que promove o melhor crescimento e metabolismo dos organismos responsáveis pela detoxificação (CRAWFORD, 2006).

Bioaugmentação significa adicionar material biológico exógeno, microrganismos ou plantas, ao sistema natural para acelerar a biorremediação. Quando ocorre um acidente de contaminação, o local pode não apresentar uma microbiota com capacidades enzimáticas de degradação do composto ou apresentar número insuficiente de microrganismos para um tratamento imediato. Normalmente são utilizados microrganismos ou plantas nativos do local, multiplicados em fermentadores ou casas de vegetação, podendo ser utilizados também organismos geneticamente modificados para o propósito da descontaminação (RISER-ROBERTS, 1998).

A biorremediação pode ser realizada em biorreatores contendo o solo a ser tratado em meio líquido, onde podem ser adicionados nutrientes para estimulação do metabolismo dos microrganismos, como fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, ou então inóculos de microrganismos sabidamente degradadores do contaminante. Com o objetivo de estimular o metabolismo também pode ser injetado ar ou oxigênio puro, ou o processo pode ocorrer anaerobicamente. A injeção de oxigênio ou ar requer equipamentos específicos e gasto de energia, portanto é a parte mais cara do processo. Processos anaeróbicos podem ser mais baratos por este motivo, porém, nem sempre os contaminantes são degradados

anaerobicamente, como tetracloroetileno e diversos compostos aromáticos e poliaromáticos. Uma variação bastante utilizada em reatores, os leitos fluidizados, utilizam microrganismos imobilizados em partículas como polímeros plásticos, grãos de areia ou de polissacarídeos que circulam pelo sistema. As fases gasosas contaminadas com vapores, como, por exemplo, solventes clorados, também podem ser tratadas com biomassa imobilizada em uma matriz sólida. Um método comum de tratamento de contaminantes múltiplos é alternar condições aeróbicas e anaeróbicas para tratar contaminantes nas formas oxidadas e reduzidas, o que funciona bem para solventes clorados como bifenilas policloradas (PCBs) e tetracloroetileno (BÜYÜKSÖNMEZ, 1998). Outras alternâncias entre tratamentos podem ser feitas, por exemplo um reator abiótico (de luz ultravioleta ou onde ocorra reação de Fenton) juntamente com um reator biológico (CRAWFORD, 2006).

A biofiltração é outro método para o tratamento de contaminantes na fase gasosa. O ar passa por um leito de solo ou compostagem onde estão alojados os microrganismos capazes de degradar os contaminantes. Alguns contaminantes tratados com eficácia por este método são: estireno, misturas de pentano e isobutano, tolueno, benzenos clorados, etileno, dimetilsulfato e outros compostos orgânicos voláteis (VOCs). É comum o uso desta tecnologia na Europa para tratamento de odores e têm se tornado freqüente nos Estados Unidos pela sua simplicidade e efetividade (RISER-ROBERTS, 1998).

Air sparging é um processo de remediação *in situ* onde ar ou oxigênio é bombeado para dentro do solo ou água subterrânea para estimular a atividade da microbiota existente, que degrada os contaminantes por oxidação. Podem ser utilizados outros aceptores de elétrons disponíveis, como Fe^{+3} , Mg^{+3} e nitrato, porém o oxigênio é um agente oxidante muito mais poderoso, que pode inclusive causar problemas pelo excesso de biomassa formada quando ele é aplicado. Com o propósito de fornecer oxigênio para melhorar a biodegradação, as indústrias desenvolveram compostos (a base de peróxidos de magnésio) que fornecem uma liberação de oxigênio controlada e por bastante tempo, os chamados ORCs (*oxygen-releasing compounds*) (CRAWFORD, 2006).

A bioventilação assim como *air sparging*, tem o objetivo de prover oxigênio para o ambiente sub-superficial, estimulando a degradação pelos microrganismos existentes no local. Funciona melhor com contaminantes que são moderadamente voláteis, pois promove a biodegradação de vapores fazendo com que o ar passe através do solo (CRAWFORD,

2006). Uma desvantagem desta técnica é que ela necessita de grande investimento de equipamentos construídos no local, ou utilização de sofisticados aparelhos móveis para a ventilação do solo (PEDROZO, 2002).

Landfarming é um método de remediação *ex situ* onde ocorre a remoção do solo contaminado e o espalhamento deste em camadas onde também são adicionados os nutrientes necessários (nitrogênio e fósforo) para estimular a biodegradação. É controlada a umidade e o solo é arado regularmente para prover oxigênio suficiente, sendo normalmente necessária uma área grande. Dependendo dos contaminantes presentes é necessária a construção de um local com impermeabilização para não haver migração dos compostos, coletores de lixiviado, ou sistema para tratamento de gases. Contaminações por petróleo são eficientemente tratadas por este método, porém altas concentrações de metais pesados, encontradas muitas vezes em produtos derivados do petróleo em decomposição, podem inibir a atividade microbiana. A presença de plantas pode acelerar a biodegradação de HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) pois a zona de raízes possui a atividade microbiana aumentada (PEDROZO, 2002; CRAWFORD, 2006).

As chamadas Biopilhas são variantes do *Landfarming*, com um maior controle sobre o processo. Elas utilizam menos área e os vapores são recuperados e tratados. Podem ser utilizados compostos liberadores de oxigênio (ORCs) e são controladas as condições de temperatura, umidade e nutrientes. Podem ser inoculados microrganismos selecionados, porém isto raramente é realizado, pois dadas as condições necessárias, a própria microbiota autóctone é capaz de degradar a maioria dos contaminantes. Podem ainda ser adicionados na biopilha materiais orgânicos como lascas de madeira e esterco de animais para auxiliar na retenção de umidade e prover nutrientes para a microbiota, tornando o processo mais barato e mais rápido (CRAWFORD, 2006).

Um método bastante simples para tratamento de solos contaminados é a compostagem. O solo contaminado é retirado e misturado com matéria orgânica como palha, esterco e outros resíduos de agricultura, sendo aerado periodicamente. As temperaturas geradas pela atividade microbiana podem chegar em torno de 50-60° C. Este método tem sido utilizado para o tratamento de resíduos de petróleo, clorofenóis e resíduos de explosivos, porém pode haver pouca mineralização dos compostos, formando produtos dos quais não se sabe a estabilidade e a toxicidade. Por isso, resíduos perigosos como

pesticidas ou outros xenobióticos devem ser estudados e testados antes de se aplicar este tratamento em larga escala. Apesar de ser um método simples e barato, este método ainda não é considerado seguro para o tratamento de diversos resíduos perigosos (CRAWFORD, 2006).

A Fitorremediação envolve o uso de plantas para remoção, degradação ou estabilização dos contaminantes do solo ou da água (GERHARDT et al., 2009). Por fitoextração, os contaminantes podem ser absorvidos e acumulados nos tecidos vegetais, e quando a vegetação é colhida, é normalmente queimada, o que reduz o volume de material contaminado a ser disposto em 95% (CRAWFORD, 2006). No caso de metais pesados ainda é possível extrair os metais concentrados nas cinzas. As plantas podem produzir exudatos que fornecem fontes de carbono e nitrogênio para estimular o desenvolvimento e a atividade de microrganismos associados às raízes. Poucos compostos químicos podem ser completamente mineralizados pelas plantas somente, entretanto, a associação com microrganismos é bastante eficiente para diversos compostos. Esta microbiota presente na região das raízes é que atua degradando ou transformando os contaminantes, o que também é chamado de rizorremediação (ALKORTA & GARBISU, 2001). As plantas podem ajudar também a proteger o solo de erosão e infiltração, diminuindo riscos do poluente se espalhar. A fitorremediação normalmente é um processo lento, várias colheitas podem ser necessárias e muitas vezes as raízes não conseguem atingir a profundidade de toda a contaminação. As condições ambientais, de nutrientes e disponibilidade de água devem ser adequadas para garantir o sucesso do desenvolvimento das plantas (CUNNINGHAM et al., 1995).

Apesar de a maioria dos estudos de biorremediação se concentrar na atividade de degradação realizada por bactérias, a biorremediação pode também ocorrer pela ação de fungos. Os fungos decompositores de madeira produzem para este fim enzimas oxidases que podem ajudar a degradar alguns poluentes. É uma tecnologia ainda em estudo, pois podem apresentar degradação incompleta dos compostos formando subprodutos desconhecidos. Além disso, altas concentrações dos contaminantes podem inibir a atividade fúngica. As enzimas peroxidases de *Phanerochaete chrysosporium* são as mais intensamente estudadas para fins de biorremediação de xenobióticos. Foi demonstrado que a presença deste fungo aumentou a taxa de mineralização de HPAs e que suas enzimas são

capazes de iniciar a degradação de diversos xenobióticos, incluindo compostos clorados como os PCBs (CRAWFORD, 2006; BRODKORB, 1992).

1.2.3. Limitações da utilização de biorremediação

Sendo um processo biológico, a biorremediação possui algumas limitações como, por exemplo, as condições ambientais de pH, temperatura, radioatividade, umidade e nutrientes que os organismos suportem e consigam realizar a degradação, absorção ou biotransformação. Altas concentrações dos contaminantes (>50000ppm de petróleo) ou de metais pesados como chumbo, mercúrio e zinco ou substâncias antimicrobianas podem inibir a atividade de biorremediação (CRAWFORD, 2006). A biorremediação pode ser inibida também por baixas concentrações dos contaminantes (que não contém energia suficiente para o metabolismo microbiano) ou estarem indisponíveis para a biota (aderidos à matéria orgânica ou partículas de solo como argila ou em poros inacessíveis para as bactérias) (BOOPATHY, 2000). A biorremediação pode ser utilizada para vários contaminantes, mas não para todos, pois existem xenobióticos que não são biodegradáveis, como alguns compostos clorados assim como os metais pesados e radionuclídeos (que não são degradados e sim absorvidos) (PEDROZO, 2002). Uma das desvantagens da biorremediação é que em alguns casos o metabolismo microbiano dos contaminantes pode produzir metabólitos tóxicos (BOOPATHY, 2000), portanto a aplicação de um processo de biorremediação deve ser muito bem estudada e monitorada.

A biorremediação pode ser uma boa alternativa de tratamento de locais contaminados quando as condições ambientais para o metabolismo microbiano são adequadas e se conhece a microbiota e os produtos de degradação gerados. É uma técnica que pode ser aplicada *in situ*, com pouco distúrbio do ambiente, gera pouco ou nenhum resíduo, eliminando riscos e responsabilidades a longo prazo. Este método de tratamento possui uma boa aceitação pública e pode ser acoplado com métodos de tratamento físicos e químicos (BOOPATHY, 2000).

1.3. Biodegradação de Hidrocarbonetos

O petróleo é uma mistura complexa de alcanos, aromáticos, resinas e asfaltenos e pode ser constituído por mais de 250 hidrocarbonetos, variando bastante na composição, dependendo do tipo e origem (BARATHI & VASUDEVAN, 2001; PEDROZO, 2002). Por ser um composto natural, proveniente de matéria orgânica de plantas e animais aquáticos e terrestres que foi decomposta e transformada por processos biológicos, químicos e geológicos e acumulada ao longo de milhões de anos, a sua biodegradação é comum na natureza (Richard & Vogel , 1999).

Existem microrganismos que possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, transformando-os em compostos mais simples, que são utilizados por outros microrganismos, até a completa mineralização, ou seja, quando o carbono retorna a atmosfera na forma de CO₂, podendo então ser utilizado novamente pelas plantas (RON, 2002). Nos locais contaminados a microbiota sofre uma adaptação, ou seja, as trocas genéticas e a evolução ocorrem e levam ao surgimento de novas populações que são resistentes e que podem degradar os xenobióticos (CRAWFORD, 2006).

Ambientes impactados com petróleo ou derivados possuem uma grande variedade de substratos e metabólitos, onde acaba se desenvolvendo uma comunidade complexa de microrganismos. Para o estudo e entendimento destas comunidades, têm sido desenvolvidos diversos métodos tanto de cultivo de microrganismos como métodos independentes de cultivo. Isolar e identificar microrganismos capazes de degradar estes compostos são técnicas fundamentais quando o objetivo é a aplicação para biorremediação. Entretanto diversas técnicas moleculares têm surgido como ferramentas para descrever as comunidades microbianas, muitas vezes formadas por microrganismos que não são cultiváveis (VAN HAMME, 2003).

Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser divididos em 4 classes: saturados (que podem ser parafínicos, os alcanos, e naftênicos, os cicloalcanos), aromáticos (benzeno, tolueno, o-xileno, t-butilbenzeno), asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e resinas (piridinas, quinilinas, carbazóis, sulfóxidos e amidas). Além de hidrocarbonetos, o petróleo contém pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, assim como baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos, principalmente níquel e vanádio. Diversos trabalhos demonstraram a

capacidade de degradação de hidrocarbonetos por bactérias isoladas. Hidrocarbonetos como n-alcenos são degradados por uma grande gama de microrganismos que os utilizam como fonte de carbono. Compostos aromáticos leves possuem também uma boa taxa de degradação no ambiente. Porém, hidrocarbonetos aromáticos com alto peso molecular, policíclicos e compostos polares são degradados principalmente por co-oxidação, apresentando níveis de degradação extremamente baixos.

Microrganismos isolados podem metabolizar somente uma variedade limitada de hidrocarbonetos, portanto, no ambiente, o petróleo é degradado por consórcios de microrganismos, associando, assim, uma maior variedade de capacidades enzimáticas para que sejam degradadas misturas complexas de hidrocarbonetos (LEAHY & COLWELL, 1990; RICHARD & VOGEL, 1999). Richard & Vogel (1999) caracterizaram um consórcio de 7 microrganismos onde quatro deles não eram capazes de degradar nenhum dos substratos testados. Entretanto, retirando estes quatro microrganismos a degradação de óleo diesel diminuía sensivelmente, demonstrando que os microrganismos possuíam capacidades catabólicas complementares. A partir disso, o ideal é que sejam selecionados mais de dois microrganismos para compor um consórcio eficiente em biorremediar áreas contaminadas.

Segundo Leahy e Colwell (1990) as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos mais importantes em ambientes terrestres e marinhos são representantes dos gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas*. Entre os fungos, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, e *Sporobolomyces* estão entre os mais encontrados no mar, e *Trichoderma* e *Mortierella* são os mais comuns isolados de solos, além de algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Richard e Vogel (1999) encontraram 4 espécies de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. versicularis* e *P. capacia*) e uma *Achromobacter anthropi* em um solo contaminado por solvente derivado de petróleo, pertencentes a um consórcio de 7 isolados que são capazes de degradar 90% do diesel adicionado a um meio líquido. Barathi e Vasudevan (2001) demonstraram o consumo de diversos hidrocarbonetos por uma linhagem de *P. fluorescens* isolada de solo contaminado por petróleo na Índia. Bento et al. (2005a) utilizaram como inóculo para biorremediação de solos contaminados com óleo diesel um consórcio de bactérias isoladas de um solo da Califórnia (também contaminado

por óleo diesel) que continha *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. pumilus*, *Acinetobacter junii* e *Pseudomonas* sp. Jaques et al. (2005) obtiveram como as melhores degradadoras de antraceno 3 linhagens de *Pseudomonas*, sendo duas *P. aeruginosa* e a outra *P. citronelollis*, as quais foram isoladas de um solo em processo de tratamento por “landfarming” contaminado há 14 anos por resíduos de indústrias e refinaria de petróleo no Rio Grande do Sul. Entre 18 bactérias isoladas de um solo contaminado na Grécia, 3 delas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Microbacterium* e *Paracoccus* foram capazes de degradar uma grande variedade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e n-alcenos (ZHANG, 2004).

A biodegradação de hidrocarbonetos realizada por um consórcio de microrganismos é um processo complexo que envolve oxidação em sítios específicos das moléculas por alguns grupos de microrganismos e subsequente utilização dos produtos gerados por outros grupos de microrganismos. O primeiro passo na biodegradação de hidrocarbonetos envolve uma enzima oxigenase ligada à membrana, sendo isto essencial para bactérias entrarem em contato direto com este substrato (RON, 2002). A via de degradação de alcanos mais bem conhecida em bactérias gram-negativas é codificada pelo plasmídeo OCT de *Pseudomonas putida* Gp01. Uma monooxigenase ligada à membrana, rubredoxina e rubredoxina redutase servem para mover elétrons do NADH para a hidroxilase para a conversão de um alcano em um álcool. O álcool então pode ser oxidado a um aldeído e um ácido antes de entrar na β -oxidação e ciclos dos ácidos tricarbóxicos. Nesta linhagem, o operon *alkBFGHJKL* codifica as enzimas necessárias para a conversão de alcanos em acetil-coenzima A (CoA), enquanto *alkST* codifica uma rubredoxina redutase (alkT) e um regulador positivo do operon (AlkS). Ainda há genes possivelmente envolvidos em quimiotaxia e transporte de alcanos. Também foram caracterizados outros sistemas de degradação diferentes, como o plasmídeo pDEC de *Pseudomonas* sp. C12B e o plasmídeo OCT de *Stenotrophomonas maltophilia* que possui um gene (*alkA*) diferente de *P. putida*. *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* sp. ADP1 e *Acinetobacter* sp. M1 também possuem algumas diferenças genéticas quanto a via para degradação de alcanos. Foi descrito em *P. putida* GMo1 e *Nocardiodes* sp. CF8 a presença de duas monooxigenases que não estão em operon. Uma monooxigenase contendo cobre que está ligada à membrana é induzida em resposta à presença no ambiente de alcanos de diversos tamanhos, enquanto que outra monooxigenase

binuclear ligada a ferro é induzida somente por alcanos de mais de 6 carbonos (VAN HAMME, 2003). Portanto existem diversas vias para a degradação destes compostos, que possuem semelhanças, mas também diferenças, dependendo das espécies ou das linhagens que são investigadas. Ainda há bastante campo de estudo para caracterizar melhor os sistemas genéticos existentes, as enzimas envolvidas e como eles podem ser úteis para a remediação ambiental e para a síntese química de compostos.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de degradar aerobicamente vários hidrocarbonetos, inclusive compostos aromáticos e seus derivados provenientes de atividades industriais, alguns deles bastante tóxicos. O mecanismo básico para a degradação de compostos aromáticos é a inserção de hidroxilas para a posterior quebra do anel aromático. Na degradação de tolueno por *P. putida*, por exemplo, estão envolvidas 3 enzimas dioxigenases e uma hidrolase para a abertura do anel aromático. Diversos compostos cíclicos, compostos policíclicos e outros derivados, podem ser metabolizados por linhagens de *Pseudomonas* através de rotas que convergem a um intermediário comum, o β -ceto-adipato, onde a clivagem “ortho” de um anel aromático é realizada por uma 1,2-dioxigenase. Foi demonstrada também a clivagem na posição “meta” por uma 1,2-dioxigenase quando o substrato era benzoato e por uma 2,3-dioxigenase quando o substrato era fenol (GARRITY et al, 2005).

O desenvolvimento de microrganismos em água pode apresentar problemas pelo fato de os hidrocarbonetos serem imiscíveis em água. As bactérias degradadoras de petróleo possuem alta atividade emulsificante (LEAHY & COLWELL, 1990), ou seja, são boas produtoras de biosurfactantes, que emulsificam o substrato tornando-o mais disponível para utilização como fonte de carbono (BARATHI & VASUDEVAN 2001). Utilizando este princípio, um método bastante utilizado para remediação de vazamentos de óleo que atingem corpos d’água é o uso de dispersantes, inclusive misturando-os à água do mar e realizando jateamentos, para que as manchas sejam limpas e o óleo seja emulsionado. Dispersantes artificiais têm sido usados e estudados como um meio de aumentar a área de superfície de manchas de óleo permitindo melhor biodegradabilidade. Alguns dispersantes utilizados na década de 60 se mostraram extremamente tóxicos. Outros, menos tóxicos, ainda podem inibir a atividade microbiana. Porém alguns são efetivos e podem aumentar a biodegradação (CANTAGALLO et al., 2007; LEAHY & COLWELL, 1990).

1.4. Biosurfactantes

Diversos microrganismos são capazes de produzir moléculas surfactantes, extracelularmente ou associadas à membrana, então chamados de biosurfactantes (BODOUR, 2003; THAVASI, 2007). Os surfactantes são compostos que adsorvem às interfaces e alteram suas propriedades, diminuindo a tensão superficial e interfacial. Emulsificantes são uma classe de surfactantes que estabilizam dispersões de um líquido em outro, como as emulsões de óleo em água, porém não necessariamente são capazes de diminuir a tensão superficial de um líquido. Os surfactantes se concentram nas interfaces pelo fato de serem moléculas anfipáticas, ou seja, possuem grupos polares e também grupos hidrofóbicos (KARANTH, 1999; RON & ROSEMBERG, 2001).

1.4.1. Importância da produção de biosurfactante na biodegradação de hidrocarbonetos

Uma das principais razões da persistência de hidrocarbonetos no ambiente é a sua baixa solubilidade em água, facilitando a adesão destes compostos a partículas do solo, onde ficam indisponíveis para a biodegradação (BARKAY et al, 1999). Por este motivo, uma característica importante de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos é a capacidade de produção de biosurfactantes. Estas moléculas auxiliam na degradação, por solubilizar e emulsificar os compostos hidrofóbicos, que podem estar aderidos ao solo ou partículas orgânicas, aumentando a concentração do contaminante na água (BANAT, 2000). Os surfactantes auxiliam na dispersão do óleo, aumentam a área de superfície para o crescimento microbiano e ajudam as células a se destacarem das gotas de óleo após o consumo do hidrocarboneto (RON, 2002).

O emulsificante Alasan, um biosurfactante de alta massa molecular produzido por *Acinetobacter radioresistens* KA53, melhora a solubilidade e a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos como fenantreno, fluoranteno e pireno. A presença do mesmo biosurfactante numa cultura de *Sphingomonas paucimobilis* aumenta bastante a taxa de mineralização de fluoranteno e fenantreno (BARKAY et al., 1999).

