



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**



UTILIZAÇÃO DE CONSÓRCIO MICROBIANO PARA BIORREMEDIAÇÃO DO MEIO AMBIENTE CONTAMINADO COM DERIVADOS DE PETRÓLEO

**Fábio Guimaro Dias
(Biólogo)**

**Prof^a Dr^a Lucia Regina Durrant
Orientadora**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

**CAMPINAS
SÃO PAULO – BRASIL - 2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

D543u Dias, Fábio Guimaro
Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo / Fábio Guimaro Dias. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Biorremediação. 2. Petróleo. 3. Consórcios. 4. Microcosmos. I. Durrant, Lucia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: The use of a microbial consortium for biorremediation of oil derivatives – contaminated environment

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biorremediation, Oil, Consortia, Microcosms

Titulação: Doutor em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Andrea Roberta Clemente

Marta Cristina Teixeira Duarte

Ranulfo Monte Alegre

Fabiana Fantinatti-Garboggini

Telma Teixeira Franco

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

Errata

nas páginas 10 e 11 onde se lê: (figuras 4) e (figuras 5) deve-se excluir essas informações.

na página 50 onde se lê: (os valores nas figuras estão em porcentagem de redução comparadas com o controle) deve-se excluir essa informação.

nas páginas 51 e 52 figuras 12 e 13 onde se lê: % de redução da tensão superficial para as cepas.

Leia-se: redução da tensão superficial para as cepas.

na página 62 onde se lê: Os resultados obtidos indicam que houve uma maior degradação para o experimento 3, onde os hidrocarbonetos, fenantreno, antraceno e fenildecano, foram degradados em 100% e, o benzeno em 41,23%.

Leia-se: Os resultados obtidos indicam que houve uma maior degradação para o experimento 2, onde os hidrocarbonetos, fenantreno, antraceno e fenildecano, foram degradados em 100% e, o benzeno em 76,58%.

nas páginas 62 e 63 onde se lê: Já para o experimento 2 houve uma degradação de 76,58% para o benzeno e de 100% para o fenantreno e benzeno.

Leia-se: Já para o experimento 3 houve uma degradação de 41,32% para o benzeno e de 100% para o fenantreno, antraceno e fenildecano.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr^a. Lucia Regina Durrant
(Orientadora)**

**Prof. Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte
(Membro)**

**Dr^a. Fabiana Fantinatti-Garboggini
(Membro)**

**Prof. Dr^o. Ranulfo Monte Alegre
(Membro)**

**Prof. Dr^a. Telma Teixeira Franco
(Membro)**

**Dr^a. Andréa Roberta Clemente
(Membro)**

Deves ensinar a teus filhos que o chão debaixo de seus pés são as cinzas de nossos antepassados; para que tenham respeito ao país, conta a teus filhos que a riqueza da terra são as vidas da parentela nossa. Ensina a teus filhos o que temos ensinado aos nossos: que a terra é nossa mãe. Tudo quanto fere a terra - fere os filhos da terra. Se os homens cospem no chão, cospem sobre eles próprios.

De uma coisa sabemos. A terra não pertence, ao homem: é o homem que pertence à terra, disso temos certeza. Todas as coisas estão interligadas, como o sangue que une uma família. Tudo está relacionado entre si. Tudo quanto agride a terra, agride os filhos da terra. Não foi o homem quem teceu a trama da vida: ele é meramente um fio da mesma. Tudo o que ele fizer à trama, a si próprio fará

Discurso feito pelo Chefe Seattle ao Presidente Franklin Pierce em 1854.

(depois do Governo Americano ter dado a entender que desejava adquirir o Território da Tribo)

Aos meus pais Walter e Neide, aos meus irmãos Walney e Luciani que sempre me apoiaram e me incentivaram nesta empreitada.

A minha filha Gabriela que é e sempre será o motivo de inspiração na minha vida

A minha esposa Elisangela que sempre me apoiou nos momentos difíceis da tese

Dedico

Agradecimentos

A Prof. Lucia Regina Durrant pela oportunidade de estar desenvolvendo o projeto e pela orientação que foi dada

A FAPESP pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do trabalho

Ao aluno de iniciação científica Ricardo pela ajuda no desenvolvimento do projeto

Aos amigos do laboratório Emerson (Didi), Cristiano, Eder (Galo), Elisangela, Isis, Andréia, Maricy, Kethlen, Roberto, Francine pela amizade e momentos de descontração passados juntos

Ao Marquinho, Jardete e Marcão pela amizade e eficiência nos momentos em que precisei

Ao Cosme pelas informações prestadas e pelo exemplo de funcionário que é

Ao pessoal do centro de informática, Estefane, Eduardo, Marçal pela assistência dada no desenvolvimento da tese

Aos membros da banca pelas correções e sugestões que fizeram engrandecer o trabalho

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS -----	X
ÍNDICE DE TABELAS -----	XIII
RESUMO -----	XIV
ABSTRACT -----	XVI
1 – INTRODUÇÃO -----	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	3
2.1. IMPORTÂNCIA DA REMEDIAÇÃO DE POLUENTES DE PETRÓLEO -----	3
2.1.1. Hidrocarbonetos nos alimentos -----	7
2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEO BRUTO E DERIVADOS DE PETRÓLEO -----	8
2.3. PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS NO AMBIENTE -----	11
2.4. O USO DE MICRORGANISMOS NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS -----	14
2.5. IMPORTÂNCIA DOS BIOSURFACTANTES NA BIORREMEDIAÇÃO -----	15
2.6. IMPORTÂNCIA DOS NUTRIENTES NA BIORREMEDIAÇÃO -----	17
2.7. TOXICIDADE DE PRODUTOS DA BIODEGRADAÇÃO -----	18
2.8. CONSÓRCIO MICROBIANO -----	20
2.9. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS -----	21
3 – OBJETIVOS -----	23
4 – MATERIAL E MÉTODOS -----	24
4.1. REATIVAÇÃO DE LINHAGENS PRESERVADAS SOB CONGELAMENTO -----	24
4.2. AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS -----	26
4.3. ETAPAS DO ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO -----	29
4.3.1. Inoculação das bactérias em meio mínimo de sais contendo hidrocarbonetos -----	29
4.3.2. Crescimento celular e avaliação do pH -----	30
4.3.3. Porcentagem de degradação -----	30
4.3.3.1. Extração -----	30
4.3.3.2. Análise cromatográfica -----	30
4.3.4. Produção de biossurfactantes -----	31
4.3.4.1. Determinação da tensão superficial -----	31
4.3.4.2. Determinação da atividade de emulsificação -----	31

4.4. TESTE DE TOXICIDADE COM SEMENTES DE ALFACE CULTIVAR LISA NACIONAL -----	33
4.5. AVALIAÇÃO DO TAMANHO DO INÓCULO NA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO BRUTO EM MEIO MÍNIMO DE SAIS -----	33
4.6. OTIMIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO BRUTO PELO CONSÓRCIO FORMULADO EM MICROCOSMO UTILIZANDO UM SOLO SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO -----	35
4.6.1. Evolução de C-CO ₂ no experimento em microcosmos utilizando solo sem histórico de contaminação-----	39
4.6.2. Análise por Cromatografia Gasosa dos hidrocarbonetos presentes no óleo bruto utilizado no microcosmo com solo sem histórico de contaminação -----	39
4.7. AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO BRUTO PELO CONSÓRCIO MICROBIANO EM MICROCOSMO UTILIZANDO SOLO DO LANDFARMING DA REPLAN (PETROBRAS) -----	40
4.8. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO ÓLEO PELO CONSÓRCIO MICROBIANO LIOFILIZADO COM E SEM FONTE DE NUTRIENTE -----	41
4.9. IDENTIFICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SEQÜÊNCIA DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S-----	42
4.9.1. Quantificação de DNA extraído por eletroforese-----	43
4.9.2. Amplificação de fragmentos de DNA 16S pela técnica de PCR -----	44
4.9.3. Sequenciamento do Gene 16S rRNA -----	44
4.9.3.1. Análise filogenética das seqüências-----	45
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	47
5.1. CRESCIMENTO CELULAR-----	47
5.1.1. Avaliação do pH-----	49
5.2. DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL -----	50
5.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO -----	52
5.3.1. Emulsificação tipo O/A-----	52
5.3.2. Formação de Halo - Emulsificação do tipo A/O-----	53
5.4. AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO-----	54
5.5. TESTES DE TOXICIDADE-----	59
5.5.1. Hidrocarbonetos Lineares -----	60
5.5.2. HPA's -----	61
5.6. AVALIAÇÃO DO TAMANHO DO INOCULO NA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO BRUTO EM MEIO MÍNIMO DE SAIS.-----	62
5.7. OTIMIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO BRUTO PELO CONSÓRCIO FORMULADO EM MICROCOSMOS COM SOLO SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO-----	63

5.7.1. Evolução de C-CO₂ no experimento em microcosmos	68
5.8. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA DOS HIDROCARBONETOS PRESENTES NO ÓLEO BRUTO UTILIZADO NO MICROCOSMO COM SOLO DE LANDFARMING	82
5.9. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO ÓLEO PELO CONSÓRCIO MICROBIANO LIOFILIZADO COM E SEM FONTE DE NUTRIENTE	84
5.10. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS PRESENTES NO CONSÓRCIO MICROBIANO ATRAVÉS DE ANÁLISES DE SEQÜÊNCIAS DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S	85
6. CONCLUSÕES:	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: PRINCIPAIS ATIVIDADES DE ORIGEM DAS ÁREAS CONTAMINADAS.....	6
FIGURA 2: ESTÁGIO DE ATENDIMENTO ÀS ÁREAS CONTAMINADAS DO ESTADO DE	6
FIGURA 3: COMPONENTE B.T.X., COMPOSTO PELO BENZENO (A), TOLUENO (B) E XILENO (C), RESPECTIVAMENTE.....	9
FIGURA 4: FÓRMULA MOLECULAR E ESTRUTURA QUÍMICA DOS HIDROCARBONETOS UTILIZADOS.....	28
FIGURA 5: AVALIAÇÃO DE EMULSÃO TIPO O/A (1) E A/O (2)	32
FIGURA 6: ESQUEMA PARA AVALIAÇÃO DE EMULSÃO TIPO O/A (1) E A/O (2).....	32
FIGURA 7: FOTOS DO EXPERIMENTO CONDUZIDO DURANTE 53 DIAS.	38
FIGURA 8: PESO SECO DAS LINHAGENS EM HPA E HIDROCARBONETOS LINEARES.	47
FIGURA 9: PESO SECO DAS LINHAGENS EM HPA E HIDROCARBONETOS LINEARES.	47
FIGURA 10: PH DO MEIO NO FINAL DO EXPERIMENTO PARA AS LINHAGENS DE 1 A 22.....	49
FIGURA 11: PH DO MEIO NO FINAL DO EXPERIMENTO PARA AS LINHAGENS DE 23 A 44.....	49
FIGURA 12: % DE REDUÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL PARA AS CEPAS 1 À 22.....	51
FIGURA 13: % DE REDUÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL PARA AS CEPAS 23 À 44.....	52
FIGURA 14: CAPACIDADE DE EMULSIFICAÇÃO DO TIPO O/A (LINHAGENS 1-22).....	53
FIGURA 15: CAPACIDADE DE EMULSIFICAÇÃO DO TIPO O/A (LINHAGENS 23-44).....	53
FIGURA 16: DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS PELAS LINHAGENS ESTUDADAS.....	56
FIGURA 17: DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS PELAS LINHAGENS ESTUDADAS.....	57

FIGURA 18: AVALIAÇÃO DO TAMANHO DO INÓCULO NA DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS EM MEIO MÍNIMO PELO CONSÓRCIO FORMULADO.....	62
FIGURA 19: DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS EM SOLOS SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO PARA OS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO DE 1 A 13.....	63
FIGURA 20: DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS EM SOLOS SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO PARA OS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO DE 14 A 27.....	64
FIGURA 21: DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS EM SOLOS SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO PARA OS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO DE 1 A 13.....	65
FIGURA 22: DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS EM SOLOS SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO PARA OS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO DE 14 A 27.....	66
FIGURA 23: CURVA DE CONTORNO PARA FONTE DE FERRO E NITROGÊNIO.....	73
FIGURA 24: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA FONTE DE FERRO E NITROGÊNIO.....	73
FIGURA 25: CURVA DE CONTORNO PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE DE FERRO E FÓSFORO.....	75
FIGURA 26: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE DE FERRO E FÓSFORO.....	75
FIGURA 27: CURVA DE CONTORNO PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO E TAMANHO DO INÓCULO.....	76
FIGURA 28: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO E TAMANHO DO INÓCULO.....	76
FIGURA 29: ÁREA DE CONTORNO PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE FERRO E TAMANHO DO INÓCULO.....	78
FIGURA 30: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE FERRO E TAMANHO DO INÓCULO.....	78
FIGURA 31: ÁREA DE CONTORNO PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE DE FÓSFORO E TAMANHO DO INÓCULO.....	79
FIGURA 32: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE DE FÓSFORO E TAMANHO DO INÓCULO.....	79

FIGURA 33: CURVAS DE CONTOURNO PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE DE FÓSFORO E NITROGÊNIO.....	80
FIGURA 34: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA C-CO₂ EM FUNÇÃO DA FONTE DE FÓSFORO E NITROGÊNIO.....	80
FIGURA 35: PORCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS ANALISADOS EM MICROCOSMO UTILIZANDO SOLO DO LANDFARMING DA REPLAN PETROBRAS	83
FIGURA 36: PORCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS ANALISADOS EM MICROCOSMO UTILIZANDO SOLO DO LANDFARMING DA REPLAN PETROBRÁS PELO CONSÓRCIO LIOFILIZADO COM NUTRIENTE (EXPERIMENTO 5) E SEM NUTRIENTE (EXPERIMENTO 6).....	84
FIGURA 37: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,7% PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA EXTRAÍDO.	85
FIGURA 38: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,7% PARA CONFIRMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR.....	86
FIGURA 39: ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA SEQÜÊNCIA DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S DAS LINHAGENS DO CONSÓRCIO MICROBIANO (COM SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS DE HOMOLOGIA PELO NCBI) CONSTRUÍDA PELO MÉTODO “NEIGHBOUR JOINING”. A ÁRVORE FOI ENRAIZADA UTILIZANDO-SE O GENE RNA RIBOSSOMAL 16S DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> COMO UM GRUPO EXTERNO. OS VALORES ACIMA DAS LINHAS SÃO VALORES DE BOOTSTRAP OBTIDOS COM 1000 REPLICAÇÕES.	87

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ALGUNS TIPOS DE ÓLEOS	10
TABELA 2: LINHAGENS DA COLEÇÃO DE CULTURAS DO LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA E FISILOGIA MICROBIANA, ISOLADAS DE SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL. TODAS AS LINHAGENS FORAM TESTADAS QUANTO AO USO DOS HIDROCARBONETOS COMO FONTE DE CARBONO	24
TABELA 3: COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO DE SAIS (M.M.S.):	27
TABELA 4: HIDROCARBONETOS UTILIZADOS NOS TESTES DE BIODEGRADAÇÃO	27
TABELA 5: ANÁLISE DOS NUTRIENTES DO SOLO PELO IAC.	35
TABELA 6: VALORES REAIS E CODIFICADOS DO EXPERIMENTO.	37
TABELA 7: PORCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO OBSERVADA PARA OS MICRORGANISMOS COM MELHOR DESEMPENHO.	54
TABELA 8: RESULTADOS EM PORCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO DAS MELHORES LINHAGENS.	58
TABELA 9: CONCENTRAÇÃO EFETIVA (EC_{50}) PARA OS HIDROCARBONETOS LINEARES.	59
TABELA 10: CONCENTRAÇÃO EFETIVA (EC_{50}) PARA OS HPA'S.	60
TABELA 11: PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO COM OS VALORES CODIFICADOS E REAIS.	69
TABELA 12: COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA C-CO ₂ .	71
TABELA 13: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA C-CO ₂ (ANOVA).	71

Resumo

Neste trabalho foi formulado um consórcio microbiano para avaliação de seu potencial em degradar petróleo e seus derivados, em microcosmos e meio mínimo de saís. As 43 bactérias testadas na primeira fase do projeto demonstraram alguma propriedade que as classificam como potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos. Todavia, as cepas 1, 9, 22, 23 e 36 demonstraram os melhores e mais homogêneos resultados em praticamente todos os parâmetros analisados, sendo estas, portanto, as cinco cepas selecionadas para a formulação do consórcio. As cepas do consórcio propiciaram uma degradação média para todos os hidrocarbonetos testados de 62,65% para cepa 1, 61,12% para a cepa 9, 53,77% para a cepa 22, 57,87% para a cepa 23 e de 44,03% para a cepa 36. Com exceção de alguns HPA's degradados por determinadas cepas, a grande maioria não foi totalmente biodegradado, fato que pode ser comprovado pelos baixos valores de EC_{50} , e, com isso, altos valores de toxicidade aguda. No experimento realizado em microcosmo, avaliando-se a evolução de C-CO₂ por modelos estatísticos, pode-se concluir que a melhor condição para a maximização desse parâmetro foi na condição do ponto central para a fonte de nitrogênio (0,10 g/100g de solo), ferro (0,0015 g/100g de solo) e inóculo (0,6ml/100 g de solo) e, na condição de +2 para a fonte de fósforo (0,08 g/100g de solo). Com este experimento foram fixadas as condições ótimas para uma melhor evolução de C-CO₂ em solos contaminados. No mesmo experimento, analisando a degradação dos hidrocarbonetos por cromatografia gasosa, foi obtida uma melhor degradação para o experimento 3 (uréia 0,07 g/100g de solo, fosfato de potássio 0,065 g/100 g de solo, Sulfato de ferro 0,001 g/100 g de solo, e inoculo 0,4 ml/100 g de solo), com uma degradação de 70,74% dos hidrocarbonetos. Nos microcosmos utilizando solo da REPLAN (Refinaria de Paulínia/PETROBRAS), com histórico de contaminação, foi obtida uma melhor degradação para os hidrocarbonetos analisados de 75% quando se utilizou a bioestimulação e de 51,7% quando se utilizou a bioaumentação e bioestimulação juntas. Para os microcosmos utilizando o consórcio liofilizado, foi obtida uma degradação de 57,85% para o liofilizado sem

nutriente e, de 67% para o liofilizado com nutriente. As linhagens foram identificadas através da técnica do RNA 16S, como sendo pertencentes a gênero *Bacillus*, exceto o microrganismo 23, cuja identificação não foi possível através dos resultados obtidos, o consórcio microbiano tem potencial para ser aplicado em áreas contaminadas com petróleo e seus derivados.

Abstract

In this work, a microbial consortium was evaluated regarding to its potential to degrade oil and derivatives, using microcosms in salt minimal medium. Forty three bacteria were tested in the first phase of this project to demonstrate some properties that could identify them as potentially degraders of hydrocarbons. The strains 1, 9, 22, 23 and 36 showed the best and homogeneous results in practically all the analyzed parameters, and five strains were selected to be part of the bacterial consortium. These strains had an average degradation of 62.65% for the strain 1; 61.12% for the strain 9; 53.77% for the strain 22; 57.87% for the strain 23; and 44.03% for the strain 36. Some PAHs were not completely degraded by some strains, and this fact could be proven by the low values of EC_{50} , with production of high values of acute toxicidade. In the microcosm experiments, the C-CO₂ evolution was performed using statistical models, which could be concluded that the best condition for the maximization of this parameter was in the central point condition for the nitrogen source (0.10g/100g of soil), iron (0.0015g/100g of soil) and inoculum (0,6ml/100g of ground), using the condition of +2 for the phosphorus source (0.08g/100g of soil). In this experiments could be set an excellent condition for a better evolution of C-CO₂ in contaminated soil. In the same experiment, analyzing the degradation of the hydrocarbons in GC-FID, a better degradation was obtained for the experiment 3 (urea 0,07g/100g of soil, potassium fosfate 0.065g/100g of soil, iron sulphate 0.001g/100g of ground, and inoculum of 0.4 ml/100g of soil), reaching hydrocarbons degradation of 70.74%. In the microcosms using the REPLAN (PAULINIA REFINARY/PETROBRAS) soil with previous contamination history, the best degradation of 75% was promoted when bioestimulating, and 51.7% when this soil was bioaugmented with the bacterial consortium and also bioestimulated. For the microcosms using the lyofilized consortium, a degradation of 57.85% was verified without nutrient, and 67% with nutrient. The strains were identified through the RNA 16S sequencing as Bacillus genus, excepting to the strain 23, whose results of sequencing identification was not possible in this time. These results showed that the microbial consortium has a

potential application in contaminated areas with oil and derivatives.

1 – INTRODUÇÃO

Petróleo e seus derivados continuam a ser nossa principal fonte de energia tornando necessário o transporte destes compostos dos locais de produção para diferentes locais de consumo em torno do mundo, seja através de oleodutos, por terra ou por mar.

Constantemente recebemos informações pelos meios de comunicação sobre os desastres ecológicos e sociais resultantes de acidentes causados por despejo de petróleo e seus derivados levando a destruição do “habitat” de animais e plantas aquáticas, bem como a devastação de toda a fauna e flora circundante, assim como sérios riscos de saúde para os habitantes locais. Para exemplificar, podemos citar o derramamento de óleo pelo petroleiro Prestige , em novembro de 2002, no litoral da Espanha o que resultou no o derramamento de 77 mil toneladas do óleo que transportava. Segundo Du Peron Ribeiro, professor do Departamento de Engenharia Oceânica da UFRJ, esse não foi o maior vazamento de petróleo da História em relação ao volume derramado, mas em termos relativos talvez seja o mais grave (GLOBONEWS, 2002). Outros exemplos acidentes ambientais, com elevado derramamento de óleo aconteceram em 1978, envolvendo o navio petroleiro Amoco Nadiz, o qual derramou 200 mil toneladas de petróleo na costa da França, e em 1991, durante a Guerra do Golfo, que contaminou o Kuwait com 820 mil toneladas de óleo (CRAPEZ, 2002). Estima-se que de 3,2 bilhões de toneladas de óleo produzido por ano, 3,2 milhões de toneladas contaminam o ambiente marinho (CHHATRE et al., 1996).

Em um recente levantamento realizado no Estado de São Paulo, em outubro de 2003, pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, órgão ambiental do estado, foram confirmadas 727 áreas contaminadas, sendo os postos de combustíveis, com 464 (63%) dos casos confirmados, a principal atividade contaminante. Outro setor de destaque foi o de bases de petróleo, cujas atividades tem ações de controle mais intensivas por parte do

órgão. Do restante, 263 (27%), representam indústrias (22%) e disposição de resíduos (6%), e também tem, como os principais contaminantes, os derivados de petróleo. Ainda de acordo com o levantamento, das 727 áreas, apenas 14 (2%), já tiveram sua remediação concluída, enquanto que 402 (55%) ainda faltam avaliações detalhadas ou propostas de remediação, e 312 (43%) tem proposta de remediação ou remediação em andamento (CETESB, 2003a).

A biotecnologia tem se destacado ao longo dos últimos anos como uma solução efetiva para a eliminação de diversos poluentes, entre eles os produtos do petróleo, óleo bruto e graxas, sendo esta denominada de biorremediação. A literatura cita grande variedade de microrganismos, principalmente bactérias e fungos filamentosos, que tem demonstrado habilidade em degradar ou transformar as substâncias químicas presentes no petróleo (KORDA et al., 1997). No entanto, o que se observa é que uma única espécie isoladamente não consegue degradar todos os componentes do petróleo, que nada mais é que uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Sob condições favoráveis um microrganismo consegue degradar um tipo ou uns poucos componentes ao mesmo tempo (KORDA et al., 1997).

Vários autores têm proposto a utilização de culturas mistas para fins de biorremediação (RAMBELOARISOA et al., 1984; CHHATRE et al., 1996; TANO-DEBRAH et al., 1999; VENOSA et al., 1999).

Com a utilização de um consórcio microbiano formado por bactérias de ocorrência natural, especialmente selecionadas, o trabalho tem o objetivo de acelerar os processos de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, removendo os compostos tóxicos e de difícil degradação.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância da remediação de poluentes de petróleo

Desde a revolução industrial, com a utilização cada vez mais acentuada dos combustíveis fósseis, principalmente o petróleo, aliado ao atual sistema de produção e consumo cada vez mais depredativo destes recursos, e uma densidade demográfica nunca antes vista, a humanidade está, cada vez mais, tomando consciência de que tudo que o planeta nos fornece é limitado, e que os desequilíbrios provocados por todos estes fatores podem trazer conseqüências inimagináveis à biosfera. Segundo especialistas, a humanidade já ultrapassou em 20% a capacidade de reposição dos ecossistemas (NOVAES, 2002).

Petróleo e seus derivados continuam a ser nossa principal fonte de energia tornando necessário o transporte destes compostos dos locais de produção para diferentes locais de consumo em torno do mundo, seja através de oleodutos, por terra ou por mar.

Constantemente recebemos informações pelos meios de comunicação sobre os desastres ecológicos e sociais resultantes de acidentes causados por despejo de petróleo e seus derivados levando a destruição do “habitat” de animais e plantas aquáticas, bem como a devastação de toda a fauna e flora circundante, assim como sérios riscos de saúde para os habitantes locais. Como exemplo, podemos citar o derramamento de óleo pelo petroleiro Prestige , em novembro de 2002, no litoral da Espanha. Segundo especialistas esse pode se tornar o mais grave derramamento de petróleo da história. Isso se deve ao fato do vazamento ter ocorrido perto da costa, onde se encontra a maior diversidade de vida marinha. Estima-se que 10 mil toneladas, das 77 mil que transportava, tenham vazado antes que ele naufragasse. Segundo Du Peron Ribeiro, professor do Departamento de Engenharia Oceânica da UFRJ, esse não é o maior vazamento de petróleo da História em relação ao volume derramado, mas em termos relativos talvez seja o mais grave (GLOBONEWS, 2002). Outros exemplos de acidentes

ambientais, com elevado derramamento de óleo, aconteceram em 1978, envolvendo o navio petroleiro Amoco Nadiz, o qual derramou 200 mil toneladas de petróleo na costa da França, e em 1991, durante a Guerra do Golfo, que contaminou o Kuwait com 820 mil toneladas de óleo. (CRAPEZ, 2002).

Estima-se que de 3,2 bilhões de toneladas de óleo produzido por ano, 3,2 milhões de toneladas entram no ambiente marinho (CHHATRE et al., 1996). No Brasil, podemos citar inúmeros acidentes desta natureza, tais como o choque entre navios no porto de Santos, em julho de 1998, levando ao despejo de mais de duas toneladas de óleo combustível, provocando uma mancha de mais de cinco quilômetros de extensão; ou em abril de 1999, quando seis praias da região de São Sebastião (litoral norte de São Paulo) foram afetadas por um vazamento de petróleo de um emissário submarino da Petrobrás; e em janeiro de 2000, a baía de Guanabara apareceu coberta por uma mancha de óleo de cerca de 40 quilômetros quadrados, atingindo a área de proteção ambiental de Guapimirim, provocada pelo vazamento de 800 mil litros de combustível de um duto da Petrobrás (KUSHIDA, 2000). O último acidente no país ocorreu no dia 15 de novembro de 2004, quando o navio Vicuña, de bandeira chilena, explodiu no porto de Paranaguá, estado do Paraná, ocasionando o lançamento de aproximadamente 5.000 toneladas de metanol e um volume ainda não quantificado de óleo combustível no meio ambiente (CETESB, 2004c). Além da morte de inúmeros animais marinhos, prejuízos sociais foram confirmados, e na ocasião, a Defesa Civil do estado cadastrou os pescadores da região para posterior envio de mantimentos, já que os mesmos estão proibidos de realizarem seus trabalhos de pesca em geral, principalmente de ostras (CETESB, 2004c).

Os acidentes desta natureza são intensamente noticiados devido a sua magnitude, porém acidentes com vazamentos de derivados de petróleo por outras formas ocorrem com muito mais frequência do que imaginamos, causando sérios problemas, muitas vezes de uma forma silenciosa (HEISER, 1999), levando a contaminação do solo, lençóis freáticos, ar e águas continentais. Podemos citar

uma oficina de reparos de caminhões transportadores de derivados de petróleo, onde devido ao risco de explosões durante a soldagem, os compartimentos destes caminhões são previamente lavados com jatos de vapor d'água. O destino desta água de lavagem é um reservatório de cimento ao ar livre, onde permanece para a sedimentação da borra, sem nenhum outro tratamento. Um afluente do rio Atibaia próximo a oficina, acaba recebendo constantemente este efluente oleoso. O rio Atibaia é um dos responsáveis pelo abastecimento de água na região de Campinas (JACOBUCCI, 2000).

Fatos como estes são também comprovados pelo mais recente levantamento realizado no Estado de São Paulo, de outubro de 2003, pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, órgão ambiental do estado. Nesse levantamento, foram confirmadas 727 áreas contaminadas, sendo, como principais atividades contaminantes, os postos de combustíveis, com 464 (63%) dos casos confirmados. Outro setor de destaque foi o de bases de petróleo, atividades estas com ações de controle mais intensivas por parte do órgão. Do restante, 263 (27%), representam indústrias (22%) e disposição de resíduos (6%), e também tem, como principais contaminantes, os derivados de petróleo, conforme (Figura 1).

