



UNICAMP

SHEILA DE OLIVEIRA

**BIODEGRADAÇÃO E BIOCONVERSÃO DO D-
LIMONENO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE ESGOTO
DOMÉSTICO**

CAMPINAS

2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

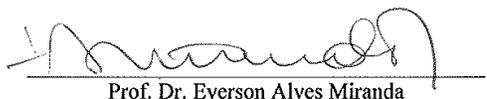
SHEILA DE OLIVEIRA

**BIODEGRADAÇÃO E BIOCONVERSÃO DO D-LIMONENO POR
BACTÉRIAS ISOLADAS DE ESGOTO DOMÉSTICO**

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA SHEILA DE OLIVEIRA
E ORIENTADA PELO PROF.DR.EVERSON ALVES MIRANDA



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

OL4b Oliveira, Sheila de, 1974-
Biodegradação e bioconversão do d-limoneno por bactérias isoladas a partir do esgoto doméstico / Sheila de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Everson Alves Miranda.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Limoneno. 2. Efluentes. 3. Frutas cítricas - Indústria. 4. Tratamento de efluentes industriais. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biodegradation and bioconversion of d-limonene by bacteria isolated from wastewater

Palavras-chave em inglês:

Limonene

Wastewater

Citrus fruit industry

Industrial wastewater treatment

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Everson Alves Miranda [Orientador]

Elisângela Francison

Ademir Castro e Silva

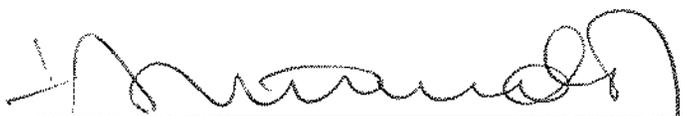
Data de defesa: 02-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Sheila de Oliveira e aprovada em 02 de julho de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



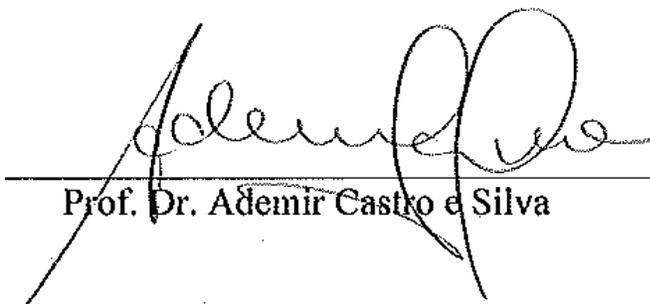
Prof. Dr. Everson Alves Miranda



Prof. Dr. Everson Alves Miranda



Dra. Elisângela Franciscon Guimaro Dias



Prof. Dr. Ademir Castro e Silva



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo.

Aos meus pais e a toda minha família, em especial à minha mãe Neusa, pelo incentivo e amor.

Ao meu namorado Sanderson, pelo amor, ajuda, paciência e companheirismo.

Aos meus amigos Flávio e Patrícia pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda, pela orientação, confiança e paciência.

À Profa. Dra. Lúcia Durrant, por quem tenho muito respeito e admiração profissional, pelo seu interesse no meu aprendizado durante a realização desta dissertação.

Às contribuições e sugestões das Profas. Dra. Andrea Fonseca de Faria e Elisângela Franciscon e colega de trabalho André Monutti.

Aos colegas do Laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Unicamp, em especial à Maria Carolina Grassi, pelo uso dos equipamentos e orientação dos ensaios de identificação dos microrganismos.

À Sabesp pelo apoio financeiro e uso dos equipamentos e instalações.

À Foz do Brasil, pelo apoio na finalização da dissertação.



“Mães zelosas, pais corujas, vejam como as águas de repente ficam sujas...”.

Gilberto Gil.

RESUMO

As indústrias cítricas geram grandes quantidades de efluentes líquidos. Estes efluentes são potencialmente poluidores para descarte em corpos d'água e necessitam de tratamento adequado. A maioria das plantas de tratamento de efluentes cítricos utilizam processos biológicos, devido a custos operacionais mais baixos quando comparado aos processos físico-químicos. Porém, estas plantas têm apresentado problemas de eficiência de remoção da carga orgânica e inibição da atividade biológica, em função das características tóxicas do efluente cítrico, devido à presença residual do d-limoneno, um monoterpene extraído da casca da laranja. O d-limoneno, quando separado e purificado, tem ampla aplicação industrial, na área cosmética como fragrância e na área alimentícia como agente antimicrobiano e também pode ser bioconvertido em produtos como ácidos e alcoóis períficos e carvona que podem ser utilizados na terapia do câncer.

Os objetivos deste estudo foram selecionar e identificar microrganismos capazes de degradar o d-limoneno em altas concentrações (até 5%), simulando condições similares aos efluentes cítricos e avaliar o comportamento de consórcio destes microrganismos. Também foi avaliada a qualificação dos produtos obtidos da bioconversão do d-limoneno. Os microrganismos foram isolados a partir do lodo ativado de uma estação de tratamento de esgotos. Uma pré-seleção, de 56 linhagens de bactérias foi realizada, durante as 3 etapas de enriquecimento com o d-limoneno, através da técnica de esgotamento em superfície. Foram selecionadas 10 linhagens, que apresentaram maior crescimento visual, que foram caracterizados através da morfologia, coloração diferencial (Gram) e análise filogenética. A biodegradação do d-limoneno foi avaliada pela remoção de DQO em meios de cultivos diferentes variando as concentrações de d-limoneno (1%, 3% e 5%) sob condição agitada e estática na temperatura de 30°C. A bioconversão dos produtos foi qualificada por cromatografia gasosa. Foram isoladas bactérias Gram-positivas, do gênero *Bacillus* resistentes à concentração de 5% de d-limoneno sem fonte complementar de carbono. A remoção de DQO foi de 77% e terpineol, alcoóis ciclodecanol e octanediol foram qualificados como produtos bioconvertidos.

Palavras chave: limoneno, efluentes, indústrias cítricas.

ABSTRACT

The citrus' industries generate large quantities of wastewater. These effluents are potentially polluting to disposal in water bodies and require treatment. Most sewage treatment plants citrus use biological process due to lower operating costs compared to physical-chemical processes. However these plants have presented problems in the efficiency removal of organic charge and inhibition of the biological activity due to citric toxic characteristics because of the presence of residual d-limonene, a monoterpene extracted from orange peel. The d-limonene, when it is separated and purified, has large industrial application, on field cosmetics as fragrances and foods fields as antimicrobial agent. Besides, the d-limonene can be bioconverted in perillic acids and perillyl alcohol, α -terpineol and carvone that can be used in cancer therapy.

The achievement of this study was select and isolate microorganism able to degradation high containing limonene (since 5%), simulating the same condition of wastewater characterizes of citric plants and evaluated the consortium microorganism behavior. In addition, the products of biotransformation d-limonene were qualified. Microorganisms were isolated from activated sludge of sewage treatment plant. A pre-selection, with 56 strains, was undertaken, during the 3 stage of enrichment with d-limonene, using depletion technique to isolate microorganisms. Ten strains were selected that showed the greater visual growth. They were characterized through of morphology, Gram and phylogenetic analysis. The d-limonene biodegradation was determinate by reduction COD in different cultivation media, varying the concentration of d-limonene (5 %, 3 % and 1 %) in agitated and stationary condition at temperature 30°C. The bioconversion of product obtained was confirmed by gas chromatography. Gram-positive bacteria were isolated of the *Bacillus* genus, bacteria resist to 5% of limonene-containing without complementary source of carbon. The removal of COD was 77% and terpineol, cyclodecanol and octadienol was evaluated as products bioconverted.

Keywords: limonene, effluent, citric industries

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.2. Objetivo | 3 |
| 1.3.Etapas desenvolvidas | 4 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 2.1. Indústrias cítricas no Brasil e no mundo | 6 |
| 2.2. Processo de produção do suco de laranja | 7 |
| 2.3. Subprodutos do processo de produção do suco de laranja | 9 |
| 2.3.3. d-Limoneno..... | 10 |
| 2.4. Resíduos líquidos cítricos | 12 |
| 2.4.1. Origem dos efluentes líquidos cítricos | 12 |
| 2.4.2. Caracterização dos efluentes líquidos cítricos..... | 13 |
| 2.5. Gestão dos efluentes líquidos cítricos | 15 |
| 2.5.1. Produção mais limpa (P+L) para minimização dos resíduos cítricos..... | 16 |
| 2.5.2. Tratamento dos efluentes cítricos | 17 |
| 2.5.2.1. Processos de tratamento biológico para os efluentes cítricos..... | 18 |
| 2.5.2.2. Biodegradação do d-limoneno por microrganismos isolados | 21 |
| 2.5.2.3. Impactos inibitórios de sistemas de tratamentos de efluentes com o d-limoneno..... | 27 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 3.1. Materiais | 30 |
| 3.1.1. Reagentes..... | 30 |
| 3.1.2. Microrganismos utilizados | 30 |



| | |
|---|----|
| 3.1.3. Meios de cultura e soluções utilizadas | 30 |
| 3.1.3.1. Reagentes utilizados como fonte de carbono complementar..... | 30 |
| 3.1.3.2. Composição do meio mínimo de sais para bactérias | 31 |
| 3.1.3.3. Meio de cultivo | 31 |
| 3.1.3.4. Coloração de Gram..... | 31 |
| 3.1.3.5. Reagentes utilizados na determinação da demanda química de oxigênio (DQO)..... | 31 |
| 3.1.3.6. Reagentes utilizados na extração do DNA | 31 |
| 3.1.3.7. Reagentes utilizados na amplificação da região 16S rDNA..... | 32 |
| 3.2. Métodos analíticos..... | 32 |
| 3.2.1. Ensaio de coloração de Gram | 32 |
| 3.2.2. Ensaio de demanda química de oxigênio (DQO)..... | 33 |
| 3.2.3. Ensaio de turbidez..... | 34 |
| 3.2.4. Determinação do pH..... | 35 |
| 3.3. Métodos experimentais..... | 35 |
| 3.3.1. Isolamento de microrganismos do lodo biológico da estação de tratamento de esgotos na presença de d-limoneno | 35 |
| 3.3.2. Seleção de microrganismos resistentes ao d-limoneno | 36 |
| 3.3.3. Ensaio de biodegradação do d-limoneno com microrganismos isolados | 37 |
| 3.3.6.1. Determinação da curva de crescimento dos microrganismos..... | 38 |
| 3.3.6.2 Extração do DNA genômico dos microrganismos isolados | 39 |
| 3.3.6.3. Ampliação da região 16S rDNA..... | 39 |
| 3.3.7. Análise cromatográfica gasosa acoplada ao espectrômetro de massa para qualificação dos subprodutos bioconvertidos a partir do d-limoneno | 40 |



| | |
|---|----|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 4.1. Isolamentos dos microrganismos do lodo biológico da estação de tratamento de esgotos na presença de d-limoneno | 42 |
| 4.2. Isolamento de microrganismos resistentes ao d-limoneno | 42 |
| 4.2.1. Seleção dos microrganismos resistentes ao d-limoneno..... | 44 |
| 4.3. Ensaio de biodegradação do d-limoneno para microrganismos cultivados isoladamente | 45 |
| 4.3.1. Ensaio de turbidez..... | 45 |
| 4.3.2. Ensaio de DQO | 46 |
| 4.4. Formulação de consórcios com os microrganismos isolados para biodegradação do d-limoneno | 48 |
| 4.4.1. Ensaio de turbidez..... | 49 |
| 4.4.2. Ensaio de DQO | 50 |
| 4.5. Identificações dos microrganismos | 51 |
| 4.6. Avaliações dos produtos bioconvertidos pelos microrganismos cultivados isoladamente e em consórcios | 52 |
| 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 57 |
| 5.1. Conclusões..... | 57 |
| 5.2. Sugestões para trabalhos futuros | 58 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.0. Diagrama esquemático representando as etapas do trabalho desenvolvido | 5 |
| Figura 2.1. Anatomia da laranja representando esquematicamente seus constituintes. | 7 |
| Figura 2.2. Estrutura química do d-limoneno e do l-limoneno..... | 11 |
| Figura 2.3. Análise cromatográfica do efluente industrial cítrico bruto por cromatografia gasosa..... | 15 |
| Figura 2.4. Esquema das unidades da etapa biológica do sistema de lodos ativados convencionais. (Von Sperling, 2002)..... | 19 |
| Figura 2.5. Representação esquemática do processo combinado de lagoa facultativa. (Metcalf&Eddy, 2005 adaptada) | 20 |
| Figura 2.6. Principais vias metabólicas do d-limoneno..... | 22 |
| Figura 2.7. Mapeamento gráfico das vias metabólicas do d-limoneno relacionadas com os microrganismos correspondentes e os principais produtos bioconvertidos..... | 23 |
| Figura 3.1. Esquema de renovação do meio e enriquecimento com d-limoneno durante os 21 dias de incubação em condições agitadas (150 rpm) e estática à temperatura de 30° C. | 35 |
| Figura 3.2. Metodologia de isolamento dos microrganismos a partir do lodo ativado incubado com d-limoneno..... | 36 |
| Figura 4.1. Exemplo de crescimento de diferentes linhagens a partir do ensaio de enriquecimento com d-limoneno..... | 43 |
| Figura 4.2. Curva de crescimento dos microrganismos isolados. Identificação das bactérias:..... | 52 |
| Figura 4.3. Cromatograma referente ao branco sem adição dos microrganismos..... | 53 |
| Figura 4.4. Cromatograma referente à amostra incubada com todas as bactérias em estado agitado..... | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.5. Cromatograma referente à amostra incubada com todas as bactérias em estado estático..... | 54 |
| Figura 4.6. Cromatograma referente a amostra incubada com a bactéria BP9 em estado estático..... | 55 |
| Figura 4.7. Cromatograma referente à amostra incubada com a bactéria 3BA 1 marrom em estado agitado..... | 55 |

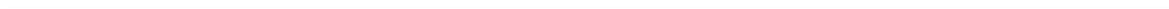


LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1. Composição química do óleo essencial da laranja (Marostica, 2007). | 11 |
| Tabela 2.2. Caracterização dos efluentes líquidos das unidades operacionais de indústrias cítricas do Estado de São Paulo na Região do Matão (Guimarães, 1998). | 13 |
| Tabela 2.3. Caracterização dos efluentes reunidos de todas as operações unitárias geradoras de efluentes líquidos: dados de plantas de indústrias do Estado de São Paulo, sendo (1) Cetesb, 1985 apud Guimarães, 1998 e (4) Ponezi <i>et al.</i> , 2005..... | 14 |
| Tabela 4.1. Características físicas e morfológicas das bactérias Gram positivas selecionadas resistentes ao d-limoneno. | 44 |
| Tabela 4.2. Turbidez média (NTU) dos microrganismos cultivados em condição agitada à 30°C, após 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno..... | 45 |
| Tabela 4.3. Turbidez média (NTU) dos microrganismos cultivados em condição estática à 30°C, após 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno..... | 46 |
| Tabela 4.4. Remoção de DQO média (%) dos microrganismos cultivados em condição agitada à 30°C, após 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno..... | 47 |
| Tabela 4.5. Remoção de DQO média (%) dos microrganismos cultivados em condição estática à 30°C, após 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno..... | 48 |
| Tabela 4.6. Turbidez média (NTU) dos consórcios de microrganismos cultivados em condição sob agitação à 30°C, durante 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno..... | 49 |

Tabela 4.7. Turbidez média (NTU) do consórcios de microrganismos cultivados em condição estática à 30°C, durante 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno.....50

Tabela 4.8. Remoção média de DQO (%) dos consórcios de microrganismos cultivados em condição estática (consórcio 2) e sob agitação (consórcio 1 e 3) à 30°C, durante 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno.....50



LISTA DE ABREVIATURAS

ABECITRUS – Associação Brasileira de Exportadores de Cítricos

APHA – American Public Health Association

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

FAO – Food and Agriculture Organization

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidreto

NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl

SST – Sólidos Suspensos Totais



1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o líder mundial na produção da laranja e exportador de suco de laranja concentrado (FAO, 2010). Apesar da grande importância econômica no desenvolvimento rural do país, esta atividade apresenta a problemática de produzir grandes volumes de resíduos, equivalentes a 50% da massa da fruta e 82% de umidade (Rivas *et al.*, 2008).