Existem estudos que comprovam a melhora da biodegradação na presença de biosurfactantes, porém também existem relatos de que eles não possuem efeito ou até inibem a biodegradação. Bruhein e colaboradores (1997) não encontraram nenhum efeito

de aumento da biodegradação de $1\text{-}^{14}\text{C}$ -hexadecano por *Rhodococcus* sp. 094 utilizando tanto surfactantes comerciais quanto biosurfactantes. A inibição da biodegradação pode ocorrer pela toxicidade de surfactantes sintéticos a alguns microrganismos, ou porque as micelas formadas pelo surfactante incorporam os hidrocarbonetos de forma que ficam indisponíveis para a ação da microbiota (BARKAY, 1999).

Uma grande variedade de microrganismos produz moléculas biosurfactantes, com estruturas químicas e propriedades muito diferentes. Isto leva a crer que estas moléculas possuem diferentes funções nas diferentes populações de microrganismos, e que sua produção está relacionada a alguma vantagem evolutiva (BODOUR, 2003; ROSEMBERG, 2006). Alguns microrganismos degradadores de óleo produzem biosurfactantes, porém esta não é uma regra geral. Microrganismos não-degradadores de óleo também são capazes de produzir surfactantes, como a surfactina de *B. subtilis* (ROSEMBERG, 2006). Outra possível explicação para a função destas moléculas é que elas atuem como antibióticos, defendendo as células do ataque de outros microrganismos (MORIKAWA, 2000). Existem 3 hipóteses que explicam as funções naturais dos biosurfactantes: 1) aumentar a área de superfície de substratos hidrofóbicos insolúveis em água (formando um microambiente onde a degradação do substrato é favorecida), 2) aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos insolúveis em água (principalmente os surfactantes que diminuem a tensão interfacial tornam as moléculas hidrofóbicas disponíveis para a biodegradação) e 3) regular a adesão e destacamento dos microrganismos das superfícies (ROSEMBERG, 2006).

Cada tipo de biosurfactante provavelmente possui uma função específica. A surfactina de *B. subtilis*, além de apresentar atividade antimicrobiana, deve estar envolvida na formação de poros de íons nas membranas. A estreptofactina de *S. tendae* provavelmente atua na ereção das hifas aéreas diminuindo a tensão superficial dos delgados filmes aquosos que circundam as colônias. As polimixinas de *B. polymyxa* também possuem atividade antimicrobiana e por sua característica anfipática acabam atuando também como detergente (ROSEMBERG, 2006).

Os biosurfactantes podem ser divididos em moléculas de baixa massa molecular, que são eficientes em reduzir as tensões superficiais e interfaciais e polímeros de alta massa molecular, que se ligam firmemente às superfícies (ROSEMBERG, 2006). A maioria destas

moléculas é complexa podendo se apresentar em estruturas como lipopeptídeos ou lipoproteínas, glicolipídeos, complexos proteína-polissacarídeos e lipídeo-polissacarídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos e ácidos micólicos (THAVASI, 2007).

Alguns microrganismos bastante estudados por produzirem biosurfactantes de baixa massa molecular são: *Pseudomonas aeruginosa* (rhamnolipídeos), *Rhodococcus erythropolis* (trealose-lipídeos), *Pseudomonas* spp. *Arthrobacter* sp., *Mycobacterium* sp., *Torulopsis bombicola* (levedura) (sophorolipídeos), *Alcanivorax borkumensis* (glicose-lipídeos), *Candida borgoriensis* (levedura), *P. fluorescens* (viscosina), *Bacillus subtilis* (surfactina ou subtilisina), *B. brevis* (Gramicidina S), *B. polymyxa* (polimixinas), *Serratia marcescens* (serrawetina), *B. Licheniformis* (Lichenisina, um lipopeptídeo), *Serratia liquefaciens* (lipopeptídeo), *Streptomyces tendae* (streptofactina), *Nocardia erythropolis* (ácidos corinomicólicos), *Corynebacterium lepus* (ácidos corinomicólicos), *Acinetobacter* spp. (fosfolipídeos), *Thiobacillus thiooxidans* (fosfolipídeos) e diversos outros gêneros que produzem biosurfactantes compostos por ácidos graxos. Algumas linhagens conhecidas por produzirem surfactantes de alta massa molecular são: *Acinetobacter calcoaceticus* (RAG-1 emulsan), *A. calcoaceticus* BD413 (BD4 emulsan), *A. radioresistens* KA53 (Alasan), *A. calcoaceticus* A2 (Biodispersan), *Candida tropicalis* (Mannan-lipídeo-proteína), *C. lipolytica* (Liposan), *P. fluorescens* (Emulsan 378), *Methanobacterium thermoautotrophium* (complexo protéico), *P. tralucida* (emulsifica inseticidas), *B. stearothermophilus* (emulsificante termofílico), *Sphingomonas paucimobilis* (acetilheteropolissacarídeo), *C. utilis* (emulsificante alimentício), *Halomonas eurihalinia* (polissacarídeos sulfatado), *P. marginalis* (fator PM) e *Phormidium J-1* (Emulcyan) (ROSEMBERG, 2006).

Os biosurfactantes são normalmente produzidos na fase estacionária do crescimento. A regulação genética da produção dos biosurfactantes ainda não é totalmente compreendida pela dificuldade em se obter mutantes viáveis e pela falta de ferramentas genéticas adequadas como plasmídeos, transposons e bibliotecas de genes. Porém a regulação da produção destas moléculas tem sido estudada através dos mecanismos de produção de glicolipídeos-rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* e de lipopeptídeos por *Bacillus*. Nestas bactérias foi demonstrado que a produção é induzida por sinais envolvidos em *quorum sensing*, ou seja, quando as células se encontram em altas densidades populacionais

e ocorre uma comunicação em nível molecular, através de moléculas sinalizadoras e receptores de membrana. A regulação da produção de emulsificantes de alto peso molecular é mais complexa e envolve maior número de genes, ainda mais quando se trata de complexos proteína-polissacarídeos. Porém estudos sugerem que o controle por *quorum sensing* também ocorra na regulação destes emulsificantes, desde que sua produção ocorra a partir do início da fase estacionária de crescimento. A produção de biosurfactantes quando a densidade celular é alta pode ser uma vantagem seletiva em microrganismos patógenos ou naqueles que degradam hidrocarbonetos, por exemplo. Em patógenos, se a molécula produzida é um fator de virulência, ela é produzida em altas concentrações celulares para causar um ataque localizado no hospedeiro. Em bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, que necessitam se multiplicar em interfaces óleo-água, estas moléculas aumentam esta superfície a ser colonizada. Além disso, após o substrato ser consumido, a produção dos emulsificantes auxilia no destacamento das células das gotas de óleo que não possuem mais o substrato de interesse, permitindo-as atacarem outras gotas, principalmente no caso de o isolado consumir somente um ou poucos compostos de uma mistura (ROSEMBERG, 2006; RON, 2002). Além disso, aquelas gotas de óleo onde já foi consumida a molécula de interesse, ficam marcadas, isto é, envoltas por moléculas hidrofílicas, impedindo as células de se aderirem novamente, como demonstrado para o Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 que atua como um fator anti-aderente (ROSEMBERG, 1983).

A produção de biosurfactantes pelos microrganismos depende do meio utilizado e da fonte de carbono (BODOUR, 2003). Se forem trocados o substrato ou as condições de crescimento podem ser produzidos diferentes tipos de biosurfactante pelo mesmo isolado microbiano (BANAT, 2000). Vários autores utilizam glicose como única fonte de carbono (em meio mínimo de sais) para a produção dos biosurfactantes (BODOUR, 2003; CHEN, 2007). Toledo et. al. (2006) utilizam caldo nutritivo (10g/L de glicose, 5g/L de extrato de levedura, 5g/L de peptona e 5g/L de NaCl) para cultivar as bactérias produtoras de emulsificantes. Thavasi e colaboradores (2008) utilizaram além de petróleo, óleo lubrificante usado e torta da extração de óleo de amendoim para produção em larga escala (reator com 2,1L) do biosurfactante de *Azotobacter chroococcum*, que havia sido isolado de ambiente marinho. O máximo de produção do surfactante emulsan produzido por A.

calcoaceticus RAG-1 foi atingido utilizando um meio mínimo de sais com 2% de etanol como única fonte de carbono (ROSEMBERG, 2006).

1.4.2. Métodos para a detecção da atividade de biosurfactantes

A literatura sobre isolamento de microrganismos produtores de biosurfactantes apresenta diversos métodos para a detecção da atividade destas biomoléculas, estando as principais técnicas listadas abaixo.

- Atividade hemolítica: os isolados são inoculados em placas com agar-sangue (5% de sangue) e após 24-48h a atividade hemolítica é medida pelo halo claro formado ao redor da colônia (PLAZA, 2006). Este método foi primeiro descrito em 1970 por Bernheimer e Avigad, que detectaram a atividade de hemólise de células vermelhas pela surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, e a partir de então utilizada para detecção de surfactina, rhamnolipídeos e prospecção de novos isolados produtores de biosurfactantes (YOUSSEF, 2004).
- Método do colapso da gota: parte do princípio que uma gota de líquido contendo biosurfactante colapsa e se espalha na superfície de um óleo (YOUSSEF, 2004). O fundo dos poços de uma microplaca de 96 poços de poliestireno é coberto com uma fina camada de óleo (1,8-2 µL ou 7 µL) que é deixado estabilizar por 1-2 h (teste quantitativo) ou 24 h (teste qualitativo – realizado com óleo mineral). Gotas de 5 µL (ou 20 µL) das culturas são colocadas a um ângulo de 45° C. As culturas que contém biosurfactantes em seguida apresentam a gota de óleo colapsada, isto é dispersada. Para uma medida quantitativa, após um minuto o diâmetro da gota é medido em lupa ou microscópio. (BODOUR, 1998; TUGRUL, 2004) É eficiente para poucas quantidades de surfactante na amostra. Com o aumento da concentração do surfactante, aumenta também o diâmetro da gota de amostra, até colapsar (TUGRUL, 2004). Plaza e colaboradores (2006) descrevem assim o método do colapso da gota: 100 µL de sobrenadante da cultura é adicionado a um poço de placa de 96 poços, onde 5 µL de petróleo (ou outro óleo) são pipetados.
- Técnica do espalhamento do óleo: são colocados 40 ou 50 mL de água destilada em placa de Petri e 10-100 µL de petróleo, sobre o petróleo são adicionados 10 µL do sobrenadante da cultura e é medido o diâmetro da zona clara (gota) formada. Para

estimar a quantidade de biosurfactante produzido, as medidas podem ser comparadas a uma curva padrão preparada com um biosurfactante comercial, como a surfactina. (MORIKAWA et al, 2000; YOUSSEF et al, 2004; PLAZA, 2006).

- Estalagmômetro de Traube: uma espécie de pipeta com terminação em tubo capilar, por onde se mede o número de gotas que caem do líquido em comparação com um líquido de referência (PLAZA, 2006).
- Atividade de emulsificação OD_{610nm} : 5 mL de solução com o biosurfactante (purificado ou sobrenadante) são colocados em tubos de 30 mL e 5 mg do óleo a ser emulsificado é adicionado e misturado por 20 min. A densidade ótica a 610 nm é medida em espectrofotômetro a 610 nm após 20 min ou 24 h e os resultados expressos em densidade ótica (OD_{610nm}) (THAVASI, 2008). Barkay et al. (1999) também utilizam a OD, porém lida a 600 nm para estimar a atividade emulsificante do Alasan produzido por *A. radioresistens* em emulsionar HPAs.
- Teste de emulsificação: Método desenvolvido por Cooper and Goldenberg em 1987, que é mais apropriado para biosurfactantes com atividade emulsificante (DESAI, 1997). 2 mL da cultura livre de células (sobrenadante) são adicionados a 2 mL de óleo (óleo diesel, querosene, heptadecano ou outro substrato oleoso), a mistura é agitada em vórtex por 2 min e deixada descansar por 24 h. O índice E24 é definido pela percentagem da altura da camada emulsificada em mm em 24 h, dividido pela altura total do líquido no tubo de ensaio (IQBAL, 1995; DESAI, 1997; BENTO 2005). Banat (2000) descreve este ensaio utilizando 6 mL de óleo de motor e 4 mL de meio de cultura. Toledo et. al. (2006) utilizam os volumes de 3 mL de substrato hidrofóbico misturados a 3 mL de solução com biosurfactante para os estudos de emulsificação. Barati & Vasudevan (2001) utilizam 5 mL de meio de sobrenadante do meio de cultura misturados com 1 mL de óleo (tolueno, querosene, óleo de girassol e hexano).
- Medida de tensão superficial utilizando tensiômetro (método do anel *du Nouy*): equipamento que mede a força necessária para que um anel feito de fio de platina seja empurrado através de uma interface líquido-ar ou líquido-líquido (BODOUR, 1998).
- Método de *screening* rápido em microplaca por diminuição da tensão superficial: é baseado no efeito que a forma do menisco produz sobre um fundo

quadriculado e é realizado em placas de 96 poços. São colocados 100 µL de água pura no poço, que forma uma superfície de ângulo aproximadamente igual a 90° C em relação às paredes do poço, que exhibe um quadriculado de tamanho normal. São adicionados 100 µL de sobrenadante de uma cultura, e a presença do surfactante faz com que a superfície do líquido se torne côncava, distorcendo a imagem do quadriculado, tornando os quadrados menores e em maior quantidade (VAUX & COTTINGHAM, 2001 *apud*: CHEN, 2007). Chen e colaboradores (2007) sugerem um ensaio quantitativo utilizando este método.

Iqbal e colaboradores (1995) correlacionaram diferentes concentrações do biosurfactante de *P. aeruginosa* S8 com os halos formados nas placas de agar sangue e concluíram que a hemólise pode ser usada para quantificar a produção de biosurfactante e também que a hemólise é resultado da produção dos biosurfactantes e não de hemolisina. Entretanto esta é uma técnica em desuso e a relação biosurfactante-hemólise não deve ser uma regra geral para todos os biosurfactantes. Por este motivo alguns autores contestam seu uso (PLAZA, 2006; YOUSSEF, 2004). Plaza e colaboradores testaram diversos métodos para verificar a produção de biosurfactantes por 16 isolados de solo contaminado com petróleo. Os métodos do colapso da gota, espalhamento do óleo e estalagmometria foram indicativos para a produção de biosurfactantes, correlacionando bem com os resultados de tensão superficial. Porém os resultados para o teste de hemólise em agar sangue não correlacionaram com os demais testes, não sendo indicado para este propósito. Embora a medida da tensão superficial seja uma boa medida de produção de biosurfactantes, estes resultados não correlacionam bem com a atividade emulsificante (PLAZA, 2006). Youssef e colaboradores (2004) compararam os métodos de atividade hemolítica, colapso da gota e espalhamento do óleo com a redução da tensão superficial para os biosurfactantes produzidos por 215 linhagens de microrganismos. Eles concluíram que a hemólise de sangue não é um método confiável para prever a produção de biosurfactante, pois apresentou muitos falsos positivos e falsos negativos, além de apresentar baixa correlação com a medida de tensão superficial. Também sugerem um protocolo de prospecção utilizando o teste de colapso da gota como um primeiro método para detectar a produção de biosurfactante, seguido do teste de espalhamento do óleo para determinar a concentração (YOUSSEF, 2004).

1.4.3. Potenciais aplicações de biosurfactantes

Os biosurfactantes podem ser utilizados em diversas atividades industriais, tais como: recuperação de óleo, perfuração para petróleo, lubrificantes, limpeza de tanques e dutos, remediação de poluentes, cosméticos, produtos farmacêuticos, processamento de alimentos, tratamento de metais, mineração, indústrias têxteis, de papel e de tintas (THAVASI, 2007; BANAT, 2000). Outras aplicações dos biosurfactantes na indústria de óleo são a redução da viscosidade de óleos pesados e a chamada MEOR (*micorbial enhanced oil recovery*), onde os microrganismos nos reservatórios são estimulados a produzir polímeros e surfactantes que diminuem a tensão superficial na interface óleo-rocha, auxiliando na extração do óleo (BANAT, 2000). Sobre as aplicações em saúde já foram relatados diversos biosurfactantes que apresentam atividade antimicrobiana, assim como alguns exibindo atividade anti-fúngica, anti-virais, anti-tumorais, inibidores de hemólise e da formação de coágulos (BANAT, 2000).

Uma aplicação potencial dos biosurfactantes é em limpeza de ambientes contaminados, onde surfactantes químicos muitas vezes são utilizados (BANAT, 1995) para dispersar, ou seja, tornar disponíveis um contaminante de característica apolar, que possui baixa solubilidade em água. Como já descrito no item 1.4.1, os surfactantes aumentam a superfície óleo-água, aceleram a degradação de vários óleos pelas bactérias, aumentando a biodegradação no solo e na água (BARKAY, 1999; ROSEMBERG, 2006).

Diferentes tipos de biosurfactantes são produzidos por microrganismos e alguns são dificilmente sintetizados por processos químicos (BANAT, 2000), sendo os processos biológicos de produção normalmente mais baratos. Existem diversas outras vantagens na utilização de biosurfactantes em substituição a surfactantes químicos. Os biosurfactantes são mais efetivos que os surfactantes comerciais em aumentar a biodisponibilidade dos compostos hidrofóbicos e geralmente menos estáveis, isto é, não persistem no ambiente (RON, 2002). Podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, e são ativos em diversas condições ambientais de pH, salinidade e temperatura (termofílicos e halofílicos) (ROSEMBERG, 2006). Os biosurfactantes normalmente são biodegradáveis, de baixa toxicidade, aceitáveis ecologicamente, e podem ser produzidos a partir de substratos baratos e renováveis (THAVASI, 2007). Para utilização em limpeza de ambientes os biosurfactantes são uma boa alternativa em relação aos surfactantes químicos porque são

menos perigosos para o ambiente e são compatíveis com eventuais enzimas utilizadas em biodetergentes (alguns detergentes químicos podem inativá-las) (ROSEMBERG, 2006).

Bioemulsificantes podem também ser usados nas formulações de herbicidas e pesticidas, pois quando os componentes ativos das fórmulas são hidrofóbicos, surfactantes são necessários para dispersá-los em ambientes aquosos. Além disso, podem ser usados como substitutos de solventes clorados na limpeza de equipamentos eletrônicos ou outros instrumentos delicados que podem ser danificados com o uso de detergentes comuns. Os bioemulsificantes de alto peso molecular são de especial interesse para indústrias alimentícias e de cosméticos. Estas moléculas são capazes de formar emulsões muito estáveis e se aderem fortemente às moléculas hidrofóbicas mesmo na escassez ou ausência de água (ROSEMBERG, 2006).

O custo de produção de biosurfactantes para estes usos industriais ainda é alto, e ainda há poucas experiências de aplicações, porém existe uma tendência de que cada vez mais os surfactantes biológicos, principalmente produzidos por microrganismos, substituam os surfactantes químicos em diversas aplicações (ROSEMBERG, 2006).

1.5. A indústria de rerrefino de óleo lubrificante

A indústria de rerrefino de óleo lubrificante é um setor importante já que a legislação atual (CONAMA nº 362/2005) regulamenta que todo o óleo mineral usado ou contaminado deve ser coletado e destinado ao rerrefino, que é considerado o método mais seguro e a melhor alternativa de gestão ambiental deste resíduo.

O óleo lubrificante mineral representa cerca de 2% dos derivados do petróleo e é um dos poucos produtos oriundos desta mesma fonte que não é totalmente consumido durante seu uso. Os óleos lubrificantes são essenciais para uma gama de atividades industriais, destacando-se a operação de maquinário dos diversos segmentos, como por exemplo as operações de corte, estampagem, fabricação de borrachas, metalurgia, sistemas hidráulicos, turbinas, além do intenso uso em motores de automóveis, ônibus e caminhões. O uso automotivo representa 60% do consumo nacional principalmente em motores a diesel (IBAMA, 2008).

O óleo lubrificante usado ou contaminado (“Oluc”) ou óleo queimado é um óleo lubrificante, que, em função do seu uso normal, ou por motivo de contaminação, tenha se

tornado inadequado à sua finalidade original. O Oluc pode se constituir, na maioria das vezes, de uma mistura de óleos acabados usados, e é considerado um resíduo perigoso pela classificação da ABNT na norma NBR-10004/2004 por apresentar em sua composição ácidos orgânicos, cetonas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), dioxinas, além de metais pesados (provenientes de desgaste de motores e máquinas) como cádmio, níquel, chumbo, mercúrio, cromo e cobre. Também estão presentes no óleo usado os diversos aditivos que foram adicionados aos óleos básicos e outros contaminantes como poeira ou combustível não queimado. Alguns destes compostos são considerados potencialmente carcinogênicos, portanto a poluição por Oluc pode ser altamente danosa para o ambiente. O descarte de 1 tonelada por dia de óleo usado para o solo ou cursos d'água equivale ao esgoto doméstico de 40 mil habitantes (IBAMA, 2008). A queima como combustível em processos térmicos diversos como fornos de olaria e caldeiras, sem o tratamento prévio de desmetalização, gera emissões de óxidos metálicos, dioxinas, óxidos de enxofre, organoclorados e partículas sólidas. O artigo 13 da Resolução Conama 362/2005 proíbe estes destinos que são prejudiciais ao ambiente. Outros destinos ilegais para o Oluc são uso para lubrificação de correntes de motoserras, pintura de mourões e uso no combate a berne em animais no campo.

A legislação ambiental vigente proíbe o descarte de Oluc diretamente nos compartimentos ambientais e a incineração deste resíduo por processos térmicos diversos, podendo causar multa de mil a cinquenta milhões de reais, ou multa diária. A mesma legislação determina a reciclagem como destinação correta para este resíduo. Assim, por meio do processo de rerrefino (artigo 3º da Resolução do CONAMA nº 362/2005), o Oluc representa um recurso mineral bastante valioso, pois possibilita a geração de importante parcela de óleos básicos, destinados à formulação de lubrificantes acabados. Ao óleo mineral básico são adicionados os aditivos caracterizando os diversos produtos de diferentes marcas existentes no mercado e estes são comercializados novamente.