Ainda, o levantamento da CETESB (2003 a) mostrou que das 727 áreas contaminadas, apenas apenas 14 (2%), já tiveram sua remediação concluída, enquanto que 402 (55%) ainda faltam avaliações detalhadas ou propostas de remediação, e 312 (43%) com proposta de remediação ou remediação em andamento (Figura 2).

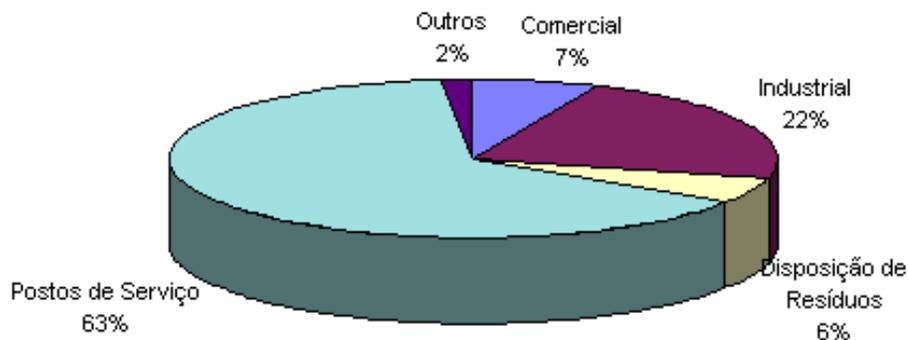


FIGURA 1: Principais atividades de origem das áreas contaminadas.

FONTE: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, Divulgação de Nova Lista de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo. 2003. 7p. Disponível em: http://cetesbnet/Destaques/2003/outubro/291003_areas_contaminadas.htm
 Acesso em: 11 dez. 2003a.

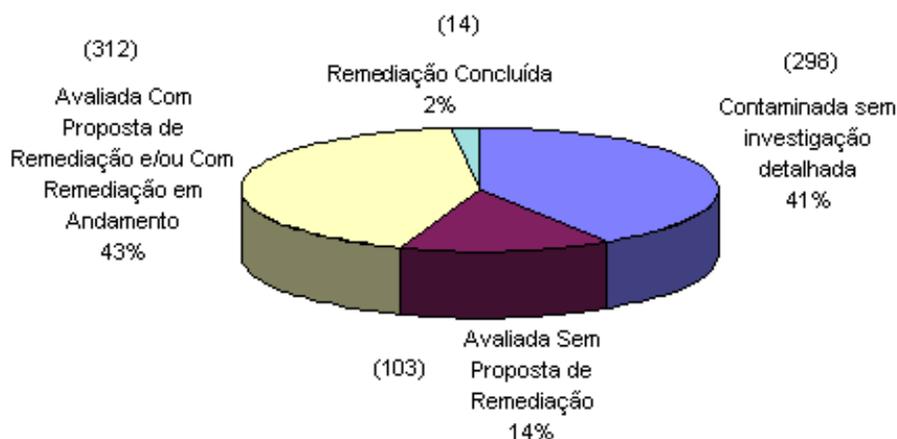


FIGURA 2: Estágio de atendimento às áreas contaminadas do Estado de São Paulo

FONTE: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, Divulgação de Nova Lista de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo. 2003. 7p. Disponível em: http://cetesbnet/Destaques/2003/outubro/291003_areas_contaminadas.htm
 Acesso em: 11 dez. 2003a.

Existe uma série de propostas voltadas a solucionar os danos desta natureza, envolvendo métodos químicos, físicos e biológicos. A biotecnologia tem se destacado ao longo dos últimos anos como uma solução efetiva para a eliminação de diversos poluentes, entre eles os produtos do petróleo, óleo bruto e graxas, sendo denominada de biorremediação. A literatura cita uma grande variedade de microrganismos, principalmente bactérias e fungos filamentosos, que tem demonstrado habilidade em degradar ou transformar as substâncias químicas presentes no petróleo (KORDA et al., 1997). No entanto, o que se observa é que uma única espécie isoladamente não consegue degradar todos os componentes do petróleo, que nada mais é que uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Sob condições favoráveis um microrganismo consegue degradar um tipo ou uns poucos componentes ao mesmo tempo (KORDA et al., 1997).

2.1.1. Hidrocarbonetos nos alimentos

Na natureza, a biossíntese de alguns HPAs (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos) ocorre em algumas plantas e microrganismo naturalmente (WILSON & JONES, 1993). Porém esta pode ser considerado uma fonte pouco significativa quando comparada às de origem antrópica.

Os alimentos são considerados importantes fontes de exposição humana aos HPAs, havendo inclusive estudos que os relacionam a algumas etiologias de câncer (DE VOS et al., 1990). A contaminação de alimentos por HPAs pode ocorrer por diferentes formas, incluindo contato com solo, ar e água contaminados e pelo emprego de algumas técnicas de processamento e industrial, como secagem, defumação, tostagem e grelhagem (HOWARD & FAZIO, 1980; GRASSO, 1984; LARSSON, 1986; BARTLE, 1991; CAMARGO, 2000, PHILLIP, 1999). ZABIK et al.(1996) mostraram que peixes defumados ricos em gordura, assim como as carnes vermelhas, são fonte significativa de exposição aos HPAs.

TAKATSUKI et al. (1985) analisaram pescados de uma área não industrializada do Japão e observaram em filés de várias espécies de peixe

contaminação abaixo do limite referencial para Benzo-a-pireno e quantidades superiores a 3 μ g/Kg nos mariscos. Os peixes, em geral, conseguem biotransformar os HPAs de forma muito mais eficiente que os moluscos. Nestes últimos a contaminação persiste por longos períodos e, quando são coletados em locais poluídos, podem apresentar contaminação com HPAs na ordem de mg/Kg (PHILLIPS, 1999).

McLEESE et al. (1987) investigaram o acúmulo de HPAs em pescados de interesse comercial, expostos a água e sedimentos contaminados. Os resultados mostraram que mexilhões, mariscos, e camarões tendem a incorporar este poluente nos seus tecidos em períodos relativamente curtos (4 dias), tornando-os importantes fontes de HPAs para o homem.

Os HPAs encontram-se concentrados nos sedimentos marinhos, principalmente em águas costeiras, onde estão disponíveis principalmente para peixes que se alimentam do fundo e para organismos filtradores (PHILLIPS, 1999). Bivalvos, devido a sua capacidade de filtrar eficientemente as partículas suspensas na água do mar, podem estar cronicamente expostos a sedimentos contendo HPAs em estuários poluídos (PRUEL et al., 1987; BAUMARD et al., 1999).

2.2. Composição química de óleo bruto e derivados de petróleo

O petróleo é derivado de matéria de origem biológica, como restos de plantas e animais, que, após sedimentação em depósitos argilosos, sofreram decomposição por bactérias aeróbicas e anaeróbicas, sendo transformados por altas pressões e temperaturas e incorporados por água, ácidos, enxofre e outros produtos inorgânicos presentes naturalmente no meio (CETESB, 2004a). Têm como características físicas o estado líquido, oleoso, insolúvel e menos denso que a água, de coloração variando entre pardo escuro e negro, sendo uma mistura complexa de hidrocarbonetos, com 98% de predominância, contendo ainda nitrogênio, oxigênio e enxofre como importantes elementos químicos presentes em

menor quantidade, e ainda metais como níquel, vanádio, cobre e até urânio. A composição física e química do petróleo bem heterogênea de local para local, influenciada por vários fatores ambientais, como diferentes temperaturas, pressões, tipos de sedimentos e rochas além das características dos elementos originalmente decompostos. A tabela 1 mostra a característica do óleo bruto e alguns compostos derivados de petróleo (CETESB, 2004a).

Estes compostos podem ser constituídos de poucos carbonos, como é o caso do metano (CH_4), até cadeias contendo inúmeros destes elementos, estando constituídos de ligações abertas entre si, formando cadeias carbônicas, até ligações cíclicas, ou aromáticas, formando anéis benzênicos, como por exemplo o benzeno, tolueno e xileno. Suas fórmulas químicas estão descritas a seguir, na figura 3.

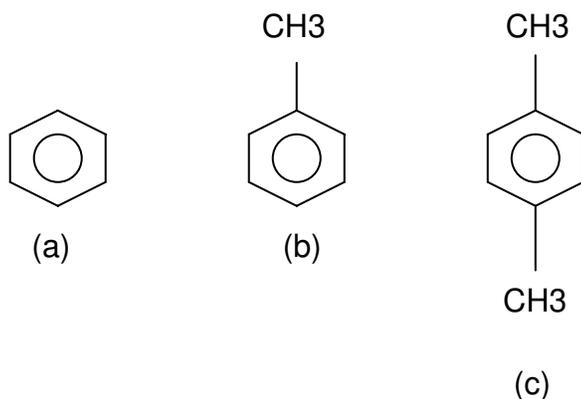


FIGURA 3: Componente B.T.X., composto pelo benzeno (a), tolueno (b) e xileno (c), respectivamente.

Fonte: SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro, v.1, 777p, 1996.

Após os processos de refino ou destilação, muitos são os produtos derivados do petróleo, tais como óleo diesel, gasolina, polímeros, querosene, etc., também constituídos de uma mistura complexa de hidrocarbonetos diferentes e que, igualmente, possuem carga poluidora muito grande quando em contato com o

meio ambiente (BAIRD, 2002).

A gasolina possui muitos compostos tóxicos, sendo que o principal é o benzeno, um conhecido carcinógeno. Estão presentes também outros supostos carcinógenos tais como compostos aromáticos e aditivos oxigenados (PRO-ACT, 1999).

No óleo diesel, compostos toxicologicamente relevantes como benzeno, tolueno, etil benzeno e xileno são encontrados, sendo também comum alquil benzenos (C3 e C4) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA's) tais como: naftaleno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno e pireno (IPCS, 1996).

TABELA 1: Características físicas de alguns tipos de óleos

	Gravidade específica (15 C)	Grau API 15 C	Viscosidade cs (38C)	Ponto de pureza (°C)	Ponto de ignição (°C)	Ponto de ebulição (°C)
Óleo cru	0,8 a 0,95	5 a 40	20 a 1000	- 35 a 10	variável	30 a 500
Gasolina	0,65 a 0,75	60	4 a 10	na	- 40	30 a 200
Querozene	0,8	50	1,5	na	55	160 a 290
Óleo comb. nº 2	0,85	30	1,5	- 20	55	180 a 360
Óleo comb. nº 4	0,9	25	50	- 10	60	180 a 360
Óleo comb. nº 5	0,95	12	100	- 5	65	180 a 360
Óleo comb. nº 6	0,98	10	300 a 3000	2	80	180 a 500

Fonte: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, **Aspectos Físico-Químicos do Petróleo**, Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a_fisicos.asp acesso em: 10 out. de 2004a.

Os hidrocarbonetos, constituintes de todos estes produtos, são subdivididos em dois grupos fundamentais, os alifáticos, que são geralmente lineares (Figura 4) e/ou ramificado, onde estão, por exemplo, os alcanos (hidrocarbonetos lineares

saturados, ou seja, com hidrogênio completando as ligações carbono carbono) e os alcenos (hidrocarbonetos lineares insaturados, pois há ausência de alguns hidrogênios, forçando a cadeia a fazer uma ou mais ligações duplas carbono carbono), e os aromáticos (Figura 5), como sugere o nome, possuem anéis aromáticos, ou benzênicos em sua fórmula estrutural, dando, com isso, arranjo típico a esses hidrocarbonetos (MORRISON, 1996).

2.3. Petróleo e seus derivados no ambiente

Desde o primeiro grande acidente em 1969, no canal da Inglaterra, ocorreram mais de 40 grandes derramamentos marinhos de petróleo. Os vazamentos durante o transporte são responsáveis por 45,5% do petróleo lançado ao mar, enquanto que os vazamentos de atividades em terra vêm em segundo lugar, representando 29% (SLOAN, 1999).

Após a entrada no ambiente, o petróleo sofre alterações de suas características originais, devido a fatores físicos (evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, adsorção às partículas, etc) e principalmente biológicos (biodegradação) (SLOAN, 1999). As transformações físicas e biológicas são reguladas pelas características específicas do derramamento e do ambiente atingido. Assim, o grande impacto ambiental e persistência do petróleo no ambiente dependem de fatores como: habitat atingido, tipo e quantidade do óleo derramado, espécies de organismos atingidos, época do ano (pode afetar o ciclo de vida das espécies), condições hidrográficas e meteorológicas (podem afetar a dispersão do petróleo), clima, frequência e duração da exposição ao petróleo e práticas utilizadas na tentativa de descontaminação (SLOAN, 1999).

O petróleo e seus derivados podem persistir por mais de 20 anos nos manguezais, antes que a vegetação se recupere totalmente (MICHEL, 2002). Esta alta persistência é explicada pela lenta biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo, devido à limitação de oxigenação do meio e lenta ciclagem dos nutrientes, essenciais para a atividade microbiana aeróbia (SCHERRES & MILLE,

1989).

Os efeitos crônicos da poluição com petróleo são pouco conhecidos (STRICKLAND, 1990). Os efeitos tóxicos imediatos do petróleo tendem a ser causadas principalmente por moléculas de baixa massa molecular e que se degradam mais rapidamente. Já os efeitos tóxicos crônicos são devidos às moléculas de alta massa molecular, geralmente aromáticas, que apresentam menor toxicidade, mas são persistente, causando efeitos mais duradouros (SPIES et al; 1996). CLARK & FINLEY (1982) consideram os efeitos crônicos mais significativos do que os efeitos imediatos. Pequenas quantidades de petróleo podem ter efeitos de longo prazo na diminuição da diversidade de espécies em um sistema (HOWARTH, 1991 ; NELSON SMITH, 1982). Tal alteração é causada principalmente por efeitos fisiológicos, carcinogênicos e citogenéticos de longo prazo, alterando a reprodução, crescimento, respiração, movimentação e susceptibilidade a doenças de especiais vegetais e invertebrados marinhos em um ambiente contaminado (SUCHANEK, 1993).

Foi observado que plantas de mangue diminuíram drasticamente a produção de sementes durante 17 meses após um derramamento de petróleo no sudeste da Austrália (CLARK & WARD, 1994). Já em outras regiões, a presença do óleo exerceu impacto negativo sobre a vegetação durante 17 anos (BAKER et al, 1993).

No caso de hidrocarbonetos aromáticos, como o benzeno, tolueno e xileno, por terem baixa densidade, ou peso molecular, devido à presença de poucos anéis aromáticos, possuem mais facilidade de solubilização em água, tendo, com isso, alto potencial tóxico e facilidade de serem incorporados pelos seres vivos, principalmente costeiros, que podem ser assimilados pela pele, brânqueas, ingestão de água e alimentos contaminados (CETESB, 2004a).

Já os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), por possuírem muitos anéis aromáticos, ou benzênicos, são mais resistentes à biodegradação,

persistindo, com isso, mais tempo nos ambientes contaminados. Como exemplos destes compostos altamente tóxicos e persistentes estão o Antraceno, Benzo-a-pireno, Fenantreno e Naftaleno. Estes HPA's são de fácil solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água, por possuírem maior peso molecular pelo número de anéis benzênicos (CETESB, 2004a).

Devido ao formato de suas estruturas moleculares os HPA's possuem alto poder mutagênico, por estarem diretamente relacionadas à atividade biológica. Com isso, sua toxicidade pode causar câncer em moluscos, animais marinhos e ao homem (CETESB, 2004a). Como exemplos destes HPA's podemos citar o Fenantreno e Benzo-a-pireno, que estão entre os 16 HPA's prioritários pela EPA (Environmental Protection Agency) (SISINNO, 2003), sendo, desta forma, também inclusos neste trabalho.

Dentre os efeitos carcinogênicos causados pelos HPA's cita-se as alterações enzimáticas nas mucosas do trato gastrointestinal, aumento do peso do fígado, leucemia e tumores no fígado e estômago dos animais, sendo classificados de efeitos agudos (exposição à elevadas concentrações por curto período de tempo), ou crônicos (baixas concentrações por longo período de tempo). Os compostos mais solúveis, como anteriormente vistos, podem ser adsorvidos pela corrente sanguínea, ocasionando danos às células, à medula óssea e, principalmente, no sistema nervoso central. No homem, estes compostos podem ainda provocar danos no fígado e rins (CETESB, 2004a).

A entrada de hidrocarboneto em um ecossistema pode resultar num aumento ou decréscimo seletivo no tamanho da população microbiana. O efeito do petróleo no tamanho da população dependerá da composição química do óleo contaminante e das espécies de microrganismos presentes na comunidade de um ecossistema particular. Compostos como o tolueno e o fenol, encontrados no petróleo, têm sido usados como desinfetantes. A ação dos componentes podem ser bacteriostáticos ou bactericidas para os microrganismos, dependendo da solubilidade e da concentração. O tolueno, por exemplo, pode estimular o

crescimento de microrganismos em baixa concentração, mas mostra ação bacteriostática em alta concentração (DAVIS et al., 1964). O fenol é outro exemplo e pode ser utilizado por alguns microrganismos, mas apresenta atividade bactericida quando em alta concentração. Além do efeito direto dos componentes do petróleo na comunidade microbiana, há também o efeito tóxico dos produtos liberados, durante o processo de degradação. Os produtos da oxidação dos hidrocarbonetos aromáticos, por exemplo, podem ser mais tóxicos que os compostos originais. LIU et al. (1992), por exemplo, verificou que os alcanos C5-C9 não eram tóxicos, entretanto os álcoois correspondentes apresentavam atividade bacteriostática.

2.4. O uso de microrganismos na degradação de hidrocarbonetos

A biorremediação é a tecnologia que utiliza microrganismos para a degradação de várias substâncias químicas tóxicas e outras menos tóxicas ou não tóxicas, ou ainda a redução de sua concentração a níveis aceitáveis no ambiente como solo, água e ar. A biorremediação visa acelerar os processos naturais de degradação e reciclagem de poluentes, tais como produtos de petróleo (gás, diesel, óleo combustível, etc.), hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (PAH,s – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, PCB's – bifenilas poli clorados, etc.), solventes industriais (fenóis, benzeno, acetona, etc.), pesticidas e metais (arsênico, cromo, etc.) (KORDA et al., 1997).

A biorremediação teve um papel muito importante na limpeza do derramamento de óleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989 e há boas razões para se acreditar que este método terá um papel importante no tratamento de futuros derramamentos de óleo em circunstâncias apropriadas (PRICE, 1993).

A utilização de microrganismos nos processos de remediação tem sido bastante explorado, principalmente nos últimos 25 anos. No entanto, ainda existe uma resistência por parte da opinião pública quanto a sua aplicação. A capacidade

de certos microrganismos serem capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono foi apresentada por ZoBell em (1946). Ele também verificou que esses microrganismos eram amplamente distribuídos na natureza, e a utilização de hidrocarbonetos era altamente dependente da natureza química dos compostos existentes na mistura do petróleo e das condições ambientais.

Para que a degradação de hidrocarbonetos de petróleo possa acontecer efetivamente é necessário que bactérias adequadas estejam presentes e desta forma a taxa de crescimento e biodegradação podem ser maximizadas, desde que concentrações adequadas de nutrientes e oxigênio sejam fornecidos e que o pH esteja entre 6 e 9 (faixa de pH ótima para degradação), (VENOSA, 2001).

2.5. Importância dos biosurfactantes na biorremediação

Os biosurfactantes são compostos anfipáticos e portanto tendem a se concentrar na interface de duas fases imiscíveis, alterando suas propriedades interfaciais (HOROWITZ et al., 1990). São produzidos na superfície celular microbiana ou excretados extracelularmente (VAN DYKE et al., 1993).

O crescimento de microrganismos em uma interface de água e óleo favorece o aparecimento de um biofilme, cuja formação envolve as seguintes etapas: a) os microrganismos aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células; b) as células aderidas formam uma camada delgada na interface óleo/água, extraindo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa; c) como as células revestem as gotas de óleo com seus biosurfactantes produzindo, elas reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a água, resultando na emulsificação do óleo e aumentando a área interfacial disponível para o crescimento microbiano; d) quando o composto oleoso contido nas gotas desaparecem, os microrganismos colonizam outras gotas (ÁSCON-CARRERA & LEBEAULT, 1995).

Estes compostos de superfície ativa oferecem vantagens quanto aos

surfactantes quimicamente sintetizados, devido a sua baixa toxicidade, biodegradabilidade, especificidade e estabilidade em valores extremos de pH e temperatura (HOROWITZ et al., 1990, KUSHIDA, 2000). Em um estudo realizado no mar do norte, o surfactante comercial Finasol OSR5 e um biosurfactante foram adicionados, separadamente, em porções oleosas no ambiente marinho. O biosurfactante adicionado não mostrou efeitos tóxicos sobre diatomáceas, ciliados, nematóides, copépodos e plantas aquáticas e removeu mais eficientemente o óleo quando comparado ao surfactante comercial, o qual foi altamente maléfico aos organismos marinhos (VAN DYKE et al., 1993).

A maior área para a aplicação dos biosurfactantes é a indústria de óleo, tanto para a extração de petróleo como para incorporação nas formulações de óleo. Outras aplicações incluem biorremediação/dispersão de derramamento de óleo em solo e no mar, remoção de lodo de óleo de tanques de estocagem e aumento de recuperação de óleo (BANAT et al, 2000).

Os bioemulsificantes também podem ser adicionados nos ambientes para estimular o processo de biorremediação. *Acinetobacter radioresistens* que produz o bioemulsificante alasan não foi capaz de usar hidrocarbonetos como fonte de carbono, mas foi adicionado numa mistura de bactérias degradadoras de óleo para aumentar a taxa de biorremediação. Isso acontece pela transferência horizontal do emulsificante da bactéria produtora para a bactéria heteróloga. Foi observado que o emulsificante alasan se ligou na superfície de *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 e *A. calcoaceticus* RAG-1 e mudou as propriedades superficiais desses microrganismos. Essa transferência horizontal de bioemulsificantes de uma espécie de bactéria para a outra tem implicações significantes nas comunidades microbianas, co-agregação e biofilmes (RON & ROSENBERG, 2001).

Na biodegradação de compostos de petróleo, os biosurfactantes apresentam fundamental importância, uma vez que estes são insolúveis em água, colaborando na solubilização e emulsificação dos mesmos, e facilitando o acesso

do microrganismo aos hidrocarbonetos. A área superficial do óleo é de extrema importância devido ao crescimento dos microrganismos degradadores ocorrer quase que exclusivamente na interface óleo/água.

Os microrganismos que produzem biosurfactantes são bastante adequados na formação do consórcio microbiano, desde que a adição de agentes biosurfactantes, incorre em custos maiores de produção e purificação.

2.6. Importância dos nutrientes na biorremediação

O petróleo é composto principalmente de hidrocarbonetos, que podem servir como fonte de carbono para o desenvolvimento de microrganismos. Há, entretanto, necessidade de outros nutrientes e, entre eles, o nitrogênio e o fósforo são requeridos em maior quantidade. Além disso há também demanda por micronutrientes, tais como o enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio, os quais devem estar presentes para o crescimento dos microrganismos.

Historicamente, nutrientes necessários que limitam a degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo foram o N e P (ZHOU & CRAWFORD, 1995; TING et al., 1999). Estes nutrientes são importantes para a produção celular e seu suplemento aumentam a eficácia da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (WALWORTH & REYNOLDS, 1995; ZHOU & CRAWFORD, 1995; TING et al., 1999). A quantidade de N e de P requeridos para converter 100% do petróleo em carbono/biomassa pode ser calculado pela relação C:N e C:P encontrada no material celular (DIBBLE & BARTHA, 1979).

O ferro é essencial aos microrganismos pois é requerido para diversas funções celulares. Apesar de ser um dos metais mais abundantes na Terra, apresenta baixa solubilidade em ambientes aeróbios e no pH fisiológico da célula. Além disso, quando em soluções, são formados complexos de hidróxidos férricos insolúveis, limitando a quantidade de ferro solúvel. Como consequência, o ferro encontra-se em baixa biodisponibilidade no ambiente e geralmente, não atende a

demanda celular dos microrganismos (CRICHTON, 1991).

A disponibilidade desses elementos varia em diferentes ambientes e eles podem ser adicionados para estimular a biodegradação. No solo, o ajuste no balanço C/N/P pode ser facilmente efetuada pela adição de fertilizantes. Entretanto, em ambiente aquático, o ajuste de balanço oferece maior problema, pois deve ser efetuada de forma a não ser dissipado da interface óleo-água. Duas estratégias têm sido utilizadas para sanar o problema: o encapsulamento do fertilizante numa matriz que permita a flutuação e liberação lenta ou o uso de compostos oleofílicos que permaneçam na interface (ATLAS & BARTHA, 1973). Entre os fertilizantes oleofílicos podem ser utilizados uréia parafinada, octilfosfato, octoato férrico, fosfato duplo de amônia e magnésio parafinado, que podem estimular a biodegradação em diferentes ecossistemas aquáticos (ATLAS & BARTHA, 1973; DIBBIE & BARTHA, 1976; HOWORITZ & ATLAS, 1977; OLIVIERI et al. , 1976; BERGSTEIN & VESTAL, 1978).

Em estudo utilizando fertilizantes de lenta liberação, como o Osmocote (Os. Scotts, Marysville, OH) e Inipol EAP-22 (Ip; ATOFINA Chemicals, Philadelphia, PA), combinado com nutrientes inorgânicos Ran Xu e Obbard 2003, avaliaram a eficiência desses nutrientes na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo presentes nos sedimentos de praia. A degradação dos hidrocarbonetos alifáticos presentes no óleo tratados com Osmocote no sedimento de praia foi de 96%. A combinação de nutrientes solúveis e Osmocote favoreceu a estímulo do metabolismo dos microrganismos indígenas, bem como manteve o liberação dos nutrientes, aumentando, assim, a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo presentes no sedimento da praia.

2.7. Toxicidade de produtos da biodegradação

A toxicidade nada mais é do que a exposição de organismos as substâncias potencialmente tóxicas, em determinadas concentrações e durante certos períodos de tempo. Alguns testes, chamados testes de toxicidade, têm como

objetivo avaliar propriedades tóxicas destas substâncias em determinado grupo ou quantidade de organismos.

Um destes testes, chamado de toxicidade aguda, tem por objetivo avaliar resposta severa e rápida de um organismo vivo a determinada substância, sendo avaliada num intervalo que varia de 0 a 96 horas. Para avaliar a toxicidade aguda utiliza-se geralmente testes de concentração letal (CL₅₀) ou concentração efetiva (CE₅₀), em 50% dos organismos testados (KAMIDA, 2004).

Segundo DUTKA (1989), um bioensaio utilizando sementes de alface ou de outras espécies com crescimento rápido e baixa reserva de energia é recomendado. Em curto espaço de tempo, pode-se avaliar germinação e/ou crescimento radicular, sendo, desta forma, um indicador biológico sensível à efeitos tóxicos agudos.

No processo de biodegradação de um composto, este é alterado e subdividido em minerais (mineralização) e demais sub-compostos, os quais podem permanecer no próprio local, solo ou água, onde o composto está sendo degradado (biodegradação *in situ*), ou podem ser utilizados por outros seres vivos, sendo assimilados e utilizados no seu processo metabólico (TECNOLOGIAS, 2003), neste caso podem oferecer poder toxicológico ao ser vivo que entrar em contato com ele, causando, em alguns casos, manifestação adversa dos seres a este novo composto, como reações fisiológicas e bioquímicas, provocando, por exemplo, inibição no crescimento, na vitalidade, alterações na resistência à parasitas e aparecimento de doenças, e na capacidade reprodutiva (LIMA, 2003 a e b).

Em virtude disto, muitos organismos vivos são utilizados como bioindicadores na avaliação da presença de algum composto adverso ao meio, como algas e líquens, para indicar certos compostos poluentes presentes no ar, e vegetais para indicar contaminantes na água e no solo. Ainda as plantas superiores são comumente utilizadas como bioindicadores de contaminação ambiental, e, quando

utilizadas em laboratório, com objetivo de indicar a presença de compostos tóxicos. Estes organismos são chamados de organismos testes (LIMA, 2003 a e b).

2.8. Consórcio microbiano

Como visto no item 2.2. o óleo bruto e derivados de petróleo constituem uma mistura complexa de muitas diferentes classes de hidrocarbonetos. Assim um único organismo não é capaz de degradar completamente uma área contaminada. Portanto, é interessante o uso de um consórcio microbiana com várias cepas, para promover uma biorremediação mais efetiva.

As características físico e químicas do óleo são importantes para que ocorra a biorremediação. Assim os óleos brutos mais pesados que contém grandes quantidades de resinas e asfaltenos são mais difíceis de serem biodegradados do que os óleos brutos mais leves que são mais ricos em compostos alifáticos (VENOSA, 2001).