Os principais resíduos gerados nas indústrias cítricas são os efluentes líquidos e resíduos sólidos. Os efluentes líquidos são derivados da utilização da água na lavagem das frutas e equipamentos de processo e equivale à 83 L por caixa de fruta processada (Tavares, 1998). Os resíduos sólidos são rejeitos de polpa, sementes, bagaço e cascas (Yamanaka *et al.*, 2005).

Os resíduos sólidos têm sido reaproveitados como complemento de ração animal da polpa da fruta e óleos essenciais retirados da casca da laranja, que são comercializados como insumos na indústria de alimentos, solventes e tintas, cosméticos e perfumes (Beneditti e Rezzadori, 2009). Por outro lado, o tratamento e a reutilização dos efluentes líquidos têm apresentado desafios para as empresas tratadoras.

As caracterizações dos efluentes cítricos apresentam alta concentração de matéria orgânica e nitrogênio, DQO média de 3989 mg/L e NTK médio de 12 mg/L (Ponezi *et al.*, 2005), sais e substâncias como o d-limoneno, decorrente do residual do óleo da casca da laranja (Maróstica *et al.*, 2009).

Os tratamentos dos efluentes cítricos são usualmente realizados por sistemas biológicos, devido sua viabilidade econômica e ambiental, não utilizando produtos químicos e também apresentando custos energéticos baixos (Metcalf e Eddy, 2005). Podem-se citar sistemas de tratamentos aplicados em indústrias cítricas: lagoas aeradas,

reator de fluxo ascendente, lodos ativados convencionais e membranas de ultrafiltração submersas em biorreatores. Porém, a presença de substâncias como o d-limoneno e seus subprodutos decorrentes da bioconversão metabólica, prejudica a eficiência do tratamento, acarretando queda na qualidade do efluente final que são dispostos em corpos d'água (Falconi, 2003).

Em sistemas biológicos anaeróbios, a concentração de 70 mg/L de d-limoneno presente no efluente provoca a inibição da atividade metanogênica das bactérias devido a ação biocida da substância. O óleo d-limoneno é absorvido na biomassa granular causando a intensa toxicação e degranulação que pode ser praticamente irreversível na reativação do lodo (Ruiz *et al.*, 2009). Em lagoas aeradas verifica-se que o limite para o tratamento é de 0,005% de d-limoneno (Falconi, 2003). Em sistemas de lodos ativados convencionais são removido 90% da massa de d-limoneno por biodegradação e volatilização no processo de aeração, porém é considerando dosagens de aplicações de 0,5 a 10 mg/L, conforme reportado por Alvarez *et al.*, 1999. Porém, dosagens superiores exigem controle refinado, pois podem diminuir o processo de fosforilação oxidativa nas células dos microrganismos do lodo (Chatterjee e Bhattacharya, 2001). Em biorreatores de membranas de ultrafiltração, o controle na massa biológica é similar ao sistema de lodos ativados convencionais, porém também é verificada a necessidade de grande controle de incrustações na superfície da membrana, devido à característica oleosa do d-limoneno, causando o impedimento da filtração do efluente, com conseqüente aumento de pressão e gasto com energia elétrica (Braddock, 2006).

O d-limoneno, em meio aquático apresenta elevada toxicidade para peixes, comprovada pelo bioensaio utilizando *Daphnia similis* (Filipsson, F., A., Bard, J., e Karlason, S., 1998). Esta toxicidade é ampliada também a muitas bactérias, por sua propriedade antimicrobiana (Pattanik *et al.*, 1997; Bakkali *et al.*, 2008). As disposições dos efluentes cítricos nos corpos d'água podem causar grandes impactos ambientais. Como exemplo, pode-se citar que no Estado de São Paulo, onde se tem a maior concentração da produção, na região de Matão, foi evidenciado o incremento no consumo de oxigênio dissolvido durante as safras no Rio São Lourenço (Guimarães, 1998).

A biodegradação e bioconversão do d-limoneno por microrganismos resistentes, utilizando como fonte única de carbono e energia, tem sido descrita largamente na literatura (Cadwallader *et al.*, 1989; Chang e Oriel, 1994; Dhavalikar *et al.*, 1966; Vander Werf *et al.*,

1999; Duez et al., 2003). No tratamento de efluentes cítricos foi verificado que bactérias isoladas *Pseudomonas sp*, *Enterobacter sp* e o fungo *Fusarium sp* foram capazes de degradar o d-limoneno em alta concentração (Falconi, 2003). Também foi investigada a redução de matéria orgânica e de uma ribonuclease em efluente cítrico por *Penicillium citrinum* (Tavares et al., 1998). Outro estudo demonstrou a biodegradação do d-limoneno com a utilização da *Pseudomona struzieri* e microrganismo não identificado (Ponezi, 2005).

1.1. Colocação do Problema

Mediante ao uso crescente do d-limoneno como matéria prima por diversas indústrias além das plantas cítricas na produção do suco de laranja e conseqüente aumento da concentração deste composto nas estações de tratamento de efluentes, torna-se necessária à investigação da sua biodegradação e bioconversão por microrganismos resistentes a característica tóxica do d-limoneno para melhor destinação ambiental destes efluentes. Neste trabalho a biodegradação e bioconversão do d-limoneno foi avaliada por cultivos isolados (puros) e também pelo consórcio dos microrganismos em condições estática e agitada.

1.2. Objetivo

Neste trabalho o objetivo foi estudar a bioconversão e biodegradação do d-limoneno por microrganismos obtidos por isolamento de lodo ativado de uma estação de tratamento de esgoto.

Estudou-se a resistência dos microrganismos isolados com o aumento gradativo da concentração do d-limoneno, no intuito de identificar a concentração máxima de controle nas estações de tratamento de efluentes cítricos. Comparativamente ao estudo de degradação envolvendo culturas puras, foi realizado o consórcio dos microrganismos para avaliar se o rendimento da degradação do d-limoneno seria superior aos microrganismos cultivados isoladamente. Os subprodutos obtidos a partir do d-limoneno foram avaliados quanto a sua toxicidade e também quanto ao seu valor comercial.

1.3.Etapas desenvolvidas

Para a realização deste trabalho desenvolveu-se um plano estruturado em cinco etapas (Figura 1) que são listados a seguir com a indicação da etapa de trabalho pertinente apresentada entre parênteses ao final da descrição do tópico:

- a) Isolamento de microrganismos por ensaios de cultivo e enriquecimento utilizando o d-limoneno como fonte de carbono durante 21 dias com aumento gradativo da concentração deste, em temperatura controlada de 30°C e condições de agitação de 150 rpm e condição estática (**Etapa 1**);
- b) Pré-seleção de microrganismos resistentes através de protocolo de esgotamento em placas contendo ágar nutriente como meio de cultura, durante as 3 etapas de enriquecimento. Seleção de microrganismos através de crescimento visual e tempo de inoculação. Seleção das culturas puras por análises morfológicas das colônias de colônias diversificadas e estudo da coloração de Gram utilizando a técnica de repicagem em tubos com meio NA inclinado repetido até obtenção de culturas puras (**Etapa 2**);
- c) Estudo da degradação do d-limoneno através de análises de DQO, turbidez e pH após tratamento com as culturas isoladas e com o consórcio (**Etapa 3**);
- d) Ensaios de identificações dos microrganismos selecionados através do protocolo de análise filogenética (**Etapa 4**);
- e) Qualificações das substâncias bioconvertidas a partir do d-limoneno após tratamento com os microrganismos através de ensaios de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (**Etapa 5**).

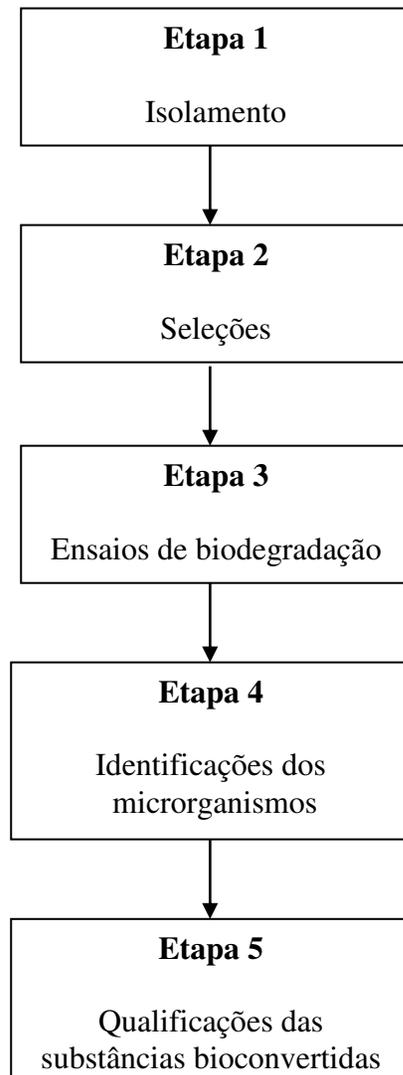


Figura 1. Diagrama esquemático representando as etapas do trabalho desenvolvido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Indústrias cítricas no Brasil e no mundo

O Brasil é o primeiro produtor mundial de citros e o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja, representando 53% da produção mundial, seguido dos Estados Unidos, potencial concorrente no mercado internacional de “commodity”. (ABECITRUS , 2010). Conforme dados da FAO, 2010, nos anos 60 a produção brasileira alcançava o valor de 1,76 milhões de toneladas de laranja e no final da década de 80 alcançou 17,77 milhões de toneladas. Uma década depois já apresentava o valor de produção de 22,89 milhões de toneladas, o que era correlacionada às fortes geadas na região norte dos Estados Unidos e avanços tecnológicos, tanto em técnicas de plantio quanto defensivos sanitários e logística.

Mesmo na década de 90 apresentando fatores externos desfavoráveis ao crescimento, excessiva oferta de laranja e suco, diminuição das importações americanas e barreiras tarifárias, o Brasil conseguiu preservar e aumentar a posição conquistada no mercado internacional devido a estratégias de novos mercados. Atualmente o suco de laranja tem expressivo valor na economia brasileira: em 2009 ultrapassou o valor de 18,58 milhões de toneladas (IBGE, 2008), sendo que na balança comercial gera divisas que ultrapassam de US\$ 1 bilhão por ano. A produção brasileira responde a 60% do mercado mundial do suco de laranja e 70% do volume de exportação é direcionado ao mercado europeu (IBGE, 2008)

O mercado mundial da laranja, após o programa “Brazilian Fruit”, apresentou como novos mercados os países do norte europeu, países árabes e a Rússia, além dos países da América Latina. O mercado tem apresentado grandes tendências de crescimento e as

estratégias de mercado que vem se firmando no âmbito nacional e internacional são sucos prontos para beber e de frutos cítricos típicos de mesa.

A produção de laranja tem notória concentração na região sudeste: ela está presente em 322 municípios paulistas e 11 municípios mineiros. O Estado de São Paulo é responsável pela produção de 70% da produção de laranja e 98% do suco de laranja do Brasil. Esta atividade econômica emprega cerca de 400 mil pessoas (MDIC, 2010).

2.2. Processo de produção do suco de laranja

A produção do suco de laranja utiliza cerca de 60% da fruta, obtidas das vesículas de suco, que pode ser observado na Figura 2.1. Além do suco de laranja, durante a produção são gerados subprodutos: farelo da polpa cítrica (49,24%), células congeladas (2,67%), óleos essenciais (1,79%), d-limoneno (0,92%) e líquidos aromáticos (0,57%), (Abecitrus, 2008).