O processo de rerrefino para formar um óleo mineral básico é composto de basicamente três etapas: a primeira é uma destilação, para resgatar somente a fração ainda útil do óleo. A segunda é uma filtração em filtros de argila, que retira impurezas. E a terceira é uma reação química de clarificação. A retirada dos contaminantes como limalhas, aditivos, borras, combustíveis não-queimados pelo processo clássico gera certas

quantidades de borra ácida. Esta deve passar por um processo de neutralização e posteriormente encaminhada para co-processamento na indústria cimenteira. Os processos mais modernos utilizam evaporadores especiais e geram sub-produtos que são usados como impermeabilizantes, revestimentos plásticos e asfálticos. O rerrefino envolve a remoção dos contaminantes que então passam a integrar os resíduos sólidos ou líquidos do processo. A água removida do processo deve passar por tratamento complexo, em função de contaminação com fenol e hidrocarbonetos leves (IBAMA, 2008).

O Brasil já contou com cerca de 50 pequenas usinas de rerrefino de óleo usado, porém, desde 1987, além da queda do imposto único sobre os óleos básicos, a fiscalização dos problemas ambientais destas empresas também aumentou (IBAMA, 2008). Atualmente, existem 11 indústrias de rerrefino no Brasil associadas ao SINDIRREFINO (SINDIRREFINO, 2010) sendo a Indústria Petroquímica do Sul (IPS) a maior do sul do Brasil e a segunda maior do país. No processo de produção desta indústria, do total de óleo usado coletado, aproximadamente 60% se torna óleo básico e 30% permanece como resíduo. Os resíduos gerados são sólidos e líquidos. Da primeira etapa é formada uma borra ácida, classificada como resíduo de classe I (perigoso). Esta necessita ser neutralizada para poder ser transportada (normalmente para o Estado do Paraná, pois no estado do Rio Grande do Sul o órgão ambiental – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler - FEPAM – não permite este tipo de destinação) para co-processamento. A neutralização é realizada adicionando água e cal, portanto também é gerada grande quantidade de efluente líquido, que também é ácido e deve ser neutralizado para poder ser transportado para uma estação de tratamento terceirizada. Além destes dois resíduos ainda resta a chamada “torta dos filtros”, que é uma mistura de argila com contaminantes e impurezas do óleo. A IPS que coleta aproximadamente 2,1 milhões de litros de óleo usado por mês, produz aproximadamente 630 mil litros de resíduo por mês, que necessitam ser destinados corretamente. Isto representa um alto custo para a empresa já que todo o tratamento é terceirizado e envolve o transporte, no caso dos sólidos, interestadual. Isto pode ainda representar riscos de acidentes nos transportes, e a destinação dos resíduos sólidos ainda é controversa já que o co-processamento envolve incineração, o que gera vapores de difícil tratamento.

Neste trabalho foi utilizado o efluente da IPS para testar a capacidade dos microrganismos de degradarem os hidrocarbonetos ali presentes. Com este estudo, espera-se contribuir no futuro para a construção de uma estação de tratamento de efluentes própria para a indústria, que pode conter microrganismos selecionados para este fim. Além disso, os microrganismos selecionados poderão ser testados e posteriormente utilizados para a descontaminação de outras amostras contendo hidrocarbonetos.

1.6. Contaminações ambientais por vazamentos em postos de combustíveis

Os postos de combustíveis, principalmente aqueles em situações irregulares, são potenciais poluidores de solo e águas subterrâneas. No estado de São Paulo, o número de áreas contaminadas vem aumentando sensivelmente desde 2002. Em novembro de 2008 eram 2.514 áreas contaminadas cadastradas pela CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), sendo que 78% destas áreas estavam contaminadas devido a vazamentos em postos de combustíveis e somente 13% eram contaminações originadas de atividades industriais (ALLEBRANDT, 2009).

A Resolução do CONAMA nº 273/2000 regulamenta as instalações e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo, como os postos de combustíveis, estabelecendo que devem seguir processo de licenciamento prévio do órgão ambiental competente e que as instalações devem seguir as normas técnicas expedidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (CONAMA, 2000). Os vazamentos de combustíveis derivados de petróleo podem ocorrer devido a instalações inadequadas ou processos de corrosão dos tanques e também no processo de abastecimento. Grande parte dos postos possui mais de dez anos de atividades, portanto o cuidado e o monitoramento dessas áreas devem ser constantes, uma vez que este é o tempo mínimo que os tanques costumam permanecer sem apresentar problemas (ALLEBRANDT, 2009).

Dados da ANP de 2005 indicam que neste ano existiam 55.917 postos de combustíveis no Brasil, sendo 12.163 na região sul. Neste ano muitos postos ainda se encontravam em situação irregular, pois as exigências estavam começando a ser cobradas após a elaboração da Resolução CONAMA 273 no ano 2000 (ALLEBRANDT, 2009). Em 2010, o boletim nº 25 da ANP informa que existem 37.627 postos de distribuição de combustíveis no Brasil, sendo 8.002 na região sul (ANP, 2010). Foi vista, portanto, uma

redução no número de estabelecimentos, resultante da inadequação dos locais às legislações vigentes. Dos estabelecimentos que foram fechados restaram as áreas contaminadas a serem monitoradas e remediadas, além dos diversos estabelecimentos que continuam operando com o compromisso de tratamento dos seus passivos ambientais, ou seja, de remediar o solo ou o lençol freático que foi contaminado pelas atividades daquele posto.

Considerando o grande número de áreas contaminadas e a demanda existente por novas tecnologias de remediação, que possam ser realizadas *in situ* e sem o comprometimento das atividades dos postos de combustíveis, este trabalho busca contribuir avaliando a atuação dos microrganismos selecionados também na biorremediação de água subterrânea contaminada por vazamento de combustíveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Selecionar microrganismos que tenham a capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo para o desenvolvimento de um produto para biorremediação do ambiente contaminado por estas fontes.

2.2. Objetivos Específicos

- Seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes
- Seleção de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos
- Formulação de um consórcio de microrganismos para atuar em efluente de indústria petroquímica ou outra água contaminada por derivados de petróleo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Alguns microrganismos utilizados são provenientes do banco de linhagens da Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda., considerando a literatura existente que relata os gêneros e espécies que são eficientes na degradação de hidrocarbonetos. Foram acrescentados 5 microrganismos provenientes do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM) da UNICAMP que foram isolados de solo contaminado com óleo diesel. Além destes, alguns microrganismos foram isolados do próprio resíduo a ser testado (o efluente líquido da IPS - Indústria Petroquímica do Sul) e outros de areia ou invertebrados marinhos de praia com histórico de contaminação por petróleo.

3.1. Isolamento de microrganismos existentes no efluente de indústria de rerrefino de óleo lubrificante

Cada lote de efluente coletado a partir do tanque de estoque do efluente líquido foi analisado quanto à carga microbiana já existente nas amostras. Foram realizados plaqueamentos em ágar nutritivo e isoladas as colônias de morfologias diferentes.

3.2. Isolamento de microrganismos provenientes do trato intestinal de invertebrados marinhos e de areia provenientes de praia com histórico de contaminação por petróleo

Os invertebrados das espécies *Emerita brasiliensis* (tatuíra), *Mesodesma mactroides* (mexilhão branco) e *Donax* sp. (moçambique) foram dissecados e seus tratos gástricos foram inoculados em efluente líquido da indústria de rerrefino (segundo lote coletado) e foram cultivados a 30 °C e 180 rpm. Areia da praia também foi inoculada no efluente (4 g em 40 mL) e cultivada da mesma forma. Foram realizados enriquecimentos (inóculos e diluições sucessivas) com intervalos de 3 a 4 dias por no mínimo 3 vezes. Após foram realizados plaqueamentos e isoladas as colônias com morfologias diferentes.

3.3. Identificação dos microrganismos

Testes Bioquímicos foram realizados utilizando os kits de identificação Bactray (Laborclin) e BD BBL CRYSTAL (Becton, Dickinson and Company).

A identificação foi confirmada pelo sequenciamento de fragmento do gene 16S rDNA. Para a extração de DNA, o isolado foi inoculado em 5 mL de caldo LB (Luria-Bertani – 10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; pH=7,4) em tubos de vidro, que foram deixados durante a noite em agitador orbital a 30 °C e 180 rpm. 1,5 mL do cultivo foi centrifugado à 5000 rpm por 1 minuto e após as células foram ressuspendidas em 500 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH=7,6 / 1 mM EDTA pH=8). Para a lise celular foi adicionado 15 µL de SDS (10%) e 1,5 µL de proteinase K (20 M) e incubado a 37 °C por 1 h. Após foi adicionado 100 µL de NaCl (5 M) e 80 µL de CTAB (1%) e incubado a 65 °C por 10 min. Para a extração do DNA adicionou-se 1 volume de solução fenol:clorofórmio (1:1) homogeneizando-se gentilmente a solução. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 13000 rpm, o sobrenadante transferido para outro tubo onde repetiu-se a extração com fenol:clorofórmio. A terceira extração foi realizada somente com clorofórmio e ao sobrenadante foi adicionado 1 volume de isopropanol gelado ficando armazenado durante a noite a -20 °C. A amostra foi centrifugada por 5 min a 13000 rpm e lavada (centrifugando e descartando sobrenadante) duas vezes com 500 µL etanol 70% gelado. O precipitado nos tubos foi deixado secar à temperatura ambiente (ou na estufa a 37 °C) e após ressuspendido em 15 µL de água. Foi adicionado 1 µL de RNase (10 mg/mL) e incubado por 1 h a 37 °C. 1,5 µL do DNA foi checado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

A reação de PCR (reação da polimerase em cadeia) foi realizada com a GoTaq™ polimerase (Promega). A reação de volume total de 25 µL continha solução tampão e MgCl₂ nas quantidades recomendadas pelo fabricante, 5 mM de DNTPs, 10 pmol de cada *primer* e 5 U/µL de enzima. Os *primers* utilizados foram: 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') e 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Direito, 2005; Bento, 2005b). O programa da reação em cadeia foi: 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C e 1 min 30 s a 72 °C; e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose

1,2% corado com brometo de etídeo. Foi utilizado um marcador de peso molecular (λ Hind ou λ 100) para verificar o tamanho do fragmento (1465 pb).

Os produtos foram purificados adicionando-se 1 μ g de t-RNA (Invitrogen) a cada 20 μ L de produto e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e armazenando-se overnight a -20 °C. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 min e o precipitado foi lavado com 100 μ L de etanol 70% a após centrifugado por 3 min a 14000 rpm. O precipitado foi deixado secar a temperatura ambiente e após foi ressuscitado em 20 μ L de água (miliQ).

O sequenciamento dos fragmentos foi realizado utilizando-se os dois *primers* citados, em triplicata para cada *primer* em sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham). As seqüências foram analisadas no programa STADEN package e as identificações foram realizadas utilizando o banco de dados e o programa BLAST do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para todos os isolados, tanto as seqüências geradas pelo primer 27F quanto as geradas pelo primer 1492R concordaram pelo menos quanto ao gênero identificado, a maioria concordando quanto à espécie do microrganismo.

3.4. Seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes

Os microrganismos foram cultivados em caldo nutriente (5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de carne) e foi avaliada a produção de biosurfactantes com 3 diferentes métodos: Método da microplaca de *screening* rápido (CHEN, 2007), formação de emulsão água em óleo através do teste da altura da emulsão (BARATHI e VASUDEVAN, 2001) e formação de emulsão do tipo óleo em água, através da leitura da densidade ótica da amostra a 610 nm (THAVASI, 2007).

3.4.1. Ensaio em Microplaca

O teste de *screening* rápido em microplaca (CHEN, 2007) é um método pouco preciso, mas rápido e de fácil preparação, para avaliar a mudança na tensão superficial do meio de cultura no qual o microrganismo foi cultivado. 100 μ L do sobrenadante são adicionados a 100 μ L de água em cada poço da microplaca e através dela é visualizado um fundo quadriculado. Conforme a amostra modifica a tensão superficial da água, são formadas diferentes lentes em cada poço (côncavas ou convexas) e a figura abaixo da placa aparece maior ou menor. Quando a lente se torna mais convexa do que o controle, a figura

se torna menor, indicando a produção de biosurfactante por aquele microrganismo. Foram realizadas pelo menos 4 repetições do ensaio com culturas independentes. O cultivo foi realizado em tubos de ensaio com 5 mL de caldo nutriente e o inóculo foi realizado por alçada.

3.4.2. Ensaio em proveta: Emulsão água em óleo e emulsão óleo em água

Foi preparada uma cultura pré-inóculo em tubo de ensaio, utilizada para inocular dois Erlenmeyers com 50 mL de caldo nutriente de modo que a concentração de células atingisse uma absorbância de 0,05 a 600 nm. Após 24 h de crescimento o conteúdo dos dois Erlenmeyers foi centrifugado em tubos GSA por 10 min a 10000 rpm. Com o sobrenadante foi montado o ensaio em triplicata para cada microrganismo. Foram utilizadas provetas de 100 mL onde são colocados 25 mL do sobrenadante da cultura e 5 mL de óleo lubrificante comercial (Lubrax MG 1, BR-Petrobras). A mistura é agitada em vortex por 2 min e após deixada repousar por 24 h. A leitura é feita em mL de emulsão no tempo de 24 h e 48 h para verificar se a emulsão formada é estável. Com a medida observada em 48 h é calculada a porcentagem de emulsão formada.

A emulsão óleo em água medida pelo valor de absorbância a 610 nm é proporcional à quantidade de óleo emulsionado no sobrenadante da cultura, que é coletado logo abaixo da emulsão água em óleo.

3.5. Seleção de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos contidos em petróleo ou derivados

3.5.1. Crescimento em efluente de indústria petroquímica

Os microrganismos que apresentaram resultados positivos para produção de biosurfactante foram cultivados em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de efluente líquido da indústria de refinamento em agitador orbital a 180 rpm e 30 °C.

O inóculo em efluente foi realizado da seguinte maneira: os microrganismos foram inoculados em 5 mL de caldo nutritivo em tubos de ensaio e cultivados por 24 h, 180 rpm a 30 °C. Foi retirado 1 mL do caldo e centrifugado em microcentrífuga a 10000 rpm para precipitar as células. As células foram lavadas com solução salina, centrifugadas

novamente e após ressuspensas em solução salina. Este procedimento foi realizado para retirar quaisquer resíduos do meio de cultura rico em nutrientes em que as células se encontravam. Foi feita a leitura da absorbância desta solução salina a 600 nm em espectrofotômetro e foi calculado um inóculo em μL de forma que o cultivo no efluente iniciasse com 10^4 UFC/mL, a partir de curvas de crescimento relacionando UFC/mL e absorbância a 600 nm previamente preparadas.

O crescimento da população microbiana foi monitorado por plaqueamentos em gota durante 6-13 dias, até que a curva de crescimento estabilizasse.

O efluente do 1º lote foi utilizado puro e foi autoclavado, pois apresentava uma carga microbiana que interferia nas contagens dos microrganismos testados isoladamente. O efluente do 3º lote foi diluído a 10% (em solução salina estéril) e não foi esterilizado.

Os microrganismos que foram capazes de se multiplicar neste meio foram testados em triplicata e as amostras foram congeladas para posterior análise cromatográfica.

3.5.2. Crescimento em meio mineral com 1% de óleo diesel

Os dez isolados que foram capazes de se multiplicar no efluente foram inoculados em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio mineral (Tris(hidroximetil)aminometano 12 g/L; NaCl 23 g/L; KCl 0,75 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,47 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,16 g/L; NH_4Cl 3,74 g/L; solução de FeSO_4 (1 g/L) 2 mL/L; solução de NaH_2PO_4 (0,1 M) 4 mL/L; ajustando o pH com HCl 2 M para 7,3) (DIAS, 2007) e 0,5 mL de óleo diesel comercial.

O inóculo neste meio de cultivo foi realizado da mesma forma que no efluente, como descrito no item 3.4.1. Como controle negativo, para cada isolado microbiano foi inoculado um frasco com meio mineral sem óleo diesel, com o objetivo de verificar se o microrganismo consome mesmo o óleo como fonte de carbono.

Os frascos foram colocados em agitador orbital a 30 °C e 180 rpm, e foram retiradas alíquotas de 1mL nos dias 0, 1, 2, 3 e 6 para plaqueamentos pelo método de gota.

3.6. Análise da degradação de hidrocarbonetos lineares presentes no efluente líquido

A degradação dos hidrocarbonetos lineares presentes no efluente líquido foi verificada por quantificação dos TPHs (C-9 a C-24) nas amostras tratadas e não tratadas com microrganismos, ensaios realizados no Laboratório de Química Analítica e Ambiental

da UFRGS. A metodologia utilizada segue o procedimento desenvolvido por Jaffé et al. (1995) sendo que foi utilizada apenas a fração F1 que contém os compostos de interesse. Resumidamente, 10 mL do efluente foram extraídos três vezes com 30 mL de hexano em balão de separação. As amostras foram concentradas em rota-evaporador e evaporadas completamente a temperatura ambiente. O frasco foi lavado com hexano e a amostra foi separada em coluna de sílica onde foi eluída com 30 mL de hexano. A amostra foi concentrada novamente em rota-evaporador. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas (Agilent 6890 e 5973) equipado com coluna cromatografica DB5-MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m). A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, mantidos por 1 min, seguido de aquecimento até 290 °C onde permaneceu por 15 minutos. A temperatura do injetor foi de 290 °C. No extrato final (1 mL) adicionou-se 100 μ L de padrão de C-20 deuterado na concentração de 103,2 ppm para a quantificação por padronização interna, sendo que o volume de amostra injetado foi de 1 μ L, com o injetor operando no modo *splitless*. O gás de arraste utilizado foi hélio de alta pureza com fluxo de 1 ml min⁻¹.

Os efluentes dos lotes 1 e 3 foram analisados nos laboratórios Pró-ambiente e Bioensaios, respectivamente. Na Pró-ambiente análises químicas e toxicológicas, os componentes da fase oleosa foram extraídos conforme a norma 5520 do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) (2005) e detectados por cromatografia gasosa com detector de chama ionizável (GC-FID). Os componentes metálicos foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica. Na Bioensaios, os hidrocarbonetos totais de petróleo foram analisados pelo método EPA 8015B e os metais pelas normas 3120 B, 3112 B e 4500 do SMEWW. Os HPAs foram pesquisados conforme o método EPA 8270C e os VOCs conforme EPA 8260B.

No laboratório ALAC foram quantificados os TPH-GRO (*gasoline organics range*: C-5 a C-10) dos experimentos com o consórcio e foi utilizado o método EPA 8015B.

3.7. Cultivo microbiano em meio padrão

Os microrganismos que apresentaram melhores resultados em degradar os hidrocarbonetos presentes no efluente líquido foram inoculados em um meio de cultura

padrão para avaliar a eficiência de crescimento populacional e a produção de biomassa, visando a produção em larga escala para comercialização. O meio utilizado foi composto de: Triptona (10g/L), Extrato de levedura (5g/L), NaCl (10g/L) e Glicose (0,5g/L) sendo o pH acertado para 7,4.

Os microrganismos foram inoculados em Erlenmeyers de 125 mL, com chicanas para aumentar a difusão de oxigênio, com 25 mL de meio de cultura, calculando-se para que no tempo zero a concentração de células fosse 10^4 UFC/mL, o que foi determinado por experimentos prévios relacionando absorvância e UFC/mL de cada isolado. A densidade populacional foi monitorada através da medida da densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro e por plaqueamentos em gota nas horas 0, 3, 6, 9 e 24.

3.8. Consórcio dos microrganismos selecionados

Os microrganismos BH, CL e EC01 foram selecionados para compor um consórcio para degradar hidrocarbonetos presentes no efluente da IPS e também em água subterrânea contaminada por vazamento em um posto de combustível de Porto Alegre. O pré-inóculo foi cultivado em tubos de ensaio com 5 mL de caldo LB a 30 °C, 180 rpm. As células foram lavadas e ressuspendidas com solução salina e foi lida a absorvância a 600 nm para calcular a quantidade de inóculo necessária para que cada Erlenmeyer contivesse 1.10^4 UFC/mL de cada microrganismo. O efluente foi diluído a 10% com solução salina 0,9% estéril e a água subterrânea foi utilizada pura. Os ensaios foram realizados em triplicata em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de volume de cultivo, que ficaram sob agitação de 180 rpm a 30 °C por 72 h. Para cada tipo de efluente foram feitos dois controles sem inóculo de microrganismo sendo um deles sem agitação e temperatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de microrganismos

Foram testados 13 microrganismos provenientes da coleção da Empresa Bioplus e 5 da coleção do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM) da UNICAMP (Tabela 1). Os microrganismos da Bioplus, em sua maioria, compõem ou já compuseram formulações de produtos biorremediadores de efluentes de diversos tipos. Os microrganismos do LSFM foram isolados de solos contaminados com petróleo ou óleo diesel e demonstraram capacidade de degradação de diversos hidrocarbonetos padrão lineares e aromáticos (DIAS, 2007).

Dezoito microrganismos foram isolados de 3 lotes coletados do efluente da IPS, enquanto 7 foram provenientes do enriquecimento realizado com areia ou vísceras de invertebrados marinhos de local com histórico de contaminação por petróleo (Tabela 1).

Na tabela 1 estão listados os 43 microrganismos utilizados neste estudo, juntamente com algumas características como morfologia celular, coloração de gram e se produzem esporos ou não.

A grande maioria dos isolados eram gram positivos, porém os que apresentaram maior potencial para utilização em degradação de hidrocarbonetos foram gram negativos.