Vários autores tem proposto a utilização de culturas mistas para fins de biorremediação (RAMBELOARISOA et al., 1984; CHHATRE et al., 1996; TANO-DEBRAH et al., 1999; VENOSA et al., 1999). Com a utilização de um consórcio microbiano, formado por bactérias de ocorrência natural, especialmente selecionadas, objetiva-se acelerar os processos de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, removendo os compostos tóxicos e de difícil degradação.

Os hidrocarbonetos representam uma classe de compostos naturais, presentes não somente em áreas poluídas com petróleo, mas também na maioria de solos e sedimentos, em pequenas quantidades, sendo que desta forma é natural encontrarmos microrganismos capazes de degradá-los (ROSENBERG et al., 1992). Para que os microrganismos possam utilizar os hidrocarbonetos insolúveis é necessário o fornecimento de mais nitrogênio e fósforo do que as

quantidades normalmente presentes no meio ambiente, de forma que há a necessidade da manutenção de concentrações ótimas de nutrientes em contato com o óleo (VENOSA, 2001).

Segundo ROSENBERG et al. (1992), as fontes usuais de nitrogênio e fósforo possuem uma alta solubilidade em água, limitando a utilização destas fontes em sistemas abertos (águas e solos contaminados no tratamento “in situ”, ou seja no próprio local de ocorrência da contaminação) devido a sua rápida diluição. Os autores sugerem a utilização de outras fontes de nitrogênio e fósforo, menos solúveis, tais como um fertilizante hidrofóbico na forma de P_2O_5 .

2.9. Caracterização molecular de microrganismos

Os primeiros sistemas de classificação de procariotos eram baseados apenas em algumas propriedades fenotípicas que eram usadas para agrupar linhagens, a despeito de qualquer afinidade evolutiva verdadeira e por isso foram tidos como artificiais. Estes sistemas refletiam as limitações tecnológicas daquele período. Na prática, estes sistemas, baseados em algumas propriedades morfológicas e comportamentais, levaram à sérios erros de classificação microbiana, nos mais variados grupos de bactérias (BOONE & CASTENHOLZ, 2001). Tais métodos microbiológicos tradicionais baseados em características fenotípicas, como propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, governaram por décadas a taxonomia microbiana e forneceram informação descritiva para a estruturação de diversos taxa bacterianos.

Na natureza apenas uma pequena fração dos microrganismos são cultiváveis através do emprego de métodos microbiológicos convencionais (AMANN et al., 1995). Estimativas recentes sugerem que existam pelo menos 6 milhões de espécies de bactérias em solos e oceanos (CURTIS et al., 2002).

Nos últimos 40 anos, com o desenvolvimento nas áreas de química, biologia molecular, estatística e informática, a taxonomia de procariotos sofreu profundas

alterações na direção de um sistema que refletisse as relações evolutivas entre os organismos aproximando a classificação microbiana o melhor possível da realidade biológica. O uso da homologia DNA-DNA associada a uma variedade de características ecológicas e fenotípicas na classificação de microrganismos foi denominada de taxonomia polifásica por Colwell (1970ab). Colwell propôs a integração da informação do nível molecular ao ecológico para se obterem identificações e classificações mais precisas e confiáveis. Em princípio, toda informação genotípica, fenotípica e filogenética pode ser incorporada na taxonomia polifásica, mas a hibridização de DNA-DNA tem papel pivotal no delineamento de espécies.

WOESE & FOX (1977) publicaram o trabalho seminal sobre o uso de seqüências do cromossomo RNAr 16S para a reconstrução da Árvore da Vida. Subsequentemente, se demonstrou que o RNAr 16S seria extremamente útil na afiliação filogenética de bactérias em espécies, gêneros e famílias (WOESE, 1987). O uso do RNAr 16S foi prontamente incorporado à taxonomia polifásica (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1987). O desenvolvimento rápido dos métodos de sequenciamento de DNA e o acúmulo da informação de seqüências em bases de dados públicas de livre acesso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), têm permitido o sequenciamento comparativo de genes homólogos entre linhagens microbianas e é agora procedimento padrão em sistemática microbiana.

3 – OBJETIVOS

Verificar a capacidade dos microrganismos em degradar os hidrocarbonetos derivados de petróleo utilizados na primeira fase do trabalho.

Formular um consórcio com as cinco linhagens que obtiveram melhores resultados na degradação dos hidrocarbonetos derivados de petróleo.

Avaliar a capacidade deste consórcio em degradar os hidrocarbonetos presentes no óleo bruto em microcosmos utilizando solo com e sem histórico de contaminação.

Avaliar a necessidade de fontes de nutrientes na liofilização do consórcio microbiano.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reativação de linhagens preservadas sob congelamento

Quarenta e três linhagens de bactérias da coleção de cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP), preservadas sob congelamento em solução de glicerol/caldo nutriente (10% v/v), foram submetidas a reativação com o intuito de serem testadas quanto à degradação de hidrocarbonetos (Tabela.2).

Todas as linhagens foram isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos, coletados nas proximidades da refinaria em Paulínia - SP e de efluente de oficinas de reparos de tanques de caminhões de petróleo. As linhagens são produtoras de biossurfactantes conforme descrito por CARVALHO et al. (1997). A reativação se deu por cultivo direto em agar nutritivo ou caldo nutriente. Linhagens de difícil crescimento foram cultivadas em meio sólido. Após a reativação, foi verificada a pureza através da coloração de Gram.

TABELA 2: Linhagens da coleção de culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, isoladas de solo contaminado com óleo diesel. Todas as linhagens foram testadas quanto ao uso dos hidrocarbonetos como fonte de carbono

Cepa	LINHAGEM	CARACTERÍSTICAS DA CULTURA	IDENTIFICAÇÃO
1	4001V	Bastonetes G+ cultura creme rugosa	não identificada
2	4002	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus firmus</i>
3	4003	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus firmus</i>
4	4004	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus circulans</i>
5	4005	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus megaterium</i>
6	4006	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus brevis</i>
7	4007	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus brevis</i>
8	4008	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus sp.</i>
9	4009	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus sp.</i>

10	4010	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus sphaericus</i>
11	4011	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus badius</i>
12	4012	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus badius</i>
13	4013	Bastonetes G+ colônias branco acinzentada	<i>Bacillus subtilis</i>
14	4015	Bastonetes G- colônia pigmento violáceo	<i>Chromobacterium sp.</i>
15	4016	Bastonetes G- colônia pigmento violáceo	<i>Chromobacterium sp.</i>
16	4016L	Bastonetes G- colônia pigmento violáceo	<i>Chromobacterium sp.</i>
17	4018	Células em espiral G+/- colônia amarela cremosa	<i>Planococcus citreus</i>
18	4019	Bastonetes G -	<i>Aeromonas sp.</i>
20	4021	Cocos G + colônias amarela-laranjada	<i>Micrococcus luteus</i>
21	4022	Bastonetes G - cultura amarela	<i>Enterobacter aerogenes</i>
22	4022L	Bastonetes G – cultura amarela cremosa	não identificada
23	4023	Bastonetes G - cultura amarela	<i>Enterobacter aerogenes</i>
24	4024	Cocos G+ colônias brancas	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	5B II	Bastonetes G – colônia brancas	Não identificada
26	L- 28	Bastonetes G - colônia brancas	Não identificada
27	B1A	cultura amarela, rugosa, bastonetes pequenos, G -	<i>Enterobacter agglomerans</i>
28	B1E	cultura branca, circular, borda rugosa, bastonetes esporulados, G +	não identificada
29	B1H	cocos, G + colônias brancas	não identificada
30	B2A	cultura creme-amarelada, aspecto floculento, bastonetes finos, formando longos filamentos, G +	não identificada
31	B2B	cultura branca, circular, borda rugosa, bastonetes grandes, esporulados, G +	não identificada
32	B3A	cultura creme, cremosa, circular, borda rugosa, bastonetes pequenos, G +	não identificada
33	B3B	cultura creme com borda rugosa, circular, bastonetes G + espora central, com filamentos	Não identificada
34	B3C	cultura branca, circular, cremosa, bastonetes compridos, esporulados G +	não identificada
35	B3E	cultura branca, cremosa, borda rugosa, bastonetes grandes, esporulados, G+	não identificada
36	B3F	cultura branca, cremosa, bastonetes esporulados, G +	não identificada
37	B3G	cultura creme, borda rugosa, bastonetes pequenos, G +	não identificada

38	B3H	cultura grande, branca, cremosa, borda rugosa, bastonetes grandes, esporulados, G +	não identificada
39	B3I	cultura branca, cremosa, borda rugosa, bastonetes grandes, esporulados, G +	não identificada
40	B5A	creme, bastonetes pequenos muito finos, G -	não identificada
41	B3J	cultura branca, cremosa, borda rugosa, bastonetes grandes, esporulados, G +	não identificada
42	5B4	bastonete G- colônia amarela cremosa	<i>Flavobacterium sp</i>
43	B1G	cocobacilos, G -	não identificada
44	B1F	cultura branca, cremosa, bastonetes finos esporulados, G +	não identificada

4.2. Avaliação da biodegradação dos hidrocarbonetos

Para avaliação da biodegradação foram utilizadas as 43 bactérias reativadas conforme descrito anteriormente. Foi utilizado um meio mínimo de sais, o qual contém a quantidade mínima de nutrientes necessária para o desenvolvimento microbiano (RAMBELOARISOA *et al.*, 1984). Este meio possui carência do elemento carbono, o qual deve ser obtido pelas bactérias através dos hidrocarbonetos adicionados.

A Tabela 3 mostra a composição do meio mínimo de sais utilizado neste experimento:

TABELA 3: Composição do Meio Mínimo de Sais (M.M.S.):

Compostos (sais)	Quantidade	Unidade
Tris(hidroximetil)aminometano (0,1 M)	12,10	g/l
NaCl	23,00	g/l
KCl	0,75	g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,47	g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	5,08	g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	6,16	g/l
NH ₄ Cl	3,74	g/l
Solução de Sulfato de Ferro (1 g/l)	2,00	ml/l
Solução de Fosfato de Sódio (0,1 M)	4,00	ml/l
PH	7,30	pH

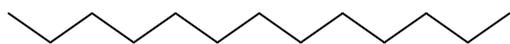
Fonte: RAMBELOARISOA, 1984.

O meio mínimo foi acrescido dos nas concentrações listadas na Tabela 4. Suas estruturas químicas estão representadas na Figura 4.

TABELA 4: Hidrocarbonetos utilizados nos testes de biodegradação

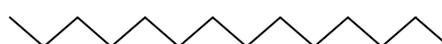
Hidrocarboneto	Concentração (%)
tetradecano e tridecano (hidrocarb. alifáticos lineares e saturados)	0,005
hexadeceno (linear insaturado)	0,005
pristano (ramificado saturado)	0,005
fenildecano (aromático ramificado)	0,005
naftaleno, fenantreno, pireno, benzo-a-pireno (aromáticos policíclicos)	0,005

Tridecano – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$:



Estrutura química do Tridecano.

Tetradecano – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$:



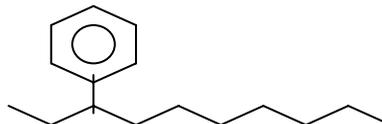
Estrutura química do Tetradecano.

Hexadeceno - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$:



Estrutura química do Hexadeceno.

Fenildecano $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$:



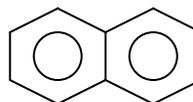
Estrutura química do Fenildecano.

Pristano $\text{C}_{15}\text{H}_{32}$ $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$:



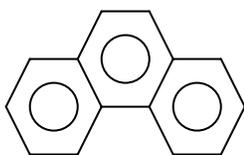
Estrutura química do Pristano.

Naftaleno – C_{10}H_8 :



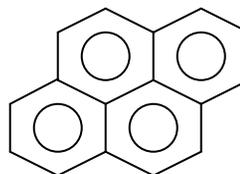
Estrutura química do Naftaleno.

Fenantreno – $\text{C}_{14}\text{H}_{10}$:



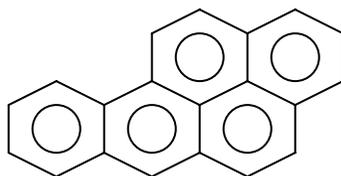
Estrutura química do Fenantreno.

Pireno – $\text{C}_{16}\text{H}_{10}$:



Estrutura química do Pireno.

Benzo(a)pireno – $\text{C}_{19}\text{H}_{12}$:



Estrutura química do Benzo(a)pireno.

FIGURA 4: Fórmula molecular e estrutura química dos hidrocarbonetos utilizados

4.3. Etapas do ensaio de biodegradação

Os hidrocarbonetos foram divididos em dois grupos distintos, sendo os hidrocarbonetos lineares, compostos pelo tridecano, tetradecano, pristano, hexadeceno e fenildecano, e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), compostos pelo fenantreno, naftaleno, pireno e benzo(a)pireno.

O experimento para cada bactéria e cada grupo de hidrocarbonetos, foi composto pelas seguintes fases:

4.3.1. Inoculação das bactérias em meio mínimo de sais contendo hidrocarbonetos

Cada linhagem foi incubada isoladamente em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 30 ml do meio mínimo de sais, acrescido de hidrocarbonetos como fonte de carbono na proporção de 0,005%, designados como hidrocarbonetos de referência, em agitador rotatório (Shaker marca New Brunswick Scientific modelo Innova 4900) a 150 rpm e 30°C para conferir aeração adequada, por um período de 11 dias. Como controle foram utilizados as mesmas concentrações de sais do meio de cultura e de hidrocarbonetos, mas sem inoculação de bactérias, e frascos controle contendo bactérias, mas sem hidrocarbonetos, sendo submetidos às mesmas análises. O pH final de cada amostra foi analisado para verificar se as atividades metabólicas das bactérias, principalmente quanto ao crescimento, interferiram neste parâmetro químico.

Posteriormente, os meios de cultura foram centrifugados (Hitachi modelo himac CR 21) por 20 min a 9.979,2 g e 15 °C, para separação da massa celular e do sobrenadante com os hidrocarbonetos. O sobrenadante foi reservado para posteriores análises.

A massa celular foi lavada com uma solução de acetona:hexano (3:1 v/v) para remoção de resíduos oleosos e novamente centrifugado, repetindo todo o

processo mais duas vezes, para total separação das fases oleosas e das células microbianas (PRUTHI & CAMEOTRA, 1997).

4.3.2. Crescimento celular e avaliação do pH

Após separação por centrifugação, o precipitado foi armazenado em frasco do tipo pesa-filtro, sendo colocado à estufa de secagem a 105 °C até obtenção de peso constante. O crescimento, ou produção de biomassa, foi determinada como peso seco, em gramas por mililitro (g/mL), (PRUTHI & CAMEOTRA, 1997).

O pH do meio de cultura foi avaliado no início e final do experimento utilizando um pHmetro marca Micronal.

4.3.3. Porcentagem de degradação

4.3.3.1. Extração

Os hidrocarbonetos não degradados foram extraídos do meio de cultura com hexano, na concentração 1:1 (v/v). O procedimento foi realizado com auxílio de funil de separação, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante, contendo o solvente, submetido à cromatografia gasosa para análise da porcentagem de degradação (JACOBUCCI, 2000).

4.3.3.2. Análise cromatográfica

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (Cromatógrafo Shimadzu modelo GC 14A) , através da injeção de 1 µL de amostra, utilizando uma coluna capilar de Sílica Fundida (Supelco), 60 m x 0,32 mm d.i. x 0,2 µm de espessura de filme, detector FID a 350 °C, injetor a 330°C, razão de split 50:1 e hélio como gás de arraste em fluxo de 15 mL/min. A coluna foi mantida a 100 °C por 2 minutos, depois a 275 °C por 10 minutos através da rampa de temperatura a 8 °C por minuto até 275 °C.

4.3.4. Produção de biossurfactantes

No processo de degradação dos hidrocarbonetos, cada bactéria foi analisada quanto à capacidade de produção de biossurfactantes, através de duas metodologias descritas a seguir:

4.3.4.1. Determinação da tensão superficial

O objetivo da avaliação da tensão superficial é dado, pois quando ocorre a emulsão dos hidrocarbonetos em água (meio de cultura), provocada pelas atividades microbianas, ocorre uma redução da tensão superficial da amostra pela quebra do filme de óleo normalmente encontrado na superfície de amostras em que não ocorre a emulsão. As amostras foram avaliadas quanto à redução da tensão superficial em Tensiômetro digital marca Kruss, modelo K10ST (COOPER & GOLDENBERG, 1987). Como amostra padrão de calibração, foi utilizada amostra controle, contendo a mesma concentração de hidrocarbonetos.

4.3.4.2. Determinação da atividade de emulsificação

A atividade de emulsificação é medida pela densidade óptica da emulsão óleo em água (O/A) (Figuras 5 e 6) (JOHNSON *et al.*, 1992). No caso da emulsificação O/A, os hidrocarbonetos estarão disponíveis no próprio meio, e, portanto mais relevante, enquanto que nas emulsões A/O os hidrocarbonetos estão acima do meio. A medida da altura do halo formado na parte superior do tubo da emulsão água em óleo (A/O) é feita em 24 h e a atividade foi expressa em cm (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

A avaliação da capacidade de emulsão foi determinada em três fases diferentes:

A primeira medida foi realizada com uma alíquota de 3,5 ml retirada após a centrifugação do meio de cultura por 20 minutos a 9979,2 g e 15 °C, para

eliminação das células conforme item 4.3.1, sendo as alíquotas de cada amostra colocada em tubos de ensaio padronizados Pyrex, de 13x100 mm e 1 cm de diâmetro, e submetidas à leitura a 610 nm em espectrofotômetro marca Bausch & Lomb, modelo Spectronic, para padronização das amostras (JOHNSON *et al.*, 1992).

A segunda leitura foi realizada após adição de 2,0 ml de tolueno nos tubos Pyrex, e agitação vigorosa, em agitador de tubos Vortex, por 1 minuto e 1 hora de repouso (JOHNSON *et al.*, 1992).

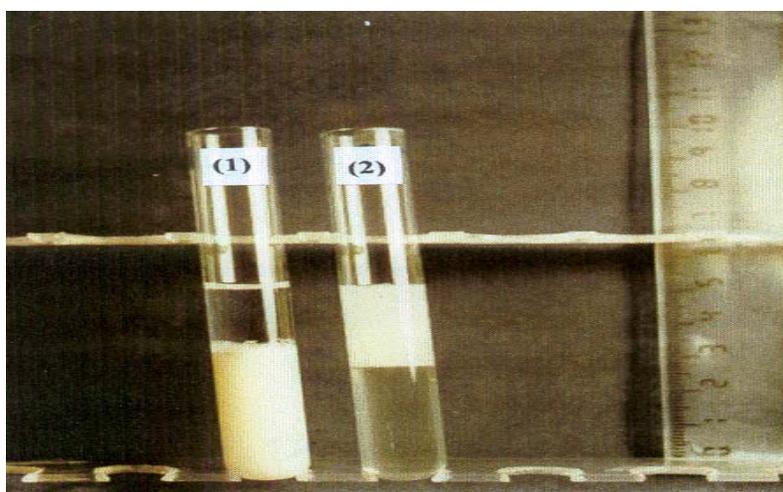


FIGURA 5: Avaliação de emulsão tipo O/A (1) e A/O (2)

FONTE: KUSHIDA, 2000.

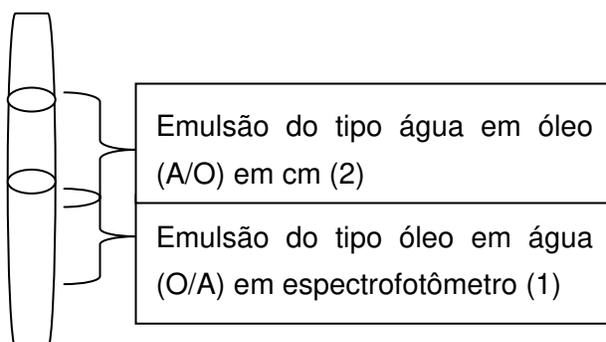


FIGURA 6: Esquema para avaliação de emulsão tipo O/A (1) e A/O (2)

4.4. Teste de toxicidade com sementes de alface cultivar Lisa Nacional

O teste de toxicidade foi feito com as cinco melhores cepas, selecionadas a partir dos resultados de degradação dos hidrocarbonetos. Amostras retiradas dos sobrenadantes obtidos no item 4.3.1 foram filtradas em membrana Millipore 0,22 μm e o filtrado diluído nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56% em água destilada. Uma alíquota de 2mL de cada concentração foi utilizada para embeber discos de papel de filtro, os quais foram colocados no interior de placas de petri de poliestireno (9cm ϕ) (DUTKA, 1989). Para controle positivo de toxicidade foram empregados 2 mL de NaCl (5 g/L) e para controle negativo, água destilada. Foram colocadas em cada placa 50 sementes de alface e foram, incubadas em temperatura ambiente, envoltas em papel alumínio por 48 horas. A medida do tamanho das raízes germinadas foi realizada com auxílio de papel milimetrado (DUTKA, 1989).

A porcentagem de variação de crescimento foi calculada segundo a equação:
 $\% \text{ variação de crescimento} = \frac{\text{comprimento médio da amostra} - \text{comprimento médio do controle}}{\text{comprimento médio do controle}} \times 100$ (DUTKA, 1989).

A concentração efetiva que causou 50% (CE_{50}) da inibição da germinação e alongamento das raízes, foi calculada pela equação correspondente à curva de regressão (valores médios de crescimento pelas concentrações de diluição correspondentes) e o valor de R^2 da equação.

4.5. Avaliação do tamanho do inóculo na degradação de óleo bruto em meio mínimo de sais

Com as cinco linhagens selecionadas na primeira parte do projeto (cepas 1, 9, 22, 23, 36), como sendo as melhores degradadoras de hidrocarbonetos derivados de petróleo, foi formulado um consórcio para avaliar a capacidade do mesmo em degradar óleo bruto em meio mínimo de sais (RAMBELOARISOA *et al.*, 1984), na concentração de 0,3% de óleo (V/V). As linhagens foram cultivadas

em meio Agar nutritivo por um período de 24 horas e após o período de incubação, foi transferida uma alçada para o meio Caldo Nutriente (Difco), sendo a cultura incubada em agitador rotatório (Shaker marca New Brunswick Scientific modelo Innova 4900) a 150 rpm e 30 °C. O crescimento acompanhado a intervalos regulares de tempo, através de leitura da densidade óptica (DO_{590nm}) em espectrofotômetro (marca Shimadzu modelo UV-1201) até atingir D.O de 1 para as bactérias em questão. Foram retiradas alíquotas de 100 ul (experimento 1), 200ul (experimento 2) e 300 ul (experimento 3) de cada bactéria e colocadas em eppendorf, todas juntas, para formulação do consórcio. A alíquota retirada foi centrifugada (centrífuga marca Hitachi modelo himac CF 15 D) por 10 minutos há 50400 g. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado (célula) ressuspenso com 1 ml do próprio meio mínimo de sais e, inoculados nos Erlenmeyers de 125 ml contendo 30 ml do meio mínimo acrescido de 0,3% de óleo bruto (V/V). Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Shaker) marca New Brunswick modelo Innova 4900 a 150 rpm e 30°C para conferir aeração adequada por um período de 30 dias. Após este período os hidrocarbonetos remanescentes do óleo foram extraídos com 30 ml de hexano em funil de separação conforme descrito por Chhatre et. al, (1996). Foi avaliada a degradação dos hidrocarbonetos benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo-a-pireno, tridecano, tetradecano, hexadeceno, pristano e fenildecano, presentes no óleo bruto. Uma alíquota de 1 ul do hexano foi injetada no Cromatógrafo Gasoso Shimadzu modelo CG 14 A equipado com uma coluna BPX5 de (25 metros de comprimento, 0,22 MM de diâmetro interno e 0,25 μ m de filme) e o injetor foi operado no modo splitless. A condição de operação do equipamento foi: injetor 290° C , detector 320° C, coluna temperatura inicial 55° C por 3 minutos e a primeira rampa foi aumentada de 5° C /minuto até 280° C e mantida por 5 minutos, a segunda rampa foi aumentada de 3° C/minuto até 310° C e mantida por 10 minutos. O tempo de corrida foi de 75 minutos.

4.6. Otimização da degradação do óleo bruto pelo consórcio formulado em microcosmo utilizando um solo sem histórico de contaminação

Nesse experimento foi utilizado solo Argisolo Vermelho distrófico (Hapluda) (Embrapa, 1999) proveniente da estação experimental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRG), coletados em profundidade de 0-20 cm, sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Amostras foram enviadas para o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) para análise dos nutrientes contidos o mesmo, conforme mostra a Tabela 5.

TABELA 5: Análise dos nutrientes do solo pelo IAC.

M.O	g/dm ³	29
pH		5,9
P	mg/dm ³	120
K	mmolc/dm ³	2,8
Ca	mmolc/dm ³	85
Mg	mmolc/dm ³	15
Na	mmolc/dm ³	ND
Al	mmolc/dm ³	ND
H+Al	mmolc/dm ³	18
S.B.	mmolc/dm ³	102,8
C.T.C.	mmolc/dm ³	121
V%	%	85
S	mg/dm ³	ND
B	mg/dm ³	0,2
Cu	mg/dm ³	4,0
Fe	mg/dm ³	70
Mn	mg/dm ³	3,8
Zn	mg/dm ³	52,7
N	g/Kg	0,77

Extratores: M.O.: Oxi-red; pH: sol. CaCl₂; P, K, Ca, Mg: Resina; H+Al: sol. Tampão; B: água quente; Cu, Fé, Mn, Zn: D.T. P.A.; N: Ac. Sulfuric

O solo foi peneirado com peneira Granutest ABNT 16 para retirada de pedaços de raízes e uma melhor homogeneização.

O microcosmo foi formulado adicionando-se 100 g de solo nos frascos de 1500 mL, hermeticamente fechados, com adição de óleo bruto na proporção de 5% (P/V). Sua umidade foi ajustada e mantida em 50% da capacidade de campo. O óleo bruto utilizado foi cedido pela REPLAN (Petrobras), de Paulínia-SP. Foi avaliado a concentração de nitrogênio, fósforo, ferro e tamanho do inóculo, utilizando a metodologia de superfície de resposta, com um planejamento fatorial completo 2^4 com 27 ensaios e pontos centrais em triplicata (NETO, et al.; 1995), para otimização da degradação dos hidrocarbonetos do petróleo. Utilizou-se Uréia como fonte de nitrogênio, Fosfato de Potássio como fonte de fósforo e Sulfato de Ferro como fonte de ferro. Foi preparada solução estoque de 2M de Uréia, 1M de Fosfato de Potássio e 2M de Sulfato de Ferro para posterior adição ao solo. As soluções foram adicionadas ao microcosmo conforme o planejamento do experimento mostrado na Tabela 6.

TABELA 6: Valores reais e codificados do experimento.

Ensaio	Valores codificados			
	Uréia	Fosfato de Potássio	Sulfato de Ferro	Inóculo
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

Continuação da tabela anterior

Valores reais				
Valores codificados	2M /em ul/100g de solo	1M/ em ul/100g de solo	2M/em ul/100g de solo	ml/100g de solo
0	830	280	10	0,6
1	1080	370	13	0,8
-1	580	200	7	0,4
2	1330	450	16	1
-2	330	110	4	0,2

Os experimentos foram conduzidos durante 53 dias, para a avaliação da produção de C-CO₂, e durante 91 dias para avaliação da degradação do óleo bruto através de cromatografia gasosa. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, para simular as variações naturais de temperatura, conforme mostra Figura 7. Após esse período foram retiradas amostras e armazenadas em frascos âmbar para posterior análise da degradação dos principais hidrocarbonetos do óleo bruto.



FIGURA 7: Fotos do experimento conduzido durante 53 dias.

4.6.1. Evolução de C-CO₂ no experimento em microcosmos utilizando solo sem histórico de contaminação

No experimento conduzido em microcosmos, conforme descrito no item 4.6, foi avaliado a evolução do C-CO₂. Nesse experimento foi adicionado copinho de café suspenso em um aparato de arame usado como suporte sobre a amostra de solo e, foi adicionado 20 mL de NaOH à 0,5M para captação de CO₂ liberado. No frasco controle foi adicionado apenas o copinho com NaOH. Após incubação os copinhos foram retirados e receberam 1ml de BaCl₂ à 1M e algumas gotas de fenolftaleína para titulação com HCl à 0,125M padronizado. A liberação de CO₂ foi calculada pela fórmula (STOTZKY, 1965):

$$\text{mg CO}_2 = (B-V) \cdot M \cdot E$$

onde B= volume de HCl necessário para titular o excedente de NaOH da prova em branco; V= volume de HCl necessário para titular o excedente de NaOH da amostra; M= molaridade do HCl 0,125M; E= peso equivalente do carbono. A produção de CO₂ foi medida diariamente durante 53 dias para avaliação do comportamento dos ensaios no planejamento experimental.