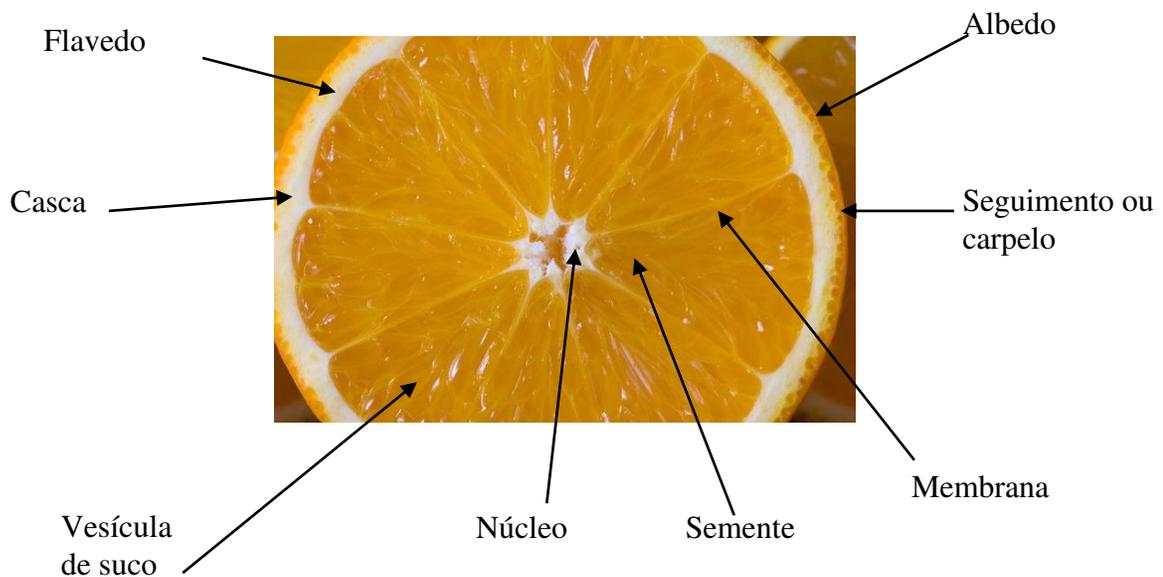


Figura 2.1. Anatomia da laranja representando esquematicamente seus constituintes.

As etapas de produção do suco de laranja podem ser divididas em: recebimento e pré-seleção de frutos, lavagem de frutos, classificação de frutos, extração de suco, ajuste do teor de polpa, pasteurização e concentração do suco, blendagem, resfriamento e armazenamento (Yamanaka, 2005).

O recebimento dos frutos é feito a partir das carretas a granel e encaminhadas até o pátio, que descarregam as laranjas em esteiras de roletes. A partir daí seguem por elevadores para outro conjunto de esteiras que transportam até o depósito. Nas pré- seleções são realizadas as análises de teor de açúcar ($^{\circ}$ Brix), índice de acidez total e relação acidez/ $^{\circ}$ Brix; as laranjas que apresentem ferimentos nas cascas (cortes e picadas de insetos), sujos, dimensões inadequadas e não suficientemente maduras são descartadas.

O armazenamento é feito em bins, que são silos de estocagem onde as laranjas são armazenadas de acordo com as características definidas pela análise do recebimento.

Na lavagem dos frutos, as laranjas são encaminhadas dos silos por esteiras para a mesa de lavagem, compostas por esguichos de água (com ou sem auxílio de detergentes) na parte superior e escovas na parte inferior. As laranjas poderão ser misturadas de acordo com a especificação do cliente referente ao teor de açúcar.

É realizada novamente a seleção das frutas estragadas por pragas, cortadas ou amassadas, por operadores, sendo estas enviadas à fábrica de ração. Posteriormente, as frutas selecionadas são encaminhadas para classificadores por tamanho e encaminhado para extração.

A extração do suco de laranja é realizada por extratores em que a laranja é colocada automaticamente no copo inferior, o copo superior desce comprimindo a fruta localizada na extremidade do tubo coador, que abre um orifício na fruta através do qual o suco escoar sem entrar em contato com a casca. Com a compressão do material retido dentro do tubo coador, a extração é completada com a casca expelida. O suco sai por meio de tubulações na parte inferior do equipamento sendo enviado para tanques de armazenamento.

O ajuste do teor da polpa é realizado por “finishers” ou “turbo-filtros”. Este equipamento é formado por cilindros de aço inox em cujo interior armações com telas de tecidos sintético funcionam como filtros. O ajuste é feito em etapas de acordo com a especificação, o que em geral apresenta valor de 4% de teor da polpa, sendo posteriormente encaminhado para centrífuga para acerto da cor.

Posteriormente é realizada a pasteurização e concentração do suco da laranja, em que o suco é encaminhado para evaporadores à vácuo de múltiplos efeito, chamado TASTE, sendo o vácuo gerado por colunas barométricas com ciclo fechado de circulação da água empregada. Antes do primeiro estágio o suco é pasteurizado, com objetivo de inativação de microrganismos responsáveis pela degradação do suco e a pectinesteras e

enzima que age na formação de ácidos pectínicos que arrastam o material colorido que confere a turbidez do suco, e também é iniciado o processo de concentração. O suco com sólidos solúveis totais de 10 a 11° Brix inicial tem como produto final 65° Brix, padrão de qualidade do FCOJ (“Frozen Concentrated Orange Juice”).

No processo de concentração é comum a obtenção de sucos concentrados com teores de sólidos solúveis variáveis, o que se torna comum a mistura (blends) de sucos de diferentes características para uniformizar o que já foi produzido.

Posteriormente, o suco chega aos resfriadores flash penetrando por meio de bicos injetores numa atmosfera de baixa pressão absoluta. O líquido evapora instantaneamente diminuindo a temperatura para 18° C. Em seguida, trocadores de calor que utilizam glicol ou solução alcoólica como fluido de resfriamento, abaixa a temperatura do suco a -7°C. O suco resfriado é encaminhado aos tanques de armazenamento e o sistema de estocagem a granel é chamado de tank-farms, onde é armazenado até o seu transporte por caminhões.

2.3. Subprodutos do processo de produção do suco de laranja

2.3.1. Farelo de polpa cítrica

A fabricação do farelo de polpa cítrica é realizada na fábrica de ração que utiliza as cascas de laranja, sementes, polpas e demais resíduos, que representam 50% do peso da fruta e é composto de 16,9% de açúcares solúveis, 9,21% de celulose, 10,5% de hemicelulose e 42,5% de pectina (que representa o componente mais importante). Este resíduo apresenta 82% de umidade, para o aproveitamento de grande parte deste resíduo, que tem alto valor agregado, é realizada a hidrólise química ou enzimática seguido da conversão biológica (Rivas *et al.*, 2008), o processo fermentativo dos açúcares remanescentes no bagaço, origina o álcool que é destilado e armazenado para comercialização.

O farelo é utilizado como alimento para bovinos e também como base para a fabricação de pectina (agente utilizado na indústria alimentícia como emulsificante, espessante e gelificante). Em 1999 a produção atingiu o valor de 1,4 milhões de toneladas por ano e em 2004 um milhão de toneladas por ano (ABECITRUS, 2008).

2.3.2. Óleos essenciais

A obtenção do óleo essencial é realizada quando a laranja está sendo processada nos copos extratores. Os óleos essenciais são utilizados para dar sabor para bebidas, sorvetes e outros alimentos e na fabricação de medicamentos e cosméticos, como sabonetes e perfumes. Outra aplicação está na fabricação de produtos de limpeza.

O Brasil destaca-se na produção mundial de óleos essenciais, durante o período de 2004 a 2007, representou 2% do total importado pelos EUA, que é o maior consumidor mundial (40%) seguido da União Européia (30%) e o Japão (7%) segundo COMRADE – “United Nations Commodity Trade Statistics Database”. O mercado mundial gira em torno de 15 milhões/ano, com crescimento aproximado de 11% ao ano. Apesar do destaque o Brasil sofre problemas crônicos como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos, representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor (Bizzo *et.al.*, 2009).

2.3.3. d-Limoneno

O d-limoneno é um subproduto do óleo essencial, obtido da remoção de compostos oxidantes, a partir do licor de prensagem extraído durante a fabricação de farelo de polpa cítrica, quando ocorre a moagem dos resíduos com cal, para acerto do pH e liberação de água. Este licor posteriormente passa por uma bateria de peneiras para a remoção de sólidos e posteriormente é enviado para o evaporador. Na etapa de concentração do evaporador, o d-limoneno é extraído no 2º estágio do evaporador de múltiplo efeito. O condensado recuperado é composto por água e quando deixado em repouso, ocorre à separação por decantação do d-limoneno. A produção brasileira anual do d-limoneno é aproximadamente 50 mil toneladas através de resíduos das cascas de laranjas derivadas das indústrias cítricas (Maróstica e Pastore, 2007). O d-limoneno, é constituído pelo anel ciclohexano e grupos de etilenos, apresenta estrutura química contendo um carbono seletor que está ligado às unidades de isopreno do início ao fim da cadeia, formando um monoterpene cíclico, considerado como grupo insaturado alifático de origem biogênica (Misra,1996). Por possuir um centro quiral, apresenta isomeria ótica, portanto, há dois enantiômeros o levógeno (l-limoneno) e o destrógeno (d-limoneno), conforme Figura 2.2.

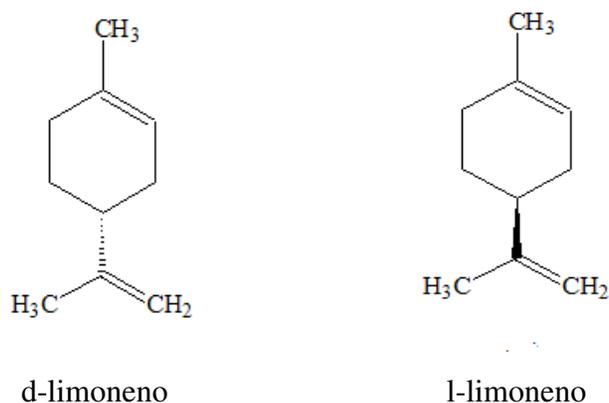


Figura 2.2. Estrutura química do d-limoneno e do l-limoneno.

Sua denominação segundo IUPAC é 1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno, e os prefixos corretos são R-limoneno e S-limoneno, porém se emprega com mais frequência os prefixos D e L ou alfa e beta. Considerado monoterpene cíclico, que são metabólitos secundários de plantas, é produzido para defesa de ataques de insetos, fungos e bactérias (Seigler, 1998). Faz parte da estrutura de mais de 300 diferentes plantas (Burdock, 1995), em concentrações de 90 - 95% de limoeiros, laranjeiras e mandarin e 1% de palmosa (Tan, 1998). Na Tabela 2.1 é possível observar que o d-limoneno apresenta mais que 90% do óleo presente na laranja (Maróstica *et al.*, 2009 e Bauer *et al.*, 2001).

Tabela 2.1. Composição química do óleo essencial da laranja (Marostica, 2007).

| Componente | % |
|-----------------------------|-------|
| α pinene | 0,53 |
| Myrcene | 1,21 |
| Terpinene | 0,20 |
| Limonene | 94,29 |
| dihydromircene | 0,55 |
| desconhecido | 0,26 |
| Tran-p- 2,8 menthadien-1-ol | 0,10 |
| Carveol | 0,72 |
| Carvone | 1,12 |
| Oxido de Limoneno | 0,15 |
| Z-citral | 0,17 |
| desconhecido | 0,10 |

Ele é resistente à hidrólise e, apesar da ausência de grupos funcionais para hidrólise, apresenta boa estabilidade em água quando em presença de surfactantes. (Li e Chiang, 2012). A reatividade do d-limoneno se dá com radicais livres como nitrato, cloreto e amônio na presença de luz (Corchnoy e Atkinson, 1990).

2.4. Resíduos líquidos cítricos

2.4.1. Origem dos efluentes líquidos cítricos

Os efluentes líquidos são um dos principais poluentes das indústrias cítricas seguido dos resíduos sólidos, além das emissões atmosféricas: materiais particulados e gases de queima de combustível e emissões odoríferas (Yamanaka, 2005). Os resíduos sólidos como as cascas, sementes, polpa ou bagaços, conforme descritos anteriormente são aproveitados e comercializados como farelo. Os efluentes líquidos são derivados de águas de lavagem da fruta, derramamento nos processos de centrifugação do óleo essencial, condensados da evaporação do suco (reutilizados), derramamento do licor da prensagem do bagaço, condensados do evaporador de ração, purga dos circuitos fechados das águas de refrigeração das colunas barométricas e lavagem de pisos e equipamentos (Guimarães, 1998 e Yamanaka, 2005).

Na lavagem da fruta, na primeira etapa é retirado o material grosseiro (terra, pesticidas, etc) e a água é encaminhada para tratamento. Na segunda etapa é utilizada água tratada e clorada, sendo reciclada para primeira etapa. As caracterizações deste efluente contem alto teor de sólidos suspensos, areia e terra e baixos teores de DBO, a temperatura varia entre 35°C e 40°C, devido a reutilização da água condensada do evaporador de suco e o pH varia entre 2 e 7 (Tavares *et al.*, 1998).

No processo unitário da extração e concentração de suco, as águas de lavagem, também cloradas, são utilizadas na lavagem dos equipamentos obrigatoriamente com solução de soda ou hidróxido de potássio, onde é gerado grande volume enviado ao tratamento. No processo de extração de óleo, a recuperação através de centrífugas e suas descargas (contendo ainda óleo e açúcar), são encaminhadas a fabrica de ração, sendo que as águas de lavagens destes equipamentos apresentam pequenos volumes, porém altos valores de DBO também são encaminhados para o tratamento. Os efluentes provenientes da separação e concentração do suco, separação de óleo essencial e operações de lavagens de

pisos e equipamentos, são denominados “águas amarelas”. As “águas amarelas” apresentam em sua composição proteína, óleos essenciais, pectina, açúcares, ácidos orgânicos e sais, o que lhe confere alta carga orgânica, com alto potencial poluidor (Tavares, 1998).

“As águas pretas”, derivadas da fábrica de ração, que são as águas condensadas do evaporador do melaço, utilizadas na lavagem dos gases de combustão do secador. Apresentam valores elevados de DBO e temperatura e pH ácido (2,1 a 2.7), podendo conter enxofre na forma de sulfatos ou sulfitos. O derrame acidental do licor da prensagem do bagaço pode caracterizar alta toxicidade no efluente, caracterizando-o como bacteriostática.

Por último tem-se o efluente das colunas barométricas dos evaporadores, da fábrica de suco e ração, que apresenta alto volume e baixa concentração de matéria orgânica.

2.4.2. Caracterização dos efluentes líquidos cítricos

A geração dos efluentes cítricos é dependente da sazonalidade, as indústrias cítricas no início e final da safra funcionam com aproximadamente 50% da sua capacidade. As características dos efluentes também são variáveis. Durante a produção do suco de laranja, as unidades operacionais geram efluentes com diferentes concentrações, demonstradas na Tabela 2.2, referente à amostragem de uma estação de tratamento cítrico da região de Matão.