Tabela 1. Microrganismos utilizados neste estudo

Proveniência	Código	Colônia	Espécie	Morfologia celular	Gram	Esporo
Coleção Bioplus	BAr	branca, redonda, bordo regular	<i>B. acidocaldarius</i>	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	BAi	creme, bordo irregular	NI	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	BC	creme, bordo irregular	<i>B. circulans</i>	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	BG	creme, bordo irregular	<i>B. coagulans</i>	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	BH	creme, bordo irregular	<i>B. sphaericus</i>	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	BL	creme, bordo irregular	<i>B. licheniformis</i>	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	BM	creme, bordo irregular	<i>B. macerans</i>	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	BP	creme, bordo irregular	<i>B. polymyxa</i>	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	BS	creme, bordo irregular	<i>B. subtilis</i>	bastonete	+	sim
Coleção Bioplus	PF	esverdeada, bordo regular	<i>P. fluorescens</i>	bastonete	-	não
Coleção Bioplus	PS	esverdeada, bordo regular	(*) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	bastonete	-	não
Coleção Bioplus	CL	branca, redonda, aspecto seco e com lamelas	<i>Yarrowia lipolytica</i> CCT 5443	levedura	na	não
Coleção Bioplus	YL	creme, mucóide	<i>Yarrowia lipolytica</i> (Bioplus)	levedura	na	não
LSFM-UNICAMP	01	creme, rugosa	NI	bastonete	+	sim
LSFM-UNICAMP	09	creme, rugosa	NI	bastonete	+	sim
LSFM-UNICAMP	22	*rosa/violeta, mucóide	NI	bastonete	-	não
LSFM-UNICAMP	23	creme amarelada, mucóide	NI	bastonete	-	não
LSFM-UNICAMP	36	branca, mucóide	NI	bastonete	+	sim
Efluente IPS	03	branca, bordo irregular, aspecto "aerado"	NI	bastonete	+	sim
Efluente IPS	04	creme, translúcida	NI	bastonete	+	sim
Efluente IPS	07	creme	NI	bastonete	+	sim
Efluente IPS	11	branca, rugosa, bordo irregular	NI	bastonete	+	sim
Efluente IPS	8a	creme, redonda	NI	bastonete	+	sim
Efluente IPS	8b	creme, translúcida	NI	bastonete	+	não
Efluente IPS	9c	creme, bordo irregular	NI	bastonete	+	sim
Efluente IPS	9d	translúcida-creme, bordo irregular	NI	bastonete	+	não
Efluente IPS	15	creme, redonda	NI	bastonete	+	sim
Efluente IPS	EC01	branca, pequena, redonda, bordo regular	(*) <i>Brevundimonas diminuta</i>	bastonete	-	não
Efluente IPS	EC02	creme, translúcida, grande, bordo regular	(*) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	bastonete	-	não
Efluente IPS	ET1a	branca, mucóide, brilhosa	NI	bastonete	+	não
Efluente IPS	ET1b	branca, mucóide, rugosa	NI	bastonete	+	não
Efluente IPS	ET1c	amarela, seca, brilhosa	NI	bastonete	+	não
Efluente IPS	ET1d	creme, esverdeada, mucóide, opaca	NI	bastonete	+	não
Efluente IPS	ET2	creme, mucóide, pequena	(*) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	bastonete	-	não
Efluente IPS	9dp	esverdeada, bordo regular	NI	bastonete	-	não
Efluente IPS	9dg	esverdeada, bordo regular	NI	bastonete	-	não
Invertebrados/areia	E2	pequenas e brancas/translúcidas	(*) <i>Delftia</i> sp.	bastonete	+	não
Invertebrados/areia	T2	amarela escura	NI	bastonete	+	não
Invertebrados/areia	T3	amarela escura	NI	cocobacilo	+	não
Invertebrados/areia	AmCB	amarelada clara	(*) <i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	coco	+	não
Invertebrados/areia	AmCE	amarelada/esverdeada	NI	bastonete	+	não
Invertebrados/areia	E3b	branca	NI	cocobacilo	-	não
Invertebrados/areia	CG	branca	NI	bastonete	+	sim

NI= não identificada; (*)= identificadas neste trabalho por testes bioquímicos e sequenciamento do gene 16S rDNA; na= não se aplica

4.2. Seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes

4.2.1. Teste da Microplaca – redução da tensão superficial

O teste da microplaca foi utilizado para estimar a redução da tensão superficial causada pela produção de biosurfactantes pelos microrganismos. O isolado que produzia surfactantes no meio de cultura (BM- *Bacillus macerans*, Figura 1) produzia um sobrenadante que, quando adicionado ao poço com água, formava uma lente côncava, modificando a figura abaixo da placa.

Na Figura 1 estão representados os resultados de nove microrganismos, sendo sinalizados com “+” aqueles que apresentaram redução na tensão superficial.

Na tabela 2 estão os resultados para todos os microrganismos testados em pelo menos 4 repetições. O isolado que apresentou a maior modificação da tensão superficial foi o BM. Outros 7 isolados, BAr, 01, 09, BL, 07, 11 e ET1B, apresentaram um nível intermediário de redução da tensão superficial.

Para uma melhor confiança nos resultados de redução da tensão superficial, é adequado realizar o ensaio de medida da tensão superficial utilizando um tensiômetro. Porém, esta redução da tensão superficial visualizada na microplaca é dependente da concentração e da eficiência do surfactante (CHEN, 2007). Portanto os microrganismos que tiveram resultados positivos para este teste se destacam na produção de moléculas que reduzem a tensão superficial.

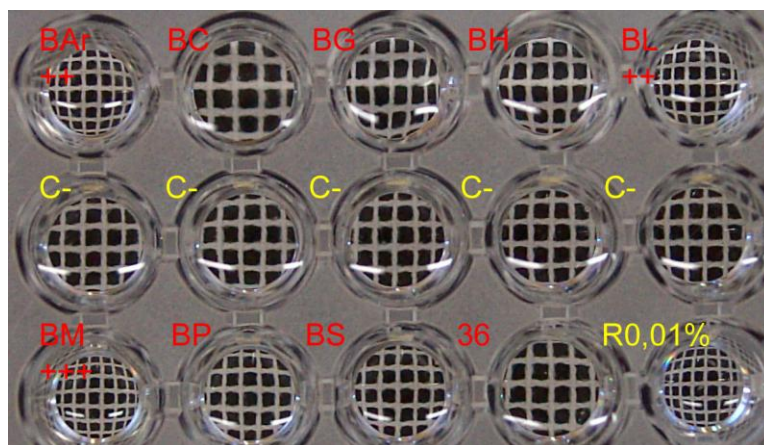


Figura 1. Redução da tensão superficial pelo teste da microplaca para 9 isolados microbianos. C- é o controle negativo (meio de cultura estéril) e R0,01% é o renex (surfactante comercial) na concentração de 0,01%, usado como controle positivo do experimento. A quantidade de sinais “+” indica maior diminuição da tensão superficial.

Tabela 2. Resultados do ensaio em microplaca para todos os microrganismos testados.

Amostra	Replicatas				Amostra	Replicatas			
Renex 0,01%	3	3	3	3	07	2	2	2	2
C- CN	0	0	0	0	11	1	2	0	2
BAr	2	2	2	2	8 ^a	0	0	0	0
BAi	0	0	0	0	8b	0	0	1	0
01	2	2	1	1	9c	0	0	0	0
09	1	1	1	1	9d	0	1	0	0
22	0	0	0	0	15	0	0	0	0
23	0	0	0	0	EC01	0	0	0	0
36	0	0	0	0	EC02	0	0	0	0
BH	0	0	0	0	ET1A	0	0	0	0
BM	3	3	3	3	ET1B	2	2	2	3
BC	0	0	0	0	ET1C	0	0	0	0
BG	0	1	0	0	ET1D	0	0	0	0
BL	1	2	2	2	ET2	1	1	0	0
BP	0	0	0	0	T2	0	0	0	0
BS	0	0	0	0	T3	0	0	0	0
PF	0	0	0	0	E2	0	0	0	0
PS	0	0	0	0	amCE	0	0	0	0
CL	0	0	0	0	amCB	0	0	0	0
YL	0	0	0	0	CG	0	0	0	0
C- CS	0	0	0	0	9p	0	0	0	0
03	1	0	0	0	9g	0	0	0	0
04	1	0	0	0	E3b	0	0	0	0

Foram realizadas pelo menos 4 repetições para os 43 isolados. 0 representa nenhuma mudança na tensão superficial comparado com o controle. Os números de 1 a 3 representam o grau de mudança na tensão superficial do líquido, sendo 3 o que mais diminui este parâmetro. C- CN é o controle negativo constituído de caldo nutriente; C- CS é constituído de caldo sabouraud.

4.2.2. Ensaio em proveta - Medida da emulsão água em óleo

A Figura 2 demonstra como é realizado o ensaio em proveta e os resultados para os isolados BG e 23, além de um controle negativo. O fato de o controle negativo (C-), composto somente por caldo nutriente estéril formar também uma pequena linha de emulsão se deve provavelmente ao fato de o óleo lubrificante comercial conter aditivos que possuem este propósito. Portanto foram considerados positivos os ensaios que apresentaram uma emulsão maior que a do controle negativo.

As Figuras 3, 4 e 5 apresentam os resultados para todos os microrganismos testados. O teste estatístico utilizado para diferenciar os diversos grupos do grupo controle foi um método não paramétrico, pois as variâncias entre os grupos eram heterogêneas e mesmo transformando-se os dados não se conseguiu homocedasticidade. O teste utilizado foi o de

Kruskal-Wallis, que é uma ANOVA não-paramétrica para um critério de classificação (CALLEGARI-JAQUES, 2006). A hipótese nula foi rejeitada, indicando que há diferença entre os grupos. Então foi realizado o teste de Dunn, um teste de comparação múltipla, somente entre cada grupo e o controle.

O microrganismo que apresentou maior formação de emulsão água em óleo foi o BG (*Bacillus coagulans*), sendo capaz de emulsionar 26,67% do volume total. Seguido deste, diversos microrganismos apresentaram capacidade de formar este tipo de emulsão. Além de BG, os isolados BC, 9c, ET1D, 15, EC01, CG, 23, T2, CE e CL foram os que apresentaram uma emulsão maior do que 20% de todo o líquido na proveta.

Dos oito microrganismos que apresentaram redução na tensão superficial pelo teste da microplaca, 5 deles (BAr, ET1b, 01, 09 e 11) apresentaram atividade de emulsificação água em óleo, ainda assim em valores menores do que 20% de emulsão. Isto se deve ao fato de que as moléculas responsáveis por emulsificar a água na fase oleosa não necessariamente possuem a atividade de reduzir a tensão superficial (KARANT, 1999).

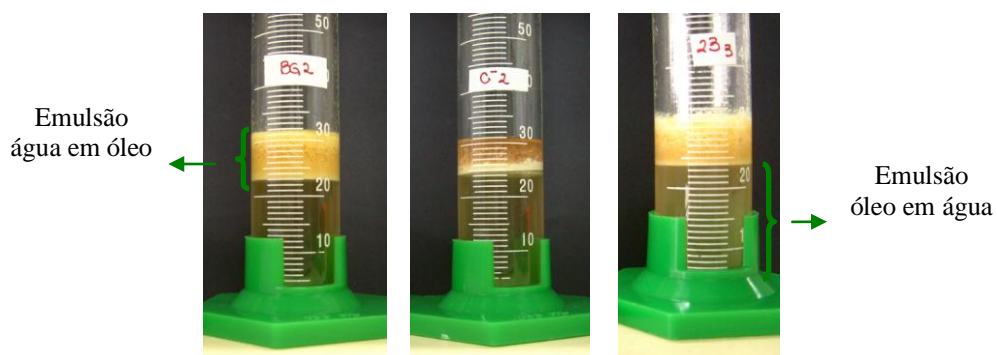


Figura 2. Ensaio em proveta onde foi medida a emulsão água em óleo em mL e a emulsão óleo em água por Absorbância a 610 nm em espectrofotômetro. BG – *Bacillus coagulans*; C – Controle negativo (caldo estéril); 23 – isolado não identificado.

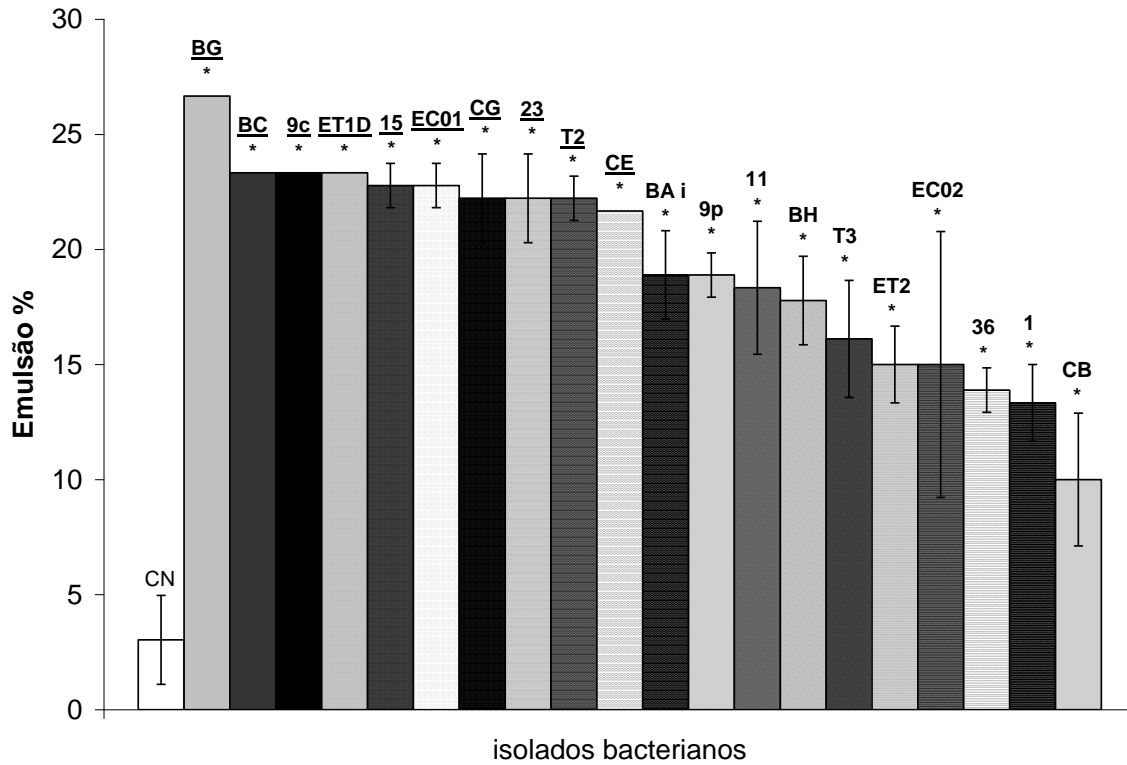


Figura 3. Atividade emulsionante (emulsão água em óleo) de 20 dos 43 microrganismos testados. Barras representam desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,05$) e comparações múltiplas. CN é o controle negativo (caldo nutritivo estéril). Sublinhados estão os isolados que apresentaram emulsão maior que 20%.

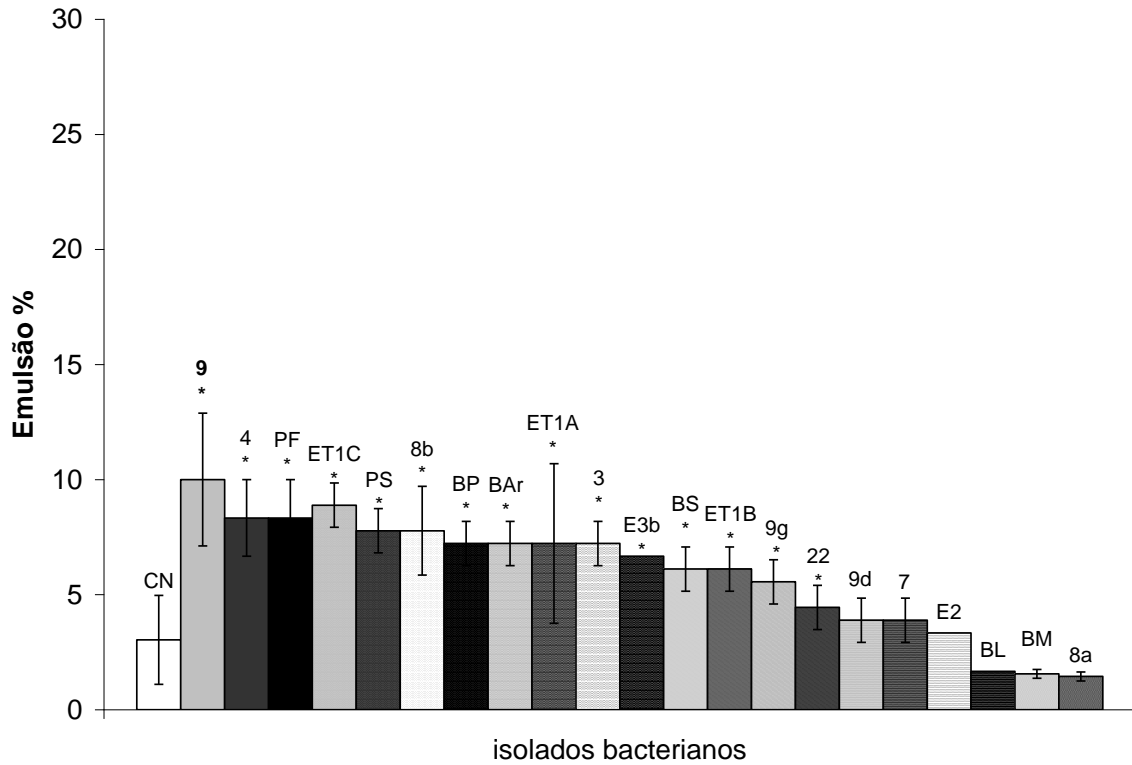


Figura 4. Atividade emulsionante (emulsão água em óleo) de 21 dos 43 microrganismos testados. Barras representam desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,05$) e comparações múltiplas. CN é o controle negativo (caldo nutritivo estéril).

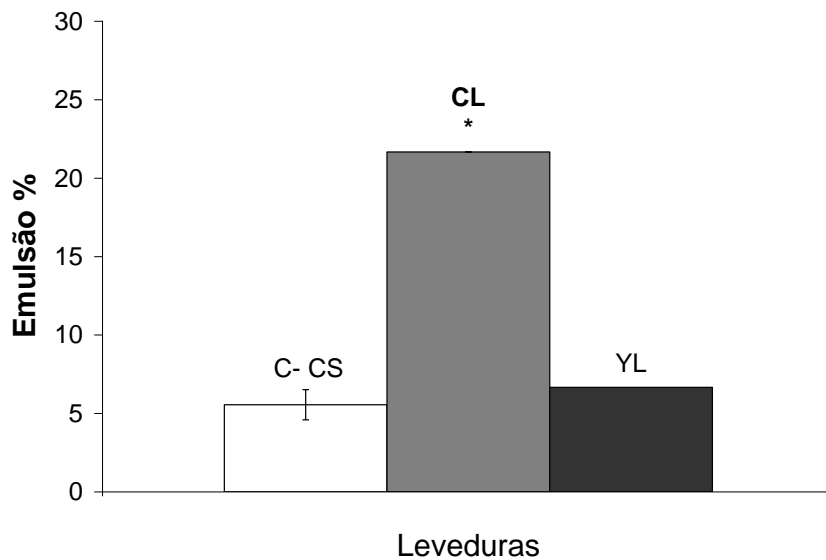


Figura 5. Atividade emulsionante (emulsão água em óleo) de 2 dos 43 microrganismos testados. Barras representam desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,05$) e comparações múltiplas. C- CS é o controle negativo (caldo sabouraud estéril) e CL e YL os isolados de levedura testados. A levedura "CL" apresentou emulsão estatisticamente diferente do controle.

4.2.3. Ensaio em proveta – Medida da emulsão óleo em água

Estes dados também foram gerados a partir do teste de emulsão na proveta (Figura 2). Foi retirada uma amostra da fase líquida (inferior) e esta foi analisada em espectrofotômetro a 610 nm. As Figuras 6, 7 e 8 apresentam os resultados para todos os microrganismos testados.

Quatorze linhagens apresentaram valor de absorbância maior que o controle: 8b, 23, BM, 9d, ET2, 01, 15, 09, PF, 9c, ET1B, BAr, T3, e ET1C. Com exceção de BM e 9d, todas apresentaram também atividade de emulsificação de água em óleo. Os isolados 23, 15 e 9c, além de apresentarem formação de emulsão óleo em água foram capazes de emulsionar mais do que 20% do líquido na proveta na forma de emulsão água em óleo.

Cinco isolados considerados bons na emulsificação de óleo em água também foram positivos para o teste de redução da tensão superficial em microplaca, são eles: BM, BAr, 01, 09 e ET1B. Os resultados para este tipo de emulsão (óleo em água) concordaram melhor com o teste da microplaca do que os resultados para emulsão água em óleo. A explicação para isto está no fato de que a emulsificação da água em óleo é realizada por moléculas de alto peso molecular, enquanto que, tanto a emulsificação óleo em água quanto a redução da tensão superficial é normalmente devida à ação de moléculas de baixo peso molecular.

Do total de 43 microrganismos testados, 40 apresentaram algum resultado positivo para produção de biosurfactante pelos ensaios realizados. Somente dois isolados (01 e 09) foram positivos para os 3 testes.

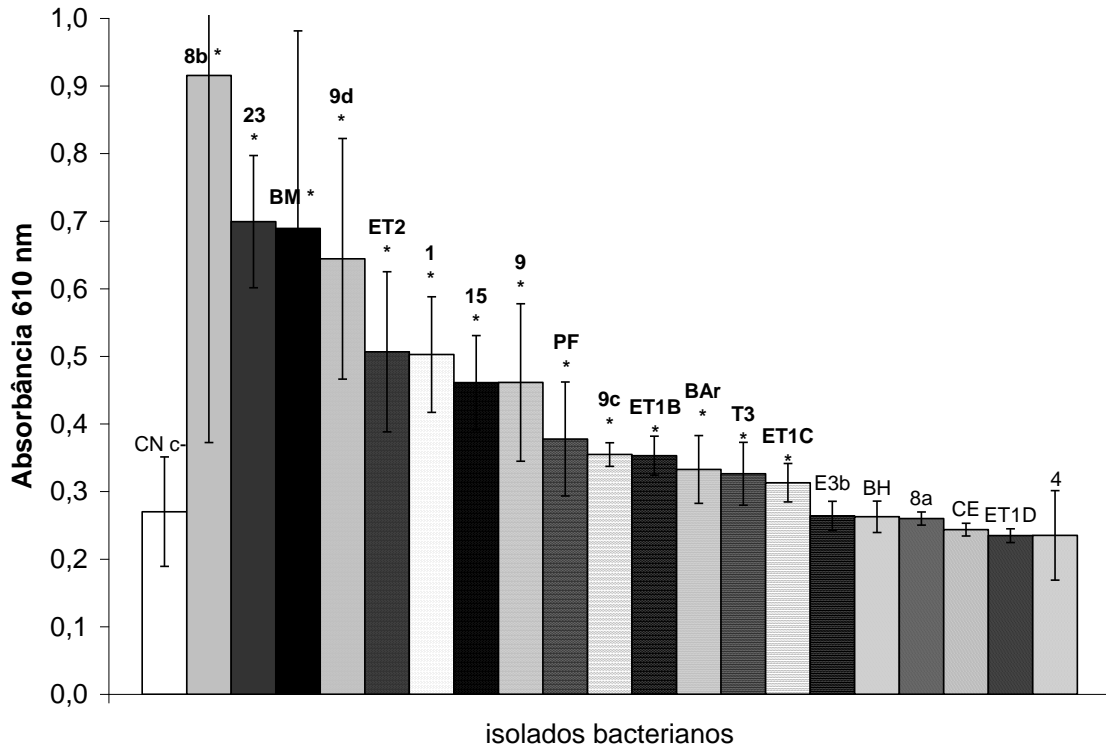


Figura 6. Atividade emulsionante (emulsão óleo em água) de 20 dos 43 microrganismos testados. Barras representam desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,05$) e comparações múltiplas. CN c- é o controle negativo (caldo nutritivo estéril).