4.6.2. Análise por Cromatografia Gasosa dos hidrocarbonetos presentes no óleo bruto utilizado no microcosmo com solo sem histórico de contaminação

Os hidrocarbonetos presentes no óleo bruto, utilizado no microcosmo (item 4.6), foram extraídos do solo utilizando a metodologia proposta por VENOSA et al.,1997, modificada. Foi pesado 1g de solo do microcosmo e adicionou-se igual massa de Na₂SO₄ anidro. Essa mistura foi extraída por sonicação em 3 tempos por um período total de 12 minutos com 30 ml de Diclorometano. O extraído foi centrifugado para deposição do material do solo em suspensão. Após centrifugação foi seco em rotaevaporador e ressuspenso em 500 ul de Diclorometano. O produto foi armazenado em frascos âmbar para análise no

Cromatógrafo Gasoso.

Uma alíquota de 1ul do extraído com Diclorometano foi injetado no Cromatógrafo Gasoso (Shimadzu modelo CG 14 A) equipado com uma coluna BPX5 de (25 metros de comprimento, 0,22 MM de diâmetro interno e 0,25 µm de filme) e o injetor foi operado no modo splitless. A condição de operação do equipamento foi: injetor 290 °C , detector 320 °C, coluna temperatura inicial 55 °C por 3 minutos e a primeira rampa foi aumentada de 5 °C /minuto até 280 °C e mantida por 5 minuto, a segunda rampa foi aumentada de 3 °C/minuto até 310 °C e mantida por 10 minutos. O total da corrida foi de 75 minutos.

4.7. Avaliação da degradação do óleo bruto pelo consórcio microbiano em microcosmo utilizando solo do landfarming da REPLAN (PETROBRAS)

Neste experimento foi utilizado um solo proveniente da área do landfarming da Refinaria da Petrobras em Paulínia-SP (REPLAN). O landfarming da REPLAN foi construído em 1987 e ocupa uma área de 40.000 m² (250 X 160 m) onde são recebidos a borra oleosa proveniente do refino do óleo bruto. Com isso, este solo apresenta uma microbiota adaptada para degradação de compostos derivados de petróleo. O microcosmo foi formulado adicionando-se 100 g do solo nos frascos de 1500 mL, hermeticamente fechados, com adição de óleo bruto na proporção de 5% (p/v). Sua umidade foi ajustada e mantida em 50% da capacidade de campo. O óleo bruto utilizado foi cedido pela REPLAN (Petrobras), de Paulínia-SP. Utilizou-se Uréia como fonte de nitrogênio, Fosfato de Potássio como fonte de fósforo e Sulfato de Ferro como fonte de ferro e o consórcio microbiano liofilizado nas concentrações otimizadas definidas no experimento descrito no item 4.6.1. Os experimentos foram desenvolvidos em triplicata da seguinte forma:

Frasco 1	Solo + Óleo (5% P/V) + HgCl ₂ p/esterilizar o solo
Frasco 2	Solo + Óleo
Frasco 3	Solo + Óleo + Nutriente
Frasco 4	Solo + Óleo + Nutriente + Consórcio não liofilizado
Frasco 5	Solo + Óleo + Liofilizado(c/nutriente)
Frasco 6	Solo + Óleo + Liofilizado (s/nutriente)

O consórcio microbiano liofilizado foi reativado em meio caldo nutriente (Difco) em erlenmeyer de 125 ml e incubado em agitador rotatório (Shaker marca New Brunswick Scientific modelo Innova 4900) onde foi mantido 30 °C e 150 rpm. O crescimento foi verificado de tempo em tempo através da densidade óptica (DO_{590nm}) em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1201) até atingir D.O de 1. Após o crescimento foi retirado um volume de 0,6 ml (valor otimizado, definido no experimento 4.6.1) do erlenmeyer, onde foi colocado em eppendorf e centrifugado por 10 minutos a 3628.8 g para precipitação das células. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200ul de água MilliQ estéril e a suspensão bacteriana foi adicionada ao microcosmo. O experimento foi conduzido durante 91 dias para a avaliação da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo através de análise por Cromatografia Gasosa. O experimento foi realizado em temperatura ambiente, para simular as variações naturais da mesma. Após o término do experimento os hidrocarbonetos remanescente do óleo bruto foram extraídos conforme descrito no item 4.6.2.

4.8. Avaliação do potencial de degradação do óleo pelo consórcio microbiano liofilizado com e sem fonte de nutriente

A avaliação do potencial de degradação dos hidrocarbonetos do óleo bruto em solos de landfarming pelo consórcio liofilizado foi realizada da seguinte forma:

Foi preparado uma solução de Skim Milk (Difco Bacto) 20%. O meio foi

distribuído em ampolas de vidro (2 mL em cada ampola), previamente esterilizadas por aquecimento a 160°C por 2 horas, e tampada com algodão onde foi autoclavada por 15 minutos. Após a esterilização as ampolas foram congeladas e transferida para o liofilizador, onde ficou por uma noite. O consórcio microbiano foi cultivado em meio caldo nutriente (Difco Bacto), até atingir densidade óptica de 1 em espectrofotômetro. Um volume de 0,6 ml do crescimento foi (volume definido na otimização, item 4.6) centrifugado e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em água MilliQ estéril e uma parte em solução de uréia, fosfato de potássio e sulfato de ferro (2M), para a avaliação da necessidade desses sais na liofilização. Após a ressuspensão das células foram liofilizadas por cerca de 60 minutos em liofilizador (FTS Systems modelo Dura-dry MP). O liofilizado foi testado, para avaliar sua eficiência em degradar os hidrocarbonetos de petróleo, conforme descrito no item 4.7.

4.9. Identificação do consórcio microbiano através da análise de seqüência do gene RNA ribossomal 16S

A extração de DNA genômico das 5 linhagens bacterianas pertencentes ao consórcio formulado, seguiu o protocolo de PITCHER et al, (1989). Uma alçada (tamanho de um grão de arroz) de crescimento bacteriano foi raspada das placas, e transferida para eppendorfs. As células foram precipitadas por centrifugação e o sobrenadante descartado. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em água Milli-Q e novamente centrifugado a 3225.6 g por 3 minutos. As células foram, então, ressuspensas em 100µL de tampão Tris-EDTA pH=8,0 contendo 2mg/ml de lisozima e incubadas a 37° C por 30 minutos. Adicionou-se 500 µL da solução de guanidina para promover a lise e agitou-se, brevemente, em vortex. O lisado foi mantido a temperatura ambiente por 10 minutos e resfriado em banho de gelo, 250 µL de acetato de amônia 7,5 M, foram adicionados ao eppendorf e incubado em gelo por mais 10 minutos. Foi adicionado 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v) ao eppendorf. Este foi agitado manualmente para misturar e centrifugado a 6451.2 g por 10 minuto. A fase aquosa formada na porção superior

do tubo foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e adicionado 0,54 vol. de isopropanol para precipitação do DNA. Após inversão sucessivas, o tubo foi centrifugado a 1892.8 g por 10 minutos. Os pellets de DNA foram lavados 2 vezes com 1 ml de etanol 70% (v/v) e secos. Os pellets foram dissolvidos em 200 μ L de tampão TRIS-EDTA pH=8,0 e adicionado 10 μ L de RNase onde foram incubados por 1 hora a 37^o C. Após essa fase colocou-se um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), após a adição de 20 μ L de cloreto de lítio 4M, a fim de remover a proteína. Os microtubos foram agitados manualmente e centrifugados a 3225.6 g por 10 minutos. Foram recuperadas 200 μ L de solução aquosa onde se encontra o DNA. O DNA foi então precipitado com a adição de dois volumes de etanol 70% e centrifugado a 1892.8 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA seco a temperatura ambiente para remoção total do etanol. O DNA foi então ressuspensão em 30 μ L de água Milli-Q e estocado a 4^o C para análise em eletroforese em gel de agarose.

4.9.1. Quantificação de DNA extraído por eletroforese

O DNA obtido na metodologia descrita no item 4.9 foi visualizado e quantificado em eletroforese em gel de agarose. Para a quantificação de DNA estimada a intensidade das bandas foram comparadas com a intensidade das bandas de padrão de DNA do fago λ (BRL Gibco) com concentrações conhecidas. O gel de agarose foi preparado dissolvendo tampão TEB (Tris base [tris (hidroximetil)aminometano], EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e ácido bórico em agarose 0,7%, em um frasco Schott, onde foi levado ao microondas para dissolver a agarose. Após dissolver o meio foi esfriado até uma temperatura de aproximadamente 60^o C, quando foi adicionado brometo de etídio. Após essa etapa o gel foi vertido em uma bandeja e transferido para a cuba de eletroforese onde continha o tampão TEB para a corrida.

O DNA foi misturado ao tampão de amostra, composto de glicerol e azul de bromofenol, dissolvido em água ou tampão TE (Tris, EDTA), na proporção de 2:5

(tampão de amostra: amostra de DNA) onde foi aplicado no gel para corrida e submetido à eletroforese (100V; 400mA e 100W) Pharmacia mod. EPS-601 por 40 minutos. A visualização e documentação das imagens dos géis foram feitas através de um sistema de fotodocumentação GDS-8000 (UVP Bioimaging Systems, Upland, CA) com o software LabWorks.

4.9.2. Amplificação de fragmentos de DNA 16S pela técnica de PCR

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S a partir do DNA das linhagens extraídas foi feita em um termociclador iCycler (Bio-Rad). O volume total de cada reação foi de 50 μ L. O rDNA 16S foi amplificado a partir da concentração 50 ng de DNA total. Cada reação continha 20 pmol de cada primer, 200 μ M de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 1/10 volume de um tampão de PCR (10X) que acompanha a enzima. Após desnaturação por 2 minutos a 96°C, as reações de amplificação foram submetidas a 30 ciclos de: desnaturação (1 min, 95°C), anelamento (1 min, 50°C) e extensão (3 min, 60°C), com uma extensão final por 7 minutos a 60°C. Os *primers* utilizados (10f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; e 1110r 5'-ACGGGCGGTGTGTACA-3') são universais para o Domínio Bactéria e foram desenhados por Amann *et al* (1995). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose (0,7%) contendo brometo de etídio (1 μ L/100 mL), submetido à eletroforese (100 V, 400 mA, 100 W) por 40 minutos. Os padrões utilizados foram o DNA do fago λ (BRL Gibco) para quantificação e Generuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas Life Sciences) para estimativa de tamanho do produto amplificado.

4.9.3. Sequenciamento do Gene 16S rRNA

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a precipitação para a eliminação dos dNTPs que não foram incorporados. Foram adicionados 10 μ L de isopropanol a 60% (recém preparado). Após a homogeneização por

agitação, as microplacas foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por 20 min e então centrifugadas a 4000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e 250 µL de etanol 70% foram adicionados. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 716.8 g, o sobrenadante descartado, e o precipitado incubado por 5 minutos a 40°C para secagem. Em seguida o precipitado foi ressuspensionado em 10 µL de formamida (HiDi formamida – Applied Biosystems). A microplaca foi colocada em um termociclador para desnaturação do DNA a 96 °C durante 5 minutos e imediatamente colocada no gelo por 2 minutos.

A leitura das bases foi realizada no Seqüenciador Automático de 96 capilares MegaBace (Amersham Life Science *Molecular Dyenamics*) do laboratório de Divisão de Recursos Microbiano do CPQBA (Centro de Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas, Biológicas e Agrícolas)/UNICAMP.

4.9.3.1. Análise filogenética das seqüências

As seqüências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (< 20) através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDO et al., 1998). As seqüências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W 1.8 (<http://www.ebi.ac.uk/indes.html>) (THOMPSON et al., 1994). Posteriormente, o ajuste das extremidade das seqüências de DNA, de forma que todas elas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas, foi realizado com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 2001). Para o cálculo da significância estatística da similaridade entre as seqüências foi utilizada uma re-amostragem para 1000 replicações (SWOFFORD et al. 1996).

O método de distância (“Neighbour Joining”) (SAITOU & NEI, 1987) foi utilizado para a construção da árvore filogenética com auxílio do programa

TREECON (VAN PEER & DE WACHTER, 1994).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Crescimento celular

A avaliação do crescimento celular teve como objetivo verificar se as 43 linhagens tinham a capacidade de utilizar os hidrocarbonetos como fonte de energia. A Figura 8 e 9 mostram o crescimento de cada bactéria nos diferentes grupos de hidrocarbonetos testados.

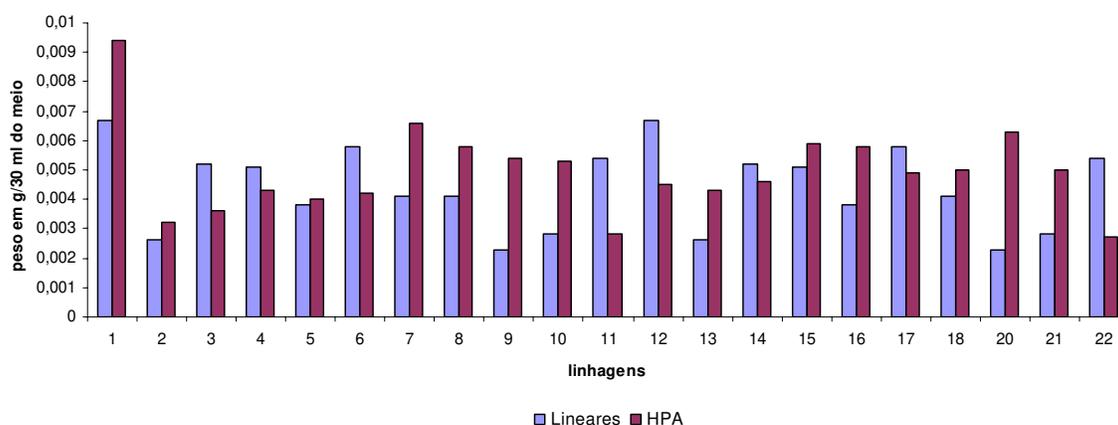


FIGURA 8: Peso seco das linhagens em HPA e hidrocarbonetos lineares.

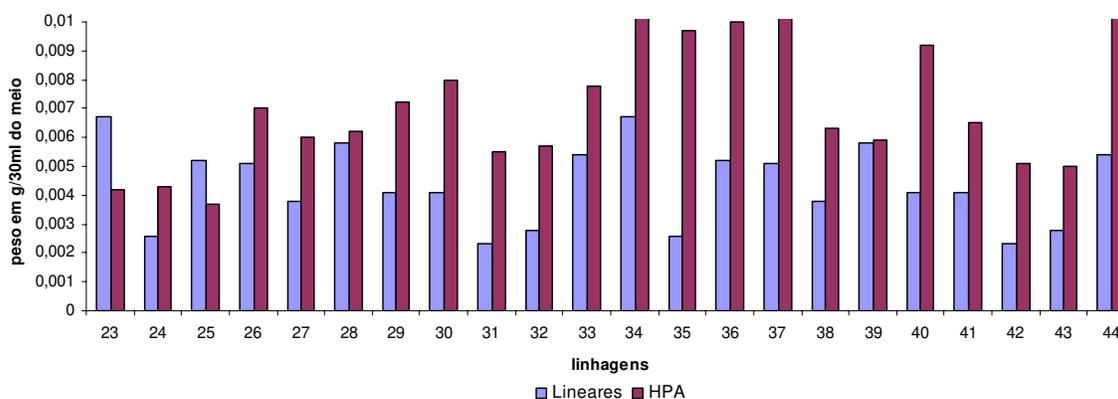


FIGURA 9: Peso seco das linhagens em HPA e hidrocarbonetos lineares.

Os gráficos mostram que as cepas 1, 12, 23 e 34 apresentaram peso seco de 0,00022 g/mL de meio, sendo estas as que apresentaram melhores crescimentos

em meio contendo hidrocarbonetos lineares como fonte de carbono.

A cepa 34 apresentou peso seco da ordem de 0,00043 g/mL de meio; as linhagens 35, 36, 37 e 44 apresentaram peso seco de 0,00032 g/mL de meio, 0,00033 g/mL de meio, 0,00038 g/mL de meio e 0,00036 g/mL de meio, respectivamente, sendo estas as melhores linhagens em relação ao peso seco em HPA's. JACOBUCCI (2000), utilizando efluente de uma oficina de reparo de caminhões, transportadores de derivados de petróleo, como meios de cultura obteve concentração celular de 1,826 mg/ml de meio de cultura utilizando a bactéria *Planococcus citreus* em 120 horas de incubação. Já, com esse mesmo efluente como meio de cultura, mas com a bactéria *Pantotea aglomerans*, o crescimento foi de 2,478 mg/ml do meio de cultura.

O crescimento celular está diretamente relacionado com o aumento da produção de biossurfactantes. A produção de biossurfactante é influenciada também pela reposição contínua do substrato utilizado como fonte de carbono (JACOBUCCI, 2000). Cabe lembrar que nos experimentos realizados, os substratos, ou hidrocarbonetos, foram adicionados apenas uma vez, no início dos testes.

KUSHIDA (2000) concluiu que houve um aumento na produção de biomassa, na produção de biossurfactantes e uma diminuição gradativa do óleo residual, com o aumento do tempo de contato entre a cepa *Planococcus citreus* e o óleo residual utilizado.

Em estudos realizados foi observado que bactérias isoladas de landfarming do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes (SITEL) do pólo Petroquímico de Triunfo, RS apresentou um crescimento de 12,82 Log UFC, utilizando Antraceno como fonte de carbono em 96 horas de incubação. (SANTOS, 2004).

5.1.1. Avaliação do pH

Nos ensaios de biodegradação (ou avaliação do crescimento dos microrganismos em hidrocarbonetos), o pH do meio de cultura foi avaliado no início e final do tempo de incubação. As Figuras 10 e 11 mostram o pH final do meio obtido após cultivo dos microrganismos do meio para todas as linhagens foi de pH 7,1 para os hidrocarbonetos lineares e de pH 7,3 para os HPAs.

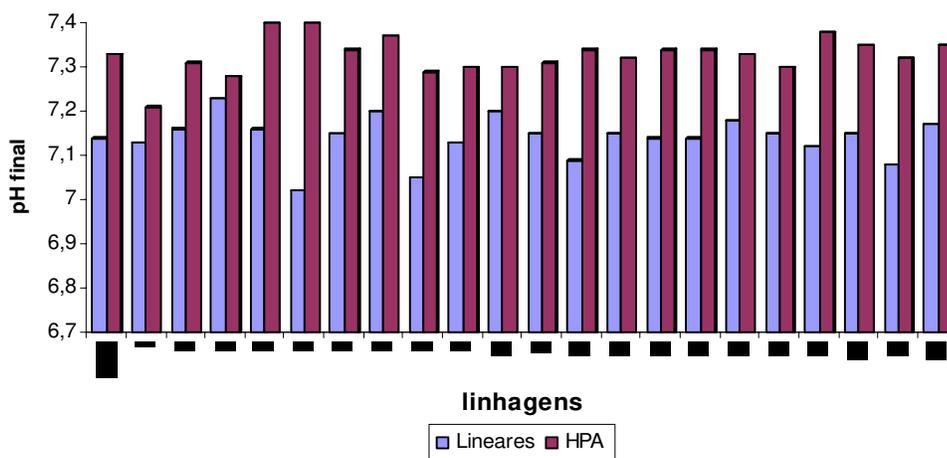


FIGURA 10: pH do meio no final do experimento para as linhagens de 1 a 22

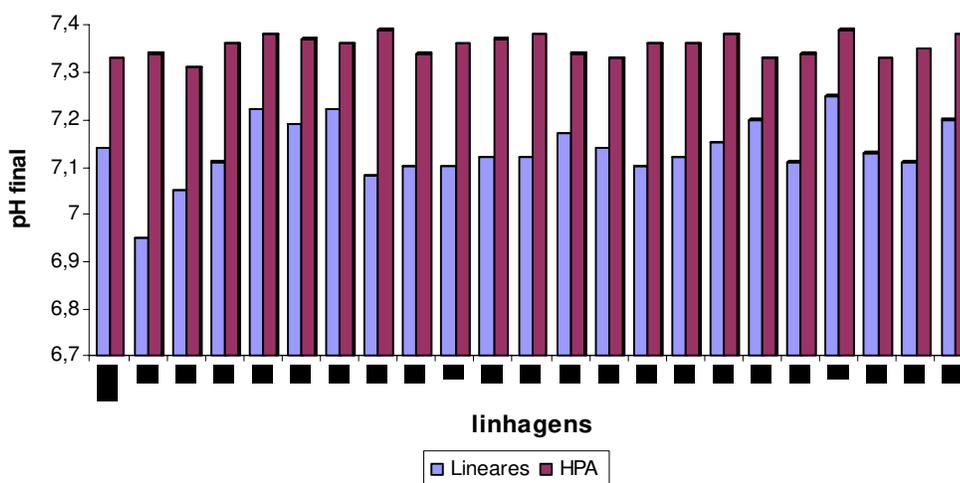


FIGURA 11: pH do meio no final do experimento para as linhagens de 23 a 44

Assim, pode-se observar (Figuras 10 e 11) que o pHs das amostras sofreram pequenas alterações quando comparados com o pH inicial. Os valores do pH das amostras pouco se desviam dos valores iniciais para os dois tipos de hidrocarbonetos.

O pH é um fator limitante para o crescimento microbiano, em função da atividade enzimática ótima depender do pH. Muitos fertilizantes são utilizados para ajustar o balanço de carbono, nitrogênio e fósforo do meio e neutralizar o pH de um efluente ou local a ser tratado biologicamente e estimular o crescimento da microbiota autóctone ou adicionada intencionalmente (RAGHAVAN & VIVEKANANDAN, 1999; FOGHT et al., 1999; MAKI et al., 1999). A maioria dos microrganismos apresentam um melhor desenvolvimento em pH neutro, podendo ocorrer o dobro da taxa de biodegradação de petróleo com a correção do pH do solo (ROSATO, 1997).

5.2. Determinação da Tensão Superficial

A tensão superficial é um parâmetro que indica, indiretamente, a emulsificação dos hidrocarbonetos no meio de cultura utilizado. Os resultados obtidos mostram que as linhagens 1, 23, 35, 38 e 42 foram as que mais reduziram a tensão superficial para os hidrocarbonetos lineares com valores respectivos de 45,5 dinas .cm⁻¹; 49,5 dinas .cm⁻¹; 54,1 dinas .cm⁻¹; 54,2 dinas .cm⁻¹ e 52,1 dinas .cm⁻¹, para um controle com valor de tensão superficial de 64,7 dinas .cm⁻¹. As cepas 2, 18, 20, 37 e 41 reduziram a tensão para todos os HPA's, obtendo-se valores de 58,3 dinas .cm⁻¹; 60,1 dinas .cm⁻¹; 60,5 dinas .cm⁻¹; 60,3 dinas .cm⁻¹ e 60,6 dinas .cm⁻¹, e para um controle de 66,8 dinas.cm⁻¹. Os valores podem ser verificados nas Figuras 12 e 13 (os valores nas figuras estão em porcentagem de redução comparadas com o controle). Essa baixa redução da tensão superficial pode estar relacionada com o tempo de exposição de apenas 11 dias.

SANTOS (2004), obteve em um de seus experimentos, utilizando bactérias e antraceno como fonte de carbono, redução da tensão superficial de 33,2

dinas.cm⁻¹ em 48 dias de cultivo. Um microrganismo eficiente em produzir biossurfactante deve reduzir a tensão superficial para valores próximos a 30,0–35,0 dinas.cm⁻¹(DESAI & BANAT, 1997). Para aumentar o rendimento da produção de biossurfactante, tem sido proposta a adição de sais de ferro ou manganês (WEI &CHU, 1998).

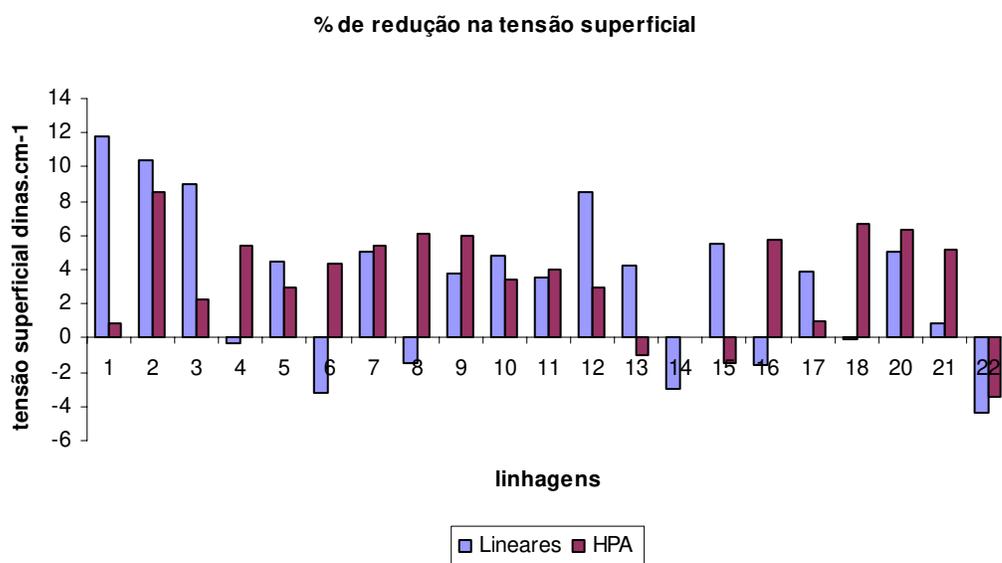


FIGURA 12: % de redução da Tensão Superficial para as cepas 1 à 22.

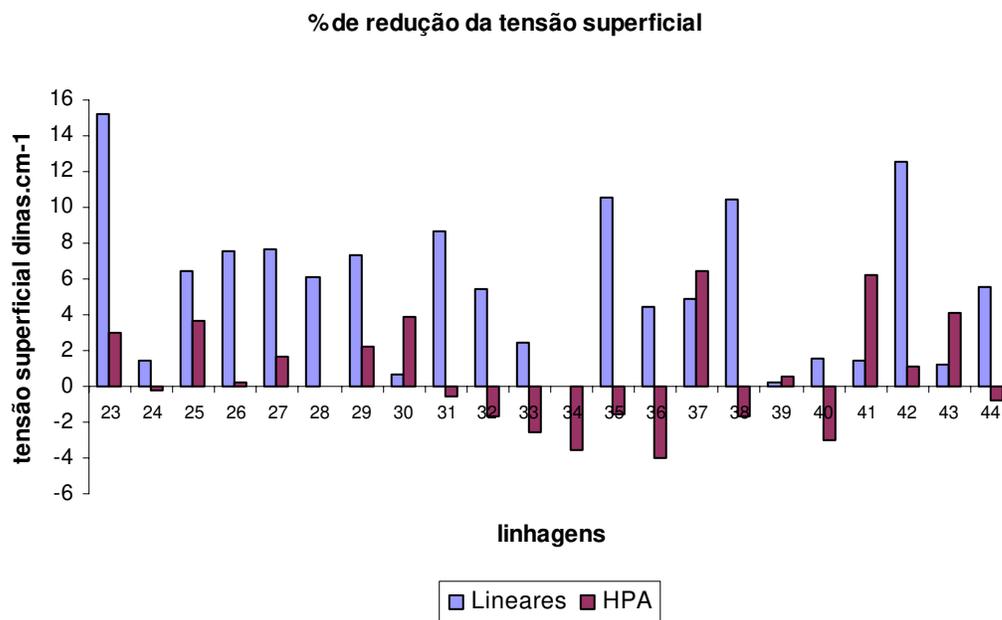


FIGURA 13: % de redução da Tensão Superficial para as cepas 23 à 44.

5.3. Determinação da Atividade de Emulsificação

5.3.1. Emulsificação tipo O/A

A emulsão do tipo óleo em água (O/A) das linhagens estudadas foi verificada pela medida de absorbância em espectrometria. Os valores de emulsão obtidos foram 0,1461 (linhagem 11), 0,1549 (linhagem 12); 0,1516 (linhagem 15); 0,183 (linhagem 16); 0,890 (linhagem 23) e 0,1587 (linhagem 38), após crescimento em presença de hidrocarbonetos lineares no meio de cultura utilizado (Figura 16). Para as linhagens com crescimento em HPA's os valores de emulsão foram 0,0705 (linhagem 6); 0,0705 (linhagem 9); 0,0925 (linhagem 11); 0,0925 (linhagem 16), 0,0757 (linhagem 17) e 0,1308 (linhagem 22) tiveram melhor desempenho após crescimento em HPA's, conforme Figura 17.

Em trabalho recente NEVES (2002) obteve atividade de emulsificação de óleo em água (ABS) para a linhagem *Bacillus badius*, utilizando meio de cultura para produção de biossurfactante, adicionado de um consórcio de HPA's (Naftaleno, Antraceno, Fluoreno e Pireno) no valor de 0,018 em 6 dias de cultivo.