Tabela 2.2. Caracterização dos efluentes líquidos das unidades operacionais de indústrias cítricas do Estado de São Paulo na Região do Matão (Guimarães, 1998).

| Parâmetros | Áreas de Processamento | | | |
|-----------------------|------------------------|----------|------------------|----------------------|
| | lavagem da laranja | extração | fábrica de ração | colunas barométricas |
| DBO (mg/L) | 295 | 1380 | 2190 | 654 |
| DQO (mg/L) | 758 | 2170 | 4020 | 852 |
| NTK (mg/L) | 49 | 36,4 | 36,4 | 32,8 |
| Fósforo total (mg/L) | 0,79 | 2,02 | 1,9 | 1,0 |
| Óleos e Graxas (mg/L) | n.d | 55 | 65 | n.d |
| pH | 3,6 – 7,0 | 4 – 11,3 | 2,1 – 2,7 | 6,3 – 7,4 |

Quanto aos efluentes reunidos de todas as etapas do processo de produção de suco de laranja, demonstrado na Tabela 2.3, é observado que apresenta alta carga orgânica, ou seja, alta concentração de DQO, em média 4000 mg/L e DBO em média 2300 mg/L. Também pode ser observada a alta biodegradabilidade, pois a DBO apresenta em média a fração de 0,55 da DQO total.

Tabela 2.3. Caracterização dos efluentes reunidos de todas as operações unitárias geradoras de efluentes líquidos: dados de plantas de indústrias do Estado de São Paulo, sendo (1) Cetesb, 1985 apud Guimarães, 1998 e (2) Ponezi *et al.*, 2005.

| Parâmetros | Referências | |
|--------------------------|-------------|------------|
| | (1) | (2) |
| DBO (mg/L) | 2279 | 1276+263 |
| DQO (mg/L) | 3904 | 3989+326 |
| Sólidos suspensos (mg/L) | 454 | 317+187 |
| Nitrogênio total (mg/L) | 31,02 | 12 - 8 |
| Fósforo total (mg/L) | 2,81 | 2,8±0,8 |
| Óleos e graxas (mg/L) | 44 | - |
| pH (variações) | 2,9 a 11,3 | 4,25 a 8,5 |
| Vazão (L/s) | 64,8 | - |

Geralmente, os efluentes brutos são ácidos devido à presença do ácido cítrico. Porém durante as lavagens dos equipamentos este pH torna-se alcalino. Quando misturados, a temperatura varia de 30° C e 35°C, podendo chegar a 40°C com a recepção das águas pretas, com temperatura na saída do equipamento em torno de 75° C ou ainda devido à adição das purgas de caldeiras. A caracterização qualitativa dos compostos orgânicos (representados por DQO) pode dar subsídios para identificar ações inibitórias durante o tratamento empregado do efluente.

Outros parâmetros importantes na caracterização do efluente industrial bruto que serão submetidos ao tratamento são os compostos orgânicos, que poderão apresentar inibição e toxicidade ao sistema de tratamento.

Dentre os parâmetros mais importantes, o d-limoneno é de fundamental relevância quanto as suas características, devido a sua toxicidade. Na Figura 2.3 é possível verificar as substâncias presentes no efluente cítrico bruto, em que apresenta o d-limoneno em sua composição.

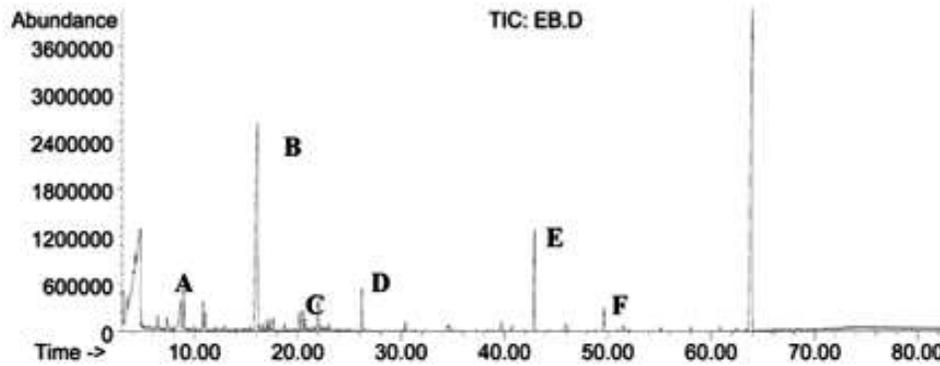


Figura 2.3. Análise cromatográfica do efluente industrial cítrico bruto por cromatografia gasosa. No gráfico: A representa a substância fenol, no tempo de detenção de 7,35 min; B representa α -terpineol no tempo de 16,10 min; C o d-limoneno no tempo de 22 min; D tetradecano no tempo de 26,1 min; E ácido benzóico no tempo de 42,90 min e F ftalato no tempo de 49,50 min (Ponezi, *et al.*, 2005).

2.5. Gestão dos efluentes líquidos cítricos

Os efluentes líquidos derivados de todas as operações unitárias da planta industrial cítrica apresentam potencial impacto ambiental de contaminação dos corpos d'água quando dispostos sem tratamento, de acordo com o enquadramento legal do Decreto 8468/76, artigos 7,8,9,10 ao 19F e CONAMA 357/05.

A gestão dos resíduos líquidos cítricos deve ser realizada com a minimização destes, de acordo com os conceitos da produção mais limpa, receber tratamento na própria empresa ou também tem a opção de negociar seu tratamento na estação de tratamento de esgoto (ETE) do município. Para a seleção da melhor opção é necessário realizar o levantamento do custo benefício da implantação de uma planta de tratamento de esgotos na indústria, através do estudo de tecnologias existentes no mercado, ou através de testes piloto.

2.5.1. Produção mais limpa (P+L) para minimização dos resíduos cítricos

A produção mais limpa, em seu primeiro princípio objetiva a revisão do processamento para minimizar a geração de resíduos e utilização de recursos naturais. No processo produtivo cítrico, a incorporação da produção mais limpa, permitiu a minimização dos volumes de efluentes através de reuso de água, redução de consumo de produtos químicos, uso racional de energia, redução de resíduos além da implantação de novas tecnologias: osmose reversa na pré-concentração, automação, utilização de enzimas para aumento de rendimento, destilação a vácuo (Yamanaka *et al.*, 2005). Atualmente no Brasil, o governo do Estado de São Paulo apresenta como apoio para estas indústrias um orientativo para implantação da produção mais limpa.

A economia de água, que é um dos maiores geradores de resíduos 83,3L/caixa processada (Tavares *et al.*, 1998), é possível devido ao aproveitamento de condensados do processo de produção de suco e do farelo da polpa. As indústrias de grande porte apresentam menor carga de poluentes (DQO, DBO, SST, nitrogênio total, fósforo e óleos e graxas) do que as indústrias de pequeno porte, reflexo das ações mitigadoras no processo produtivo que foram implementadas nestas indústrias.

O uso do condensado do T.A.S.T.E, por exemplo, chega a fornecer metade da água consumida no processo produtivo, sendo que as outras frações vem do W.H.E e da captação. A água utilizada para lavagem das frutas, também pode ser economizada, utilizando o condensado, devendo passar anteriormente por desinfecção e que atenda os padrões de potabilidade. Estudos demonstram que a utilização desta água com desinfetante diminui a quantidade de microrganismo na casca, reduzindo a carga microbiana.

Outro reuso possível é a reposição da água de caldeira com o condensado, que também reduz o consumo de energia para gerar vapor, já que a temperatura inicial é mais alta que a ambiente. A produção de pulp-wash também pode utilizar o condensado na lavagem das polpas, atentando ao teor de sódio e também desinfecção. Além da utilização no processo do óleo essencial, quando a água é utilizada para remover o óleo da casca. Tanto o preparo das soluções de limpeza como NaOH ou KOH, como a do ácido muriático também pode-se reutilizar o condensado. Finalizando é possível o reaproveitamento do condensado para limpeza de pisos e equipamentos. Os resíduos que não podem ser evitados deverão seguir a política de disposição seja sólida ou líquida.

2.5.2. Tratamento dos efluentes cítricos

O tratamento dos efluentes cítricos pode ser realizado com um pré-tratamento físico químico e posterior encaminhamento para ETE do município, para o tratamento em conjunto com o esgoto doméstico. Porém, as características do efluente não poderão impactar o sistema de coleta e tratamento existente, devendo cumprir a legislação vigente ou conforme negociação dos parâmetros com a ETE.

Normalmente a avaliação quantitativa do tratamento na ETE do município é baseada na carga orgânica (DQO – demanda química de oxigênio ou DBO – demanda bioquímica de oxigênio), na carga de sólidos e no custo do transporte.

Para o encaminhamento do efluente industrial pela rede coletora deverá cumprir a legislação vigente, que no Estado de São Paulo deverá atender o artigo 19- A do Decreto Estadual nº 8.468 de 08/09/76 (Regulamento da Lei nº 977 de 1976). Para o cumprimento do artigo na íntegra poderá ser necessária a implantação de um pré-tratamento que deverá também ser considerado no custo.

Outra opção de tratamento dos efluentes cítricos é o tratamento na própria indústria. Para a implementação do tratamento são consideradas a caracterização, a vazão, a localização da indústria e as características necessárias do efluente final que será disposto.

A caracterização do efluente cítrico, conforme apresentada no item 2.4.2, possui alta concentração de matéria orgânica (DQO e DBO) e nutriente (nitrogênio e fósforo). O efluente com estas características remete a seleção dos processos biológicos, que comumente são utilizados pelas indústrias cítricas. Quanto à vazão, é dependente diretamente da produção do suco de laranja e conseqüentemente do volume produzido de efluentes.

O tipo de tratamento biológico, leva em consideração a disponibilidade do terreno que será utilizado para implantação da planta tratadora de efluente. Se a disponibilidade é grande, são selecionados sistemas como lagoas facultativas, aeróbias ou anaeróbias bem como a combinação delas. Por outro lado, em locais em que o custo do terreno é alto, existem sistemas de tratamentos mais compactos, porém com custo maior operacional, devido à necessidade de oxigenação. O sistema de lodos ativados convencional e sistemas anaeróbios são exemplos intermediários visto que atualmente o mercado apresenta sistemas mais compactos como MBR (reatores biológicos de membranas).

Mediante a avaliação qualitativa e quantitativa do efluente cítrico, bem como os custos de implantação do processo biológico, a seleção finalmente é realizada considerando o nível de tratamento necessário para atingir as características necessárias do efluente final que será disposto, que deverá cumprir a legislação vigente, atendendo os parâmetros conforme a classificação do corpo d'água e padrões de lançamento.

2.5.2.1. Processos de tratamento biológico para os efluentes cítricos

Os processos utilizados no tratamento dos efluentes cítricos são os processos biológicos. Estes processos dependem da ação de microrganismos que estão presentes no efluente cítrico ou então são inoculados a partir do lodo ativado proveniente de uma planta de tratamento de esgotos.

Tipicamente, os processos biológicos são definidos de acordo com sua função metabólica: processos aeróbios, anaeróbios, anóxicos e combinados.

Os processos aeróbios são processos que ocorrem na presença de oxigênio. A aeração das águas residuárias resulta na remoção de material orgânico por oxidação pela ação dos microrganismos heterótrofos pela reação catabólica e também há a síntese do material celular pela reação anabólica, produzindo como produtos: sais minerais, gás carbônico e água. Simultaneamente, se formam flocos macroscópicos de microrganismos que podem ser separados da fase líquida por filtração ou decantação, obtendo-se assim o lodo ativado, que com a recirculação no processo, resulta na aceleração da remoção do material orgânico.

A tratabilidade do efluente industrial cítrico é dependente da composição do material orgânico (DQO), que pode ser dividido em três frações: DQO biodegradável orgânica (rápida e lenta), DQO não biodegradável inerte e a DQO da biomassa heterotrófica ativa (Wentzel *et al.*, 1999), além dos macronutrientes (nitrogênio e fósforo) e pH controlado.

Pode-se citar como exemplos de processo aeróbios de sistemas de tratamento de efluentes cítricos: lodo ativado convencional (tanque de aeração e decantadores secundários), reatores biológicos com membranas submersas, filtros de discos biológicos e lagoas aeradas.

Na Figura 2.4 estão demonstradas as unidades de processo da etapa biológica, do processo de lodos ativados convencionais, processo comumente utilizado nas indústrias cítricas e estações de tratamento de esgotos municipais.

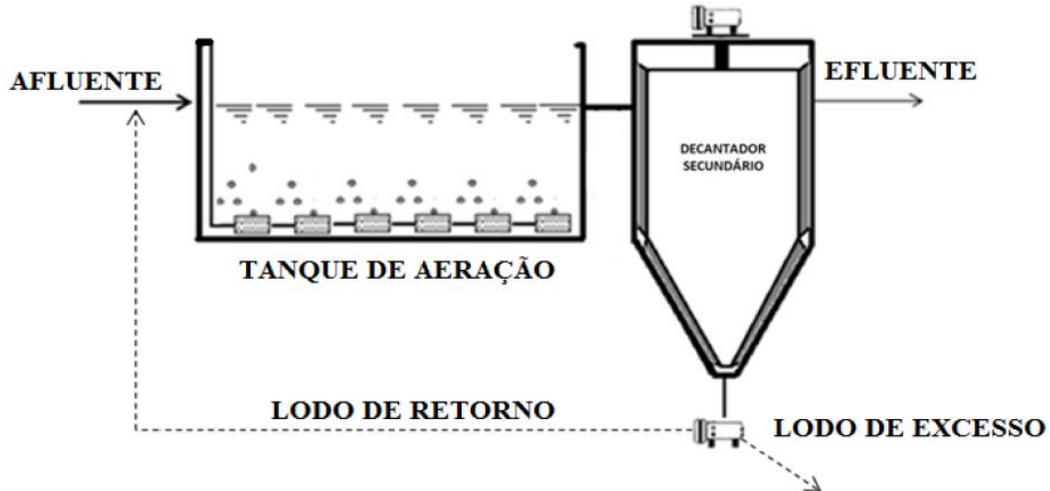


Figura 2.4. Esquema das unidades da etapa biológica do sistema de lodos ativados convencionais. (Von Sperling, 2002).

Os processos anaeróbios são processos que ocorrem na ausência de oxigênio. Muitos microrganismos são capazes de se desenvolver na ausência do oxigênio e remover o material orgânico, utilizando compostos orgânicos ou substâncias como nitrato e sulfato como aceptores finais de elétrons, durante o metabolismo fermentativo (Van Handel, 1999), tendo-se produtos gasosos estáveis (metano e dióxido de carbono principalmente). No processo de conversão do material celular para biogás distinguem-se quatro etapas principais: hidrólise, acidificação, acetogênese e metanogênese. Como exemplos de processos anaeróbios utilizados em indústrias cítricas podem-se citar reatores anaeróbios de fluxo ascendente e principalmente as lagoas anaeróbias.