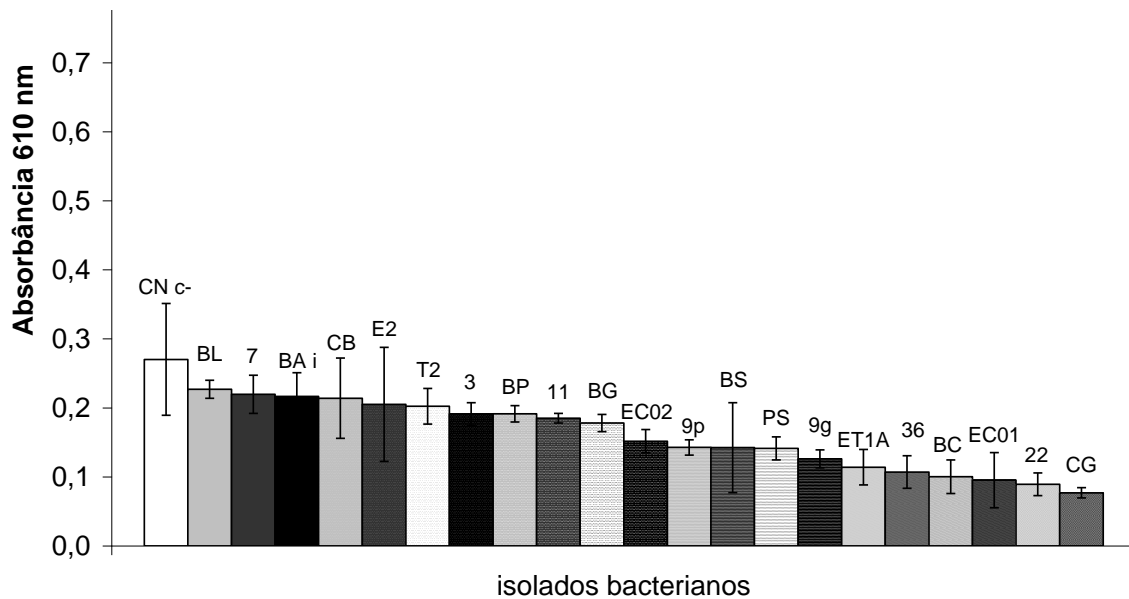


Figura 7. Atividade emulsionante (emulsão óleo em água) de 21 dos 43 microrganismos testados. Barras representam desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,05$) e comparações múltiplas. CN c- é o controle negativo (caldo nutritivo estéril).

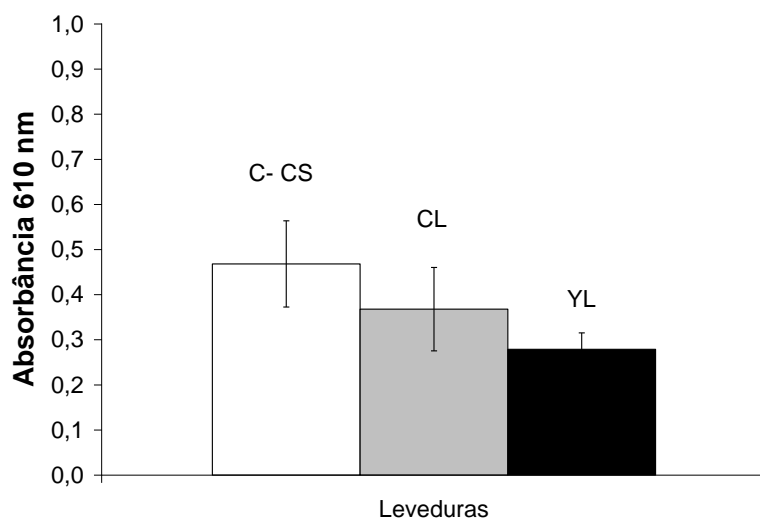


Figura 8. Atividade emulsionante (emulsão óleo em água) de 2 dos 43 microrganismos testados. Barras representam desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,05$) e comparações múltiplas. C- CS é o controle negativo (caldo sabouraud estéril) e CL e YL as linhagens de levedura testadas.

Os três testes para a produção de biosurfactantes foram realizados com os sobrenadantes das culturas, portanto, neste trabalho foi analisada a capacidade de produção de moléculas extracelulares com propriedades biosurfactantes ou emulsificantes. Entretanto, moléculas com esta propriedade podem estar localizadas na membrana celular e ter a mesma função, ou seja, tornar disponível o substrato hidrofóbico para a degradação pelo microrganismo. Bento et al. (2005b) constataram que entre os 12 microrganismos estudados, a atividade emulsificante não era extracelular, pois os ensaios realizados com o meio de cultivo livre de células não apresentava emulsificação considerável. Thavasi et al. (2007) descrevem o ensaio de adesão das bactérias aos hidrocarbonetos (BATH – *bacterial adhesion to hydrocarbons*) como um método para estimar a hidrofobicidade celular. Esta seria uma medida importante já que quanto mais aderência as células têm aos compostos hidrofóbicos, maior a possibilidade de acesso à degradação destes compostos. Entretanto, a medida da atividade do meio de cultivo sem as células é importante, pois as moléculas excretadas pelos microrganismos têm a função de biodisponibilizar os compostos hidrofóbicos não só para o microrganismo que a produziu, mas para toda a comunidade microbiana presente.

Existe extensa literatura relatando a capacidade de isolados da espécie *Bacillus subtilis* produzirem um dos mais potentes biosurfactantes conhecidos, molécula chamada surfactina (KARANTH, 1999; BANAT, 2000; RON & ROSEMBERG, 2001; ROSEMBERG, 2006; CHEN, 2007; THAVASI, 2008). No entanto a linhagem de *B. subtilis* utilizada neste trabalho somente apresentou resultado positivo para emulsão água em óleo (em nível baixo quando comparado aos outros microrganismos testados), não apresentando evidência de redução da tensão superficial pelo método da microplaca e nem resultado positivo para emulsão óleo em água.

As outras espécies de *Bacillus* que apresentaram maior potencial de emulsificação que *B. subtilis* foram *B. coagulans*, *B. circulans* e *B. sphaericus*. Huszcza & Burczyk (2006) identificaram que *B. coagulans* produz diversas isoformas de surfactinas que são lipopeptídeos com poderosa ação surfactante. Das e colaboradores (2008) caracterizaram o surfactante produzido por um isolado marinho de *B. circulans* e constataram que apesar de o microrganismo não utilizar antraceno como única fonte de carbono, a presença do biosurfactante aumentou a degradação deste hidrocarboneto, e que o antraceno induz a produção do biosurfactante. Bento e colaboradores (2005b) isolaram de solo contaminado com óleo diesel, diversos microrganismos produtores de biosurfactantes, entre eles um *B. sphaericus*.

Diversas espécies de *Bacillus* são relatadas na literatura como produtoras de biosurfactantes (BANAT, 1995; ROSEMBERG, 2006). Neste trabalho, além dos já citados *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. circulans* e *B. sphaericus*, que produziram emulsão água em óleo, *B. macerans* e *B. acidocaldarius* apresentaram boa capacidade emulsificar óleo em água. *B. macerans* e *B. liqueniformis* indicaram redução da tensão superficial pelo teste da microplaca. *B. polymyxa*, também apresentou atividade de emulsificação de água em óleo, ainda que baixa.

A capacidade de produção de emulsificantes por *Yarrowia lipolytica* já é conhecida. Cirigliano e Carman (1984) isolaram e estudaram o bioemulsificante produzido por *Y. lipolytica* em meio com substrato hidrofóbico (hexadecano), o qual chamaram Liposan. Porém este emulsificante não era detectado quando a fonte de carbono do meio de cultura era glicose. Zinjarde e Pant (2002a) descreveram a produção de moléculas emulsificantes de um isolado marinho de *Yarrowia lipolytica*. Este isolado produz moléculas

emulsificantes ligadas à superfície celular na fase inicial do crescimento, em meio contendo alcanos, o que auxilia na adesão às gotas de óleo. Na fase estacionária do crescimento, em condições de salinidade (2-3%) e limitação de nitrogênio, é produzido um emulsificante extracelular de características similares ao de superfície. Amaral e colaboradores (2006) isolaram e caracterizaram o emulsificante extracelular produzido por uma *Y. lipolytica* isolada da Baía de Guanabara (RJ), que chamaram de Yansan, o qual é produzido com glicose como fonte de carbono, sem a adição de substratos hidrofóbicos no meio, o que facilita o seu isolamento. Dos dois isolados de *Y. lipolytica* utilizados neste estudo, somente um deles (CCT 5443) apresentou potencial para produção de um emulsificante extracelular em meio sem adição de substrato hidrofóbico (caldo nutritivo).

Os microrganismos que produzem biosurfactantes são bons candidatos a terem a capacidade de degradar hidrocarbonetos. Além disso, quaisquer microrganismos encontrados neste trabalho como bons produtores de biosurfactantes, principalmente *Bacillus coagulans*, *B. circulans*, *B. macerans*, o isolado 23, e a levedura *Yarrowia lipolytica* CCT 5443 podem ser alvos de estudos de purificação e caracterização dos biosurfactantes por eles produzidos, pois estas moléculas são de extremo interesse para a indústria de biotecnologia.

4.3. Seleção de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos

4.3.1. Cultivo da população em efluente de indústria petroquímica

Com exceção de 9 isolados, todos os outros foram inoculados em efluente líquido da IPS com o objetivo de avaliar se o microrganismo era capaz de se multiplicar utilizando aquela fonte de carbono, se era tolerante à toxicidade deste meio, ou se não era resistente à ele. BS, BP e YL foram descartados deste teste pois não apresentaram resultados promissores nos testes para a produção de biosurfactantes. Os isolados 8a, 8b, 03, 9d, ET1a e ET1c não foram testados para este parâmetro, pois, além de apresentarem resultados pouco interessantes na produção de biosurfactantes, apresentavam um crescimento fastidioso no meio padrão de crescimento para os pré-inóculos (caldo nutritivo).

Conforme mostra a Tabela 3, dos 34 microrganismos testados, 6 não são resistentes ao meio composto de efluente de indústria petroquímica e após 24h já não apresentavam contagem de unidades formadoras de colônia detectáveis pelo método de gota. Dez isolados

apresentaram crescimento da população microbiana, indicando que possuem a capacidade de utilizar como fonte de carbono os nutrientes contidos no efluente, ou seja, hidrocarbonetos. Os demais isolados apresentaram contagens estáveis durante o tempo monitorado (7 dias ou mais) ou diminuiram gradativamente a população, sem desaparecer totalmente.

Os dez microrganismos capazes de se multiplicar no efluente foram testados em triplicata e após 13-15 dias as amostras foram congeladas para posteriores análises cromatográficas. As figuras 9, 10 e 11 demonstram o comportamento destas populações ao longo do tempo monitorado por contagens pelo método de gota.

Tabela 3. Comportamento das populações de 34 microrganismos inoculados em efluente de indústria petroquímica. A e B. Efluente utilizado do lote 1. C. Efluente utilizado do lote 3.

A.		B.		C.	
Isolado	Efluente (Lote 1)	Isolado	Efluente (Lote 1)	Isolado	Efluente (Lote 4)
PS	+++	23	+++	E2	+++
CL	+++	ET2	+++	E3b	+++
22	+++	EC01	+++	9dp	0
BH	+	EC02	+++	9dg	0
BC	0	15	0	CG	0
BAr	-	36	-	T2	-----
BAi	-	07	-	T3	-----
BG	-	11	-	AmCB	-----
BL	-	9c	-	AmCE	-----
BM	---	ET1b	-		
01	---	ET1d	-		
09	---	04	-----		
PF	-----				

Os sinais “+” indicam crescimento da população nos 15 dias de cultivo, enquanto que os sinais “-” indicam diminuição da população. “0” indica que não houve nem crescimento nem declínio populacional.

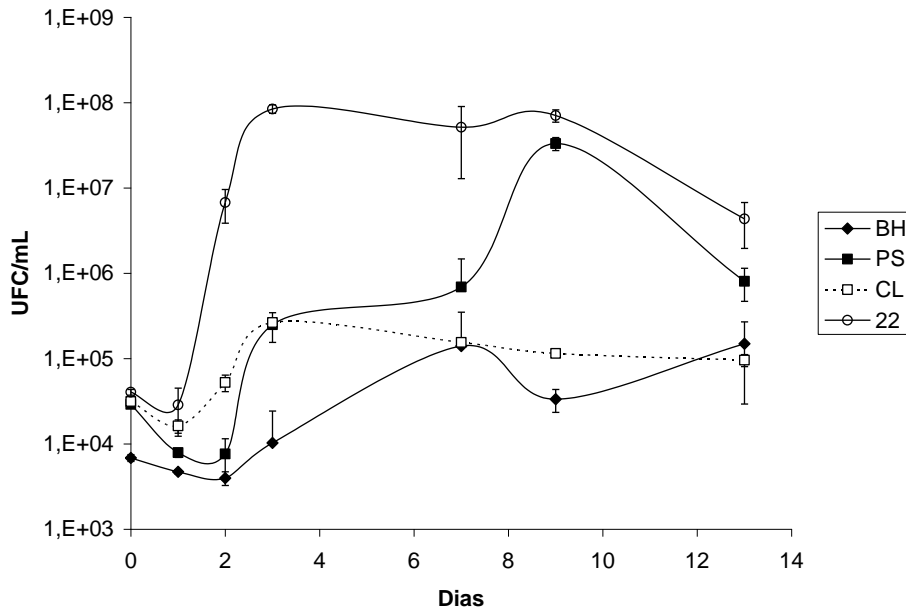


Figura 9. Crescimento populacional de 4 isolados em efluente de indústria petroquímica (do lote 2) durante 13 dias. BH=*B. sphaericus*, PS=*S.maltophilia*, CL=*Y. lipolytica* e 22=isolado não identificado.

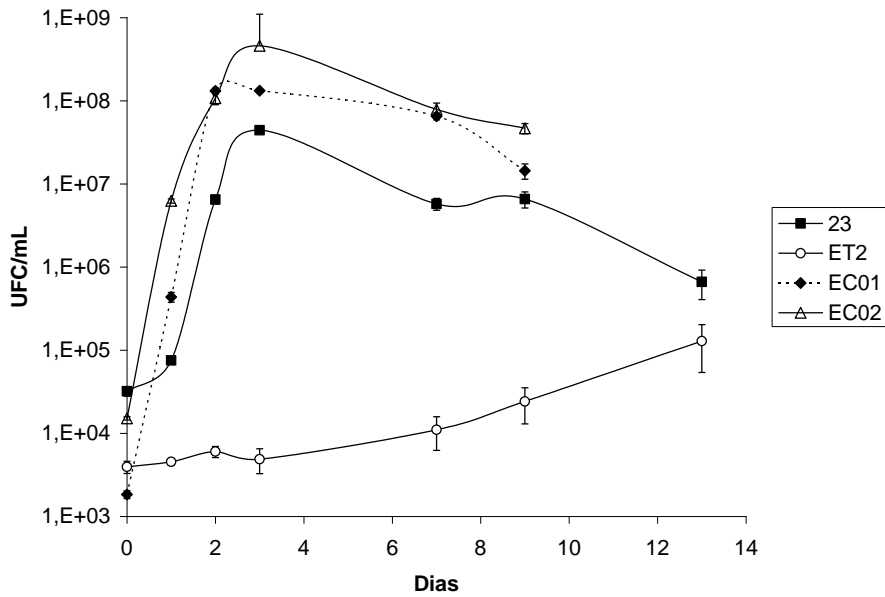


Figura 10. Crescimento populacional de 4 isolados em efluente de indústria petroquímica (do lote 2) durante 9-13 dias. 23=isolado não identificado, ET2=*S. maltophilia*, EC01=*B. diminuta* e EC02=*S. maltophilia*.

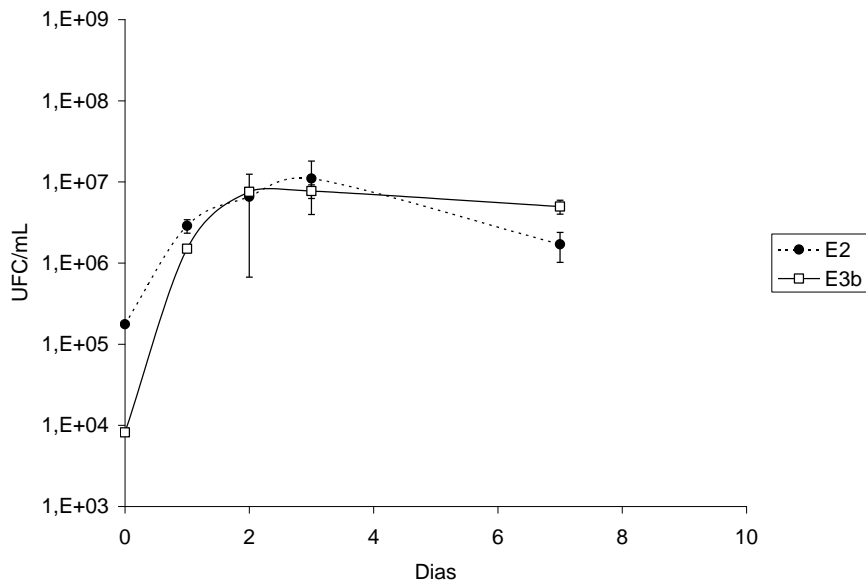


Figura 11. Crescimento populacional de 2 isolados em efluente de indústria petroquímica (do lote 3) durante 7 dias. E2=isolado não identificado, E3b=isolado não identificado.

Nenhum dos microrganismos que reduziram a tensão superficial quando cultivados em caldo nutriente foi capaz de se multiplicar no efluente. A propriedade de produzir moléculas com atividade biosurfactante ou emulsificante é uma estratégia biológica que facilita a disponibilidade dos substratos hidrofóbicos. Porém alguns microrganismos produzem polímeros que atuam como estabilizantes de emulsões mas que podem não afetar a tensão superficial (KARANTH, 1999; TOLEDO, 2006). Toledo e colaboradores (2006) selecionaram 4 linhagens que eram capazes de crescer utilizando como fonte de carbono HPAs e produzir biopolímeros que possuíam alta atividade emulsificante, porém não apresentavam atividade biosurfactante, ou seja, de redução da tensão superficial. Ao contrário, Jacques et al. (2005) selecionaram 3 isolados capazes de degradar antraceno e outros hidrocarbonetos, que não apresentaram resultados positivos para os testes de emulsificação, mas apresentavam redução na tensão superficial, indicando que produziam moléculas de baixo peso molecular.

Dos 10 isolados capazes de se multiplicar utilizando o efluente como fonte de carbono, dois (23 e ET2) apresentavam bons resultados para os testes de emulsificação (tanto água em óleo, como óleo em água). Os demais, com exceção do E2, apresentaram resultado significativo para emulsão de água em óleo (medida em mL). O fato de apresentarem atividade de emulsificação, mas não de redução da tensão superficial, indica

que produzem moléculas de alta massa molecular. O isolado E2 não apresentou resultados positivos para nenhum dos ensaios de biosurfactantes, entretanto apresentou um bom crescimento no efluente. Todavia este crescimento no efluente não foi necessariamente devido à degradação de hidrocarbonetos, como demonstrado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, no item 4.3.4, figura 16.

4.3.2. Cultivo em meio mineral com 1% de óleo diesel

As figuras 12, 13 e 14 demonstram o comportamento dos isolados neste meio e a tabela 4 apresenta o resumo destes resultados. Dos dez isolados que foram capazes de se multiplicar no efluente, somente 2 foram capazes de utilizar o óleo diesel como fonte de carbono para o crescimento da população microbiana, a levedura CL e o isolado 22. Os demais isolados ou mantém uma população estável durante os 6 dias de monitoramento, ou até são capazes de aumentar a população, o que ocorre também com seu controle negativo, o que demonstra que não é o óleo diesel que está servindo de substrato para o crescimento e sim algum componente do meio, provavelmente alguma impureza ou a alta quantidade de nitrogênio.