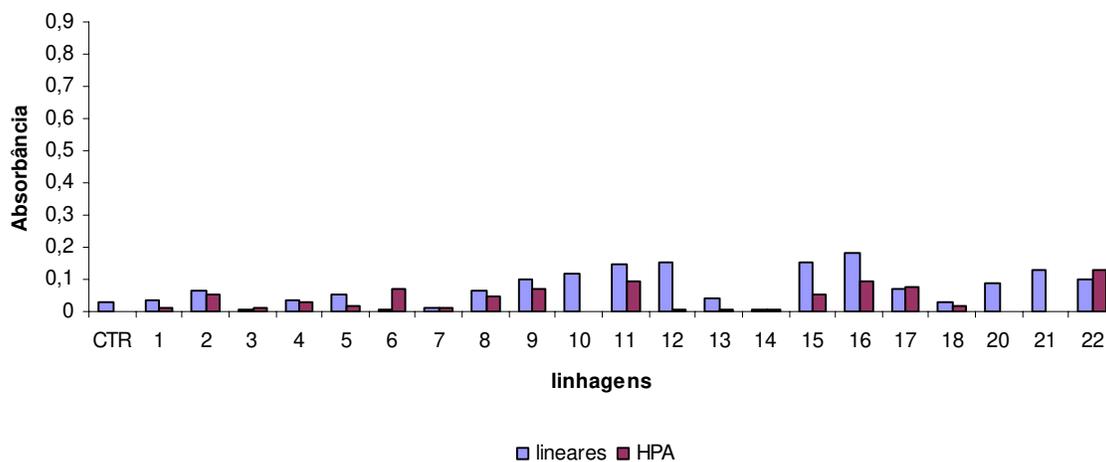


FIGURA 14: Capacidade de emulsificação do tipo O/A (linhagens 1-22).

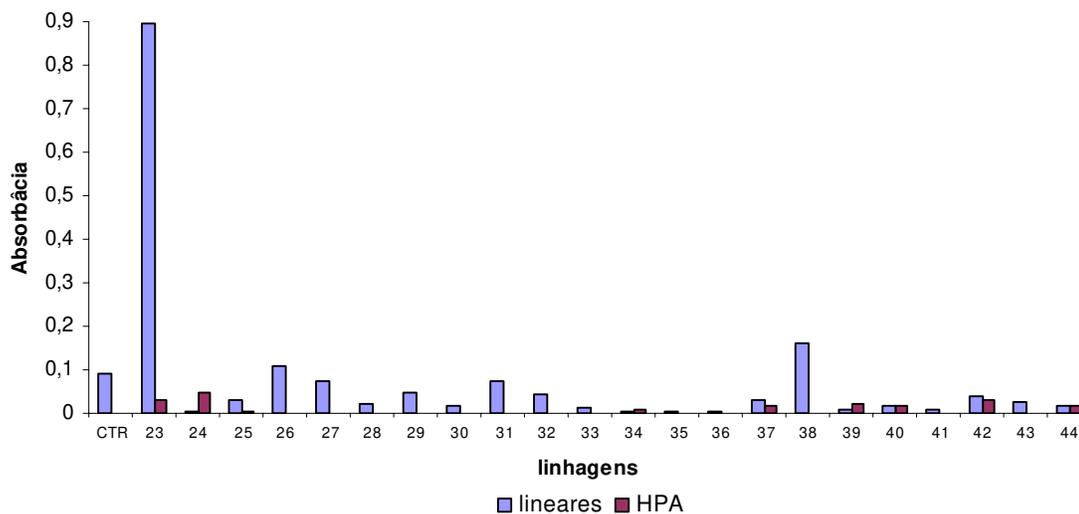


FIGURA 15: Capacidade de emulsificação do tipo O/A (linhagens 23-44).

5.3.2. Formação de Halo - Emulsificação do tipo A/O

A emulsificação do tipo A/O não foi verificado em nenhuma das linhagens. Desta forma, os hidrocarbonetos são emulsionados no próprio meio de cultura onde as linhagens estão presentes.

5.4. Avaliação da Biodegradação

A avaliação da biodegradação por cromatografia gasosa, verificou-se que as cepas 1, 5, 23, 25 e 29 apresentaram os melhores valores de porcentagem de degradação para os hidrocarbonetos lineares, e as cepas 1, 2, 9, 14 e 36 apresentaram os melhores valores de porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos conforme mostra a Tabela 7 e as Figuras 16 e 17.

TABELA 7: Porcentagem de degradação observada para os microrganismos com melhor desempenho.

Hidrocarboneto	% de Degradação									
	Linhagem	%	Linhagem	%	Linhagem	%	Linhagem	%	Linhagem	%
Tridecano	1	48,68	5	52,02	23	37,24	25	43,65	29	39,19
Tetradecano	1	48,53	5	51,44	23	33,61	25	38,14	29	34,7
Hexadeceno	1	48,76	5	52,59	23	35,42	25	36,09	29	34,13
Pristano	1	48,27	5	51,78	23	37,2	25	35,67	29	33,28
Fenildecano	1	48,79	5	52,28	23	34,23	25	34,05	29	31,24
Fenantreno	1	40,36	2	100	9	62,97	14	100	36	21,26
Naftaleno	1	100	2	100	9	100	14	100	36	100
Pireno	1	100	2	100	9	100	14	100	36	54,94
Benzo(a)pireno	1	73,22	2	100	9	100	14	100	36	72,06

Em estudos utilizando água do mar, não esterilizada, para simular as condições marinhas naturais e, adicionando petróleo extraídos de poços do Norte do Alasca, ALDRETT et al, (1997) conseguiu uma redução na fração dos hidrocarbonetos aromáticos do petróleo de 35 % em 28 dias de experimento em shaker à 200 rpm e 20°C. Já a redução na fração dos hidrocarbonetos saturados foi de 40% para o mesmo período. Com bactérias isoladas de landfarming, utilizando meio mínimo de sais e antraceno como fonte de carbono, SANTOS (2004) obteve uma redução de 71,1% e, de 72% quando foi adicionado fonte de ferro ao meio.

MARIUZZO (2000) utilizando bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas sp* inoculadas em meio mínimo acrescido de uma mistura de HPA's (Fluoranteno, B(b) Fluoranteno, B(K)Fluoranteno e B(a)Pireno) cultivadas por 40 dias a 25°C e 200rpm foi observado uma redução de 99,85%, 99,82%, 97,61% e 98,5% desses hidrocarbonetos, respectivamente. Quando se utilizou os HPA's separadamente a porcentagem de redução caiu para 96,15% do fluoranteno, 97,76% do B(b) Fluoranteno, 76,55% do benzo(K)fluoranteno e de 72,54% para o benzo(a)pireno

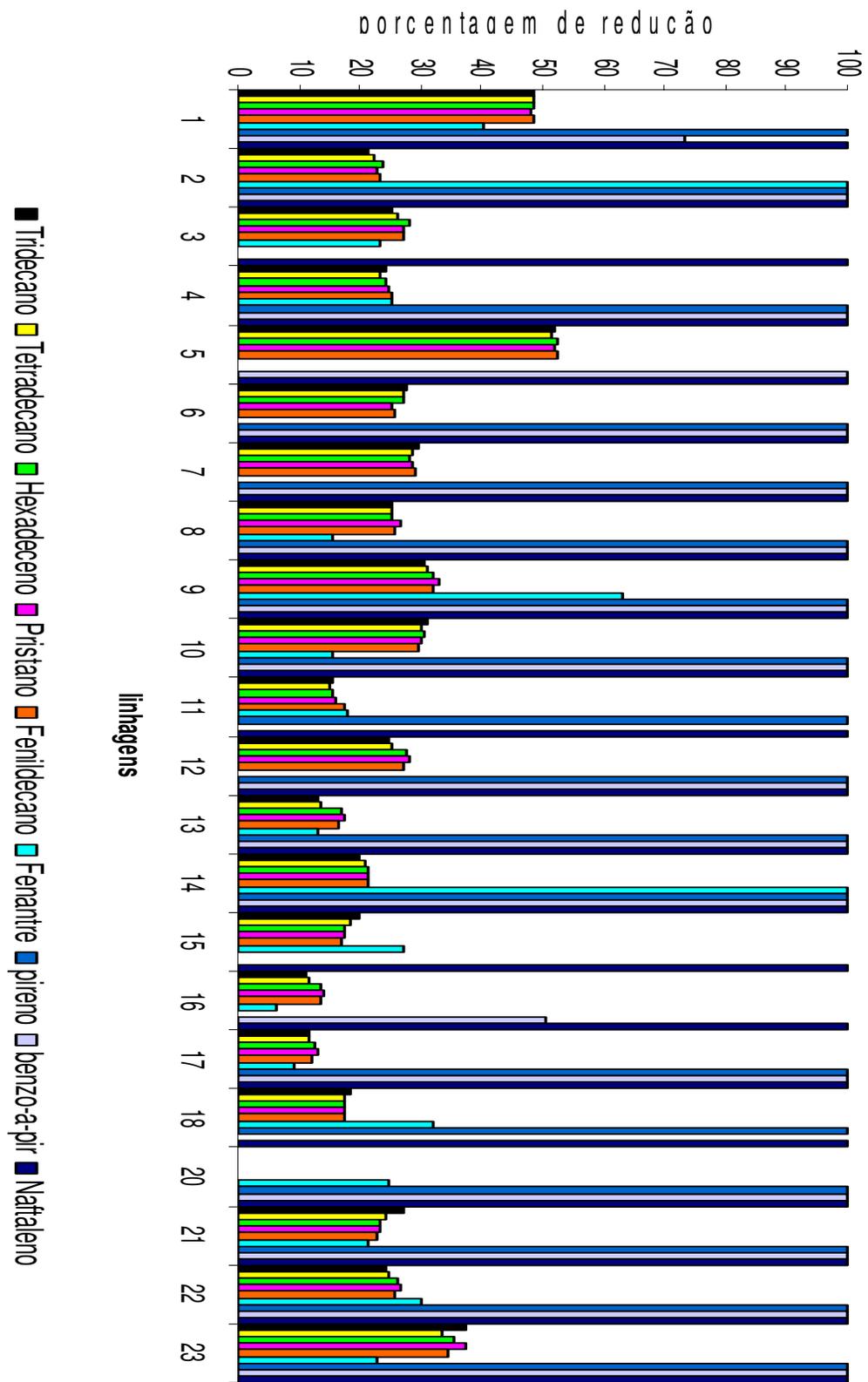


FIGURA 16: Degradação dos hidrocarbonetos pelas linhagens estudadas.

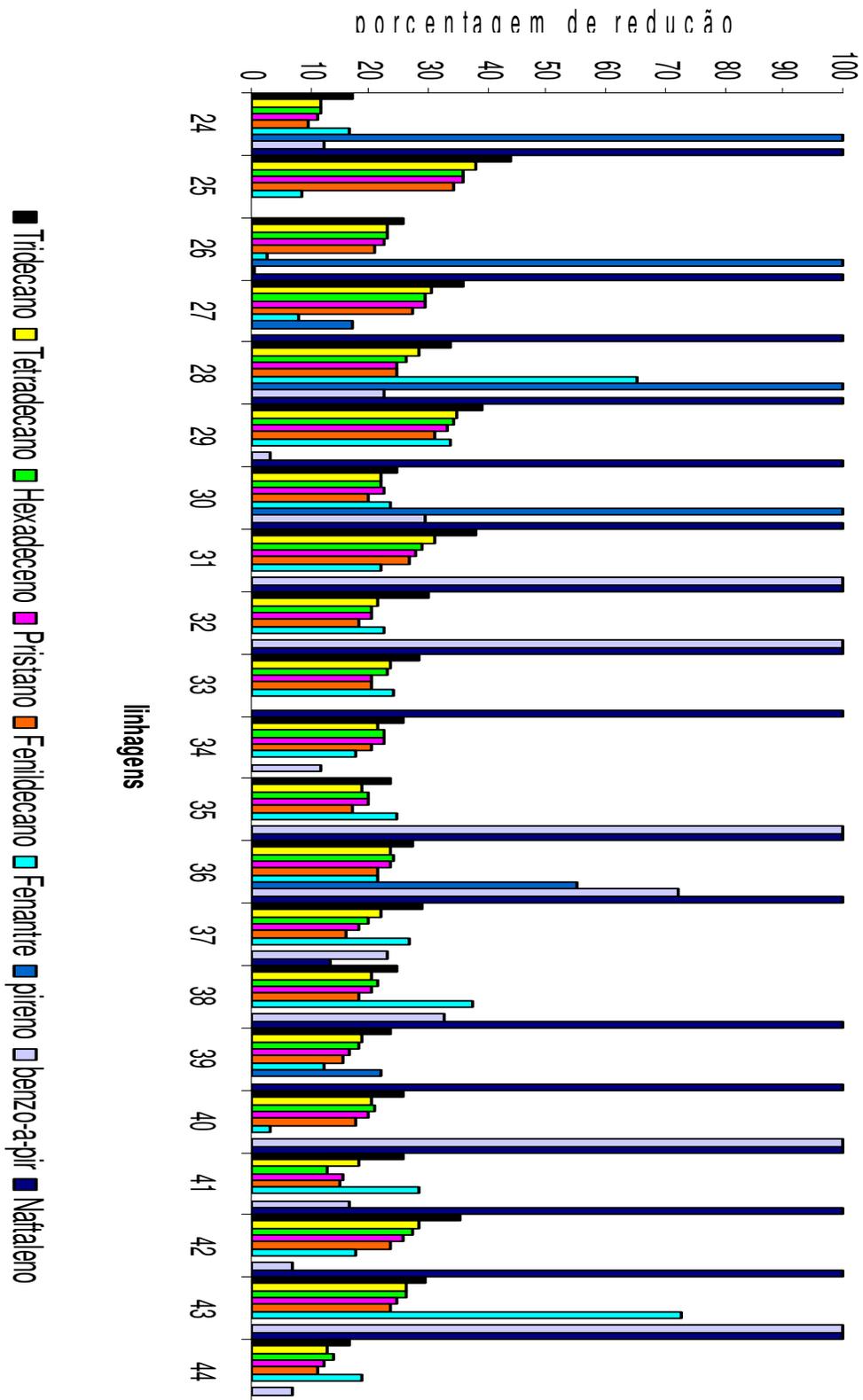


FIGURA 17: Degradação dos hidrocarbonetos pelas linhagens estudadas.

Com base nos resultados acima demonstrados, conclui-se que as cepas 1, 9, 22, 23 e 36 apresentaram melhores valores em um maior número de parâmetros analisados. Algumas linhagens apresentaram valores isolados melhores que as acima citadas, mas apenas em um ou outro parâmetro, não sendo, por isso, classificadas como melhores cepas, por não possuírem uma homogeneidade de crescimento, quebra de tensão superficial, emulsificação e porcentagem de degradação. As cinco cepas selecionadas apresentaram valores bastante equilibrados destes parâmetros, sendo consideradas bactérias com ótimo potencial de degradação dos hidrocarbonetos testados. A Tabela 8 apresenta a porcentagem de degradação das 5 cepas selecionadas, demonstrando uma homogeneidade na degradação destes compostos.

TABELA 8: Resultados em porcentagem de degradação das melhores linhagens.

Hidrocarbonetos	Porcentagem de Degradação das 5 Melhores Linhagens Selecionadas									
	Linhagem	%	Linhagem	%	Linhagem	%	Linhagem	%	Linhagem	%
Tridecano	1	48,68	9	30,46	22	24,11	23	37,24	36	27,47
Tetradecano	1	48,53	9	31	22	24,96	23	33,61	36	23,76
Hexadeceno	1	48,76	9	32,16	22	26,28	23	35,42	36	24,26
Pristano	1	48,27	9	32,82	22	26,93	23	37,2	36	23,53
Fenildecano	1	48,79	9	31,83	22	25,5	23	34,23	36	21,48
Fenantreno	1	40,36	9	62,97	22	100	23	100	36	21,26
Naftaleno	1	100	9	100	22	30,21	23	23,02	36	100
Pireno	1	100	9	100	22	100	23	100	36	54,94
Benzo(a)pireno	1	73,22	9	100	22	100	23	100	36	72,06

5.5. Testes de Toxicidade

As Tabelas 9 e 10, mostram, de acordo com a ordem crescente de concentração das amostras, os efeitos tóxicos destas na germinação e alongamento das raízes das sementes, verificando a concentração efetiva que causou 50% (CE₅₀) da inibição de germinação e crescimento radicular.

TABELA 9:Concentração efetiva (EC₅₀) para os hidrocarbonetos lineares.

Amostras / Inibição de Germinação (%) para os hidrocarbonetos Lineares						
Concent. (%)	*CTR	1	9	22	23	36
1,56	28,67	7,47	17,11	31,08	27,23	23,69
3,125	23,61	48,43	35,66	45,06	36,87	34,94
6,25	58,55	41,45	57,35	26,27	41,69	67,47
12,5	82,89	83,13	80,00	83,13	80,48	72,77
25	100,00	100,00	100,00	100	100	100
50	100,00	100,00	100,00	100	100	100
Equação (y=50)	25,141Ln(x) + 10,84	27,158Ln(x) + 4,2385	25,965Ln(x) + 8,4442	23,33Ln(x) + 13,417	24,394Ln(x) + 11,226	23,984Ln(x) + 14,221
R²	0,9102	0,899	0,9634	0,7865	0,9189	0,9464
**EC_{50%}	4,08	7,93	5,07	3,38	3,96	3,2

*** CTR: Controle abiótico** EC_{50%}: Concentração Efetiva de Toxicidade para 50% das sementes.**

TABELA 10:Concentração efetiva (EC₅₀) para os HPA's.

Amostras / Inibição de Germinação (%) para os HPA's						
Concent. (%)	*CTR	1	9	22	23	36
1,56	28,67	7,47	17,11	31,08	27,23	23,69
3,125	23,61	48,43	35,66	45,06	36,87	34,94
6,25	58,55	41,45	57,35	26,27	41,69	67,47
12,5	82,89	83,13	80,00	83,13	80,48	72,77
25	100,00	100,00	100,00	100	100	100
50	100,00	100,00	100,00	100	100	100
Equação (y=50)	24,665Ln(x) + 12,522	21,217Ln(x) + 21,2	26,353Ln(x) + 8,7621	26,551Ln(x) + 2,3903	19,954Ln(x) + 22,307	25,258Ln(x) + 9,4615
R²	0,8986	0,9437	0,9274	0,9652	0,8536	0,9368
**EC_{50%}	3,59	2,22	4,91	13,1	2,12	4,6

*** CTR: Controle abiótico** EC_{50%} Concentração efetiva de toxicidade para 50% das sementes.**

5.5.1. Hidrocarbonetos Lineares

De acordo com a Tabelas 9 e 10, pode-se verificar pela ordem crescente de concentração das amostras, os efeitos tóxicos destas na germinação e alongamento das raízes das sementes, verificando as concentrações efetivas que causou 50% (CE₅₀) da inibição de germinação e crescimento radicular, e compará-las com a porcentagem média de degradação, conforme mostra a Tabela 8, tanto para os hidrocarbonetos lineares quanto para os HPA's. Conforme as Tabelas, a cepa 1 apresenta maior porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos lineares (48,61%), e também menor efeito tóxico sobre o bioindicador utilizado (7,93%), sendo que este valor refere-se à concentração efetiva para inibir a germinação e alongamento de raiz para 50% das sementes testadas.

A cepa 36 apresentou menor porcentagem de degradação média para os

hidrocarbonetos lineares (24,1%) (Tabela 8) entre as cinco linhagens selecionadas, e também maior efeito tóxico em 50% das sementes, com concentração efetiva de 3,2%, assim como a cepa 22, que apresentou a 4ª maior porcentagem de degradação para os hidrocarbonetos lineares (25,56%) (Tabela 8) e, conseqüentemente, a 4ª concentração efetiva mais tóxica (3,38) para os mesmos hidrocarbonetos.

Já as cepas 9 e 23 apresentaram valores muito próximos na porcentagem de degradação média dos hidrocarbonetos lineares, 31,65% e 35,54% de degradação média, respectivamente. Já a concentração efetiva de toxicidade foi de 5,07% e 3,96%, respectivamente para os hidrocarbonetos lineares.

5.5.2. HPA's

Os resultados de EC_{50} e de porcentagem de degradação constantes nas Tabelas 8, e 10 mostram que a cepa 9 teve maior porcentagem de degradação (90,74%) e a segunda maior concentração efetiva (4,91%). A cepa 22, por sua vez, apresentou o segundo melhor valor em degradação (82,55%), mas foi a que apresentou menor efeito tóxico sobre o bioindicador utilizado (13,1%).

As cepas 1, 23 e 36 apresentaram ótimos valores de degradação (78,4%; 80,76% e 62,07%), mas ainda apresentam baixa concentração efetiva, sendo consideradas como altamente tóxicas para as sementes de alface, pois necessitam de apenas 2,22%, 2,12% e 4,6% de concentração para inibir os efeitos fisiológicos de 50% das sementes utilizadas.

Como anteriormente mencionado, os resultados obtidos demonstraram que alguns produtos da biodegradação apresentaram maior toxicidade do que os originalmente utilizados.

5.6. Avaliação do tamanho do inóculo na degradação de óleo bruto em meio mínimo de sais.

A Figura 18 mostra a avaliação do tamanho do inóculo do consórcio microbiano na degradação dos hidrocarbonetos, benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo-a-pireno, tridecano, tetradecano, hexadeceno, pristano e fenildecano, presentes no óleo bruto em meio mínimo de sais.

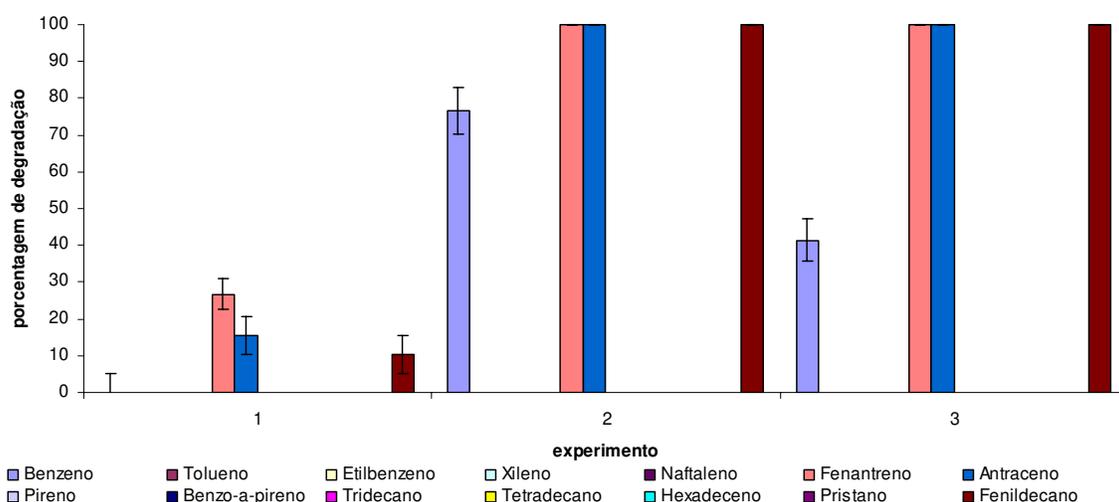


FIGURA 18: Avaliação do tamanho do inóculo na degradação dos hidrocarbonetos em meio mínimo pelo consórcio formulado

Os resultados obtidos indicam que houve uma maior degradação para o experimento 3, onde os hidrocarbonetos, fenantreno, antraceno e fenildecano, foram degradados em 100% e, o benzeno em 41,32%. Os hidrocarbonetos tolueno, etilbenzeno, xileno, naftaleno, pireno, benzo-a-pireno, tridecano, tetradecano, hexadeceno e pristano não foram detectados nem nos experimentos nem para o controle, sugerindo que os mesmos tenham sido degradados pela microbiota indígenas presentes no óleo, uma vez que este não foi esterilizado.

No experimento 1 houve uma degradação de 0,1% para o benzeno, 26,77% para o fenantreno e de 15,45% para o antraceno. Já para o experimento 2 houve

uma degradação de 76,58% para o Benzeno e de 100% para o fenantreno e benzeno.

Com este ensaio pode-se determinar que os melhores resultados foi obtido no experimento 3, onde obteve-se os melhores valores de degradação para os hidrocarbonetos analisados do óleo bruto.

5.7. Otimização da degradação do óleo bruto pelo consórcio formulado em microcosmos com solo sem histórico de contaminação

Este experimento teve como objetivo verificar qual a melhor concentração das fontes de nitrogênio, fósforo, ferro e tamanho do inóculo, para uma melhor degradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo bruto, analisados por cromatografia gasosa, conforme o planejamento experimental item 4.6.

As figuras 19 , 20, 21 e 22 mostram a porcentagem de degradação para os hidrocarbonetos analisados presentes no óleo bruto.

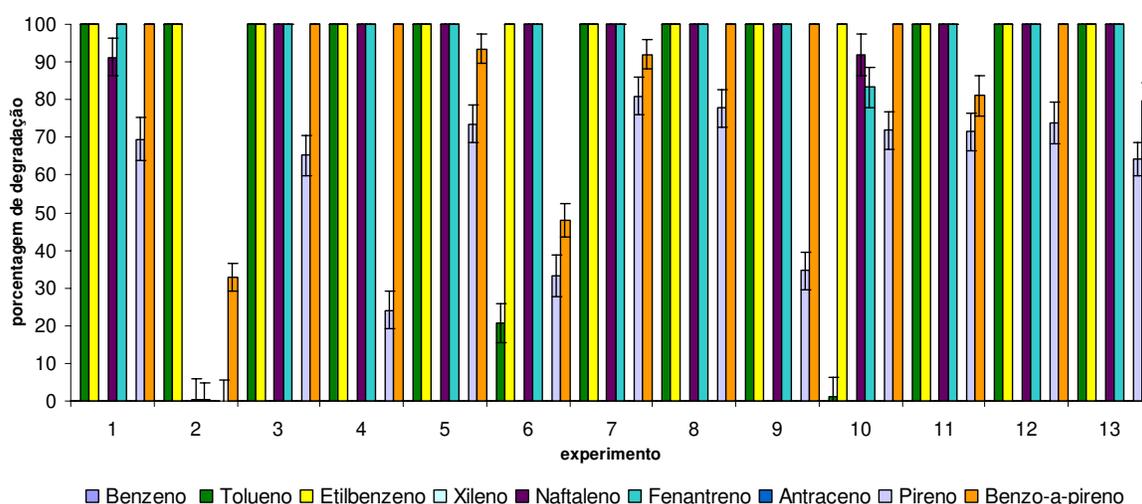


FIGURA 19: Degradação dos hidrocarbonetos em solos sem histórico de contaminação para os experimentos do planejamento de 1 a 13.

Conforme mostra a Figura 19 os experimentos de 1 a 13 tiveram uma degradação média para os hidrocarbonetos benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno e benzo-a-pireno, analisados de 62,31% no experimento 1, 25,94% no experimento 2, 62,80% no experimento 3, 58,23% no experimento 4, 63,01% no experimento 5, 44,64% no experimento 6, 63,67% no experimento 7, 64,20% no experimento 8, 59,39% no experimento 9, 49,76% no experimento 10, 61,39% no experimento 11, 63,76% no experimento 12 e de 60,44% no experimento 13.

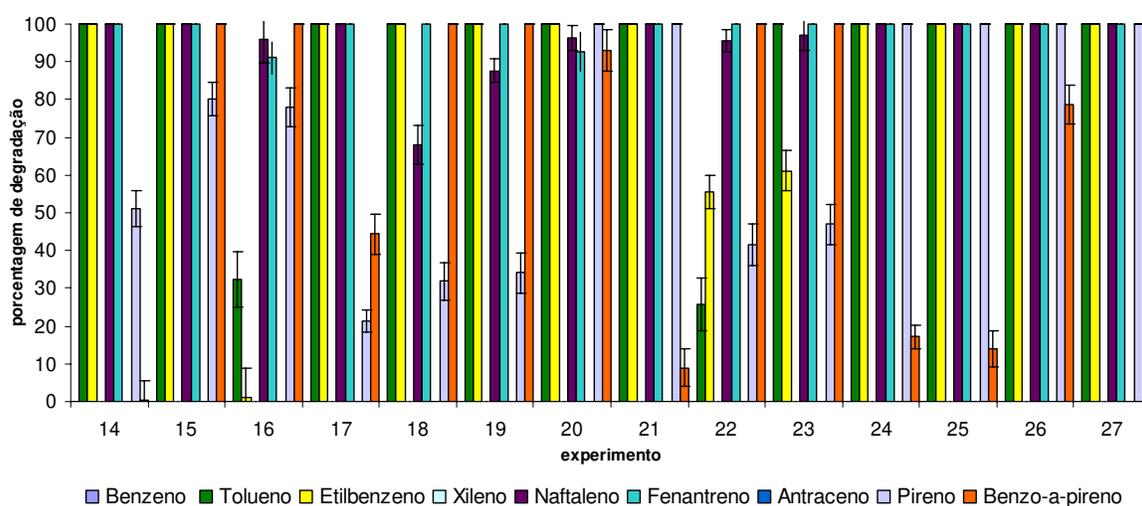


FIGURA 20: Degradação dos hidrocarbonetos em solos sem histórico de contaminação para os experimentos do planejamento de 14 a 27.