Os processos anóxicos, são processos em que o íon nitrato é convertido a gás nitrogênio na ausência de oxigênio. Este processo anóxico objetiva a remoção dos nutrientes, compostos de nitrogênio e fósforo, previstos em regiões em que a qualidade dos corpos d'água receptores de efluentes de sistemas é restritiva. Compostos de nitrogênio estão na forma de nitrogênio orgânico (proteínas) e nitrogênio inorgânico (NH_3^+ , $\text{NH}_4\text{-N}$), sendo sua soma representada por NKT e, compostos oxidados de nitrogênio, nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Durante o tratamento poderão ocorrer diferentes formas do nitrogênio,

devido as reações como amonificação, nitrificação e desnitrificação (Van Handel, 1999). Compostos do fósforo são caracterizados como frações particuladas e dissolvidos, (Park *et al.*, 1997). As frações químicas consistem de ortofosfato inorgânico dissolvido, polifosfato ou fosfato condensado e bandas de fosfato orgânico. A relação de NTK/DQO é muito importante para determinar configurações de processo e razões requeridas no metabolismo bacteriano. Normalmente é um processo complementar de sistemas aeróbios.

Os processos combinados são processos formados pela combinação dos processos aeróbios, anaeróbios ou anóxicos agrupados em conjunto para atingir um objetivo de um tratamento específico. Como exemplos de processo de tratamento de efluentes céticos é citado principalmente a lagoa facultativa nas regiões interioranas de São Paulo, como demonstrado na Figura 2.5. Também como exemplo de processo biológico combinado são utilizados biorreatores com membranas submersas que possuem câmaras anóxicas e aeradas.

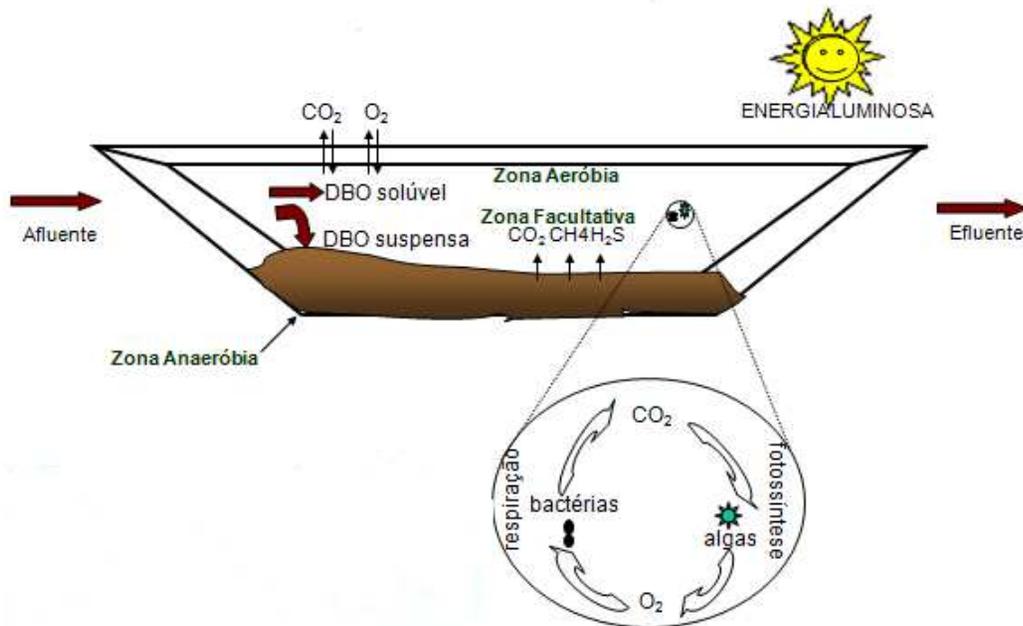


Figura 2.5. Representação esquemática do processo combinado de lagoa facultativa. (Metcalf&Eddy, 2005 adaptada)

2.5.2.2. Biodegradação do d-limoneno por microrganismos isolados

A biodegradação e bioconversão do limoneno por microrganismos resistentes, utilizando como fonte única de carbono e energia, tem sido descrita largamente na literatura científica (Cadwallader *et al.*, 1989; Chang e Oriel, 1994; Dhavalikar *et al.*, 1966; van der Werf *et al.*, 1999; Duez *et al.*, 2003). O baixo valor do limoneno (1-2 US\$/kg) e as baixas concentrações dos metabólitos que são bioconvertidos a partir do d-limoneno encontradas na natureza, como o α -terpineol, álcool perfílico, carveol, carvona e mentol motivam investigações quanto à bioconversão do d-limoneno por microrganismos isolados (Duez *et al.*, 2003).

Outro fator de motivação é a baixa eficiência de produção dos processos tradicionais, “downstream processing” (isolamento, concentração e purificação do produto) que é afetada pelo alto custo de recuperação por processar pequenos volumes, pela volatilidade e baixa solubilidade em água do d-limoneno.

Basicamente, seis vias metabólicas podem ser distinguidas pela biodegradação e bioconversão do d-limoneno: oxidação do carbono 7 para compostos perfílicos; epoxidação da dupla ligação do anel, seguido ao diol correspondente e suas oxidação; oxidação do carbono 6 para forma carveol e dihidrocarveol; hidroxidação do carbono 8 para α -terpineol; oxidação do carbono 3 para isopiperetenol e isopiperitenone, epoxidação da ligação dupla ligação 8,9 para a forma de limoneno 8,9 epóxido. As seis vias estão demonstradas no diagrama da Figura 2.6 (Maróstica e Pastore, 2007).

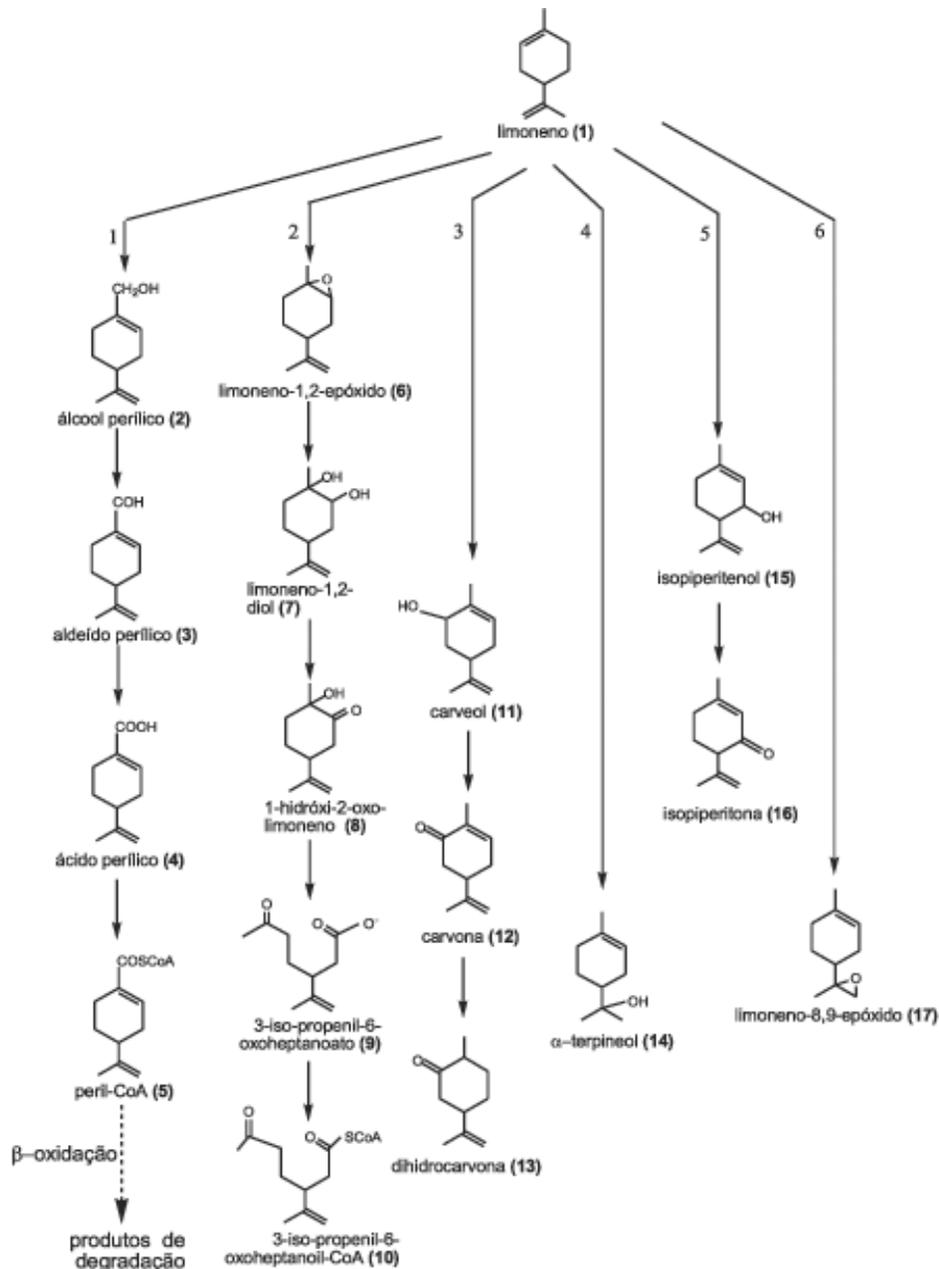


Figura 2.6. Principais vias metabólicas do d-limoneno. Na primeira rota, o (1) d-limoneno produz (2) álcool perfílico seguido por (3) aldeído perfílico, (4) ácido perfílico, (5) peril-CoA, finalizando por produtos de degradação. Na segunda rota, o d-limoneno, produz (6) limoneno-1,2-epóxido, seguido do (7) limoneno-1,2-diol, seguido por (8) 1-hidróxi-2-oxo-limoneno e (9) 3-iso-propenil-6-oxoheptanoato, finalizando em (10) 3-iso-propenil-6-oxoheptanoil-CoA. Na terceira rota o d-limoneno produz (11) carveol, seguido por (12) carvona, finalizando com (13) dihidrocarvona. Na quarta rota, o d-limoneno produz diretamente o (14) α-terpineol. Na quinta rota, o d-limoneno produz o (15) isopiperitenol,

finalizando no (16) isopiperitona. Na sexta rota, o d-limoneno produz diretamente o (17) limoneno-8,9-epóxido (Maróstica e Pastore, 2007).

Um mapeamento gráfico é apresentado conforme pesquisa dos dados de biocatálises e biodegradação da Universidade de Minnesota (2010), na Figura 2.7 e demonstra resumidamente as vias metabólicas do d-limoneno relacionadas com os microrganismos correspondentes e os principais produtos bioconvertidos, com exceção da 6 via apresentada por Maróstica e Pastore, 2007.

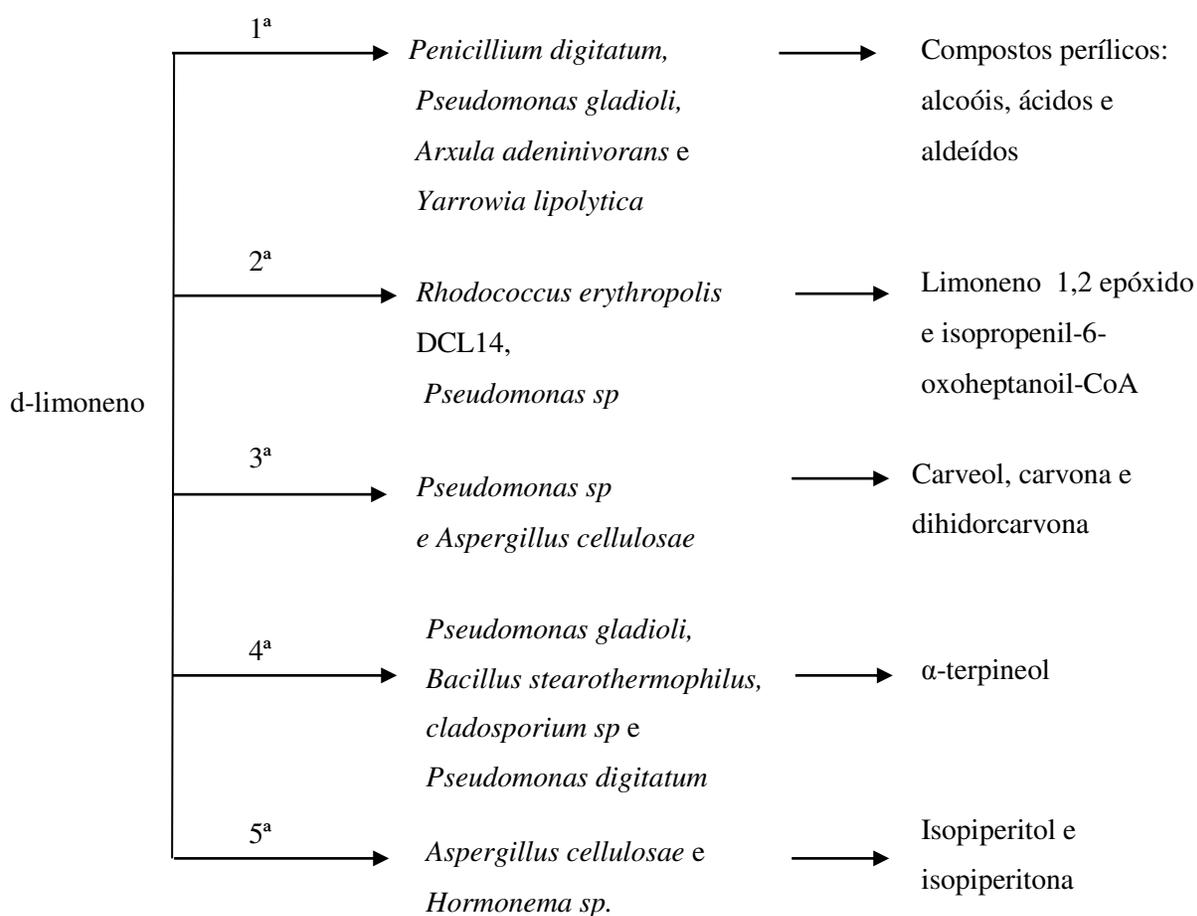


Figura 2.7. Mapeamento gráfico das vias metabólicas do d-limoneno relacionadas com os microrganismos correspondentes e os principais produtos bioconvertidos.