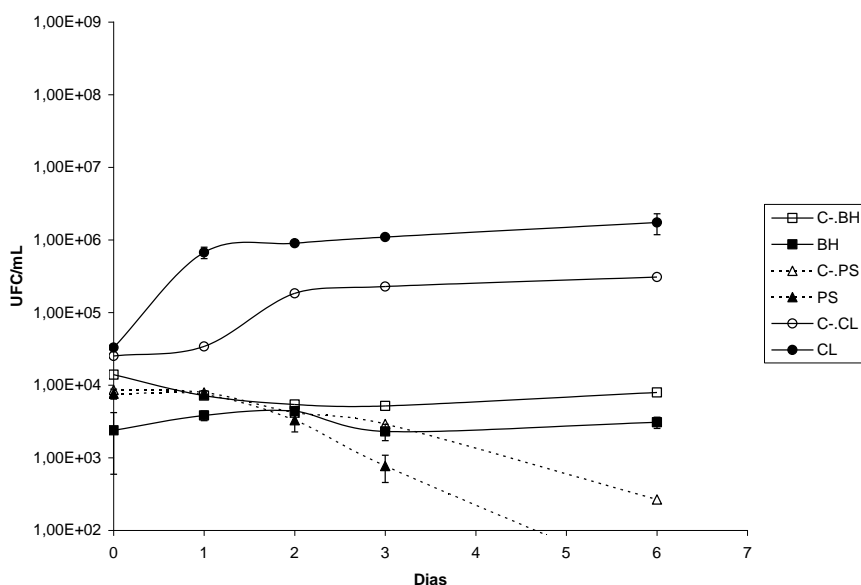


Figura 12. Comportamento populacional de 3 isolados em meio mineral com 1% de óleo diesel. C- é o meio mineral sem adição de óleo. BH=*B. sphaericus*, PS=*S. maltophilia* e CL=*Y. lipolytica*.

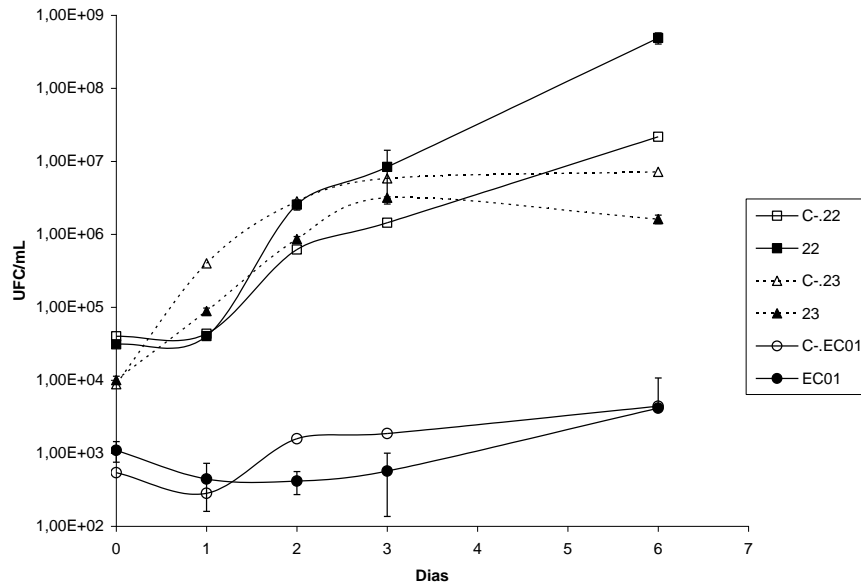


Figura 13. Comportamento populacional de 3 isolados em meio mineral com 1% de óleo diesel. C- é o meio mineral sem adição de óleo. 22 e 23=isolados não identificados, EC01=*Brevundimonas diminuta*.

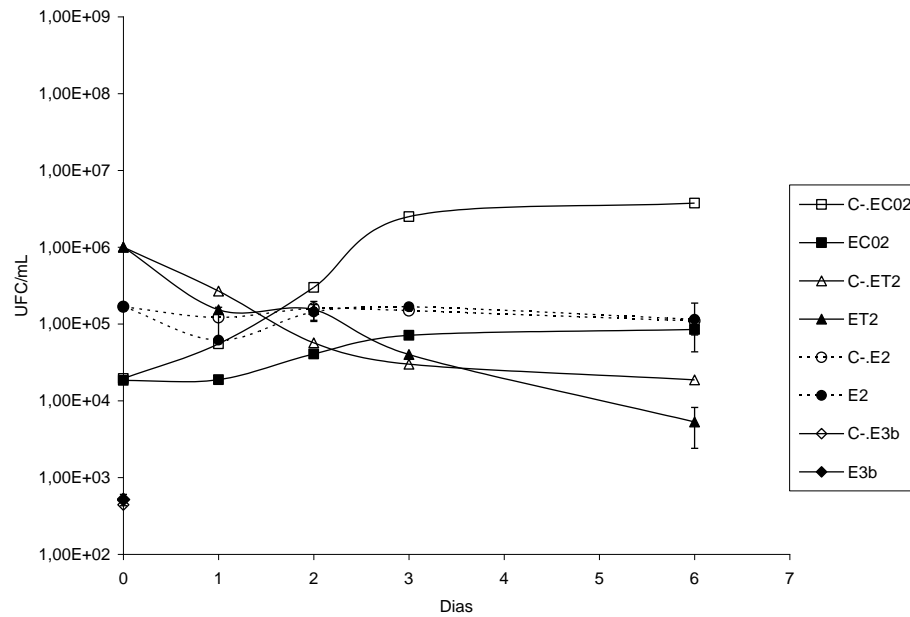


Figura 14. Comportamento populacional de 4 isolados em meio mineral com 1% de óleo diesel. C- é o meio mineral sem adição de óleo. EC01 e ET2=*S. maltophilia*, E2 e E3b=isolados não identificados.

Tabela 4. Comportamento das populações de 10 isolados em meio mineral com 1% de óleo diesel durante 6 dias de incubação a 30°C, 180 rpm..

Isolado	Óleo diesel (1%)	Meio Mineral
CL	+++	+
22	+++	+
23	++	++
BH	0	0
E2	0	0
EC01	0	0
EC02	+	+++
ET2	---	---
E3b	-----	-----
PS	-----	-----

Os sinais “+” indicam crescimento da população nos 15 dias de cultivo, enquanto que os sinais “-” indicam diminuição da população. “0” indica que não houve nem crescimento nem declínio populacional.

Tanto o isolado CL quanto o isolado 22 apresentaram resultado significativo para a produção de biosurfactante, somente para o ensaio de emulsificação de água em óleo (medido em mL), com o isolado CL atingindo mais de 20% de emulsão e o isolado 22 apresentando menos de 5% de emulsão. Provavelmente esses dois microrganismos estão utilizando componentes do óleo diesel como fonte de carbono, porém sem uma análise cromatográfica não é possível saber quais compostos estão utilizando e gerando, ou a parcela de óleo que está sendo mineralizada.

Margesin e Shinner (1997) estudaram a biodegradação de óleo diesel por um isolado de *Y. lipolytica* em meio líquido e em solo em diversas temperaturas. Após 30 dias, a levedura foi capaz de degradar aproximadamente 40% do óleo em meio líquido em temperaturas entre 10 e 20 °C. Porém quando inoculada em solo que já continha um microbiota indígena, o inóculo da levedura teve pouco ou nenhum efeito.

4.3.3. Caracterização do efluente utilizado

O efluente foi coletado 4 vezes durante a realização deste estudo e demonstrou características bastante diferentes entre as amostras. O efluente foi coletado diretamente do tanque de estoque de efluente líquido da indústria em dias e horários aleatórios.

O primeiro lote que foi coletado em março de 2008, era bastante escuro e continha um material sólido suspenso, aparentemente formado de metais e sílica. Foi analisado o teor de óleos e graxas, cinzas, componentes da fase oleosa e componentes metálicos pelo laboratório Pró-ambiente análises químicas e toxicológicas (Tabela 5). Os hidrocarbonetos lineares foram analisados pelo Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS (Tabela 5). Este foi o efluente utilizado para os testes preliminares com os microrganismos e para enriquecimento e isolamento da maioria dos isolados provenientes do efluente.

O segundo lote de efluente coletado em agosto de 2008 foi utilizado para os experimentos de cultivo da maioria dos isolados. Os hidrocarbonetos lineares dos experimentos, assim como os controles (somente o efluente, sem inóculo de microrganismos – 12 dias 30 °C, 180 rpm) foram analisados pelo Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS (Tabela 6).

O terceiro lote de efluente coletado em março de 2009 foi analisado pelo laboratório Bioensaios quanto ao o teor de metais, TPHs, HPAs e VOCs (Tabela 7). Não foi detectado nenhum dos VOCs analisados assim como nenhum dos HPAs pesquisados. A amostra também foi analisada pelo Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS, onde os hidrocarbonetos lineares foram pouco detectados, porém foram detectados altos níveis de fenóis. Este efluente foi utilizado para os experimentos de cultivo de 9 isolados, porém estes não foram considerados, pois devido à alta carga de fenóis no efluente, os microrganismos possivelmente estavam utilizando estes compostos como fonte de carbono.

O quarto lote coletado em setembro de 2009 foi utilizado diluído 10% para os experimentos de cultivo de 9 isolados e também para o consórcio. Foi analisado no Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS para hidrocarbonetos totais de petróleo (Tabela 8).

Tabela 5. Caracterização do efluente do lote 1.

Efluente LOTE 1 (março de 2008)	
óleos e graxas	0,45%
Cinzas	1,40%
<i>Fase oleosa</i>	
Cicloexano	159 mg/mL
Octano	21,25 mg/mL
Nonano	42,68 mg/mL
Benzeno	579,59 mg/mL
Tolueno	51,94 mg/mL
Etilbenzeno	80,77 mg/mL
Xilenos	231,76 mg/mL
Cumeno (metiletilbenzeno)	1372 mg/mL
Mesitileno (1,3,5-trimetilbenzeno)	1762 mg/mL
<i>Componentes metálicos</i>	
Arsênio	não detectado
Bário	não detectado
Cádmio	0,11 mg/mL
Chumbo	1,43 mg/mL
Cobre	0,16 mg/mL
Cromo Total	5,1 mg/mL
Ferro	233,1 mg/mL
Mercúrio	não detectado
Sílica	684 mg/mL
Zinco	6,23 mg/mL

Ensaio realizado pelo laboratório Pró-ambiente utilizando a norma 5520 do SMEWW.

Tabela 6. Quantificação de hidrocarbonetos lineares do efluente do lote 1.

Efluente LOTE 1 (março de 2008)	
Hidrocarboneto	Concentração (ug/L)
C-10	1341,36
C-11	3569,03
C-12	3945,05
C-13	5637,96
C-14	6118,50
C-15	5436,69
C-16	4751,91
C-17	5045,25
C-18	4190,79
C-19	3902,72
C-20	3428,85
C-21	2560,32
C-22	2106,49
C-23	1495,72
C-24	1217,02
Pristano	5340,73
Fitano	3494,17
TPH total	63582,56

TPHs foram analisados pelo Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS pelo método de Jaffé et. al (1995).

Tabela 7. Caracterização do efluente do lote 2.

Efluente LOTE 2 (agosto de 2008)

Hidrocarboneto	Concentração (µg/L)	
	amostra 1*	amostra 2*
C-9	nd	517,82
C-10	nd	959,38
C-11	nd	802,90
C-12	nd	80,82
C-13	nd	nd
C-14	43,55	146,41
C-15	87,94	94,90
C-16	119,50	78,45
C-17	156,27	70,45
C-18	163,76	69,91
C-19	159,69	69,93
C-20	169,02	63,05
C-21	133,51	50,50
C-22	116,54	54,59
C-23	79,06	35,01
C-24	70,66	nd
Pristano	189,38	83,03
Fitano	129,94	60,67
TPH total	1618,83	3237,84

* analisados após 15 dias de incubação a 30°C/180 rpm

nd= pico não detectado

TPHs foram analisados pelo Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS pelo método de Jaffé et. al (1995).

Tabela 8. Caracterização do efluente do lote 3.

Efluente LOTE 3 (março de 2009)

TPH total (C6-C40)	12,36	mg/L
<i>Componentes metálicos</i>		
Arsênio	não detectado	
Bário	0,098	mg/mL
Cádmio	não detectado	
Chumbo	não detectado	
Cobre	0,016	mg/mL
Cromo Total	0,023	mg/mL
Ferro	6,63	mg/mL
Mercurio	não detectado	
Sílica	13,3	mg/mL
Zinco	0,208	mg/mL

Análises realizadas no Laboratório Bioensaios pelo método EPA 8015B (TPHs) e normas 3120 B, 3112 B e 4500 do SMEWW (para metais).

Tabela 9. Caracterização do efluente do lote 4.

Efluente LOTE 4 (setembro de 2009)	
Hidrocarboneto	Concentração (µg/L)
C-11	2,77
C-12	3,99
C-13	16,88
C-14	22,28
C-15	27,31
C-16	31,75
C-17	41,46
C-18	31,94
C-19	24,51
C-20	21,65
C-21	14,65
C-22	15,81
C-23	11,23
C-24	8,53
Pristano	37,04
Fitano	28,10
TPH total	339,90

TPHs foram analisados pelo Laboratório de Química Analítica e Ambiental da UFRGS, segundo o método de Jaffé et al (1995).

4.3.4. Degradação dos hidrocarbonetos presentes em efluente de indústria petroquímica

A metodologia utilizada no Laboratório de Química Analítica e ambiental da UFRGS permite a detecção das cadeias carbônicas alifáticas desde as que possuem 9 carbonos até as que possuem 24 carbonos. Os hidrocarbonetos são identificados pelo tempo de retenção que apresentam e também pelo espectro de massas produzido. As somas das quantidades calculadas dos alifáticos de C9 a C24, incluindo pristano e fitano, representam a quantidade de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) da amostra.

Os microrganismos que foram capazes de se multiplicar no efluente foram cultivados em triplicata e as três amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (somente o controle do 1º lote e o isolado 23 estão em duplicata). As médias das quantidades de TPH foram comparadas por ANOVA. Para o primeiro lote, calculou-se $F_{(0,05;8;17)} = 8,273$, demonstrando que há diferença entre pelo menos 2 grupos de tratamentos com os diferentes microrganismos. Para comparações múltiplas entre os grupos foi realizado o teste de Tukey. A Figura 15 apresenta os resultados para os 8 microrganismos que foram testados com o 2º lote do efluente. Os isolados 22 e 23

apresentaram na média uma quantidade menor de hidrocarbonetos que o controle, porém como as variâncias destes 3 grupos se apresentaram muito grandes, não foi possível afirmar que esta diferença é significativa estatisticamente. Já os outros grupos, com certeza apresentam uma atividade de degradação dos hidrocarbonetos, sendo o isolado PS o mais eficiente neste processo.

A Figura 16 apresenta os resultados para 2 microrganismos que foram testados com o terceiro lote do efluente. Estes ensaios foram realizados com o efluente diluído a 10%, pois puro ele se apresentava muito tóxico, não permitindo a sobrevivência das células. Apesar de terem crescido bem no efluente (Figura 11) o tratamento com estes dois microrganismos não foi melhor do que no tratamento controle.

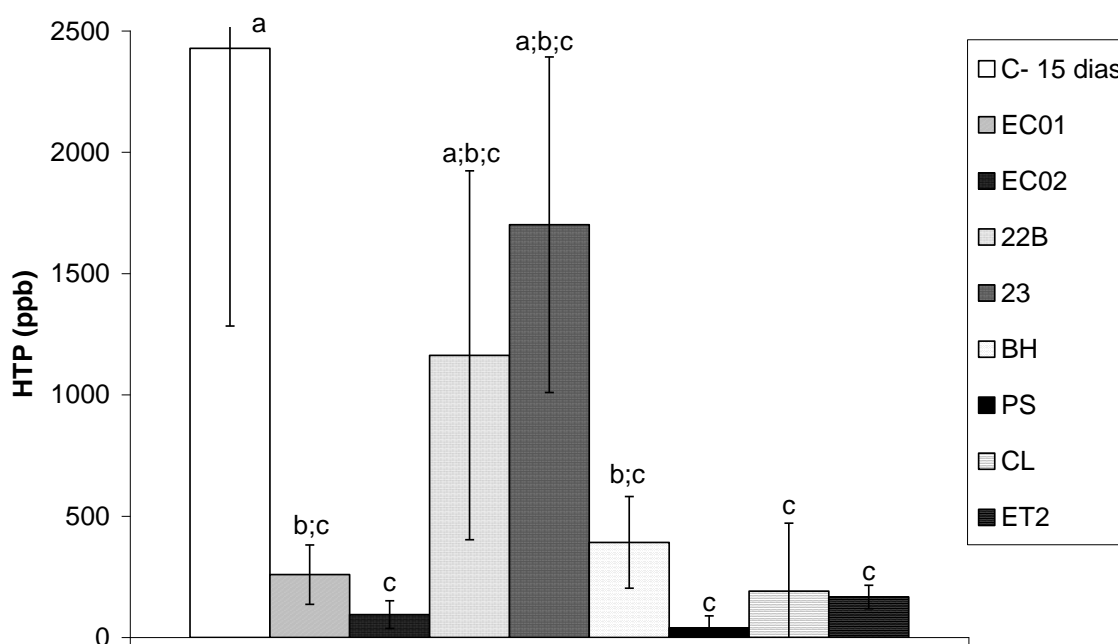


Figura 15. Quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) do efluente do 2º lote tratado com cada um dos 8 microrganismos após 15 dias de incubação. C- é o controle do experimento, onde não foi inoculado nenhum microrganismo. EC01=*Brevundimonas diminuta*; EC02, PS e ET2=*Stenotrophomonas maltophilia*; 22B e 23=isolados não identificados; BH=*B. sphaericus*; CL=*Yarrowia lipolytica*. Letras iguais entre os grupos não representam diferença significativa ($p < 0,005\%$).

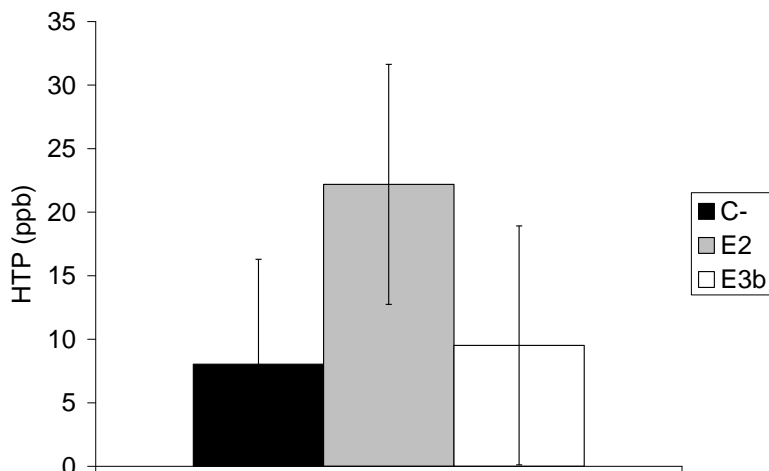


Figura 16. Quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) do efluente do 3º lote tratado com cada um dos 2 microrganismos após 8 dias de incubação. C- é o controle do experimento, onde não foi inoculado nenhum microrganismo. E2 e E3b=isolados não identificados.

Os isolados 22 e 23 oriundos de solo contaminado por hidrocarbonetos, são produtores de biosurfactantes e foram dois dos cinco melhores isolados em degradar diversos hidrocarbonetos padrão no estudo realizado por Dias (2006). Os hidrocarbonetos testados naquele estudo foram: tridecano, tetradecano, hexadeceno, pristano, fenildecano, fenantreno, naftaleno, pireno e benzo(a)pireno. O isolado 22 degradou cerca de 25% dos compostos lineares, enquanto que fenantreno, pireno e benzo(a)pireno foram 100% degradados. O isolado 23 degradou aproximadamente 35% dos compostos lineares enquanto que os mesmos compostos aromáticos foram também 100% degradados. Fica evidente a melhor eficiência destes microrganismos na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos do que dos lineares. Neste trabalho foram avaliados somente os hidrocarbonetos lineares, onde os resultados concordaram com o trabalho de Dias, já que os outros isolados foram mais eficientes em degradá-los do que os isolados 22 e 23.

Dos 6 microrganismos que melhor degradaram hidrocarbonetos presentes no efluente (Figura 15), 3 deles (EC02, PS e ET2) foram identificados (por testes bioquímicos e por sequenciamento do gene 16S rDNA) como pertencentes à espécie *Stenotrophomonas maltophilia*. Esta espécie já foi utilizada em estudos de biorremediação (BERG et al., 1999) e já foi encontrada em solo contaminado com combustíveis submetido à bioestimulação e relatado como degradador de hidrocarbonetos (MENENDEZ & VEGA, 2007). Por ser uma

espécie potencialmente causadora de doenças em humanos, pois é um patógeno oportunista, encontrado em diversos isolados clínicos e bastante relatada na literatura como resistente a diversos antimicrobianos, não é recomendado seu uso como inoculante para biorremediação (GARRITY, 2005). A legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC nº 719, que aprova o regulamento técnico para produtos saneantes à base de bactérias harmonizado no âmbito do Mercosul, exige um relatório técnico contendo dados de ensaios microbiológicos atestando a “ausência de microrganismos saprófitas principalmente *Stenotrophomonas maltophilia* com resistência fora dos padrões definidos na literatura através da apresentação dos dados de testes *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos recomendados” (ANVISA, 2006).

EC01 foi isolada do efluente da IPS e foi identificada como pertencente à espécie *Brevundimonas diminuta*. Antes pertencente ao gênero *Pseudomonas*, microrganismos desta espécie são bactérias ambientais encontradas em água e também em solo (GARRITY, 2005). Este microrganismo já foi encontrado em local contaminado (YOSHIDA, 2005) e descrito como degradador de hidrocarbonetos (TUMAİKINA, 2008). Pela técnica de DGGE (*denaturing gradient gel eletroforesis*), Yoshida e colaboradores (2005) detectaram a presença de *B. diminuta* junto a *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Burkholderia cepacia*, e *Propionibacterium acnes*, em amostras de petróleo estocado no Japão. Tumaikina et al. (2008) isolaram uma *Brevundimonas diminuta* da superfície de uma macrófita aquática (*Elodea canadensis*) que foi capaz de degradar cerca de 45% do petróleo (0,5 g/L) em meio líquido após 10 dias (enquanto a perda abiótica foi de 18%). *Pseudomonas fluorescens* (isolada do mesmo local) e a macrófita (sem microbiota associada) também foram capazes de degradar o petróleo, porém a maior taxa de degradação, que foi de 55%, foi obtida utilizando os três organismos. A associação de *E. Canadensis* com estes dois microrganismos apresentou degradação de 100% quando o substrato adicionado foi naftaleno. O isolado de *B. diminuta* também apresentou alta taxa de degradação de fenol (80%), naftaleno (97%) e tolueno (70%). *Brevundimonas diminuta*, juntamente com *Bacillus megaterium*, *Gluconobacter cerenius*, *Pasteurella caballi*, entre outras, faz parte de um produto comercial, *Oilbac (Ecolution Oy, Helsinki, Finlândia)*, que consiste em uma matriz de solo contaminado com resíduos de óleo onde é realizado *landfarming* (JORGENSEN, 2000). Entretanto, na biorremediação de

solo contaminado realizada por Jorgensen e colaboradores (2000), este inóculo não foi mais eficiente em degradar os hidrocarbonetos do que a microbiota já existente no solo.