A Figura 20 mostra a degradação dos hidrocarbonetos analisados para os experimentos de 14 à 27. Os hidrocarbonetos benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno e benzo-a-pireno tiveram uma degradação média de 50,15% no experimento 14, 64,46% no experimento 15, 44,28% no experimento 16, 51,74% no experimento 17, 55,74% no experimento 18, 57,97% no experimento 19, 64,69% no experimento 20, 56,55% no experimento 21, 46,46% no experimento 22, 56,15% no experimento 23, 57,10% no experimento 24, 64,30% no experimento 25, 66,67% no experimento 26 e de 66,66% no experimento 27.

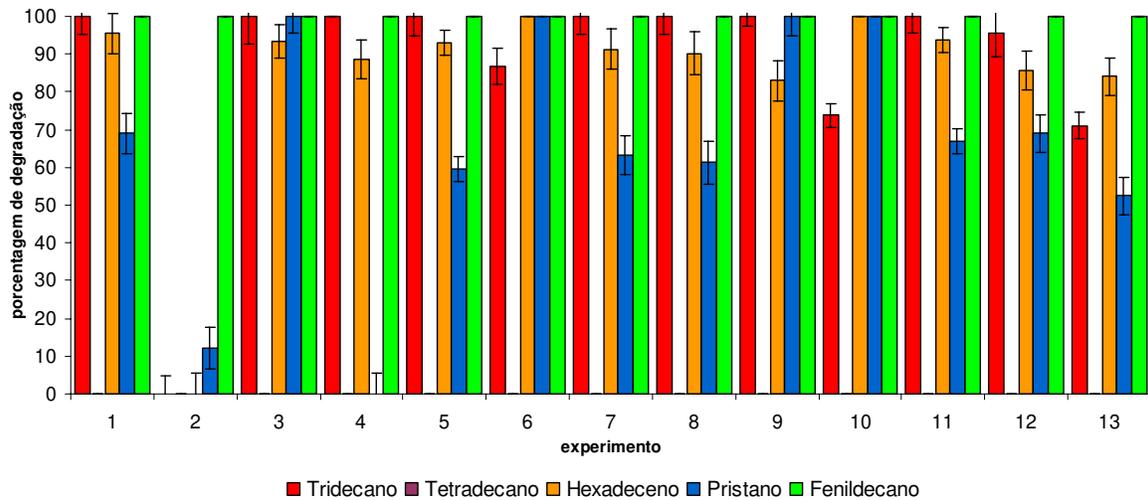


FIGURA 21: Degradação dos hidrocarbonetos em solos sem histórico de contaminação para os experimentos do planejamento de 1 a 13.

A Figura 21 mostra a degradação dos hidrocarbonetos analisados para os experimentos de 1 a 13. Os hidrocarbonetos tridecano, tetradecano, hexadeceno, pristano, fenildeceno tiveram uma degradação média de 72,87% no experimento 1, 22,48% no experimento 2, 78,67% no experimento 3, 57,74% no experimento 4, 70,50% no experimento 5, 77,33% no experimento 6, 70,91% no experimento 7, 70,29% no experimento 8, 76,60% no experimento 9, 74,74% no experimento 10, 72,11% no experimento 11, 70,11% no experimento 12, e de 70,07% no experimento 13.

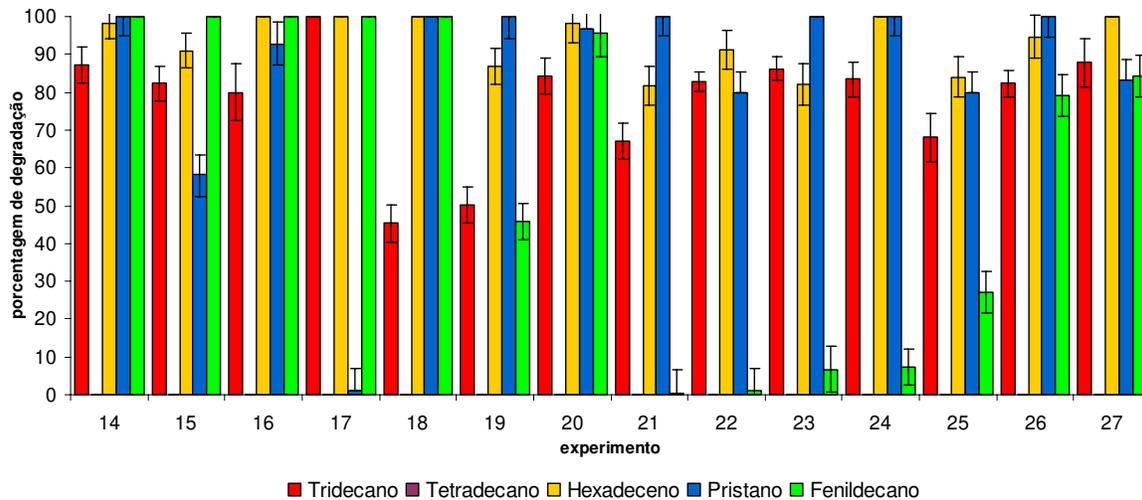


FIGURA 22: Degradação dos hidrocarbonetos em solos sem histórico de contaminação para os experimentos do planejamento de 14 a 27.

A Figura 22 mostra a degradação dos hidrocarbonetos tridecano, tetradecano, hexadeceno, pristano, fenildecano onde os mesmos tiveram uma degradação média para os experimentos de 14 a 27 de 61,52% no experimento 14, 77,05% no experimento 15, 66,25% no experimento 16, 74,05% no experimento 17, 60,23% no experimento 18, 69,05% no experimento 19, 56,57% no experimento 20, 74,93% no experimento 21, 49,81% no experimento 22, 51,79% no experimento 23, 71,18% no experimento 24, 71,02% no experimento 25, 71,18% no experimento 26 e de 71,02 no experimento 27.

O planejamento experimental (item 4.6) mostrou que a melhor condição para degradar os hidrocarbonetos analisados por cromatografia gasosa foi o experimento 3, cujas as condições de 0,07g de uréia, 0,065g de fosfato de potássio, 0,001g de sulfato de ferro e 0,4ml do inoculo em 100g de solo, com uma degradação média de 70,74% para os hidrocarbonetos analisados.

A bioestimulação com nitrogênio, fósforo e potássio aumentou significativamente a degradação da borra oleosa e de seus componentes no landfarming do pólo petroquímico de Triunfo-RS. Entretanto, o estímulo não foi suficiente para melhorar a eficiência de degradação, de modo a atender a

demanda de borra gerada no Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL) do pólo petroquímico de Triunfo, RS. Por tratar-se de um resíduo contendo basicamente carbono e hidrogênio, é provável que a adição de apenas alguns macronutrientes não seja suficiente para máxima expressão da atividade da biota degradadora. Em vista da importância metabólica do ferro para as reações catabólicas envolvidas na degradação de HPA (Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e a baixa disponibilidade deste elemento no solo, é possível que fontes mais solúveis de ferro adicionadas ao solo estimule a degradação dos desses compostos presentes na borra oleosa, aumentando, desta forma, a eficiência do landfarming e o volume e a frequência de adição deste resíduo ao solo (SANTOS, 2004).

Nutrientes podem ser adicionado em sedimento de praia tanto na forma de nutrientes orgânico como inorgânico. Em ambiente aberto a presença e adição de nutriente no sedimento são freqüentemente o fator chave no sucesso do programa de biorremediação (LEE & MERLIN, 1999). Existem duas maneiras de se manter o nível de nutriente em sedimento com água: (1) aplicar diariamente nutriente inorgânico solúvel em água (VENOSA et al., 1997) e (2) disponibilizando fertilizantes de lenta liberação, como o Inipitol EAP-22 (LESSARD et al., 1995; PRITCHARD & COSTA, 1991).

Em estudo realizado, utilizando sedimento de praia, coletado em Pulau Semakau, uma pequena ilha ao sul de Singapura, XU & OBBARD (2004) contaminou o sedimento com óleo cru leve tipo Arabian com 3,22% (p/p). Foram adicionados fontes de nutrientes, como nutrientes inorgânicos solúveis e fertilizantes de lenta liberação, como o Osmocote e Inipol EAP-22. Avaliou-se a degradação dos HPA's de dois a seis anéis presentes no óleo em questão. A degradação dos hidrocarbonetos totais alvo (2 a 6 anéis) em todos os tratamento seguiu um modelo de primeira ordem na biodegradação. A taxa de biodegradação dos HPA totais em sedimentos tratados com o fertilizante Osmocote foi significativamente superior aos outros tratamentos. Em 45 dias de experimento,

havia aproximadamente 9,3% dos totais de PAH remanescentes do tratamento apenas com Osmocote, significativamente menor que os 54,2 e 58% remanescentes dos tratamentos sem Osmocote. Em tratamento somente com Inipitol ou nutriente solúvel, ou a combinação dos dois, não houve a estimulação da biodegradação dos PAH's com anéis superior a dois. Em um outro estudo, so mesmos autores, (XU & OBBARD, 2003) avaliaram a biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos, presentes no óleo cru, em sedimentos de praia em condições tropicais marinhas. A adição de Osmocote no sedimento estimulou a biodegradação, pela microbiota natural, dos hidrocarbonetos alifáticos mais efetivamente que os nutrientes solúveis e o Inipitol EAP-22.

5.7.1. Evolução de C-CO₂ no experimento em microcosmos

Nesse experimento avaliou-se a evolução do C-CO₂ segundo a metodologia proposto por (Stotzky, 1965) que é dada em mg C/100 g de solo.

A Tabela 11 mostra o delineamento composto central rotacional planejamento fatorial completo utilizado nesse experimento e a evolução de C-CO₂.

TABELA 11:Planejamento fatorial completo com os valores codificados e reais.

Experimento	Fonte de Nitrogênio (Uréia)	Fonte de Fósforo (Fosfato de Potássio)	Fonte de Ferro (Sulfato de Ferro)	Tamanho do Inoculo	Evolução C-CO2 em mgC/100g de solo
1	-1	-1	-1	-1	5,57
2	1	-1	-1	-1	5,97
3	-1	1	-1	-1	7,21
4	1	1	-1	-1	7,72
5	-1	-1	1	-1	7,59
6	1	-1	1	-1	8,50
7	-1	1	1	-1	7,35
8	1	1	1	-1	7,39
9	-1	-1	-1	1	7,23
10	1	-1	-1	1	7,58
11	-1	1	-1	1	7,58
12	1	1	-1	1	8,05
13	-1	-1	1	1	8,12
14	1	-1	1	1	7,76
15	-1	1	1	1	7,29
16	1	1	1	1	7,75
17	-2	0	0	0	5,67
18	2	0	0	0	7,09
19	0	-2	0	0	8,49
20	0	2	0	0	8,61
21	0	0	-2	0	8,22
22	0	0	2	0	8,64
23	0	0	0	-2	7,94
24	0	0	0	2	8,37
25	0	0	0	0	8,57
26	0	0	0	0	8,47
27	0	0	0	0	8,37

Continuação tabela anterior

Valores reais				
Valores codificados	gramas de NH₂CONH₂/100g de solo	gramas de K₂HPO₄/100g de solo	gramas de Fe₂SO₄/100g de solo	mL de meio/100g de solo
0	0,10	0,05	0,0015	0,6
1	0,13	0,065	0,002	0,8
-1	0,07	0,035	0,0010	0,4
2	0,16	0,08	0,0025	1
-2	0,04	0,020	0,0005	0,2

Conforme as condições dos ensaios realizados, a evolução de C-CO₂ foi maior, ocorrendo principalmente, na condição de fonte de nitrogênio (0,10g de NH₂CONH₂/100g de solo), ferro (0,0015g de Fe₂SO₄/100g de solo) e tamanho do inóculo (0,6 mL/100g de solo), já para a fonte de fósforo foi de (0,08g de K₂HPO₄/100g de solo).

Através do resultado do planejamento foi possível determinar o coeficiente de regressão (Tabela 12) para a resposta de interesse, isto é, evolução de C-CO₂ do processo, calcular a ANOVA (análise de variância) e construir a superfície de resposta. A equação de Y em função dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos são:

$$Y = -9,0 + 133,0 \text{ Nitro} - 626,2 \text{ Nitro}^2 + 112,0 \text{ Fósforo} + 4595 \text{ Ferro} + 10,4 \text{ Inoculo} - 3,0 \text{ Inoculo}^2 - 53333,33 \text{ Fosforo. Ferro} - 42,9 \text{ Fosforo. Inoculo} - 2425 \text{ Ferro. Inoculo}.$$

TABELA 12: Coeficiente de regressão para a resposta C-CO₂.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(2)	P- valor	Limit. Confiabili. -95%	Limit. Confiabili + 95%
Média	-9,0	0,522	-17,1563	0,003380	-11,2	-6,7
(1)Nitrogênio (L)	133,0	4,444	29,9333	0,001114	113,9	152,2
Nitrogênio (Q)	-626,2	21,960	-28,5132	0,001228	-720,6	-531,7
(2)Fósforo (L)	112,0	7,201	15,5576	0,004106	81,0	143,0
(3)Ferro (L)	4595,0	227,913	20,1612	0,002451	3614,4	5575,6
(4)Inoculo (L)	10,4	0,822	12,6496	0,006192	6,9	13,9
Inoculo (Q)	-3,0	0,494	-6,0610	0,026158	-5,1	-0,9
2L x 3L	-5333,3	3333,333	-16,0000	0,003884	-67675,5	-38991,2
2L x 4L	-42,9	8,333	-5,15	0,035697	-78,8	-7,1
3L x 4L	-2425,0	250,000	-9,700	0,010462	-3500,7	-13

Pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 13, observa-se que o modelo que descreve a resposta C-CO₂ em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, é adequado visto que a porcentagem de variação explicada é de 84,17% para a resposta e, o F calculado, altamente significativo, satisfazendo os requisitos para a construção das superfícies e curvas de resposta (Figuras 23 á 34).

TABELA 13: Análise de variância para C-CO₂ (ANOVA).

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado	F tabelado
Regressão	15,777869	9	1,7514522	10,05	2,49
Resíduos	2,96531	17	0,1748194		
Falta ajuste	2,95189	15			
Erro puro	0,02004	2			
Total	18,735	26			

Através da superfície de resposta gerada pelo modelo, podem-se obter as condições de fonte de nitrogênio para a evolução de C-CO₂. É possível verificar através da superfície de resposta e da curva de contorno, Figuras 23 e 24, que para a fonte de nitrogênio a faixa ótima é 0,08 a 0,13 g de NH₂CONH₂/100g de solo e para a fonte de ferro é entre 0,002 e 0,03 g de Fe₂SO₄ /100g de solo.

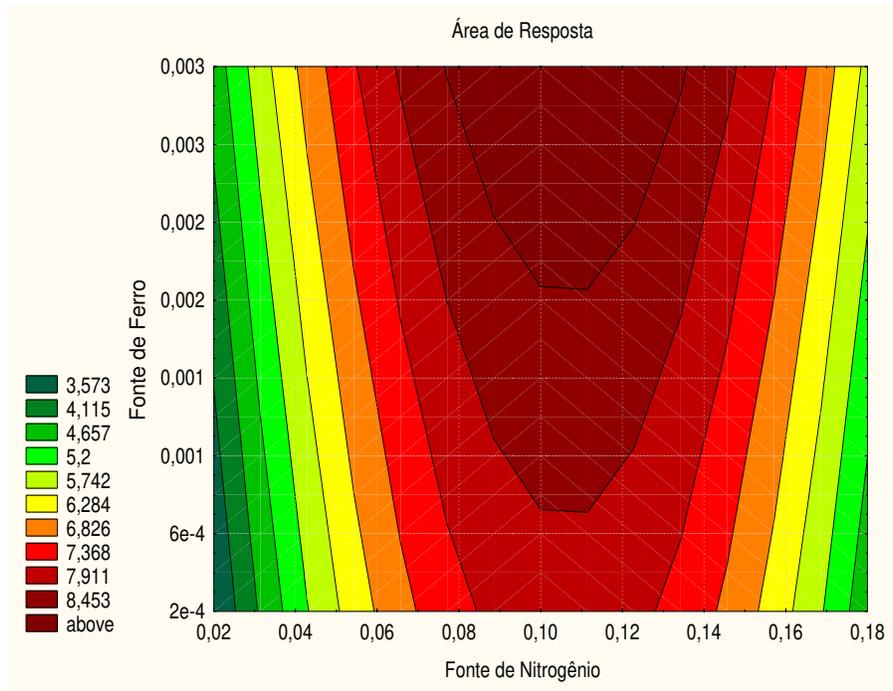


FIGURA 23: Curva de contorno para fonte de ferro e nitrogênio.

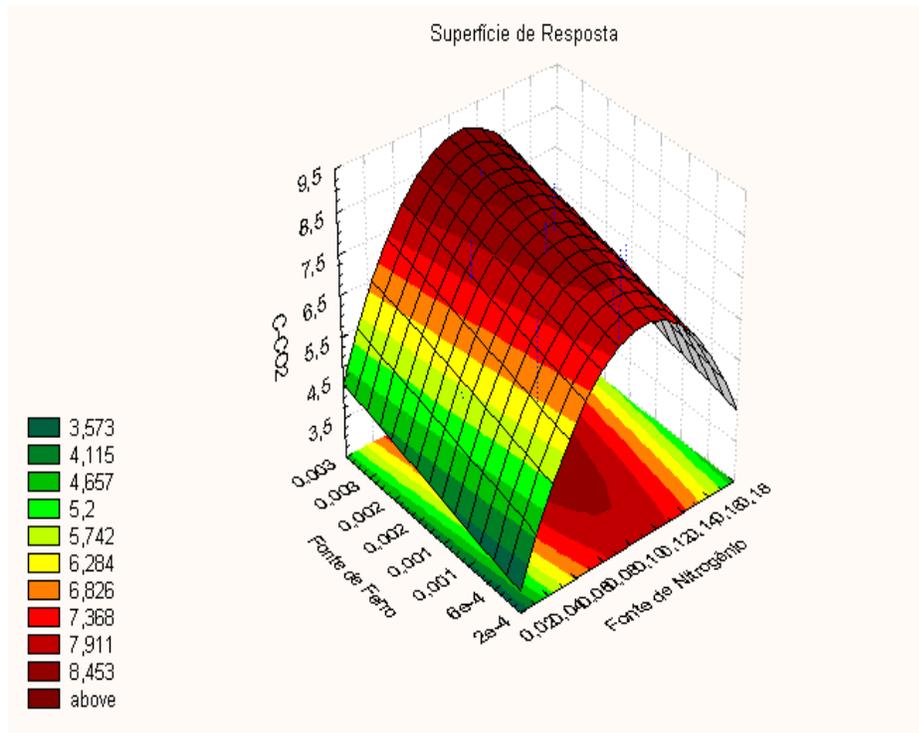


FIGURA 24: Superfície de resposta para fonte de ferro e nitrogênio.

Quando comparamos a fonte de fósforo e ferro, Figuras 25 e 26, é observado que quando adicionamos mais fósforo, aproximadamente 0,085g/100g de solo, é requerido menos ferro, aproximadamente 0,0002 g/100g de solo. E quando adicionamos menos fósforo, 0,015 g/100g de solo, é requerido quantidade maior de ferro, 0,003 g/100g de solo.

Já quando é comparada a superfície de resposta e curva de contorno entre o tamanho do inóculo e fonte de nitrogênio, Figuras 27 e 28, observa-se que a faixa ótima para o Nitrogênio é de 0,08 a 0,13 g/100g de solo e o tamanho do inóculo fica entre 0,4 a 1,1 aproximadamente.

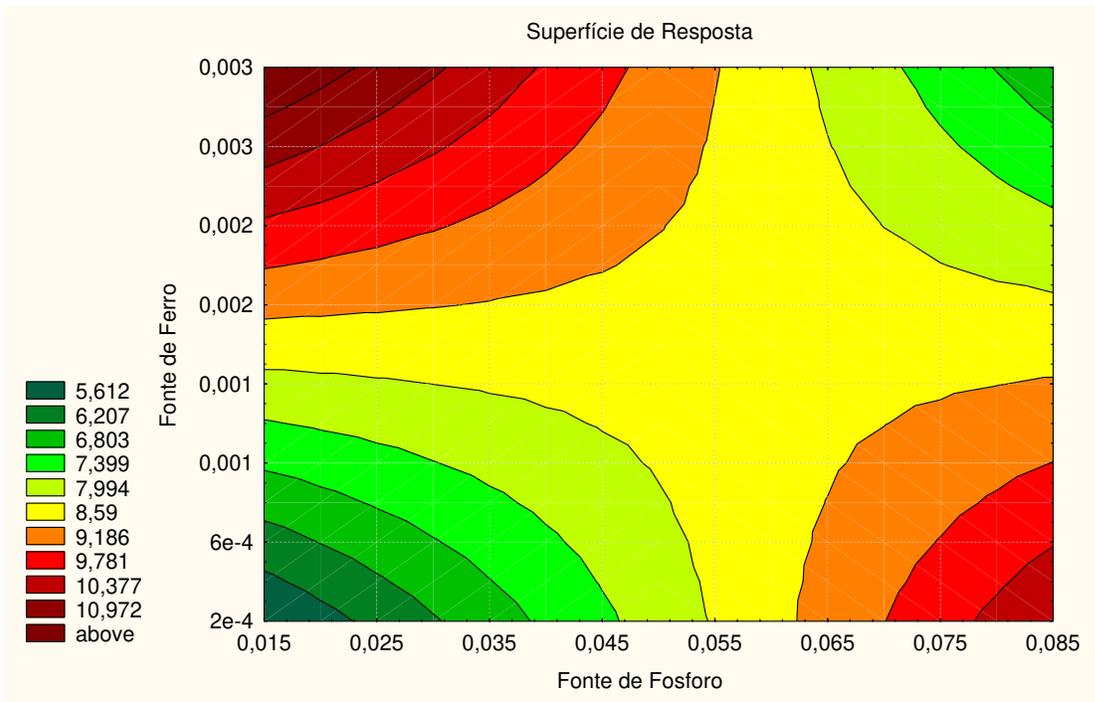


FIGURA 25: Curva de contorno para C-CO₂ em função da fonte de ferro e fósforo.

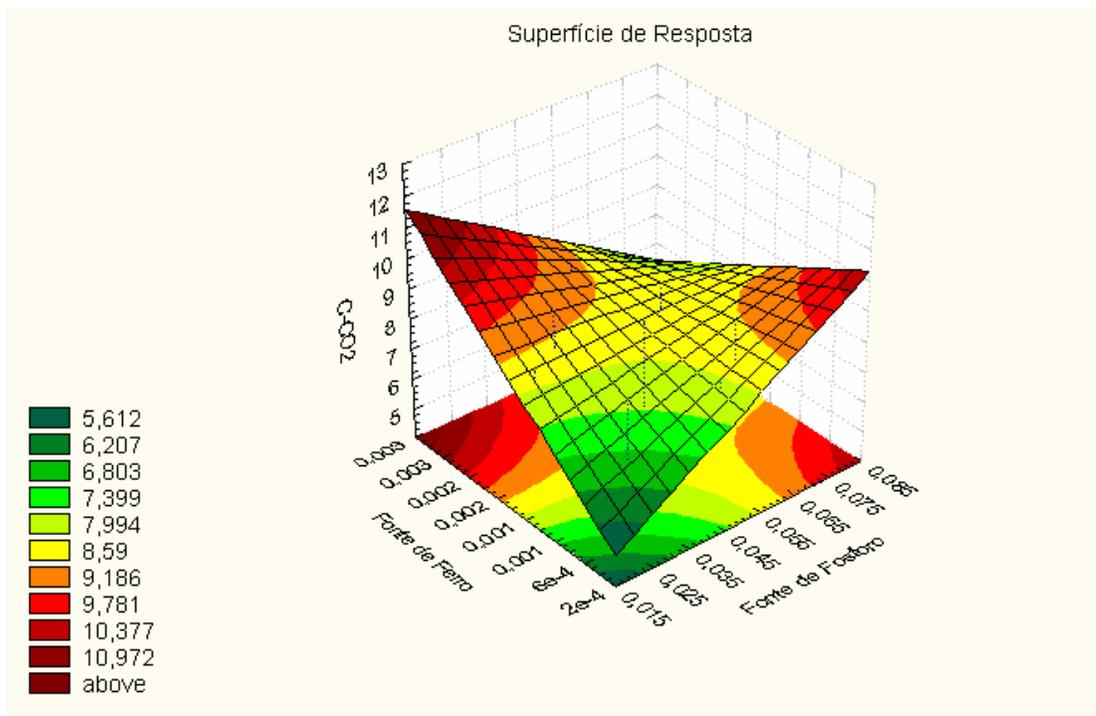


FIGURA 26: Superfície de resposta para C-CO₂ em função da fonte de ferro e fósforo.

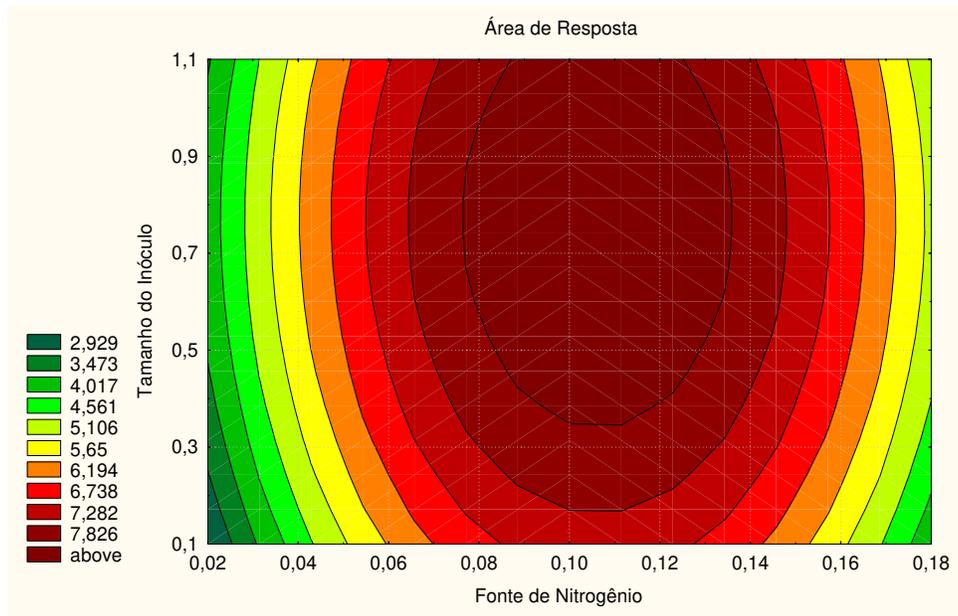


FIGURA 27: Curva de contorno para C-CO₂ em função da fonte de nitrogênio e tamanho do inóculo

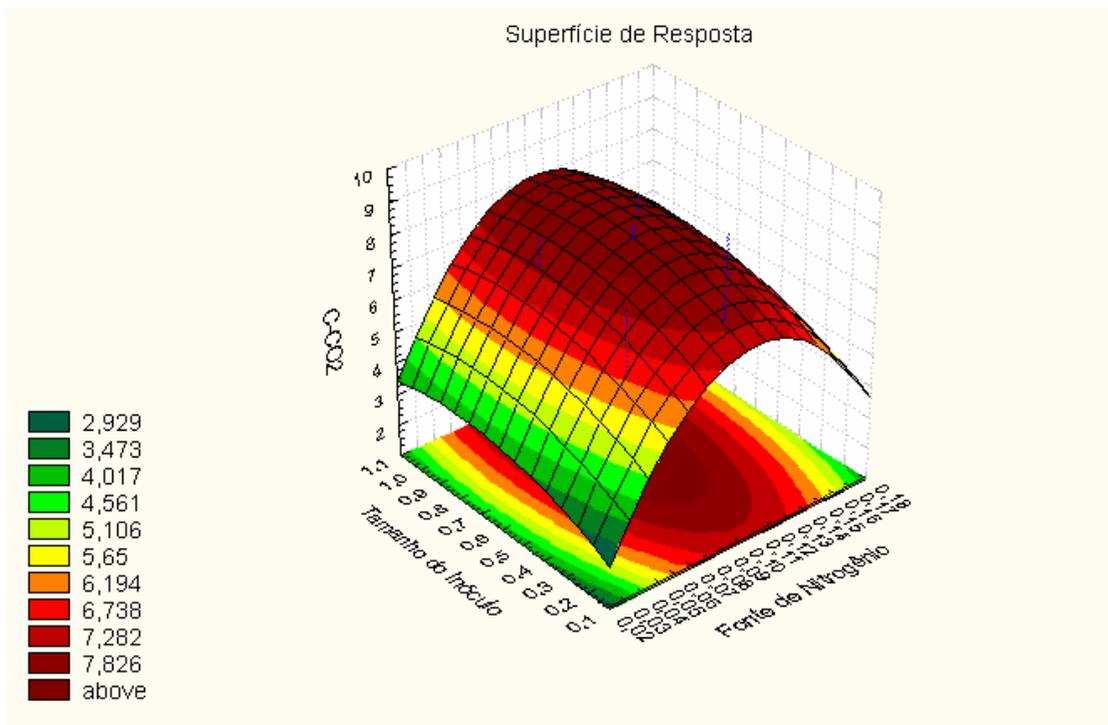


FIGURA 28: Superfície de resposta para C-CO₂ em função da fonte de nitrogênio e tamanho do inóculo.