O estudo da biotransformação do d-limoneno por microrganismo tem sido feito para substituir processos quimicamente convencionais e apresentarem vantagens industriais por ser produzido em condições brandas, terem alta regioespecificidade e enantioselectidade, não gerarem resíduos tóxicos e serem caracterizados como produtos naturais (Bicas *et al.*, 2007). Processos fermentativos convertem d-limoneno em monoterpenos oxigenados, por exemplo:

a) *Pseudomonas* isoladas inoculadas em limoneno como fonte de carbono e energia, apresentaram dehydrocarvone, carvone, carveol e 1,2-cis-diol-limoneno como componentes acumulativos durante o crescimento (Duetz, *et al.*, 2003).

b) Fungos *Aspergillus niger* oxidou o d-limoneno em álcool perílico e ácidos graxos de cadeia curta (Menéndez, *et al.*, 2002)

c) *Solanum aviculare* e *Dioscorea deltóidea* biotransformaram limoneno em carvone com rendimento de 34% e 13%, respectivamente (Tomas, *et al.*, 1999);

a) *Penicillium digitatum* bioconverteu o d-limoneno a alfa-terpineol (Tan *et al.*, 1998; Adams, *et al.*, 2002).

b) *Xanthobacter* sp C20 bioconverteu o d-limoneno em limoneno 8,9 epóxido (Werf *et al.*, 2001);

c) *Rhodococcus erythropolis*, degradou o d-limoneno via limoneno 1,2 epóxido e limoneno 1,2 diol (Werf *et al.*, 1999).

A maioria das linhagens de bactérias oxidam inicialmente o grupo 7 metil do limoneno para álcool perílico, que é subsequentemente convertido ao aldeído perílico e ácido perílico, caminho caracterizado pela *Pseudomonas putida* PL (Ballal *et al.*, 1967; Mars *et al.*, 2001).

As substâncias perílicas, obtidas como produtos intermediários na 1^a via metabólica, têm atividade quimioterapêutica contra o câncer (Crowell *et al.*, 1991; Schultz *et al.*, 1997). São encontrados artigos demonstrando a bioconversão do d-limoneno conforme a 1^a via metabólica por *Pseudomonas putida* GSI (Mars *et al.*, 2001), *Pseudomonas putida* PL (Ballal *et al.*, 1967; Mars *et al.*, 2001); *Pseudomonas putida* MTCC 1072 (Chatterjee e Bhattacharyya, 2001).

O álcool perílico tem propriedades anticarcinogênicas, que motivam estudos sobre a avaliação do álcool perílico, através de ensaios clínicos da fase II para tratamento de câncer de mama, pâncreas e colorretal. A produção biocatalítica do álcool perílico, não apresentou resultados atrativos quando o cultivo foi realizado com *Bacillus stearothermophilus* BR38 isolados, único sistema de enzimas microbianas descrita até agora que bioconverte d-limoneno em álcool perílico. O motivo do baixo rendimento da produção do álcool perílico foi que este sistema de enzimas não é suficientemente regioespecífico, o que produz produtos intermediários, carveol, carvone e terpineol, em quantidades significativas (Oriol, *et al.*,1997 e van Beilen *et al.*,2004). Carveol, carvone e terpineol são substâncias que tem pontos de ebulição muito próximos e sua hidrofobicidades são quase idênticas, estas propriedades encarecem os métodos de purificação (por exemplo: cromatografia).

Porém, a produção de álcool perílico como produto intermediário através da bioconversão por *Pseudomonas putida* poderá ser interessante, pois estudos sobre a bioconversão d-limoneno para ácido perílico pela linhagem de *Pseudomonas putida*, tem demonstrado bom rendimento, pois expressou a enzima *Cymene monooxygenase* (Mars, *et al.*, 2001). Outras enzimas obtidas pela coleção de 1800 linhagens crescidas em substratos reduzidos como tolueno, naftaleno e outros alcanos podem ter grande interesse na hidroxilação do limoneno devido à regioespecificidade suficiente.

A carvona, produto intermediário da 3^a via metabólica (Maróstica e Pastore, 2007), é uma substância que tem considerável interesse no processo do desenvolvimento de processos fermentativos devido a pequenas quantidades encontradas na natureza (Carter *et al.*,2003). A carvona, como os compostos perílicos, tem demonstrado atividade quimiopreventiva (Zheng *et al.*, 1992 e Hohl, 1996), além das características antimicrobiana (Pattnaik *et al.*,1997), inseticidas (Lee *et al.*, 1997) e também como intermediário na síntese de agentes antivirais. A produção de carvona do limoneno por *Synechococcus sp* PCC 7942 (Hamada *et al.*,2003), trans- carveol por *Rodhococcus opacus* PWD4 (Duetz, 2001) e a bioconversão por *Escherichia coli* (Carter, *et al.*, 2003) foram estudados.

Outro produto de interesse comercial que pode ser obtido através da 4^avia metabólica, (Maróstica e Pastore, 2007), é o α -terpinol, que é um produto de odor agradável, aplicado em perfumaria, como constituinte de sabonetes e cosméticos, em indústrias de produtos de limpeza como repelente de insetos, desinfetantes e aromatizante,

em indústrias farmacêutica como antifúngico e anti-séptico, em indústrias de processamento de minerais como agente de flotação e utilizado como substrato na preparação de copolímero. (Baptistella *et.al.*,2009). Quimicamente o α -terpineol pode ser obtido pela reação do limoneno com ácidos cloroacéticos, como o ácido tricloroacético, seguida por hidrólise. A bioconversão do limoneno em α -terpineol pode ser demonstrada pelo cultivo de microrganismos cultivados isoladamente como, por exemplo, *Penicillium SP* e *Penicillium digitatum* (Pescheck, et al., 2009); (Tan *et al.*, 1998); (Adams, 2002).

O uso de resíduos agro-industriais, como os efluentes líquidos cítricos, em bioprocessos podem apresentar alternativas de substratos para a produção de produtos finais e intermediários de valor agregado, com plausíveis aplicações, como os compostos perílicos, carvona e α -terpineol. Simultaneamente, a utilização dos efluentes líquidos cítricos como substratos na bioconversão do d-limoneno ajudam a resolver problemas de poluição (Pandey *et al.*,2000 e Maróstica *et al.*, 2007). No tratamento de efluentes cítricos foi investigado que as bactérias isoladas *Pseudomonas sp*, *Enterobacter SP* e o fungo *Fusarium sp* foram capazes de degradar o limoneno em maior concentração (Falconi, 2003). Em adição, foi estudado a bioconversão do d-limoneno por *Penicillium citrinum* (Tavares *et al.*,1998), visando a redução de matéria orgânica (DQO) e a produção de uma ribonuclease, a RNase P1, enzima explorada comercialmente no Japão para obtenção de nucleotídeos de sabor (5 – GMP e 5 – IMP) que são adicionadas a condimentos e alimentos pré-preparados. Também foi reportado por Ponezi, *et al.*, 2005, a utilização da *Pseudomona struzieri* e um microrganismo não identificado na análise da biodegradação do d- limoneno.

Num estudo realizado por Falconi (2003) foi observado que *Pseudomonas sp*, *Enteorbacter sp* e o fungo *Fusarium sp* foram capazes de degradar altas concentrações de d-limoneno, porém foi reportada a necessidade de estudos para avaliar a capacidade de convívio e competição destes microrganismos quando presentes no lodo ativado para o tratamento do efluente industrial cítrico. Estudos realizados em reatores com ar lift , em escala piloto (Navarro, 2008), evidenciou grande remoção de matéria orgânica, DBO, utilizando lodo ativado para tratar efluente cítrico, porém não foram identificados os microrganismos.

2.5.2.3. Impactos inibitórios de sistemas de tratamentos de efluentes com o d-limoneno

A composição do efluente industrial a ser tratado pode acarretar impactos, segundo Sposito (2006), no sistema de coleta e transporte, nas unidades de tratamento e na disposição final em corpos d'águas e reuso, como por exemplo:

- a) Danos à saúde dos operadores do sistema de coleta e tratamento;
- b) Incrustações e corrosão às tubulações e equipamentos do sistema de coleta e tratamento de esgoto;
- c) Impactos atmosféricos e explosões, quando possuir grande capacidade de volatilização;
- d) Inibição do processo aeróbio e anaeróbio, na ETE (sistema de lodo ativado convencional) levando a queda de eficiência operacional e conseqüentemente geração de compostos tóxicos liberados no ecossistema, atingindo o corpo receptor, produzindo efeitos adversos à vida aquática e à saúde pública;
- e) Inviabilidade da produção de água de reuso e disposição do lodo gerado em agricultura, indústrias e aterros em virtude dos efeitos na qualidade dos produtos gerados;

Embora o d-limoneno tenha baixa toxicidade para mamíferos, o efluente cítrico, contendo d-limoneno em sua composição, pode apresentar problemas de saúde ocupacional em plantas de tratamento. Em Boston, nos Estados Unidos, trabalhadores apresentaram sintomas de dor de cabeça e irritação ao sistema respiratório, o que foi necessário determinar concentrações limites de descarte nas linhas de tratamento (Uribe e Pena 1990). O d-limoneno é irritante para olhos e pele e pode causar vômitos quando ingerido (NBR 14725-4:2009). Os impactos atmosféricos estão inter-relacionados com a volatilidade do d-limoneno, devido sua constituição química que é estável na água apresentando também considerável volatilidade. De acordo com Grosjean et. al, 1993, reações atmosféricas do d-limoneno juntamente com o myrceno e beta felandreno, e em maior proporção o alfa pinene, beta pinene e carene, reagem com radicais livres presentes na atmosfera como nitrato, cloreto e amônio em presença de luz solar.

Nos processos biológicos, tanto aeróbios quanto anaeróbios, o grau de inibição apresenta variabilidade de acordo com a aclimatização dos microrganismos com as substâncias presentes no efluente (Machado, 2009). Em adição, segundo Melchior e

Pelegri, 2005, determinadas substâncias químicas podem funcionar como agente bacteriostático e bactericida ou também pode agir como nutriente.

O d-limoneno apresenta propriedade antibactericida (Pattnaik *et al.*, 1997, Bakkali *et al.*,2007), além disso, alguns autores relatam que apresenta efeito inibidor nos microrganismos devido a diminuição do processo de fosforilação oxidativa nas células (Chatterjee e Bhattacharyya, 2001), como por exemplo a medição de toxicidade estabelecida a microrganismos log P utilizada a solventes orgânicos imiscíveis em água. As toxicidades mais fortes foram observadas em valores de log P entre 1 e 5, compostos como o limoneno (com log P = 4,83) aumentam a fluidez das membranas dos fungos filamentosos, o que leva a permeabilidade não específica, perda de integridade celular, decréscimo de matéria seca e inativação da energia metabólica devido à dissipação da força próton motiva (gradiente eletroquímico de H⁺ através da membrana). A alta fluidez da membrana pode prevenir a manutenção dos complexos entre enzima e membrana como, por exemplo, o complexo formado entre citocromo P450 monoxigenase e citocromo P-450 redutase dependente de NADPH, que está envolvido nas transformações oxidativas de terpenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteróides e outros compostos lipofílicos, promovidas por fungos (Onken e Berger, 1999 e Marostica e Pastore, 2008).

Foi reportado que sistemas biológicos anaeróbios a concentração de 70 mg/L de d-limoneno presente no efluente provoca a inibição da atividade metagônênica das bactérias devido a ação biocida da substância. O óleo é absorvido na biomassa granular causando a intensa intoxicação e desgranulação que pode ser praticamente irreversível na reativação do lodo.Em lagoas aeradas verifica-se que o limite para o tratamento é de 0,005% de limoneno. Em sistemas de lodo ativado convencional, tipicamente é removido 90% de limoneno convertidos em outros componentes, porém com taxas de aplicação de 2-10 mg/L e 0,5 – 2,0 mg/L (Alvarez, 1999), o que demonstra a necessidade de controle refinado.

Sistemas biológicos com tecnologias mistas têm sido aplicados em tratamento de águas residuárias de indústrias cítricas. Estes sistemas, como por exemplo, MBR, bioreator de membranas tem aplicação em sistemas onde é exigida alta qualidade do efluente final para disposição em corpos d'água com exigência legislativa mais rigorosa ou também para o reuso. Estudos demonstram que o controle da concentração do d-limoneno com a massa biológica é similar ao sistema de lodos ativados convencionais, porém também é verificado a necessidade de grande controle de incrustações na superfície da membrana, devido a

característica oleosa, causando o impedimento da filtração do efluente, com conseqüente aumento de pressão e gasto com energia elétrica (Braddock, 2006).

Os impactos da presença do limoneno disposto em corpos d'águas são relacionados à elevada toxicidade para peixes e *Daphnia* (Filipsson, F., A., Bard, J., e Karlason, S., 1998), influenciando a sanidade da fauna e da flora presente na costa e rios. A liberação de d-limoneno no efluente final poderá acarretar influências na autodepuração do Rio, como foi constatado no Rio São Lourenço na região do Matão que, durante as safras, incrementavam as taxas de consumo de oxigênio dissolvido, aumentando o problema gerado com mortandade de peixes e a extensão da degradação da qualidade deste corpo receptor (Guimarães, 1998).

Além dos limites legislativos para disposição em corpos d'água e aterros sanitários, muitas plantas de tratamento de esgotos têm aplicado políticas e diretrizes de sustentabilidade ambiental, em que o esgoto tratado tem sido reutilizado como águas para irrigação de jardinagem, água para combate a incêndio, para utilização na construção civil e principalmente para uso industrial como resfriamento de unidades operacionais. (Hespanhol, 2008). Outra aplicação com foco em redução de resíduo ambiental é o reaproveitamento do lodo gerado nas plantas, em que existem estudos para utilização em agricultura como adubo, geração de energia elétrica devido ao poder calorífico, fabricação de blocos (Tsutiya, 2000). Uma vez o d-limoneno influenciando no baixo rendimento do tratamento seus produtos poderá sofrer interferência não atendendo os limites especificados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

O d-limoneno (99%) utilizado no presente trabalho foi doado pela empresa Dibierge. Os sais foram adquiridos da F. Maia e Synth do Brasil, e os meios de culturas da Merck do Brasil. Água ultrapura foi obtida com o equipamento Milli-Q System (Millipore, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2. Microrganismos utilizados

A obtenção das linhagens microbianas foi realizada a partir de uma amostra de lodo biológico do tanque de aeração da estação de tratamento de esgotos ABC. Para garantir maior número de organismos e diversidade, foi coletada a amostra na data em que a estação apresentou boas condições operacionais de eficiência de remoção de DQO no efluente final (33 mg/L), análise de contagem de microrganismos do lodo (32.000 NMP/mL) e concentração de sólidos suspensos voláteis (2300 mg/L).