Zinjarde e Pant (2002b) isolaram de ambiente marinho de Mumbai (Índia) diversas leveduras degradadoras de hidrocarbonetos. A mais eficiente foi *Yarrowia lipolytica*, que, em condições otimizadas, foi capaz de degradar 78% da fração alifática do petróleo. Entretanto este isolado, assim como as outras leveduras isoladas, não foram capazes de degradar os compostos aromáticos presentes no petróleo.

Bacillus sphaericus já foi isolado de petróleo em estoque no Japão (YOSHIDA, 2005), demonstrando que pode estar envolvido na degradação de algum de seus componentes. Bento et. al (2005a) isolaram 6 espécies de bactérias, entre elas um *B. sphaericus*, de solo contaminado com óleo diesel, que foram utilizadas em consórcio para experimentos de biorremediação por bioaugmentação.

Assim, os isolados EC01, BH e CL, que são microrganismos sem riscos potenciais ao ambiente e à saúde, e são relatados na literatura como degradadores de hidrocarbonetos, se apresentaram como os mais promissores para a formulação de um biorremediador para tratamento de efluentes com este tipo de contaminação.

Em óleos de biodegradação moderada, as razões pristano/fitano, pristano/*n*C17 e fitano/*n*C18 apresentam valores mais elevados que os óleos não-biodegradados. Porém, em óleos que apresentam biodegradação severa, as razões tendem a zero devido à ausência destes compostos, observando apenas uma curva na linha base do cromatograma mais conhecida como mistura complexa de compostos não-resolvidos (*Unresolved Complex Mixture* -UCM) (AZEVEDO et. al, 2009). Rosa e Trigüis (2006) utilizam as razões entre isoprenóides e alcanos como parâmetros para medir a biodegradação de um ambiente costeiro contaminado por óleo simulado. As razões *n*-C17/pristano e *n*-C18/fitano maiores que 1 indicavam amostras não degradadas, enquanto que as razões menores que 1 indicavam amostras degradadas. No experimento utilizando fosfato de amônia NKP como bioestimulante, a diminuição das razões que eram cerca de 2 para valores abaixo de 1 representaram comprovação de que estava ocorrendo biodegradação ao longo da simulação com a redução inicial dos alcanos lineares leves, seguido dos alcanos lineares pesados, restando apenas os isoprenóides, que também foram sendo degradados mais tardiamente. Neste trabalho, este comportamento não foi observado para os isolados selecionados, pois

os valores das razões não apresentaram grandes diferenças entre os isolados e o controle (sem microrganismo), como demonstrado na tabela 9.

Entretanto ficou evidente a preferência dos isolados pelos alcanos de cadeias menores. O efluente continha uma quantidade maior de hidrocarbonetos lineares de cadeias pequenas (C-9 a C-11) do que de cadeias grandes, mesmo após incubação (30 °C, 180 rpm) por 15 dias. Foi observado que os alcanos de cadeias menores (C-9 a C-12) foram totalmente degradados após o período de incubação de 13-15 dias (figura 17) pelos 3 microrganismos selecionados. Os alcanos de cadeias maiores (C-16 a C-24) foram somente parcialmente degradados, assim como os isoprenóides pristano e fitano.

Os cromatogramas de CL, EC01 e BH (em anexo) apresentaram a curva na linha base, que representa uma mistura complexa de compostos (UCM), e indica biodegradação severa da amostra (AZEVEDO et. al., 2009).

Tabela 9. Razões entre isoprenóides e alcanos.

Razões *	Controle	EC01	BH	CL
Pristano/C17	1,20	1,46	1,21	1,16
Fitano/C18	0,82	0,96	0,92	0,88
Pristano/fitano	1,43	1,35	1,30	1,20

* Segundo Azevedo et al. (2009) valores mais elevados representam maior biodegradação, porém valores próximos de zero representam ausência dos compostos (biodegradação severa).

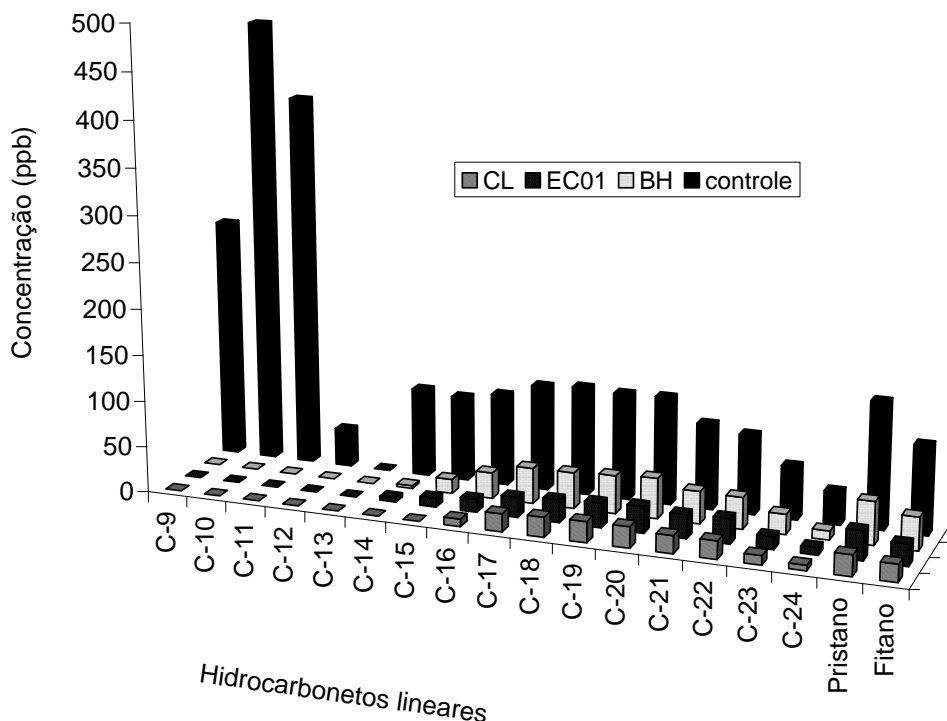


Figura 17. Degradação dos hidrocarbonetos lineares pelos três isolados escolhidos para o consórcio em 15 dias de incubação (30°C, 180 rpm). O controle foi incubado nas mesmas condições. CL=*Y. lipolytica*; EC01=*B. diminuta*; BH=*B. sphaericus*.

4.4. Crescimento microbiano em meio de cultura padrão

Os isolados EC01, BH e CL foram inoculados em um meio de cultivo padrão com o objetivo de selecionar aquele que produz a maior biomassa ou ainda, o que produz a maior biomassa em menos tempo, visando uma produção em larga escala para comercialização.

As Figuras 18 e 19 apresentam as curvas de crescimento para estes microrganismos, medidas pela absorbância a 600 nm e por plaqueamentos pelo método de gota, respectivamente. As medidas de absorbância apresentaram um desvio padrão extremamente alto (Figura 18), entretanto esta variação não se repetiu nas medidas de UFC/mL (Figura 19), sendo então devido a turvação do meio por outros motivos que não o crescimento bacteriano. O Erlenmeyer com chicanas tem o objetivo de melhorar o desempenho do cultivo por fornecer maior quantidade de agitação e por consequência de oxigênio. Porém esta agitação quando exagerada pode acabar liberando maior quantidade de material celular para o meio extracelular e contribuir para a turvação que não representa, necessariamente

só as células viáveis. Principalmente nos Erlenmeyers inoculados com levedura foi notada a grande produção de espuma e a aderência de biomassa nas paredes do vidro e na bucha, o que pode ter contribuído, somado às diferenças existentes nos formatos dos Erlenmeyers (chicanas mais ou menos profundas), para a grande variação entre as replicatas observadas na DO.

Por ambas as curvas (Figuras 18 e 19) é possível perceber que o isolado BH é o que apresenta a fase log mais curta, ou seja, se multiplica mais rápido que os outros neste meio. Porém não é o que apresenta maior produção de biomassa em UFC/mL. Enquanto BH produz $1,3 \cdot 10^9$ UFC/mL em 24 h, sendo que a curva já estava praticamente estável desde as 9h, EC01 produz $1,44 \cdot 10^{10}$ UFC/mL em 24 h, sendo que a curva não havia estabilizado ainda, ou seja, pode produzir mais. Apesar de a levedura ter apresentado uma variação enorme nas medidas de absorbância, a variação não se repetiu quando a medida de crescimento da população microbiana foi em UFC/mL. A curva de crescimento inicia já em fase log, estabilizando perto das 24h de cultivo.

O maior custo para a realização de um bioprocessamento industrial é com energia elétrica. Em segundo lugar ficam os gastos com mão-de-obra e em terceiro a depreciação de equipamentos. O meio de cultivo representa apenas 8% dos custos totais com o bioprocessamento (MITIDIARI et. al, 2003). Portanto para reduzir os custos, é preferível tentar diminuir o tempo de processo ou a temperatura utilizada do que utilizar um meio de cultivo mais barato.

Baseado neste experimento, conclui-se que o isolado BH é o mais conveniente de ser produzido em larga escala visando comercialização, pois apesar de não produzir a maior biomassa em UFC/mL é o que apresenta a mais curta fase log, estando em 9 h com a quantidade máxima de células para este meio nestas condições. CL atinge a fase estacionária perto das 24 h de cultivo, enquanto que o isolado EC01 atinge a fase estacionária após este período.

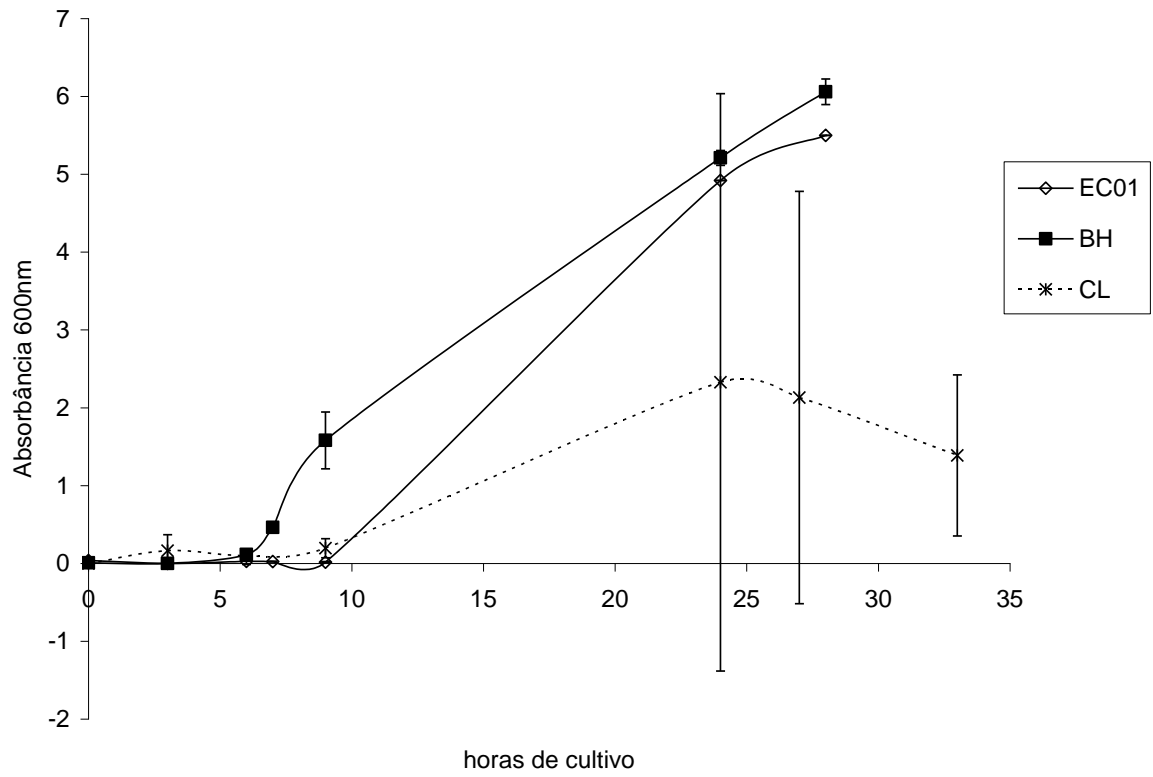


Figura 18. Crescimento populacional medido por aumento da DO 600nm. EC01= *Brevundimonas diminuta*; BH=*Bacillus sphaericus*; CL=*Y. lipolytica*.

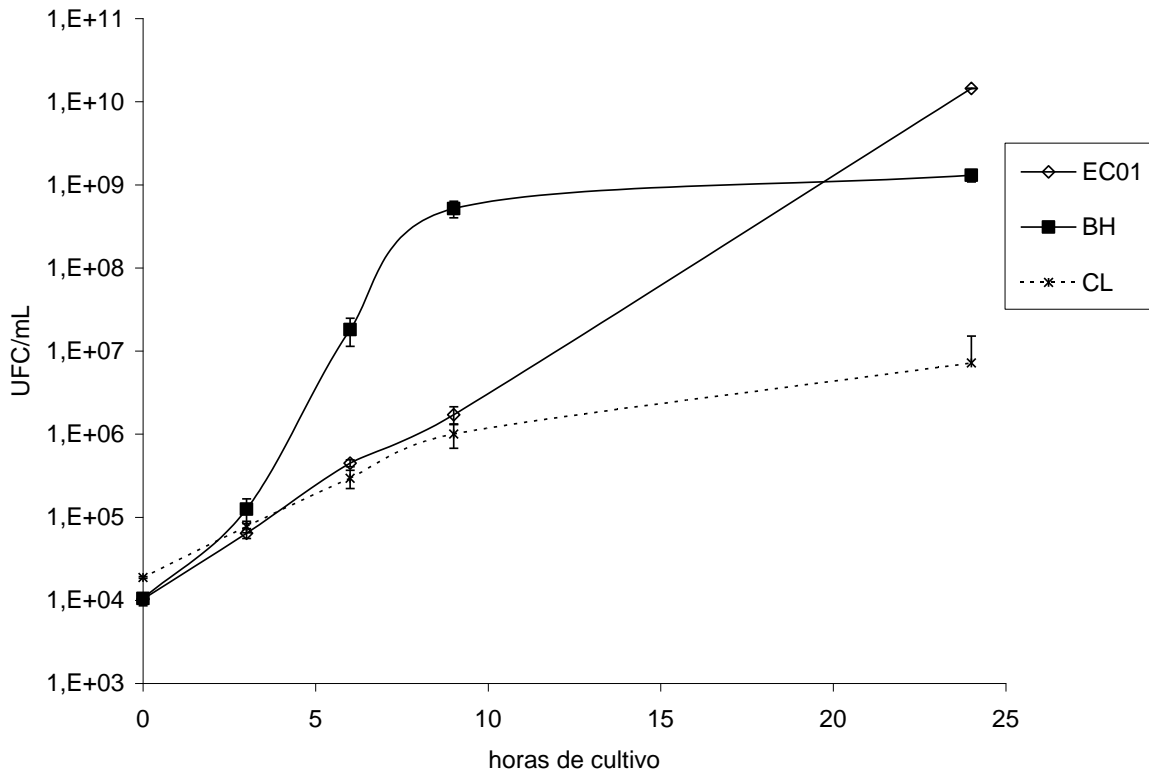


Figura 19. Crescimento populacional medido por plaqueamentos pelo método de gota. EC01=*Brevundimonas diminuta*; BH=*Bacillus sphaericus*; CL=*Y. lipolytica*.

4.5. Consórcio dos microrganismos selecionados

Os resultados apresentados nas Figuras 20 e 21 indicam que o consórcio formulado foi capaz de diminuir sensivelmente a quantidade de TPH GRO em ambos os tipos de águas contaminadas em 72 h. A adição dos microrganismos selecionados resultou na degradação dos TPH-GRO em aproximadamente 70% para o efluente e em 80% para a água subterrânea, quando comparados ao controle que ficou sob agitação a 30 °C.

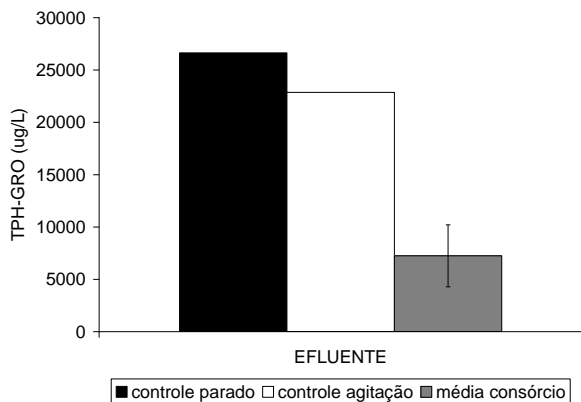


Figura 20. Degradação de THP-GRO pelo consórcio formado pelos isolados CL, BH e EC01 em 72h.

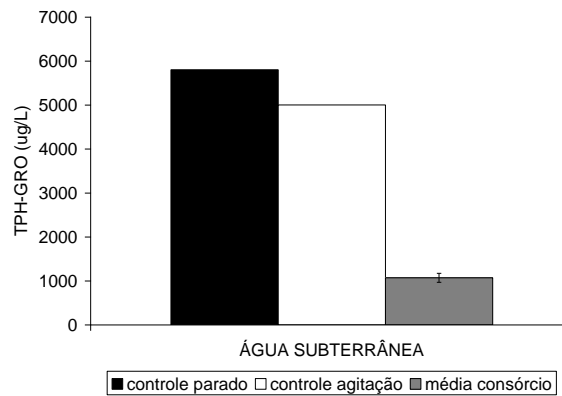


Figura 21. Degradação de THP-GRO pelo consórcio formado pelos isolados CL, BH e EC01 em 72h.

Vieira e colaboradores (2007) utilizaram dois consórcios de microrganismos provenientes de enriquecimento de amostras de solo de uma lagoa com histórico de contaminação por petróleo para testar a degradação de TPH em meio líquido (meio mineral). As taxas de degradação foram parecidas com as encontradas neste trabalho, utilizando um efluente artificial com concentração de TPH bastante superior. O consórcio 1 foi capaz de degradar 78-87% dos TPHs, enquanto o consórcio 2 degradou 70-80%, utilizando diferentes concentrações iniciais de uma mistura de óleo diesel e gasolina (0,5 a 6%) que apresentavam de 2.300 a 11.580 mg/L de TPH. Por experimentos delineados por planejamento experimental, os autores concluíram que o consórcio 1 era mais eficiente que o consórcio 2 e que a otimização da degradação ocorria com 4% de combustível e adição de 550 mg/L de nitrato de amônio. Dos seis microrganismos pertencentes ao consórcio 1, quatro foram identificados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Bacillus*. Utilizando as condições otimizadas, o consórcio 1 foi capaz de remover 90% dos TPHs em 49 dias de cultivo em reator de 4L com 1824 mL de volume de trabalho. Os compostos lineares identificados foram degradados a taxas maiores que 90%, enquanto que os aromáticos apresentaram degradação entre 45 a 55%. É possível que a degradação de TPH pelo consórcio formado por BH, CL e EC01 possa ser aumentada com suplementação de nitrogênio ou a otimização de outros parâmetros como o tempo e tamanho do inóculo.

Chavan e Mukherji (2008) observaram o efeito da relação N:P na degradação de TPH por *Burkholderia cepacia* e microrganismos fototróficos aderidos ao biofilme de discos

rotatórios em um reator. Utilizando 21 h de tempo de retenção hidráulica e 0,6% de diesel (27,33 g TPH/m² d), quando as relações N:P foram de 28,5:1 (C:N:P = 100:2,73:0,98) e 38:1 (C:N:P = 100:3,65:0,98), a eficiência de remoção de TPH foi de 99,4%, enquanto que se diminuísse ou aumentasse a quantidade de nitrogênio, a degradação era menor. As fontes de nitrogênio e fósforo utilizadas foram fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) e nitrato de sódio (NaNO₃).

Outras fontes de nutrientes podem ser utilizadas para bioestimulação dos microrganismos com atividade de degradação. Um consórcio composto por uma bactéria (*Enterobacter cloacae*) e um fungo (*Cunninghamella echinulatae*) foi capaz de diminuir a concentração de hidrocarbonetos de um solo contaminado de 6320 para 2260 mg/Kg (degradação de 64,2%) em 45 dias, utilizando palha de trigo como bioestimulante (ZHANG et al., 2008).

Um consórcio formado por *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. pumillus*, *Acinetobacter junii* e *Pseudomonas* sp., todos isolados de um solo contaminado com óleo diesel, foi utilizado em biorremediação por bioaugmentação no mesmo solo e em outro solo também contaminado. O consórcio teve efeito somente no solo de origem, degradando entre 73 e 75% dos hidrocarbonetos totais de petróleo em 12 semanas (BENTO, 2005a). Neste trabalho, somente EC01 foi isolada do efluente, e o consórcio formulado foi efetivo tanto no efluente quanto em uma amostra de água subterrânea com contaminação por vazamento de combustíveis.

Richard e Vogel (1999) isolaram 7 bactérias de um solo contaminado, seis do gênero *Pseudomonas* e um *Achromobacter antropii*, e as utilizaram em consórcio para degradação de óleo diesel em meio mineral líquido (100 mL com 1 g de óleo). Quatro dos isolados não apresentavam crescimento em nenhum dos hidrocarbonetos padrão testados, entretanto, eles foram importantes para aumentar a taxa de degradação do óleo diesel. Os isolados conseguiram degradar de 10 a 64% do óleo em 50 dias de incubação, enquanto que o consórcio dos 7 microrganismos foi capaz de degradar 90%. Entretanto, no teste de degradação de óleo diesel realizado em solo, por 30 dias, o consórcio não foi mais eficiente do que o isolado de *Achromobacter antropii*.