Relacionando a fonte de ferro com o tamanho do inóculo, Figuras 29 e 30, pode-se verificar que se adicionarmos mais ferro o tamanho do inóculo diminui para as condições ótimas e, se diminuirmos a fonte de ferro é necessário aumentarmos o tamanho do inóculo. Em relação à fonte de fósforo e o tamanho do inóculo, Figuras 31 e 32, pode-se observar através da superfície de resposta e curva de contorno que a faixa ótima para o tamanho do inoculo é de aproximadamente 1 a 0,4 ml/ 100g de solo para todas a faixas de fósforo.

As Figuras 33 e 34 mostram a superfície de resposta e a curva de contorno entre a fonte de nitrogênio e de fósforo. Analisando as figuras pode-se observar que a faixa ótima para a fonte de nitrogênio é de 0,08 a 0,13 g/100 g de solo para todas as concentrações de fósforo.

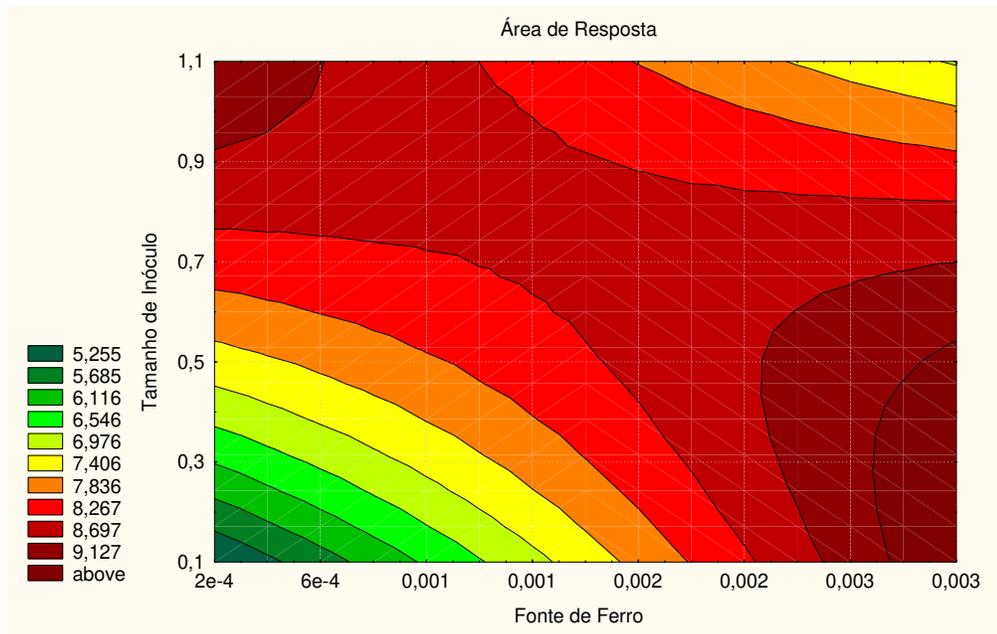


FIGURA 29: Área de contorno para C-CO₂ em função da fonte ferro e tamanho do inóculo.

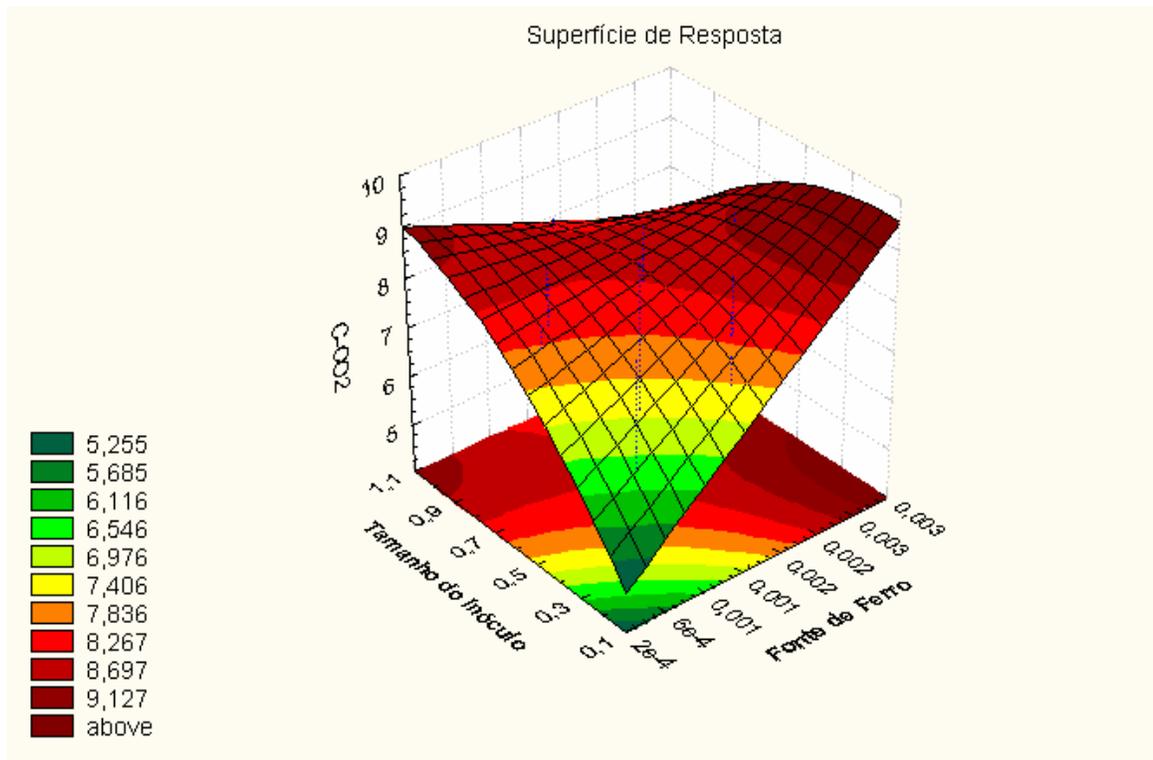


FIGURA 30: Superfície de resposta para C-CO₂ em função da fonte ferro e tamanho do inóculo.

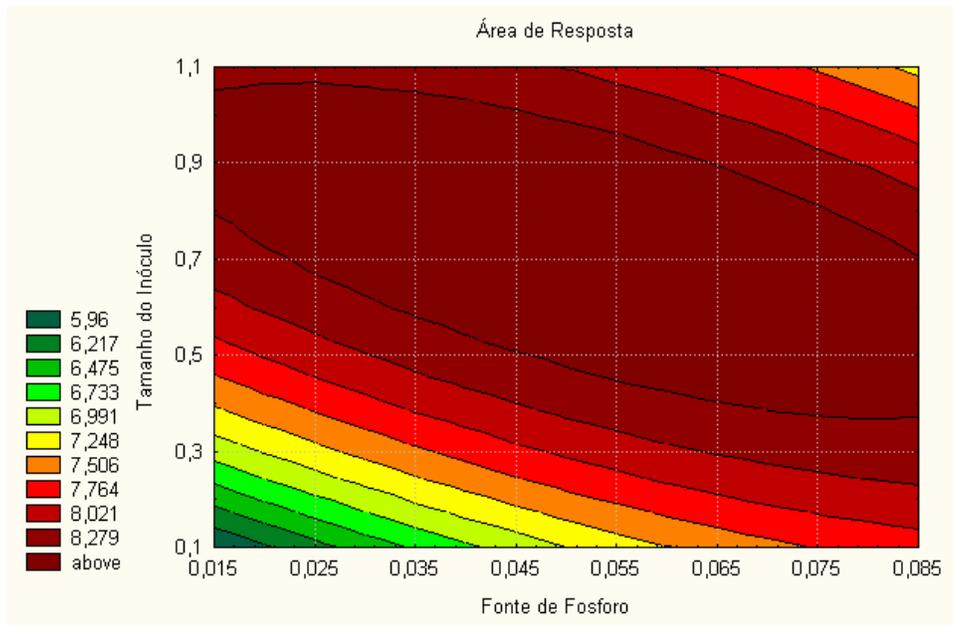


FIGURA 31: Área de contorno para C-CO₂ em função da fonte de fósforo e tamanho do inóculo

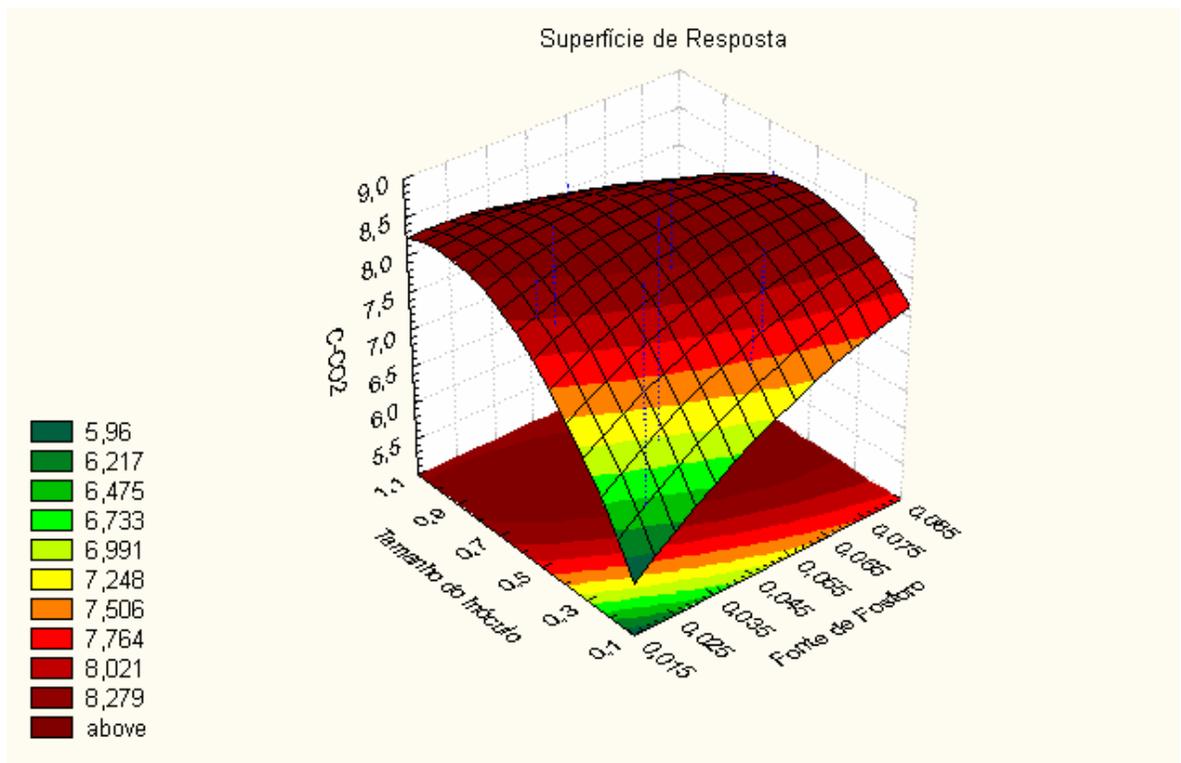


FIGURA 32: Superfície de resposta para C-CO₂ em função da fonte de fósforo e tamanho do inóculo.

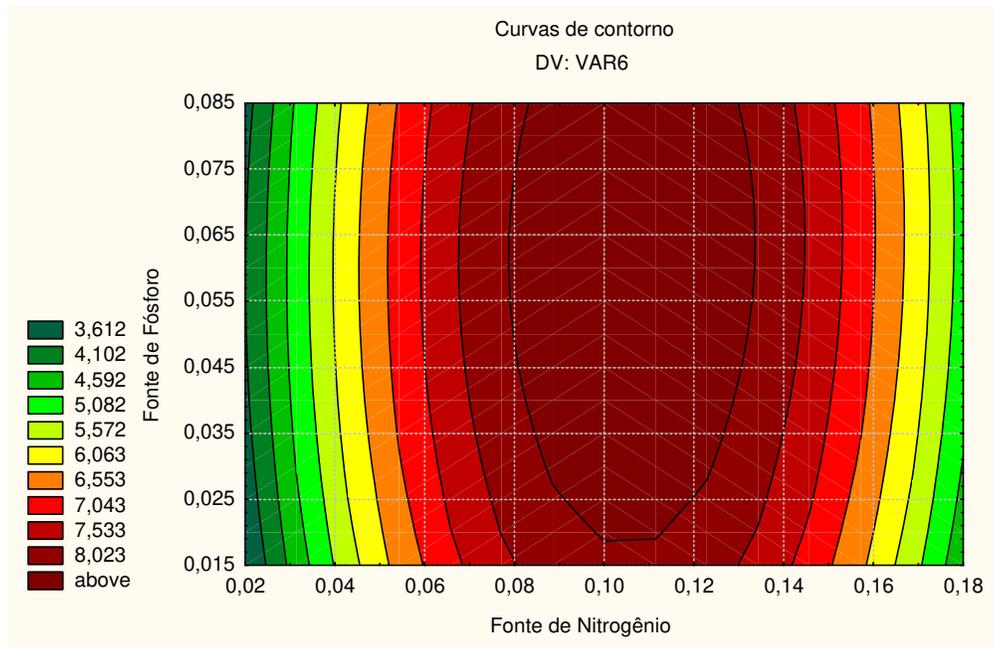


FIGURA 33: Curvas de contorno para C-CO₂ em função da fonte de fósforo e nitrogênio.

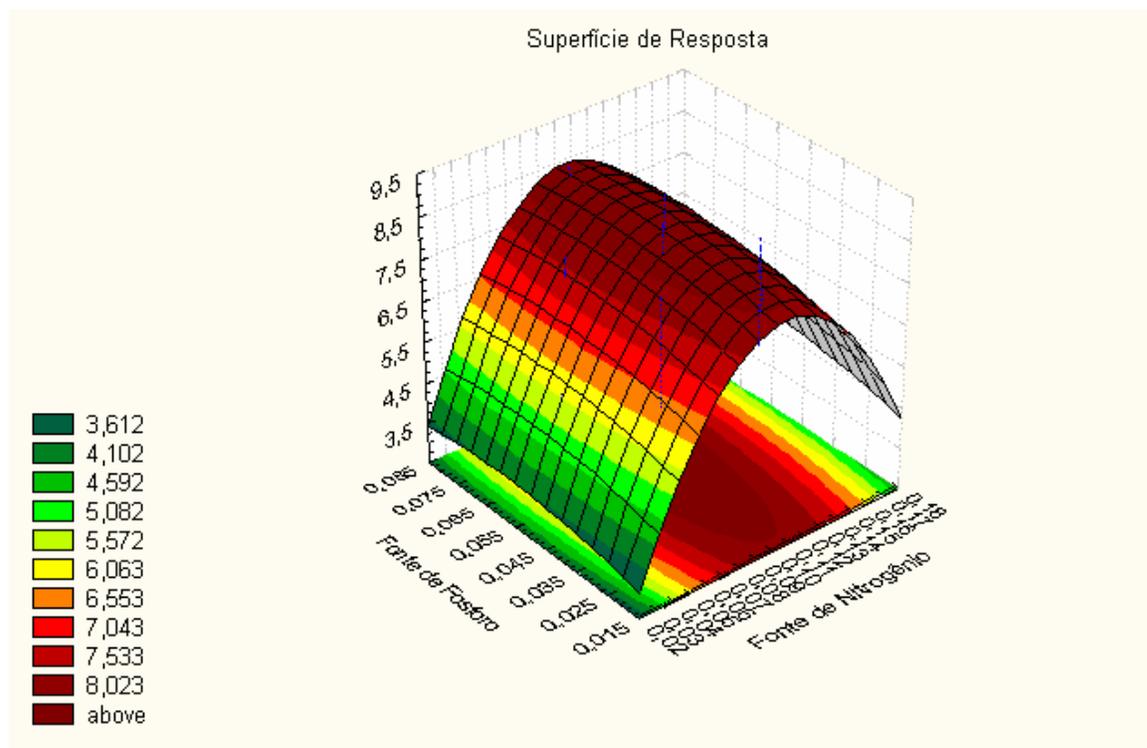


FIGURA 34: Superfície de resposta para C-CO₂ em função da fonte de fósforo e nitrogênio.

SANTOS, (2004) utilizando isolados bacterianos, cultivados em meio mineral Tanner, com 250 mg L^{-1} de antraceno, avaliou o efeito de Sulfato de Ferro no crescimento microbiano durante 48 dias de experimento. Nesse experimento foi observado crescimento de $6,78 \text{ Log UFC ml}^{-1}$. GLASAUUER et al. (2001) demonstrou que o ferro, na forma de óxidos e hidróxidos, é absorvido na parede celular, inicialmente por atração reversível tipo forças de Van der Waals, para posterior interação irreversível através de ligações químicas. Esta interação ocorre em função da superfície da parede das células microbianas possuírem cargas negativas e os óxidos e hidróxidos possuírem carga positiva (pH neutro a alcalino). Além disso, a interação entre estes minerais e a parede celular é de difícil reversão, visto que moléculas orgânicas formam ligações covalentes e iônicas com os óxidos e hidróxidos.

Foi observado que para aumentar o crescimento do *B. subtilis* era necessário um excesso de ferro, muito além das quantidades necessárias para qualquer microrganismo. O excesso de ferro foi justificado pelo fato de que o sistema de transporte deste elemento não era eficiente, devido à presença de agentes quelantes que o tornavam indisponível. Neste caso, o excesso de ferro tinha por objetivo saturar os quelantes e disponibilizar o ferro para o crescimento da bactéria e para o estoque nas ferritinas (HARRISON & AROSIO, 1996).

Simulando um derrame de petróleo em ambiente marinho tropical, realizado em laboratório, usando água do mar, óleo leve e fertilizante NPK imobilizado em suportes, durante um período de 28 dias COELHO, (2005), obteve bons resultados na biorremediação. Os estudos mostraram que o uso do fertilizante NPK é eficiente no processo de biorremediação. A evaporação foi responsável pela redução de 35% da massa de óleo derramada e aproximadamente 50% dos compostos foram reduzidos por biorremediação. Os compostos policíclicos aromáticos foram fortemente reduzidos devido a biorremediação. O grupo dos metil-fenantrenos apresentou redução de 70% e o dos metil-dibenzotiofenos, 75%.

Em um estudo de microcosmo utilizando 70 g de solo onde foi adicionado

600 ul de óleo bruto, no qual avaliou-se a concentração de fonte de Nitrogênio, Fósforo e Potássio para aumentar a biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no mesmo. Uma série de 35 frascos, com alta fertilização, foi suplementada com uma solução de nutriente composto por 3000ug N g⁻¹ solo (NO₃NH₄), 450 ug P g⁻¹ de solo (Na₂HPO₄ e KH₂PO₄) e 1500 ug K g⁻¹ de solo (KH₂PO₄). Outra série de 35 frasco, com baixa fertilização, foi suplementada como os mesmos nutrientes nas concentrações de 850 ug N g⁻¹ de solo (NO₃NH₄), 85 ug P g⁻¹ de solo (Na₂HPO₄ e KH₂PO₄) e 240 ug K g⁻¹ de solo (KH₂PO₄). Em 30 dias de experimento o solo com alta concentração de nutriente degradou as frações lineares, ramificadas e cíclicas, dos hidrocarbonetos presentes no óleo bruto, nas proporções de 57%, 47% e 18%, respectivamente. Em solos com baixa fertilização a degradação desses hidrocarbonetos foi de 73% para os lineares, 60% para os ramificados e de 34% para os cíclicos (C.H. CHAÎNEAU et al. 2005).

5.8. Análise por cromatografia gasosa dos hidrocarbonetos presentes no óleo bruto utilizado no microcosmo com solo de landfarming

A Figura 35 mostra a degradação dos hidrocarbonetos analisados em um microcosmo utilizando solo do landfarming da Refinaria de Paulínia (REPLAN) Petrobrás.

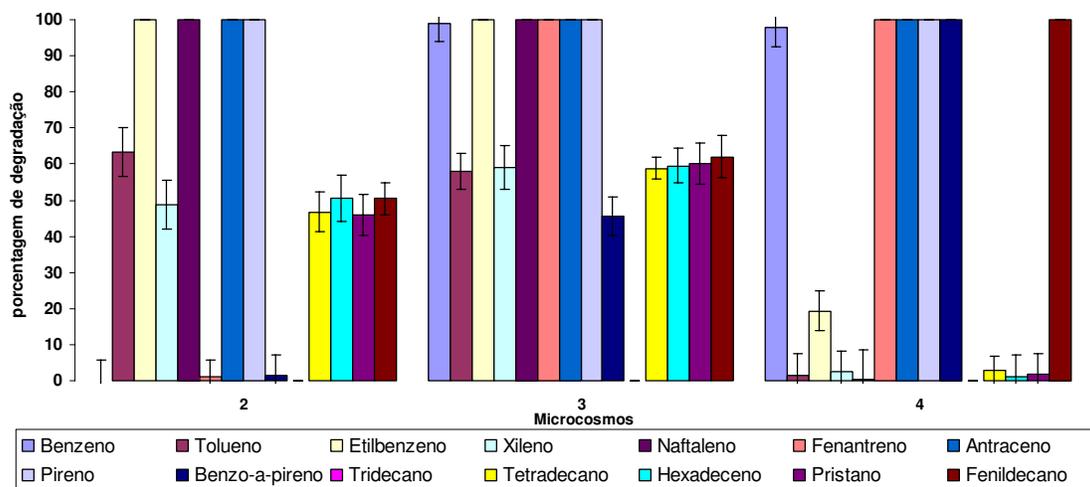


FIGURA 35: porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos analisados em microcosmo utilizando solo do landfarming da REPLAN Petrobras

Conforme mostra a Figura 35 o experimento 3 apresentou o melhor resultado de degradação dos hidrocarbonetos, com degradação média dos hidrocarbonetos analisados de 75,12%. Neste experimento foram adicionados apenas o óleo cru e fontes de nutrientes, nas condições estabelecidas no planejamento experimental, item 4.6.1. Através dos experimentos 2 e 4 foram obtidas degradações médias dos hidrocarbonetos analisados de 56,76% e 51,70%, respectivamente.

Com esses resultados pode-se observar que a microbiota presente no solo do landfarming apresentou maior porcentagem de degradação de hidrocarbonetos sem a necessidade da inoculação do consórcio (experimento 4), apenas adicionando fontes de nutrientes.

Em estudo utilizando HPAs de alto peso molecular em microcosmo, STRAUBE, et al, (2003), avaliaram a degradação dos mesmos através da bioaugmentação, com *Pseudomonas aeruginosa* e, através da bioestimulação, com adição de nutrientes. Após 11 meses de experimento foi observado redução de 23% nos HPAs totais analisados e 48% na degradação do benzo-a-pireno, para o microcosmo controle. Com a bioestimulação houve uma degradação de 34% dos HPAs e 57% do Benzo-a-pireno. Utilizando bioestimulação e

bioaugmentação juntas obtiveram degradação de 87% para os HPAs e 67% para o benzo-a-pireno.

5.9. Avaliação do potencial de degradação do óleo pelo consórcio microbiano liofilizado com e sem fonte de nutriente

Neste experimento foi avaliado o potencial de degradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo bruto pelo consórcio microbiano liofilizado com e sem fonte de nutriente (Figura 36).

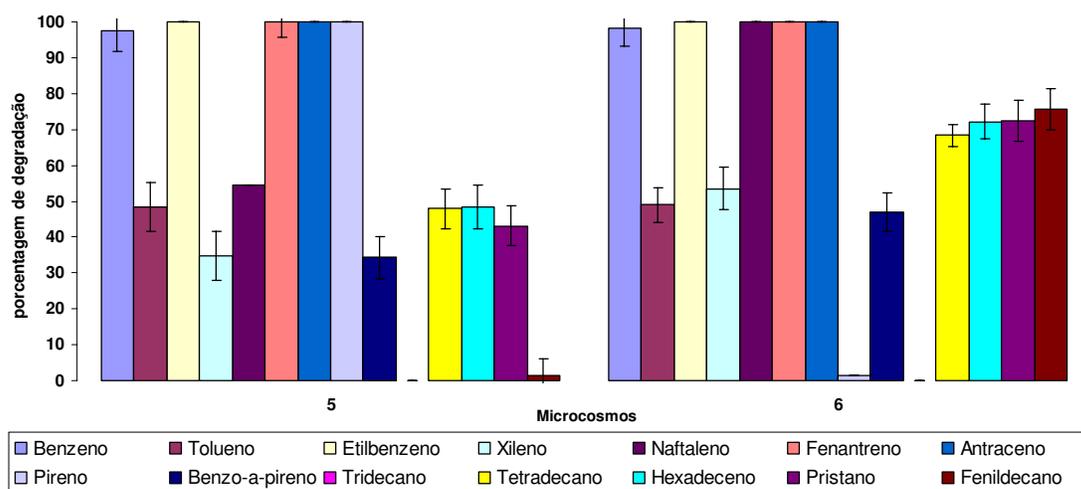


FIGURA 36: porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos analisados em microcosmo utilizando solo do landfarming da REPLAN Petrobrás pelo consórcio liofilizado com nutriente (experimento 5) e sem nutriente (experimento 6)

A Figura 36 mostra a porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos para os experimentos 5, com adição de nutrientes nas culturas e estas foram liofilizadas e, experimento 6, sem adição de nutrientes nas culturas antes de serem liofilizadas, que apresentaram degradação média para os hidrocarbonetos de 57,85% e 67%, respectivamente. Com esses resultados pode-se determinar que, para este consórcio microbiano formulado, não há a necessidade de se adicionar fontes de nutrientes, nitrogênio, fósforo e ferro, na liofilização.

5.10. Identificação das linhagens bacterianas presentes no consórcio microbiano através de análises de seqüências do gene RNA ribossomal 16S.

A identificação das linhagens bacterianas pela análise de seqüência do gene RNA ribossomal 16S revelou que as linhagens pertencem ao gênero *Bacillus*.

O método de extração do DNA genômico descrito PITCHER et al, (1989) foi efetivo para a obtenção do DNA genômico das linhagens 1, 9, 22, e 36 conforme apresentado na Figura 37, entretanto, este método não permitiu a extração do DNA genômico da linhagem 23.

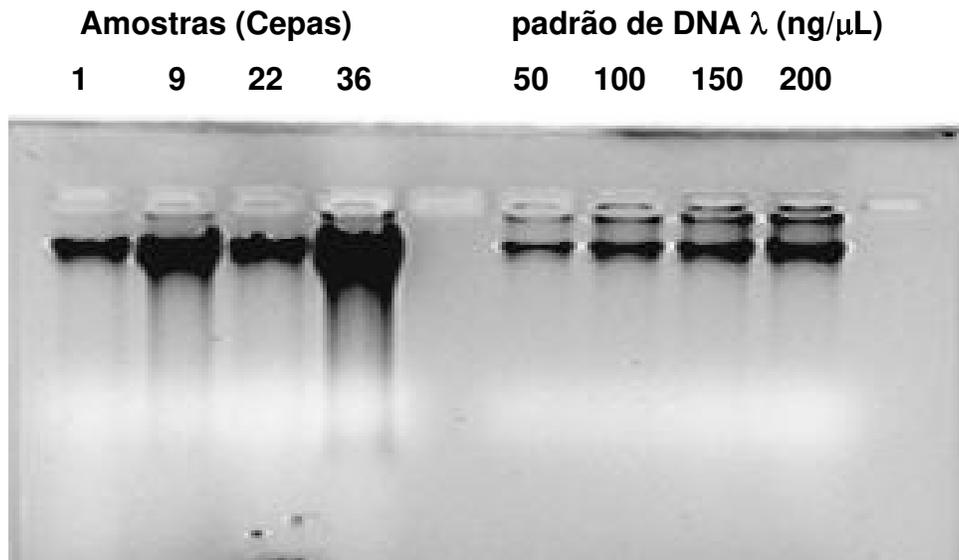


FIGURA 37: Eletroforese em gel de agarose 0,7% para quantificação de DNA extraído.

O DNA genômico das linhagens 1, 9, 22 e 36 foi utilizado como molde para a amplificação por PCR do gene RNA ribossomal 16S usando os oligonucleotídeos iniciadores 10f e 1100r (LANE, 1991) do domínio Bactéria.

O produto amplificado apresentou o tamanho de aproximadamente 1100 pares de base o qual corresponde ao tamanho para a seqüência parcial do gene

RNA ribossomal 16S (Figura 38).