3.1.3. Meios de cultura e soluções utilizadas

3.1.3.1. Reagentes utilizados como fonte de carbono complementar

Meio nutriente Agar da Merck foi utilizado para incubação em placas e tubos inclinados. Extrato de levedura foi utilizado como complemento nos meios de cultivos. Glicose 5 g/L de glicose e tripsona 5 g/L foram utilizadas como meio de cultura para inoculação dos microrganismos para medição da curva de crescimento.

3.1.3.2. Composição do meio mínimo de sais para bactérias

Solução contendo 0,5 g de fosfato de amônio, 0,8 g de fosfato de potássio, 0,3 g de sulfato de magnésio, 0,004 g de sulfato de zinco, 0,005 g de sulfato de manganês, 0,1 g de cloreto de cálcio, 0,002 g de cloreto de cobalto e 0,001 g de sulfato de ferro hexahidratado em 1 litro de água. O pH foi ajustado em 7,0 com solução de KOH 0,1 mol/L.

3.1.3.3. Meio de cultivo

Para o crescimento do inóculo durante a aclimação com o d-limoneno na etapa de isolamento foram empregados o meio mínimo de sais e extrato de levedura a 1% (p/v). Na etapa de seleção dos microrganismos resistentes ao d-limoneno foi utilizado apenas o meio mínimo de sais. Na etapa de identificação dos microrganismos foram empregados o meio salino e glicose a 0,5% (p/v) e tripton a 0,5% (p/v).

3.1.3.4. Coloração de Gram

Os reagentes utilizados na coloração de Gram foram solução de cristal violeta (solução obtida da combinação da solução A- 2,0 g de violeta cristal em 20 mL de álcool etílico e solução B - 0,8 g oxalato de amônio em 1000 mL de água ultrapurificada), solução de lugol (2,5 g de iodeto de potássio em 300 mL de água), solução de álcool e solução de safranina (5 g de safranina em 100 mL de água).

3.1.3.5. Reagentes utilizados na determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

Os reagentes utilizados na determinação de DQO foram HgSO₄ (sulfato de mercúrio); H₂SO₄ (ácido sulfúrico concentrado 98%) com AgSO₄ (sulfato de prata); K₂Cr₂O₇ (solução de dicromato de potássio 0,04167 mol/L); solução de sulfato ferroso amoniacal e indicador ferroína.

3.1.3.6. Reagentes utilizados na extração do DNA

Solução tampão TE pH 8,0; lisozima 10 mg/mL; 10% SDS; proteinase K a 10 mg/mL; NaCl 5 mol/L; CTBA/NaCl (0,8 g/L de CTBA e 0,4 g/L de NaCl); solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); isopropanol e etanol a 70%.

3.1.3.7. Reagentes utilizados na amplificação da região 16S rDNA

O gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os iniciadores 27f (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', Lane *et al.*, 1991) e 1401r (5'- CGG TGT GTA CAA GAC CC- 3', Heuer *et al.*, 1997).

Para as reações em cadeia da polimerase - PCR foi empregado o kit GoTaq® Green Máster Mix, 2 uL de iniciador 27 f (10 umol/L), 2 uL iniciador 1410r (10 umol/L), completando com água livre de nuclease para um volume final de 50 uL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha).

A restrição dos fragmentos amplificados por PCR foi realizada com os produtos de amplificação das reações de PCR e digeridos com as enzimas de restrição Sma I (CCC/GGG) e Apa I (CGGGCC/C) de acordo com a indicação do fabricantes (Introgen, Life Technologies, Brasil).

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Ensaio de coloração de Gram

O protocolo utilizado para coloração de Gram (Christian Gram, 1884) baseou no depósito e esfregação da amostra (colônia do microrganismo) sobre uma lâmina de vidro contendo uma gota de água destilada.

Posteriormente, com a amostra preparada, foi realizada a coloração, inicialmente adicionando a solução de cristal violeta (solução obtida da combinação da solução A- 2,0 g de violeta cristal em 20 mL de álcool etílico e solução B - 0,8 g oxalato de amônio em 1000 mL de água ultrapurificada) e aguardando o tempo de contato de 1 min, lavando-se em seguida a lâmina em água corrente. Posteriormente, adicionou a solução de lugol (2,5 g de iodeto de potássio em 300 mL de água), aguardando novamente um 1 min de contato para se formar o complexo de violeta cristal, lavando-se com água corrente e com álcool (agente decolorante – solução de álcool etílico 95% com acetona na proporção 4:1) e aguardando mais 1 min. Finalizando, foi adicionada a solução de safranina (5 g de safranina em 100 mL de água) aguardando o contato de 30 s e lavando-se com água corrente e secando-se com papel de filtro. Em cada lâmina de amostra, foi adicionado o óleo de imersão e a observação se fez em um microscópio equipado com retículo de Whipple e contraste de

fase, com aumento de 1000 vezes. As células Gram positivas apresentaram coloração azul ou violeta, devido a presença de membrana espessa, homogênea, geralmente não estratificada, e predominantemente constituída de peptidoglicano, o que permite que o precipitado insolúvel formado pela ação da solução de iodo, permaneça no interior da célula. As células Gram negativas apresentaram coloração vermelha, devido a apresentar uma parede estratificada constituída por uma membrana externa e uma camada mais interna, que contém peptidoglicano, e que é mais fina que as das Gram positivas, deste modo, o precipitado insolúvel, que se forma pela ação da solução de iodo, é removido e a membrana externa é parcialmente ou totalmente dissolvida pelo agente descolorante, o que permite a ação do corante safranina. A morfologia e o estudo da pureza foram realizados para finalizar a repicagem das bactérias e obter as culturas puras.

3.2.2. Ensaio de demanda química de oxigênio (DQO)

O protocolo utilizado para a determinação da demanda química de oxigênio, indiretamente a concentração de d-limoneno, foi o método 5220 B, Método do refluxo aberto do “Standard Methods 21ª Edição”.

Para esta análise, 2 mL das amostras centrifugadas (20.000 g por 15 minutos a 4°C), obtidas do cultivo com microrganismos, foi diluída 100 vezes utilizando água deionizada.

Uma alíquota de 20 ml da amostra foi transferida para um balão de refluxo de 250 mL. Em seguida foram adicionados 1 g de sulfato de mercúrio, 5 mL de ácido sulfúrico e 25 mL de dicromato de potássio 0,04167 mol/L. Posteriormente, as amostras foram colocadas no condensador, com resfriamento com água, e adicionados 70 mL de ácido sulfúrico e pérolas de vidro para manter a mistura durante o aquecimento. Foi mantido o refluxo durante 2 h numa temperatura de 100° C. Após este tempo aguardou-se o resfriamento e adicionou-se pequena quantidade de água destilada no condensador para desconectá-lo dos frascos. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, foi realizada a titulação do dicromato em excesso com a solução de sulfato ferroso amoniacal 0,25 mol/L, utilizando de 0,10 a 0,15 mL (2 a 3 gotas) do indicador ferroína. O ponto final da titulação era indicado pela viragem da coloração de cor verde azulado para vermelho tijolo com persistência de 1 min ou mais. As determinações foram realizadas em duplicatas e também com branco (controle abiótico, conforme descrito no item 3,3.5) e padrão em paralelo

(amostra preparada paralelamente nas mesmas condições da amostra sem a adição dos microrganismos). O cálculo de DQO foi determinado conforme a equação 1 e a remoção de DQO foi determinada conforme a equação 2.

$$\text{DQO (mgO}_2\text{/L)} = \frac{(A-B) * M * 8000}{\text{mL amostra}} \quad (\text{equação 1})$$

na qual:

A= volume (mL) do sulfato ferroso amoniacal utilizado no branco

B = volume (mL) do sulfato ferroso amoniacal utilizado na amostra

M = molaridade do sulfato ferroso amoniacal

8000= miliequivalente da massa do oxigênio * 1000

$$\text{Remoção de DQO (\%)} = \frac{\text{DQO branco} - \text{DQO amostra}}{\text{DQO branco}} * 100 \quad (\text{equação 2})$$

3.2.3. Ensaio de turbidez

Foi realizado o ensaio de turbidez após o cultivo dos microrganismos, descrito no item 3.3.3.1 e 3.3.3.2, para avaliar o crescimento dos mesmos. O procedimento utilizado para determinar a turbidez foi o método nefelométrico 2130 B (“Standard Methods 21^a Edição”). Uma alíquota de 10 mL da amostra, na temperatura ambiente foi transferida e homogeneizada no tubo inclinando vertendo levemente com um giro de aproximadamente 180°. O tubo foi introduzido no orifício do turbidímetro na posição determinada, fechada a tampa do turbidímetro e feita à medida. Antes da medida, o turbidímetro foi calibrado com os padrões de 20 NTU (Unidade de Turbidez Nefelométrica). (O padrão foi preparado com a diluição de 0,5 mL de formazina 4000 NTU num balão de 100 ml completado com água destilada), padrão 200 NTU (diluição de 5 mL de formazina 4000 NTU num balão de 100 ml completado com água destilada), padrão 1000 NTU (diluição de 25 mL de formazina 4000 NTU num balão de 100 ml completado com água destilada), padrões de 4000 e 7500 NTU.

3.2.4. Determinação do pH

Após incubação a cada 7 dias, durante as 3 etapas de enriquecimento e crescimento com os microrganismos selecionados, descritas no item 3.3.1 e 3.3.3 respectivamente, determinou-se o pH em meio líquido. Para a determinação do pH empregaram-se tiras plásticas indicadoras de pH de 0 – 14 (Merck).

3.3. Métodos experimentais

3.3.1. Isolamento de microrganismos do lodo biológico da estação de tratamento de esgotos na presença de d-limoneno

Amostra de lodo ativado (10 mL) do tanque de aeração de uma estação de tratamento de esgotos foi inoculada em 50 mL de meio mínimo de sais contendo 1% de d-limoneno e 1% de extrato de levedura. O pH foi ajustado em 7 com solução de KOH 0,1 mol/L. O processo foi realizado em triplicatas e as amostras foram incubadas sob agitação, a 150 rpm na temperatura de 30°C por 21 dias, sendo que a cada 7 dias foram realizadas renovações, incubando 5 mL da cultura em 50 mL de meio mínimo de sais contendo 1 mL de d-limoneno, conforme Figura 3.1. Paralelamente, réplicas das amostras foram incubadas sem agitação, nas mesmas condições de temperatura e tempo. Todos os materiais e reagentes foram previamente autoclavados antes do inoculo.

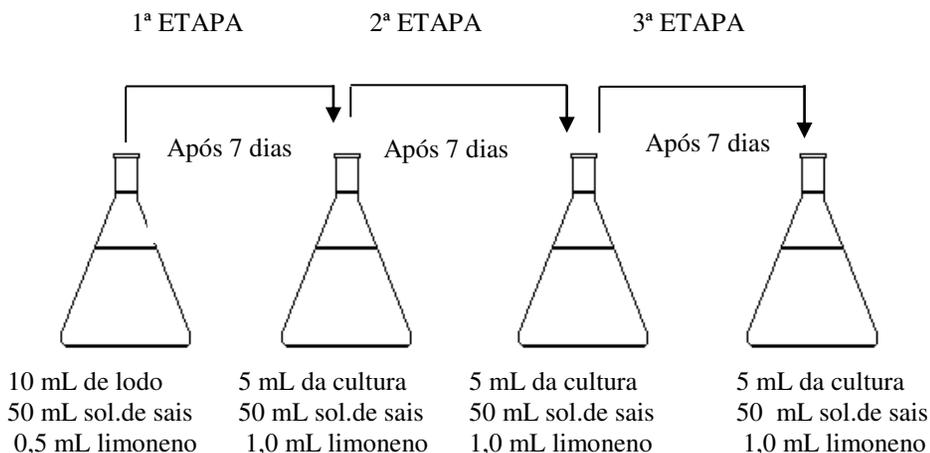


Figura 3.1. Esquema de renovação do meio e enriquecimento com d-limoneno durante os 21 dias de incubação em condições agitadas (150 rpm) e estática à temperatura de 30° C.

3.3.2. Seleção de microrganismos resistentes ao d-limoneno

Após o crescimento no meio de enriquecimento, descrito no item 3.2.1, foi realizado o protocolo de isolamento de microrganismos, segundo Ferrarezzo (1998). As amostras (0,1 mL) foram coletadas no final de cada ciclo de 7 dias e foi realizado a técnica de esgotamento em superfície em placas de Petri contendo meio NA (agar nutriente). As placas foram incubadas na temperatura de 30° C durante 5 dias. Após crescimento, uma alçada das colônias isoladas foi colocada em tubo de ensaio com 5 mL de água estéril, posteriormente os tubos foram agitados vigorosamente e uma alçada da suspensão de microrganismos de cada tubo foram inoculadas em placas com o meio NA. A metodologia está ilustrada na Figura 3.2.