Em 15 dias, os isolados CL, EC01 e BH foram capazes de degradar respectivamente 92,12, 89,34, e 83,86% dos TPHs (C9-C24) presentes no efluente da IPS (Figura 15).

Segundo Tumaikina e colaboradores (2005 *apud* TUMAİKINA, 2008), a concentração de hidrocarbonetos diminui mais rapidamente nos 3 primeiros dias. Divergindo desta informação, Mana Capeli et al. (2001), que utilizaram um consórcio proveniente de enriquecimento de resíduo contaminado, observaram que nos primeiros dias a taxa de degradação era lenta, começando a aumentar a partir do 18º dia. Em 45 dias de incubação o consórcio foi capaz de degradar 30% dos hidrocarbonetos presentes no meio líquido (0,25% de TPH, temperatura ambiente e com agitação). As curvas de crescimento dos microrganismos no efluente (figuras 9 e 10) demonstram que EC01 e CL possuem alta produção de biomassa entre o segundo e o terceiro dia após o inóculo, indicando que os hidrocarbonetos estão sendo consumidos rapidamente neste período. Ao contrário, BH apresenta maior biomassa entre 7 e 14 dias. Este resultado pode ser reflexo da acumulação de células inativas no efluente, já que *B. sphaericus* é formador de endósporos que resistem a condições adversas no ambiente. Em 3 dias, período de maior crescimento celular pelo menos para CL e EC01, o consórcio dos três microrganismos degradou cerca de 70% dos TPH-GRO presentes no efluente. Esta taxa de degradação foi menor do que a dos isolados, porém o ensaio com o consórcio foi realizado em 3 dias enquanto que os isolados foram incubados por pelo menos 13 dias.

Devem ser realizados outros experimentos para determinar em quanto tempo os hidrocarbonetos podem ser totalmente degradados pelo consórcio, em quais moléculas são transformados, qual a taxa de mineralização e se a toxicidade das amostras de efluente e de água subterrânea efetivamente diminui.

5. CONCLUSÕES

- O efluente de indústria petroquímica utilizado contém alguma carga microbiana, sendo possível isolar microrganismos eficientes em produzir biosurfactantes e degradar hidrocarbonetos.
- Diversos dos microrganismos estudados tiveram a capacidade de produzir biosurfactantes de diversos tipos com destaque para BM – *B. macerans* (atividade de redução da tensão superficial), BG – *B. coagulans* (atividade de emulsificação de água em óleo) e o isolado 23 (atividade de emulsificação óleo em água).
- Os isolados BH, PS, CL, 22, 23, ET2, EC01, EC02, E2 e E3b, foram capazes de se multiplicar no efluente de indústria petroquímica, porém somente BH, PS, CL, ET2, EC01 e EC02 demonstraram degradação significativa dos hidrocarbonetos da fração leve do petróleo (C-9 a C-24)
- Os isolados CL e 22 foram capazes de se multiplicar em meio mineral com 1% de óleo diesel, indicando que consomem hidrocarbonetos como única fonte de carbono.
- Os isolados PS, ET2 e EC02, por serem potencialmente patogênicos, não podem ser utilizados para biorremediação.
- O consórcio composto pelos isolados CL, BH e EC01 foi eficiente em degradar hidrocarbonetos presentes nas amostras de efluente de indústria petroquímica e de água subterrânea contaminada por vazamento de combustível.

6. PERSPECTIVAS

- Utilização do tensiômetro para medida da tensão superficial como método de prospecção de biosurfactantes
- Otimização da produção dos microrganismos selecionados (meio de cultura e condições de cultivo)
- Estudar a degradação de hidrocarbonetos padrão pelos microrganismos selecionados
- Formulação de um produto comercial utilizando o consórcio selecionado
- Determinação da eficiência do produto em contaminação líquida e em outras amostras contaminadas avaliando a diminuição da ecotoxicidade (testes com algas, microcrustáceos e peixes) e genotoxicidade (Teste de Ames).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEBRANDT, S.R. **Uso de peróxidos na bioestimulação de bactérias endógenas sobre hidrocarbonetos derivados de petróleo em solos contaminados.** Dissertação de mestrado. Universidade de Santa Cruz do Sul, Programa de Pós-Graduação Mestrado em Tecnologia Ambiental, Santa Cruz do Sul, RS. 2009.

ALKORTA, I; GARBISU, C. Phytoremediation of organic contaminants in soils. **Bioresource Technology** 79: 273-276. 2001.

ANP – Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis, Superintendência de Abastecimento. **Abastecimento em números: Boletim gerencial – informações sobre a comercialização de combustíveis.** Nº 25, Ano 5, Fevereiro de 2010. Disponível em <http://www.anp.gov.br>, acessado em 22 de fevereiro de 2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 719**, de 3 de outubro de 2006. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>, acessado em 22 de fevereiro de 2010.

AMARAL, P.F.F; DA SILVA, J.M.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A.M.V.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry** 41: 1894–1898. 2006.

ATLAS, R.M.; PHILP, J. **Bioremediation: Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup.** Washington: ASM Press. 366p. 2005.

AZEVEDO, D.A.; DA SILVA, T.F.; DA SILVA, D.B. Avaliação geoquímica de biomarcadores ocluídos em estruturas asfálticas. **Química Nova** 32 (7): 1770-1776. 2009.

BANAT, I. M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology** 53: 495 – 508. 2000.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, 51: 1-12. 1995.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International** 26: 413-416. 2001.

BARKAY, T.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. **Applied and Environmental Microbiology** 65 (6): 2697–2702. 1999.

BARKER, G.W.; RATERMAN, K.T.; BERTON FISHER, J.; CORGAN, J.M.; TRENT, G.L.; BROWN, D.R.; KEMP, N.; SUBLETTE, K.L. A Case Study of the Natural Attenuation of Gas Condensate Hydrocarbons in Soil and Groundwater. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 57/58: 791-801. 1996.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology** 96: 1049 - 1055. 2005a.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEK, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research** 160: 249 - 255. 2005b.

BERG, G.; ROSKOT, N.; SMALLA, K. Genotypic and Phenotypic Relationships between Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Clinical Microbiology**, 37(11): p. 3594–3600. 1999.

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods** 32: 273–280. 1998.

BODOUR, A.A.; DREES, K.P.; MAIER, R.M. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. **Applied and Environmental Microbiology** 69 (6): 3280–3287. 2003.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology** 74: 63-67. 2000.

BRODKORB, T.S.; LEGGE, R.L. Enhanced Biodegradation of Phenanthrene in Oil Tar-Contaminated Soils Supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology** 58 (9): 3117-3121. 1992.

BRUHEIM, P.; BREDHOLT, H.; EIMHJELLEN, K. Bacterial degradation of emulsified crude oil and the effect of various surfactants. **Canadian Journal of Microbiology** 43 (1): 17–22. 1997.

BÜYÜKSÖNMEZ, F.; HESS, T.F.; CRAWFORD, R.L.; WATTS, R.J. Toxic Effects of Modified Fenton Reactions on *Xanthobacter flavus* FB71. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(10): 3759–3764. 1998.

CANTAGALLO, C.; MILANELLI, J.C.C. & DIAS-BRITO, D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão **Pan-American Journal of Aquatic Sciences** 2 (1): 1-12. 2007.

CHAVAN, A. & MUKHERJI, S. Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: Effect of N:P ratio. **Journal of Hazardous Materials** 154: 63–72. 2008.

CHEN, C.; BAKER, S.C.; DARTON, R.C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **Journal of Microbiological Methods** 70: 503–510. 2007.

CIRIGLIANO, M.C; CARMAN, G.M. Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology** 48(4): 747-750. 1984.

CRAWFORD, R.L. Bioremediation. In: **Prokaryotes** 1:850–863. Edited by Dworkin M. New York: Springer-Verlag, Inc. 2006.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil). Resolução nº 362/2005: Dispõe sobre o recolhimento, coleta e destinação final de óleo lubrificante usado ou contaminado. 2005.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil). Resolução nº 273/2000.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere** 72: 1229-1234. 2008.

CUNNINGHAM, S.D.; BERTI, W.R.; HUANG, J.W. Phytoremediation of contaminated soils. **Trends in Biotechnology** 13: 393-397. 1995.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61(1): 47–64. 1997.

DIAS, F. G. **Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo.** Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. 2007.

DIREITO, I.C.N. 2005. **Detecção de genes degradadores de compostos aromáticos em solos de rizosfera sob manejo convencional e orgânico.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Environmental Protection Agency (EPA). **Understanding oil spill and oil spill response.** Office of Remedy and Remedial Response, US Environmental Protection Agency (OSWER 9200.5-104A), 48 p. 1999.

GARRITY, G. M., BELL, J. A. & LILBURN, T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2ª edição. Volume 2 (*The Proteobacteria*), part B (*The Gammaproteobacteria*). Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer. 2005.

GERHARDT, K.E.; HUANG, X.; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. **Plant Science** 176: 20–30. 2009.

GOVLEV, E.L. Metabolism in Nocardia and actinomycetes. **Actinomycetes** 13: 59-101. 1978.

HUSZCZAA, E. & BURCZYK, B. Surfactin Isoforms from *Bacillus coagulans*. **Zeitschrift für Naturforschung C** 61: 727-733. 2006.

IQBAL, S.; KHALLD, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology** 21: 176-179. 1995.

JACQUES, R.J.S.; SANTOS, E.C., BENTO, F.M.; PERALBA, M.C.R.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S.; CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. **International Biodeterioration & Biodegradation** 56: 143–150. 2005.

JAFFÉ, R.; WOLFF, G.A.; CABRERA, A.C.; CARVAJAL-CHITTY, H. The Biogeochemistry of lipids in Rivers from the Orinoco Basin. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 59: 4507-4522. 1995.

JORGENSEN, K.S.; PUUSTINEN J.; SUORTTI, A.-M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environmental Pollution** 107: 245-254. 2000.

KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science** 77 (1): 116-126. 1999.

IBAMA, Ministério do Meio Ambiente. **Manual de procedimentos para fiscalização das atividades relacionadas a óleos lubrificantes usados ou contaminados: Resolução Conama nº 362/2005** – Brasília: Ibama. 2008.

LEAHY, J.G. & COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews** 54 (3): 305-315. 1990.

MANA CAPELLI, S.; BUSALMEN, J.P.; DE SANCHEZ, S.R. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation** 47: 233–238. 2001.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Effect of temperature on oil degradation by a psychrotrophic yeast in liquid culture and in soil. **FEMS Microbiology Ecology** 24: 243-249. 1997.

MENENDEZ-VEGA, D.; GALLEGRO, J.L.R.; PELAEZ, A.I.; DE CÓRDOBA, G.F.; MORENO, J.; MUÑOZ, D.; SANCHEZ, J. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. **European Journal of Soil Biology** 43: 310 – 321. 2007.

MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Produção de enzimas hidrolíticas para formulação de detergentes bioativos e avaliação da sua viabilidade econômica**. 2003. 203p. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1488: 211-218. 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL: Committee on In Situ Bioremediation. **In situ bioremediation: when does it work?** Washington DC: National Academy Press. 207p. 1998.

PEDROZO, M.F.M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais. 246p. (Cadernos de Referência Ambiental, vol.12). 2002.

PLAZA, G.A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I.M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering** 50: 71–77. 2006.

RICHARD, J.Y.; T.M. VOGEL. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation** 44: 93-100. 1999.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical and chemical processes**. Lewis Publishers. 1998.

RON, E. & ROSEMBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, 3 (4): 229-236. 2001.

RON, E. & ROSEMBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology** 13:249–252. 2002.

ROSA, A. P. & TRIGÜIS, J. A. Estudos experimentais da análise do processo de biorremediação na mitigação do impacto ambiental. **Geochemica Brasiliensis** 20(1): 5-13. 2006.

ROSENBERG E. Biosurfactants. In: **The Prokaryotes**. Edited by Dworkin M. New York: Springer-Verlag, Inc. 2006.

ROSENBERG, E.; GOTTLIEB, A.; ROSENBERG, M. Inhibition of bacterial adherence to hydrocarbons and epithelial cells by Emulsan. **Infection and Immunity** 39 (3): 1024-1028. 1983.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution** 136: 187-195. 2005.

SINDIRREFINO, www.sindirrefino.org.br, acessado em 11 de fevereiro de 2010.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN T.; BANAT, IBRAHIM M. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 24 (7): 917-925. 2007.

THAVASI, R.; SUBRAMANYAM NAMBARU V.R.M.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I.M. Biosurfactant Production by *Azotobacter chroococcum* Isolated from the Marine Environment. **Marine Biotechnology**, 11 (5): 551-556. 2009.

TOLEDO, F.L.; CALVO, C.; RODELAS, B.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. **Systematic and Applied Microbiology** 29: 244–252. 2006.

TUGRUL, T.; CANSUNAR, E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 21: 851–853. 2005.

TUMAIKINA, Y.A.; TURKOVSKAYA, O.V.; IGNATOV, V.V. Degradation of Hydrocarbons and Their Derivatives by a Microbial Association on the Base of Canadian Pondweed. **Applied Biochemistry and Microbiology** 45(4): 382–388. 2008.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. WARD, O.P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 67(4): 503-549. 2003.

VIEIRA, P.A.; VIEIRA, R.B.; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **Journal of Hazardous Materials** 140: 52–59. 2007.

YOSHIDA, N.; YAGI, K.; SATO,D.; WATANABE, N.; KUROISHI, T.; NISHIMOTO, K.; YANAGIDA, A.; KATSURAGI, T.; KANAGAWA, T.; KURANE, R.; TANI, Y. Bacterial Communities in Petroleum Oil in Stockpiles. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 99(2): 143–149. 2005.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; McINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods** 56: 339– 347. 2004.

ZHANG, H.; KALLIMANIS, A.; KOUKKOU, A.I.; DRAINAS,C. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. **Applied Microbiology and Biotechnology** 65: 124–131. 2004.

ZHANG, K.; HUA, X-F.; HAN, H-L.; WANGA, J.; MIAO, C-C.; XU, Y-Y.; HUANG, Z-D.; ZHANG, H.; YANG, J.M.; JIN, W.B.; LIU, Y-M.; LIU, Z. Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw. **Chemosphere** 73: 1387–1392. 2008.

ZINJARDE, S.S. & PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology** 42 (1): 67–73. 2002a.

ZINJARDE, S.S. & PANT, A. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. **Marine Pollution Bulletin** 44: 118–121. 2002b.

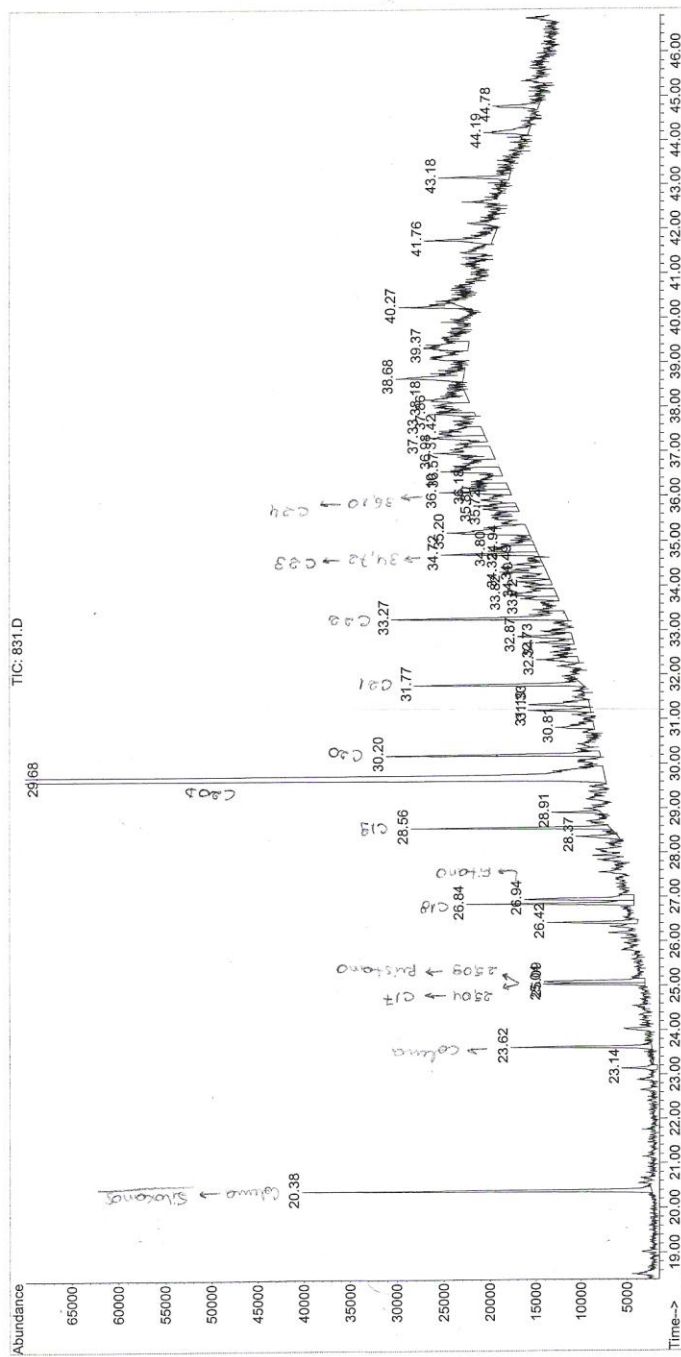
ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma do efluente incubado por 13 dias (30°C, 180 rpm) com o isolado EC01.

V = 100 µl de C_{20D} (1023,911)

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\MAPEMS3\831.D
 Operator : simone
 Acquired : 8 Dec 2009 16:34 using AcqMethod ALLFAT1
 Instrument : Instrument
 Sample Name : raquel 1
 Misc Info :
 Vial Number : 2

EC01

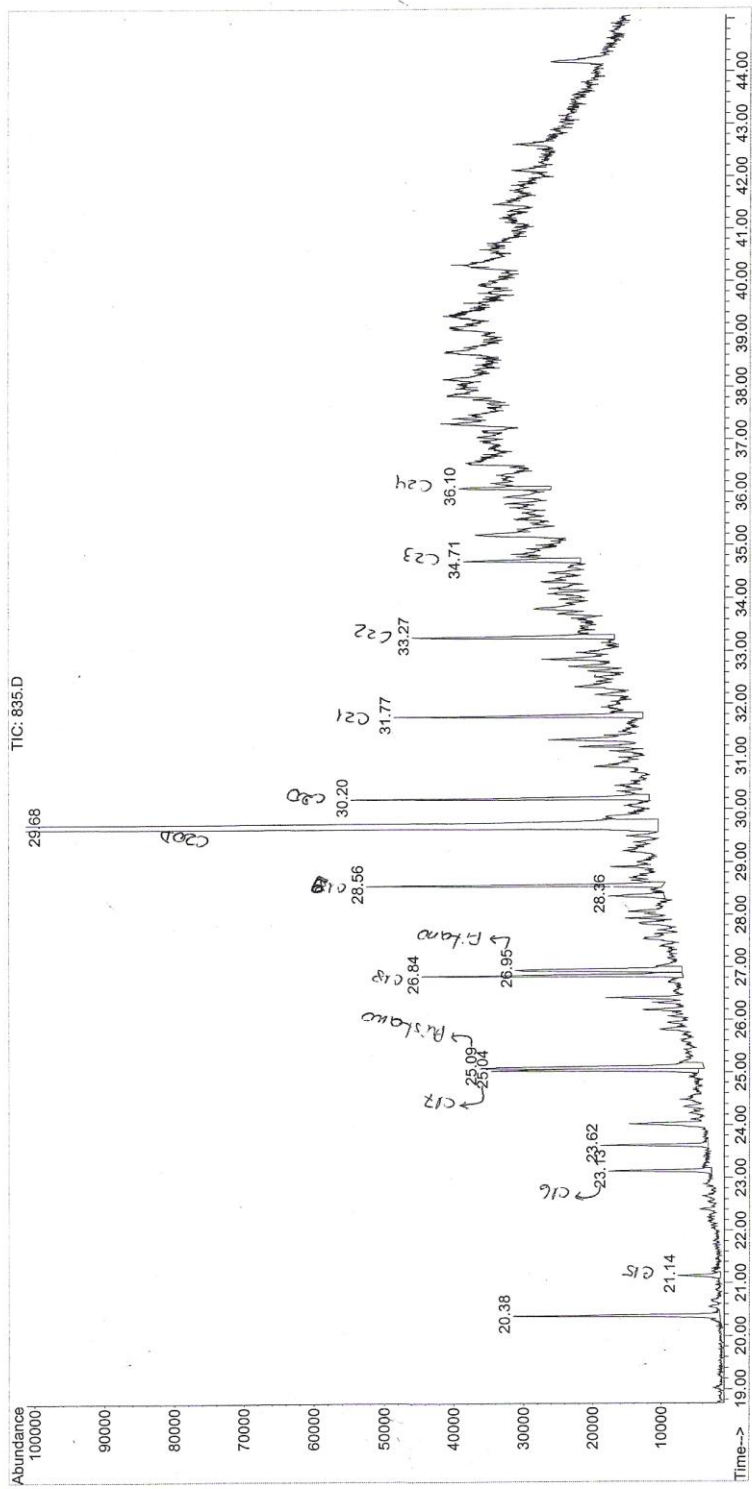


Anexo 2. Cromatograma do efluente incubado por 13 dias (30°C, 180 rpm) com o isolado BH.

V = 100 µL de C₅₀ Δ (103,2 ppm)

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\MAPEMS3\835.D
 Operator : simone
 Acquired : 8 Dec 2009 21:30 using AcqMethod ALIFATI
 Instrument : Instrumen
 Sample Name: raquel 14
 Misc Info :
 Vial Number: 6

BH 2



Anexo 3. Cromatograma do efluente incubado por 13 dias (30°C, 180 rpm) com o isolado CL.

V = 100 µL de C₂₀d (103,2 rpm)

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\MAPEMS3\842.D
 Operator : simone
 Acquired : 9 Dec 2009 6:01 using AcqMethod ALIFATI
 Instrument : Instrumen
 Sample Name: raquel 19
 Misc Info :
 Vial Number: 13