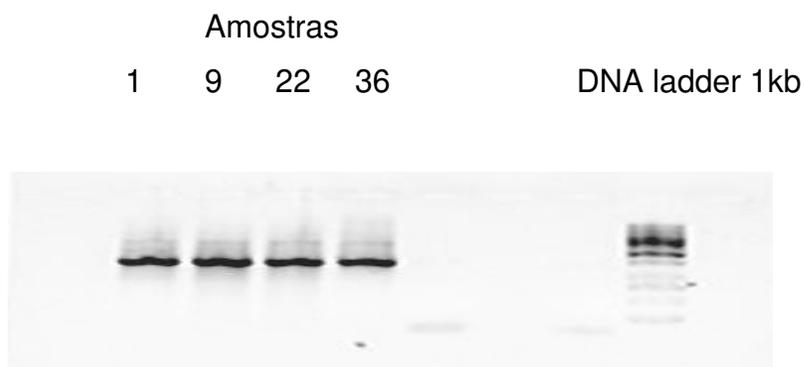


FIGURA 38: Eletroforese em gel de agarose 0,7% para confirmação e quantificação do produto de PCR.

O produto amplificado foi seqüenciado conforme metodologia descrita no item 4.9.3.

A análise de seqüência do gene RNA ribossomal 16S mostrou que as linhagens 1, 9, 22 e 36 pertencem ao gênero *Bacillus*.

A linhagem 1 apresentou 99% de similaridade com seqüências do RNA ribossomal do 16S de várias espécies de *Bacillus*, entre elas, as espécies *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus* linhagem G8639.

A linhagem 9 apresentou 99% de similaridade com seqüências do RNA ribossomal do 16S de duas espécies de *Bacillus*, sendo elas, *Bacillus sp* DF12 e *Bacillus subtilis* linhagem Jinran 14.

A linhagem 22 apresentou 100% de similaridade com seqüências do RNA ribossomal do 16S de várias espécies de *Bacillus*, entre elas, *Bacillus cereus* linhagem ZZ3 e *Bacillus thuringiensis*. Já a linhagem 36 apresentou 99% de similaridade com seqüência do RNA ribossomal 16S da espécie *Bacillus cereus* linhagem AD2.

A árvore filogenética (Figura 39) obtida mostrou que as linhagens do

consórcio microbiano formam um agrupamento consistente com o gênero *Bacillus* porém as linhagens foram identificadas em nível de espécie. A análise de seqüência do RNA ribossomal do 16S é um marcador molecular com baixa resolução para o gênero *Bacillus*, sendo necessário outros testes fenotípicos, como forma de esporos, e bioquímicos para a determinação da espécie das linhagens estudadas.

Árvore Filogenética

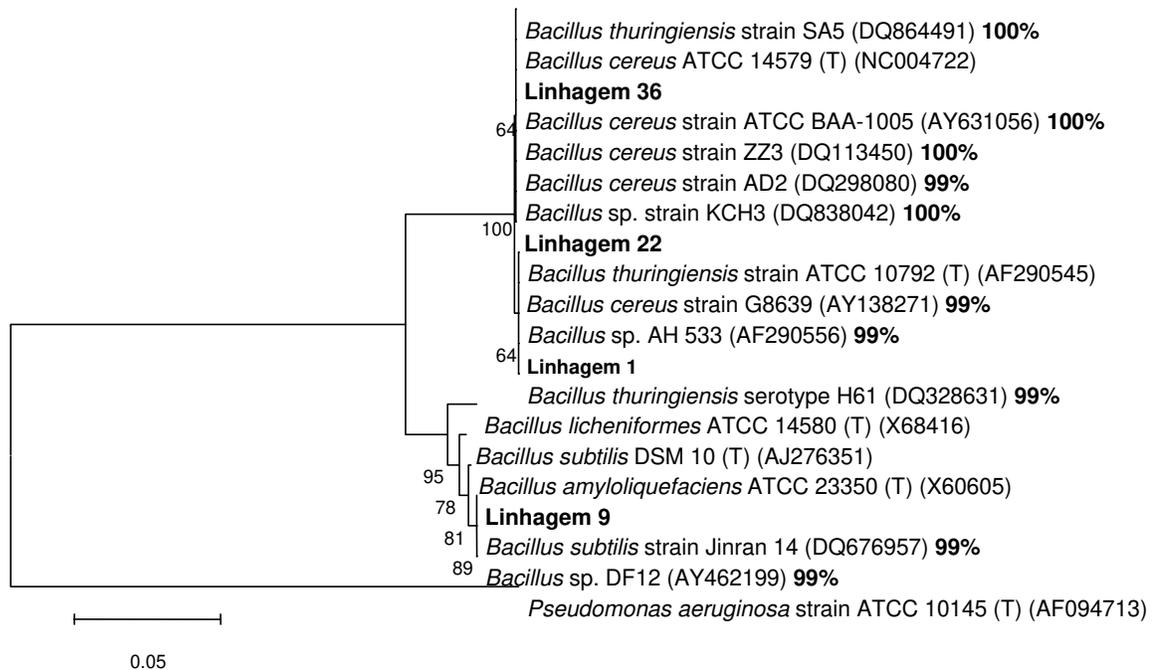


FIGURA 39: Árvore filogenética baseada na seqüência do gene RNA ribossomal 16S das linhagens do consórcio microbiano (com suas respectivas porcentagens de homologia pelo NCBI) construída pelo método “Neighbour Joining”. A árvore foi enraizada utilizando-se o gene RNA ribossomal 16S de *Pseudomonas aeruginosa* como um grupo externo. Os valores acima das linhas são valores de bootstrap obtidos com 1000 replicações.

Muitas espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* estão

relacionadas à degradação de hidrocarbonetos de petróleo. A bactéria *Bacillus fusiformis* já foi anteriormente isolada de solos contaminados por óleo diesel em Long Beach na Califórnia e está relacionada a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (BENTO et al., 2003). PINEDA-FLORES, 2004, isolou um consórcio microbiano capaz de mineralizar asfalto, de um óleo cru de Maya. Os isolados obtidos pertencem aos gêneros *Corynebacterium sp*, *Bacillus sp*, *Brevibacillus sp*. Amostra de solo do deserto do Kuwait contaminado com óleo cru foi observado a presença de *Bacillus stearothermophilus* que tinha a capacidade de crescer no óleo como única fonte de carbono, e degradar os hidrocarbonetos presentes no mesmo, em altas temperaturas (SORKHOH, N. A et al. 1993).

6. CONCLUSÕES:

As 43 bactérias testadas demonstraram alguma propriedade que as classificam como potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos, todavia, as cepas 1, 9, 22, 23 e 36 demonstraram os melhores e mais homogêneos resultados em praticamente todos os parâmetros analisados, sendo estas, portanto, as cinco cepas selecionadas para estudos complementares.

A cepa 1 apresentou crescimento homogêneo tanto em meios contendo hidrocarbonetos lineares, quanto em meios contendo HPA's, e apresentou valores próximos a 50% de biodegradação em relação aos hidrocarbonetos não aromáticos.

A cepa 9 apresentou porcentagem de degradação média de 31,65% para os hidrocarbonetos lineares, e a maior porcentagem de degradação para os HPA's (90,74%). Apresentou resultados homogêneos em crescimento celular, redução da tensão superficial e emulsificação do tipo óleo em água (O/A), mas as amostras ainda possuem alto grau de toxicidade, demonstrando que com quase 91% de degradação dos HPA's, o remanescente não degradado ainda possui efeito tóxico sobre as sementes de alface.

As cepas 22, 23 e 36 também foram selecionadas, pois apresentaram ótimos valores de degradação de todos os hidrocarbonetos testados, e também valores homogêneos em um ou mais parâmetros analisados, quanto ao crescimento, tensão superficial e emulsão.

Com exceção de alguns HPA's degradados por determinadas cepas, a grande maioria não foi totalmente biodegradado, fato que pode ser comprovado pelos baixos valores de EC_{50} , e, com isso, altos valores de toxicidade aguda.

No experimento realizado em microcosmo, avaliando-se a evolução de $C-CO_2$, pode-se concluir que a melhor condição para a maximização desse

parâmetro foi na condição do ponto central para a fonte de nitrogênio (0,10g/100g de solo) ferro (0,0015g/100g de solo) e inoculo (0,6 ml/100g de solo) e, na condição de 2 para a fonte de fósforo (0,45g/100g de solo).

A degradação dos hidrocarbonetos no microcosmo sem historio de contaminação foi mais acentuada para o experimento 3. No microcosmo com histórico de contaminação foi a bioestimulação que apresentou melhor resultado.

O consórcio liofilizado degradou melhor os hidrocarbonetos analisados em microcosmo, quando foram liofilizados sem fonte de nutrientes.

As linhagens do consórcio microbiano foram identificadas por análise de seqüência do RNA ribossomal 16S como pertencentes ao gênero *Bacillus*, exceto a linhagem 23 que não foi possível a identificação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRETT, S.; BONNER, J. S.; MILLS, M. A.; AUTENRIETH, R. L.; STEPHENS, F. L. Microbial degradation of crude oil in marine environments tested in a flask experiment. *Water Research*. v. 31, nº. 11, p. 2840-2848, 1997.

AMANN, R.I. ; LUDWIG, W.; SCHNEIDER, K.H. Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation. *FEMS Microbiological Reviews*, v. 59, p. 143-169, 1995.

ÁSCON-CABRERA, M. A. & LEBEAULT, J.M. Interfacial area effects of a biphasic aqueous-organic system on growth kinetics of xenobiotic-degrading microorganisms. *New York: Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1136-1141, 1995.

ATLAS, R.M; BARTHA, R. Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. *Antoine van Leeuwenhoek Journal of Microbiology & Serology*, v.14, p. 309-317, 1973.

BAIRD WM, HOOVEN LA, MAHADEVAN B, LUCH A, SEIDEL A, IVERSEN PL. Responses of Human Cells to PAH-Induced DNA Damage. *Polycyclic Aromatic Compounds* . 22(3-4): 771 – 780; 2002.

BAKER, J.M.; GUZAMN, L.; BARTLETT, P.D.; LITTLE, D.I.; WILSON, C.M. BÉCART, V. Production et caractérisation d'un consortium microbien pour le traitement de sol contaminé aux produits de préservation du bois (résumé et abstract). http://gch.polymtl.ca/Presentations/Abs_becaert.htm, 09/05/2001.

BARTLE, K. D. Analysis and occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. In: COLIN, C., PURCHASE, R. (Ed.). *Food contaminants: Sources and surveillance* chapter 3, p. 41-60, 1991.

BAUMARD, P.: BUDZINSKI, H.; GARRIGUES, P.; DIZZER, H. & HANSEN, P. D.

Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments in mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research*, Barking, v.47, p. 17-47, 1999.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. ***Applied Microbiology and Biotechnology***. v. 53, p. 495-508, 2000.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W.T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34 n.1, p. 65-68, 2003.

BERGSTEIN, P.E.; VESTAL, J.R. Crude oil biodegradation in arctic tundra ponds. *Arctic*, v.31, p. 158-169, 1978.

BECKER, G.; ALLSOPP, D. Ed. Proceedings of the 4th International Biodegradation Symposium. London: Pitman,. p. 15-20. 1980.

BOONE, D.R. & CASTENHOLZ, R.W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed., Volume One, Springer-Verlag, USA. 2001.

CAMARGO, M. S. F. & TOLEDO, M. C. F. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em margarina, cremes vegetais e maionese. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*. V. 20(1), p. 51-55, 2000.

CARVALHO, D.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. Production of extracellular surface-active compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. In: INTERNATIONAL IN SITU AND ON-SITE BIOREMEDIATION SYMPOSIUM, 4., 1997, New Orleans. In situ and on site bioremediation. Columbus: Battelle Press, 1997. v. 4, p. 91 – 97.

CETESB, Aspectos Físico-Químicos do Petróleo, Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a_fisicos.asp acesso em: 10 out. de 2004a.

CETESB, Divulgação de Nova Lista de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo. 7p. 2003b. Disponível em: http://cetesbnet/Destaques/2003/outubro/291003_areas_contaminadas.htm

CETESB, Sobrevôo constata manchas de óleo somente na região de Paranaguá, Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Noticias/004/11/24_vazamento.asp acesso em: 24 nov. de 2004c.

CHHATRE, S.; PUROHIT, H.; SHANKER, R.; KHANNA, P. Bacterial consortia for crude oil spill remediation. *Water Science Technology*, v. 34, n. 10, p. 187 – 193, 1996.

C.H. Chaîneau, G. Rougeux, C. Yéprémian, J. Oudot. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil biology & Biochemistry*, v. 37, p. 1490-1497, 2005.

CLARK, P.J.; FINLEY, J.S. Occurrence and impact of petroleum on Arctic environment. In: REY, L (Ed). *The arctic ocean – the hydrographic environment and the fate of pollutants*. New York: John Wiley, p.295-314, 1982.

CLARK, P.J.; WARD, T.J. The response of southern hemisphere saltmarsh plants and gastropods to experimental contamination by petroleum hydrocarbons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 175, p.43-57, 1994.

COELHO, M. F. Estudo do uso de fertilizante NPK imobilizado na biorremediação de derrames de petróleo no mar simulação em laboratório. Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte

Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo. Macaé, RJ, 2005.

COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* 104:410-433. 1970a.

COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of bacteria. *In Culture Collections of Microorganisms*, pp. 421-436. H. Iizuka & T. Hasegawa. (eds.) Tokyo, University of Tokyo Press. 1970b.

COOPER, D. G. and GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. *Washington: Applied and Environmental Microbiology*. v. 53, p. 224 – 229, 1987.

CRAPEZ, M. A. C. et al. Biorremediação, Tratamento para Derrames de Petróleo. *Revista Ciência Hoje*, v. 30, n.179, 32-37p, Jan./Fev. 2002 .

CRICHTON, R.R. *Inorganic biochemistry of iron metabolism*. New York, NY: Ellis Horwood, 1991. 356p.

CURTIS, T.P., W. T. SLOAN, AND J. W. SCANNELL.. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10494-10499. 2002.

DAVIS, J.B.; COTY, Y.F.; STANLEY, J.P. Atmospheric nitrogen fixation by methane-oxidizing bacteria. *Biotechnology & Bioengineering*, v.9, p.25-32, 1964.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v.61. n.1, p.47-64, 1997.

DIBBLE, J.T., BARTHA, R. The effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. *Applied & Environmental Microbiology*, v. 37, p. 729-739, 1976.

DIBBLE, J.T., BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 729 -739, 1979.

DE VOS, R. H.; MASSEY, R. C.; CRYPPS, G.; VENN, I.; JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chemical Toxicology*, v. 28, n. 4, p. 263-268, 1990.

DUTKA, B. J. (Ed). *Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canadá, 1989.

EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. A citizen's guide to bioremediation. 07/04/1996. <http://clu-in/org/products/citguide/bioem.html>, 15/09/2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. Brasília, 1999. 412p.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FOHT, J.; SEMPLE, K.; GAUTHIER, C.; WESTLAKE, D. W. S.; BLENNKSOPP, S.; SERGY, G.; WANG, Z.; e FINGAS, M. Effect of nitrogens sources on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions. London: Environmental Technology. 20(8), p.839-849, 1999.

GLASAUER, S. et al. Sorption of Fe (hydr)oxides to the surface of *Shewanella putrefaciens*: Cell-bound fine grained minerals are not always formed De Novo. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.67,n.12, p.5544-5550, 2001.

GLOBONEWS, Daniela Amorim. Vazamento de óleo do Prestige pode tornar-se o mais grave da história, diz especialista. <http://globonews.globo.com/globonews/article/o%2c6993%2ca440434-2420%2c00.html>. 19/11/2002.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. Genome Research, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GRASSO, P. Carcinogenic in food. In: Chemical carcinogens. V. 2, 2nd ed., edited by Charles E. SEARLE, ACS Monographs, American Chemical Society, Washington, DC, p. 1205-1239, 1984.

HALL, T. BioEdit – version 5.0.6 Raleigh: North Caroline State University, Department of Microbiology, 2001. 192p.

HARRISON, P.M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochimica Biophysica Acta, Baltimore,v.3, n.2, p.161-203, 1996.

HEISER, D. Biorremediation of petroleum pollutants in cold environments. <http://www.hort.agri.umn.edu/h5015/99fpapers/heiser.html>, 09/05/2001.

<http://www.ebi.ac.uk/index.html>

[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; MICHAEL, G. W. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology*, Amsterdan, v. 6 n. 4, p. 243 – 248, 1990.

HOROWITZ, A.; ATLAS, R.M. Microbial seeding to enhance petroleum hydrocarbon biodegradation in aquatic Arctic ecosystems. In: OXLEY, T.A.; 1977.

HOWARD, J. W. & FAZIO, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J. Association of Official Analytical Chem.* V. 63 (5), p. 1077-1104, 1980.

HOWARTH, R.W. Assessing the ecological effects of oil pollution from outer <http://www.Plato.acadiau.ca/isme/Symposium24/venosa.PDF>., 1991.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). *Environmental Health Criteria 171 – Diesel Fuel and Exhaust Emissions*. World Health Organization, Geneva, v. 171. 389 p., 1996.

JACOBUCCI CARVALHO, D. F. Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos. Campinas, 2000. 117 p. Dissertação (mestrado) – FEA, UNICAMP.

JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SITA, V. E YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *London: Biotechnology Letters*. v. 6, p. 487 – 490, 1992.

KAMIDA, H. M. Biodegradação e toxicidade de efluente contendo corantes, tratado com *Pleurotus sajor-caju*. Campinas, 2004. 150p. Dissertação (doutorado) – FEA, UNICAMP.

KORDA, A.; SANTAS, P.; TENENTE, A.; SANTAS, R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and comercial microorganisms currently used. *Applied Microbial Biotechnology*, v. 48, p. 677 – 686, 1997.

KUSHIDA, M. M. Caracterização parcial e propriedades de biosurfactantes bacterianos. Campinas, 2000. 78 p. Dissertação (mestrado) – FEA, UNICAMP.

LANE D. 16S/23S rRNA sequencing.. In: Stackebrandt E. and Goodfellow M. _eds_, *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. West Sussex, England, pp. 115-175, 1991.

LARSSON, B. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish foods – Aspects on analysis, occurrence and intake. Doctoral Thesis. Swedish University of Agriculture Science, 1986.

LEAHY, J. G. and COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 3, p. 305 – 315, 1990.

LEE, K., MERLIN, F.X. Bioremediation of oil on shoreline environments: Development of techniques and guidelines. *Pure Appl. Chem.* 77, 161-171, 1999.

LESSARD, P.E., WILKINSON, J.B., PRINCE, R.C., BRAGG, J.R., CLARK, J.R., ATLAS, R.M. Bioremediation application in the cleanup of the 1989 Alaska oil spill. In Schepart, B.S. (Ed.), *Bioremediation of Pollutants in Soil and Water*, ASTM

STP1235, Philadelphia, PA, USA, pp. 207-225. 1995.

LIMA, J. S., Bioindicação em Ecossistemas Terrestres, Universidade Federal da Bahia,
Instituto de Biologia Disponível em:
<<http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112bioindicad.htm>>. Acesso em 13 de dez. 2003-a.

LIMA, J. S., Biomonitoramento: Aspectos Bioquímicos e Morfológicos, Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia. Disponível em:
<<http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112bioindicad.htm>>. Acesso em 13 de dez. 2003-b.

LIU, D.; MAGUIRE, R.J.; PACEPAVICIUS, G.L.; NAGY, E. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic nitrogen heterocyclics. *Environmental Toxicology & Water Quality*, v.7, p. 355, 1992.

Long-term fate and effects of untreated thick oil deposits on salt marshes. In: The 1993 INTERNATIONAL OIL SPILL CONFERENCE, Washington, 1993. Proceedings. Washington: American Petroleum Institute Publication, 1993. p. 395-399.

MARIUZZO, D. M. Estudo da biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por linhagens de microrganismos nativos isolados de sítios ambientais aquáticos contaminados do estado de São Paulo. Campinas, 2000. 162p. Dissertação (Doutorado)- FEA. UNICAMP.

MAKI, H.; SASAKI, T.; SAAKI, E.; ISHIHARA, M.; GOTO, M. e HARAYAMA, S. Use of wastewater sludge for the amendment of crude oil bioremediation in meso-scale beach simulating tanks. *London: Enviromental Technology*. 20(6), p. 625-632, 1999.

MICHEL, J. Adverse effects from oil. http://www.darcnw.noaa.gov/iad_apd.pdf (16 Abr.2002).

MORRISON, R. et al. Química Orgânica. Lisboa, 1996. 1509p.

McLEESE, D. W.; BURRIDGE, L. E.; CAPUZZO, J. M. (Ed.) e KESTER, D. R. (Ed.). Comparative accumulation of PHAs in four marine invertebrates. Oceanic Processes in Marine Pollution. V. 1: Biological processes and waste in the Ocean, p. 109-118, 1987.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S. E BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos, 2ª edição. Editora da Unicamp, Campinas, 1995.

NEVES, E. B. Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Bactérias. Campinas, 2002. 200p. Dissertação (Doutorado) – FEA, UNICAMP.

NOVAES, W., Meio Ambiente e Utopia, Jornal O Estado de S.Paulo, 26 dez. 2002. Caderno A – 2.

OLIVIERI, R.; BACCHIN, P.; ROBERTIELLO, A.; ODDO, N.; DEGEN, L.; TONOLO, A. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. Applied & Environmental Microbiology, v. 31, p. 629-634, 1937.

PHILLIPS, D.H. Polycyclic aromatic in the diet. Mutation Research, v. 443, p. 139-147, 1999.

PINEDA-FLORES, G, GISELA BOLL-ARGÜELLO, CARLOS LIRA-GALEANA, ANA MARÍA MESTA-HOWARD. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. Biodegradation 15: 145–151, 2004.

PITCHER, D.G; SAUNDERS, N.A; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiology. 8, 151-156, 1989.

PRINCE, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. Boca Raton: Critical Reviews in Microbiology. 19 (4), 217-242, 1993.

PRITCHARD, P.H., COSTA, C.F. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. Environ. Sci. Technol. 25, 372-379, 1991.

PRO-ACT. Fact Sheet: Petroleum fuels: basic composition na properties. Feb. 1999. http://www.alfee.brooks.af.mil/pro_act/fact/Feb99a.htm. 18/05/2001.

PRUEL, R. J.; QUINN, J. G; LAKE, J. L.; DAVIS, W. R. Availability of PCBs and PAHs to *Mytilus edulis* from artificially resuspended sediments. In: Capuzzo, J. M., ed. Oceanic Processes in Marine Pollution. Malabar. Robert E. Krieger Publishing Company, 1987.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Short communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcerans*. London: Wourld Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 13, p. 133 – 135, 1997.

RAGHAVAN, P. U. M e VIVEKANADAN, M. Bioremediation of oil-spilled sites through seeding of naturally adapted *Pseudomonas puti*. Oxford: International Biodeterioration & Biodegradation. 44(1), p. 29-32, 1999.

RAMBELOARISOA, E.; RONTANI, J. F.; GIUSTI, G.; DUVVNJAK, Z.; BERTRAND, J. C. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. Marine Biology, v. 83, p: 69 – 81, 1984.

RAN XU & JEFFREY P. OBBARD. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments, *Journal Environment . Qual*, v. 32, p. 1234-1243, 2003.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**. v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. In: *Miicrobiologia Ambiental*. Jaguariúna: Embrapa, 1997.

ROSENBERG, E.; LEGMANM, R.; KUSHMARO, A.; TAUBE, R.; ADLER, E.; RON, E. Z. Petroleum biorremediation – a multiphase problem. *Biodegradation, Netherlands*, v. 3, p. 337 – 350, 1992.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and Evolution*, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, E.C. Biodegradação de Antraceno Estimulada por Ferro. Porto Alegre, 2004. 68p. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SHERRER, P; MILLE, G. Biodegradation of crud oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. *Marine Pollution Bulletin*. V. 20. n. 9, p. 430-432, 1989.

SISINNO, C. L., et al. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 6p, Mar./Abr. 2003.

SLOAN, N.A. Oil impacts on cold-water marine resources: a review relevant to Parks Canada's evolving marine mandate. (1999). http://parkscanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/occasional_paper11_e.PDF (16 Abr.2002).

SOLOMONS, T.W.G. Química Orgânica. Rio de Janeiro, v.1, 777p, 1996.

SORKHOH N. A. ; IBRAHIM A. S. ; GHANNOUM M. A. ; RADWAN S. S. High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. *Appl. microbiol. biotechnol.* vol. 39, nº1, pp. 123-126 1993.

SPIES, R.B.; RICE,S.D.;WOLFE,D.A.; WRIGHT,B.A. The effects of Exxon Valdez oil spill on the Alaskan coastal environment. In: EXXON VALDEZ Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium. Bethesda: American Fisheries Society Symposium, 1996.v.18, p.1-16.

STRAUBE, W. L.; NESTLER, C. C.; HANSEN, L. D., RINGLEBERG, D.; PRITCHARD, P. H.; JONES-MEEHAN, J. Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnol.* V.23 (2-3), p. 179-196, 2003.

STRICKLAND,R.M. The Pacific northwest coast: fossil fuel frontier. *Environment Journal*, v.6, p.25-77,1990.

SUCHANEK,T.H. Oil impacts on marine invertebrate populations and communities. *American Zoologist*, v.33,p.510-523, 1993.

STACKEBRANDT, E. & B. M. GOEBEL. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849. 1987.

STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C.A., eds. Methods of soil analysis. Part 2. Madison, American Society of Agronomy, 1965. p. 1550-1572.

SWOFFORD, D.; OLSEN, G.; WADDEL, P.; HILLIS, M. Phylogenetic inference. IN: HILLIS, D.M.; MORTIZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.) Molecular systematics. 2. ed. Sunderland: Sinauer Assoc., 1996. p. 407-514.

TAKATSUKI, K.; SUZUKI, S.; SATO, N. & USHIZAWA, I. Liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shellfish. Journal of Association of Official Analytical Chemists, v. 68, p.945-949, 1985.

TANO-DEBRAH, K.; FUKUYAMA, S.; OTONARI, N.; TANIGUCHI, F.; OGURA, M. An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils. Biotechnology Resources, v. 69, p. 133 – 139, 1999.

Tecnologias para Biorremediação do Solo e Recuperação do Lençol Freático, Revista Meio Ambiente Industrial, v.7, n.40, 92-98p, Jan./Fev. 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific-gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TING, Y.P., HU, H.L., TAN, H.M.,. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms. Resource and Environmental Biotechnology 2, 197e218, 1999.

VAN DYKE, M. I.; COUTURE, P.; BRAUER, M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 39, n. 11, p. 1071 – 1078, 1993.

VAN DE PEER, Y.; DE WACHTER, R. TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Application in Biosciences*, v. 10, p. 569-570, 1994.

VENOSA, A. D. NRT Fact Sheet: Biorremediation in Oil Spill Response. <http://www.epa.gov/oilspill/docs/biofact.pdf>. 01/06/2001.

VENOSA, A. D.; STEPHEN, J. R.; MACNAUGHTON, S. J.; CHANG, Y.; WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. In: PROCEEDINGS OF THE 8th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY. 1999, Canada. Bell C. R.; Brylinsky, M.; Johnson-Green, P. (editors). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999. Disponível no site:

VENOSA, A. D., SUIDAN, M.T., KING, D., WRENN, B.A., Use of hopane as a conservative biomarker for monitoring the bioremediation effectiveness of crude oil contaminating a sandy beach . *J. Ind. Microbiol. Biot.* 18, 131-139, 1997.

XU, R & Obbard, J.P. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. *Journal of Environmental Quality*, 32, 1234-1243, 2003.

XU, R & Obbard, J.P., Biodegradation of polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oil-Contaminated Beach Sediments Treated with Nutrient Amendments. *Journal of Environmental Quality*, 33, 861-867, 2004.

WALWORTH, J.L., REYNOLDS, C.M.,. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorus, nitrogen, and temperature. *Journal of Soil Contamination* 4 (3), 299e310, 1995.

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.22, p.724-728, 1998.

WILSON, S. C. & JONES, K. C. Biorremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs)a review. *Environmental Pollution*, v. 81, p.229-249, 1993.

WOESE C. R., G. E. FOX. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5088-5090. 1977.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271. 1987.

Wolf, Y.I., Rogozin, I.B., Grishin, N.V. & Koonin, E.V. (2002). Genome trees and the tree of life. *Trends Genet* 18, 472-479.

ZABIK, M. E.; BOOREN, A.; ZABIK, M. J.; WELCH, R. & HUPHREY, H. Pesticides residues, PCBs and PAHs in baked, charbroiled, salt boiled and somoked Great Lakes lake trout. *Food Chemistry*, Oxford, v. 55, n.3, p.231-239, 1996.

ZHOU, E., CRAWFORD, R.,. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation* 6, 127e140, 1995.

ZOBELL, C.E. 1946. Action of microorganisms on hidrocarbons. *Bacteriological Reviews*, V.10, p.1-49, 1946.