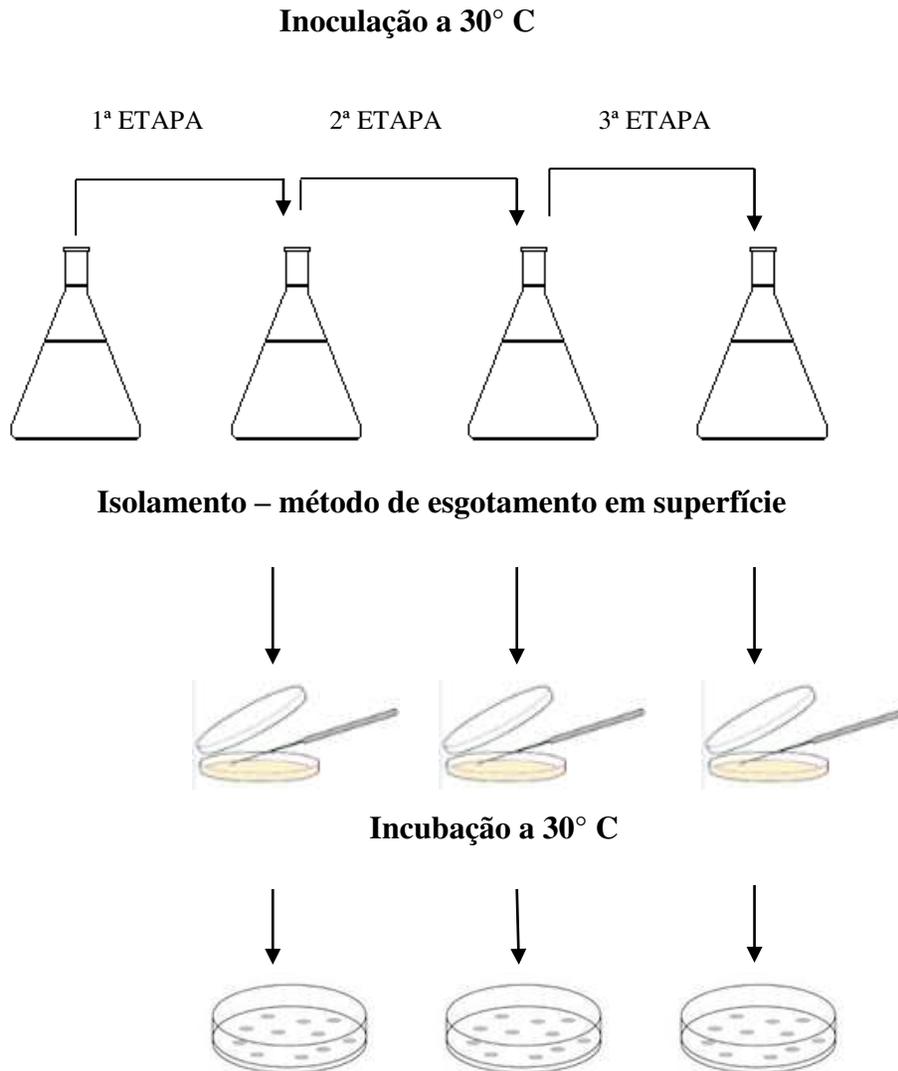


Figura 3.2. Metodologia de isolamento dos microrganismos a partir do lodo ativado incubado com d-limoneno.

Posteriormente foram selecionadas colônias de acordo com suas características morfológicas, onde os semelhantes presentes na mesma placa foram desprezados. As colônias foram analisadas através do estudo da coloração de Gram (conforme item 3.2.1) para o estudo de pureza e morfologia visando o posterior reisolamento. Este procedimento foi repetido até a obtenção das culturas puras.

As culturas puras foram posteriormente inoculadas em tubos inclinados contendo meio sólido NA e incubadas na temperatura de 30°C. As bactérias isoladas foram repicadas em tubos inclinados contendo meio NA e mantidas sob-refrigeração a 4°C.

3.3.3. Ensaios de biodegradação do d-limoneno com microrganismos isolados

Foram preparados 3 meios de cultivo diferentes variando as concentração de d-limoneno (1%, 3% e 5%). Em cada meio de cultura (50 mL), foi inoculado 2 alçadas do microrganismo isolado e selecionado. O cultivo foi mantido na temperatura de 30°C por 7 dias, sendo que para os microrganismos selecionados em condições agitadas, foram incubados sob rotação de 150 rpm e para os microrganismos selecionados em condições estáticas, foram incubados sem agitação. Após o tempo de cultivo foram feitos os ensaios de turbidez (conforme item 3.2.3), DQO (conforme item 3.2.2) e pH para avaliação do crescimento e redução de DQO.

3.3.4. Formulação de consórcios com os microrganismos isolados para biodegradação do d-limoneno.

Foram preparados 3 tipos de consórcios dos microrganismos selecionados, inoculando 2 alçadas de cada bactéria em tudo de ensaio contendo 10 mL de solução mínima de sais:

- 1) consórcio dos microrganismos cultivados e isolados em condição agitada;
- 2) consórcio dos microrganismos cultivados e isolados em condição estática;
- 3) consórcio de todos os microrganismos selecionados.

Cada consórcio foi inoculado em 2 diferentes meios de cultura (contendo variações de d-limoneno de 3% e 5%). A inoculação foi realizada com a adição de 1 mL da suspensão de microrganismos em 50 mL do meio de cultura com pH ajustado para 7 com KOH 0,1

mol/L. Os consórcios foram mantidos na temperatura de 30°C durante 7 dias, sendo que os consórcios (1) e (3) foram mantidos sob agitação de 150 rpm e o consórcio (2) sob condição estática. Após o tempo de cultivo foram feitos os ensaios de turbidez, DQO e pH para avaliação do crescimento e redução de DQO. A remoção de DQO foi determinada para todas as amostras conforme a equação 2, conforme apresentado no item 3.3.3.1.

3.3.5. Controles Abióticos

Foram utilizados erlenmeyers contendo apenas os substratos (meio mínimo de sais e o d-limoneno nas concentrações de 1%, 3% e 5%) submetidos às mesmas condições de incubação (estática e agitada a 250 rpm no período de 5 dias à 30 °C), ou seja, não foram inoculados com os microrganismos. Desta forma, eliminou-se a interferência das características dos microrganismos. Este controle foi realizado em duplicata e foi caracterizado como branco, sendo realizadas as análises de DQO e turbidez como referência.

3.3.6. Identificação dos microrganismos

3.3.6.1. Determinação da curva de crescimento dos microrganismos

Para garantir a extração de DNA em quantidades suficientes foi determinado à curva de crescimento dos microrganismos isolados.

Foi feito o pré-inóculo para cada microrganismo em estudo adicionando-se uma colônia em 5 mL do meio de cultura. O meio de cultura foi preparado diluindo em 1 L de água ultrapurificada os reagentes: 5 g de triptona, 5 g de glicose, 0,5 g de fosfato de amônia, 0,8 g de fosfato de potássio, 0,3g de sulfato de magnésio, 0,004 g de sulfato de zinco, 0,005g de sulfato de manganês, 0,1 g de cloreto de cálcio, 0,002 g de cloreto de cobalto, 0,001 g de sulfato de ferro hexahidratado e 10 g de extrato de levedura. As amostras inoculadas foram mantidas em estufa com temperatura controlada de 30°C.

Após o tempo de 24 horas, foi diluído este pré-inóculo em 100 mL de meio de cultura e iniciada as medições de absorvância no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm a cada 12 horas até atingir a fase estacionária (após 3 dias). As amostras foram diluídas 20 vezes para atender o limite de leitura do equipamento. Para evitar

contaminação os materiais e reagentes foram autoclavados e as amostras foram manipuladas utilizando o fluxo laminar.

3.3.6.2 Extração do DNA genômico dos microrganismos isolados

As identificações das bactérias foram realizadas no laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia/Unicamp. O protocolo foi iniciado pelo inóculo conforme item do ensaio 3.3.4 da determinação da curva de crescimento. Posteriormente, após 24 horas de inoculação, foi retirada uma alíquota de 2 mL e centrifugada a 12000 g por 2 min. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em 400 uL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM) pH 8,0 para quebra da parede celular e adicionado 50 uL de lisozima 10 mg/mL e a suspensão mantida “overnight” a 37° C.

Após o crescimento, foi acrescentado 70 uL de 10% SDS e 5 uL de proteinase K a 10 mg/mL. A suspensão foi homogeneizada (vortex) e incubada a 65°C durante 10 min. Em seguida foi adicionado 100 uL de NaCl 5 mol/L e 100 uL de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTBA/NaCl (0,8 g/L de CTBA e 0,4 g/L de NaCl). Esta suspensão foi agitada e incubada novamente a 65° C por mais 10 min. Em seguida, foi adicionado 750 uL de uma solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e a mistura foi agitada. Logo após, ela foi centrifugada a 5°C (12000 g por 10 min) e o sobrenadante (cerca de 600 uL) foi transferido para outro tubo. Para precipitação do DNA genômico foi adicionado 500 uL de isopropanol a -20° C e a mistura mantida a temperatura de -20°C durante 30 min. Em seguida a solução foi centrifugada a 4° C, 12000g durante 15 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado duas vezes com 500 uL de etanol a 70% a temperatura de -20° C (centrifugação a 4° C, 12000g por 5 min) O DNA precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em 50 uL de água esterilizada.

3.3.6.3. Ampliação da região 16S rDNA

A identificação dos microrganismos foi realizada utilizando o método PCR (reação em cadeia da polimerase), em que o gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os iniciadores 27f (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', Lane *et al.*, 1991) e 1401r (5'- CGG TGT GTA CAA GAC CC- 3', Heuer *et al.*, 1997). Para as reações de PCR foi empregado o kit GoTaq® Green Máster Mix, 2 uL de iniciador 27 f (10 umol/L), 2 uL

iniciador 1410r (10 umol/L), completando com água livre de nuclease para um volume final de 50 uL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). As condições de amplificação empregadas foram uma desnaturação inicial por 3 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56°C, 3 minutos a 72°C e uma extensão final 10 min a 72°C, conforme o indicado por Misbash e colaboradores (2004). A restrição dos fragmentos amplificados por PCR foi realizada com os produtos de amplificação das reações de PCR e digeridos com as enzimas de restrição Sma I (CCC/GGG) e Apa I (CGGGCC/C) de acordo com a indicação do fabricantes (Introgen, Life Technologies, Brasil). Alíquota de 2 uL de produto de PCR contendo 70 ng foram misturados a 2 uL de tampão 4 (10x), 1 uL da enzima de restrição (10 U/uL), completando com água livre de nuclease para um volume final de 20 uL, incubados a 30°C por 16 horas. Posteriormente, as enzimas foram inativadas a 70°C por 15 minutos.

3.3.7. Análise cromatográfica gasosa acoplada ao espectrômetro de massa para qualificação dos subprodutos bioconvertidos a partir do d-limoneno

A biodegradação do d-limoneno foi realizada para cada bactéria isolada e para o consórcio microbiano. Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de solução de sais e 2,5 mL de d-limoneno foram inoculados com 2 alçadas do microrganismo. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm na temperatura de 30° C durante 5 dias. Para o consórcio dos microrganismos, foram inoculadas 2 alçadas de cada bactéria num tubo de ensaio contendo 10 mL de sais; posteriormente foram recolhidas 1 mL da suspensão de microrganismos e inoculadas em 50 mL da solução de sais contendo 2,5 mL de d-limoneno. O consórcio foi cultivado durante 5 dias na temperatura de 30°C. Os mesmos experimentos foram realizados mantendo as culturas em condição estática foi realizado o mesmo procedimento.

Após o tempo de cultivo foram realizadas diluições de 0,2 mL da amostra para 100 mL de água ultrapurificada. Foram injetadas 200 uL de cada amostra no extrator com filtro de 1,0 µm e posteriormente volatilizada no cromatógrafo.

As análises foram realizadas no laboratório da Sabesp da Unidade MC em São Paulo, com extrator Aquatec 70 Vial Autosample, da Teledyne Tekman e cromatógrafo Thermo Scientific TRACE GC Ultra – DSQII, com detector de espectrometria, coluna TR-

5MS (25 m X 25 mm X 0,25 um) e gás de arraste hélio. A configuração do método foi fluxo constante de 1mL/min e temperatura programada de 70°C para 200°C a 3°C/min, tempo final de 5 minutos. A temperatura do injetor 250°C, razão 50:1 e espectrômetro de massa com a metodologia de temperatura da fonte de 200°C, ganho do detector 300000, taxa de scan 500, polaridade pos, modo do scan 50m/z, primeiro espectro de massa 50m/z e último espectro de massa 650 m/z.

3.3.8. Análise estatística

Para análise estatística dos dados coletados foi usado o software Minitab 15.0 para obter os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) e correlação entre as variáveis. Para a inferência sobre a relação entre as variáveis a serem mensuradas foi utilizado o teste ANOVA e para o teste das médias o Teste Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamentos dos microrganismos do lodo biológico da estação de tratamento de esgotos na presença de d-limoneno

Não houve crescimento de microrganismo na presença de d-limoneno como única fonte de carbono, pois as amostras não apresentaram alteração de turbidez em comparação com o branco (controle abiótico). Posteriormente, foi complementado ao meio salino 10 g/L de extrato de levedura e 10 mg/L (1%) de d-limoneno.

Nestas condições, após uma semana foi observado alteração significativa na turbidez (alta turbidez com suspensão branca) de todas as amostras inoculadas em comparação com o padrão. Após 14 dias, mantidas as características similares das amostras anteriores e após 21 dias, foi observado aumento significativo da turvação.

Foi dosada a concentração máxima indicada em literatura e posteriormente houve elevação gradativa de dosagem de d-limoneno, e como resultado todas as amostras apresentaram significativo crescimento, observado no aumento da turvação. Segundo literatura, dosagens de d-limoneno entre 2-10 mg/L em lodos ativados não causam inibição. (Alvarez, 1999 e Falconi, 2003)

4.2. Isolamento de microrganismos resistentes ao d-limoneno

Foram isoladas 56 microrganismos, predominantemente bactérias sendo bastonetes Gram positivas, das 3 etapas de enriquecimento com o d-limoneno. As bactérias que foram isoladas durante a 1ª etapa de enriquecimento do d-limoneno com 10 mg/L (1%), apresentaram diversidades de colônias grandes, médias e pequenas, com colorações vermelhas, rosa, marrom, bege, verde e branca. Foram selecionadas 15 colônias das

bactérias das placas de Petri que apresentaram maior crescimento visual e diferentes colorações e morfologias. Cada colônia de bactéria foram repicadas em tubo inclinados com meio de cultura ágar e realizada coloração de Gram para verificação da pureza da linhagem conforme item 3.2.2 e 3.2.3.

Na 2ª etapa do enriquecimento foram isoladas 8 linhagens, na condição de renovação do meio salino e dobrada a concentração de d-limoneno para 20 mg/L (2%), Foram identificadas colônias de bactérias marrons e bege, para as amostras das condições aeradas, e amostras de coloração verde, bege, rosa e vermelha para condições estáticas.

Finalizando, na 3ª etapa do enriquecimento, foram selecionadas 32 linhagens. Nesta etapa manteve a mesma concentração de d-limoneno da anterior na renovação do meio salino. Foram identificadas diferentes colônias, porém todas com tamanhos pequenos com colorações brancas, rosa, marrom e bege para as amostra em condições estáticas e somente colônias pequenas e brancas para as amostras incubadas em condições agitadas. Nas três etapas de enriquecimento foi verificado que o pH variou de 7,0 para 8,5, o que pode ser resultado da modificação do meio por produtos do metabolismo. Na Figura 4.1 está apresentado duas linhagens distintas isoladas durante a etapa de enriquecimento.

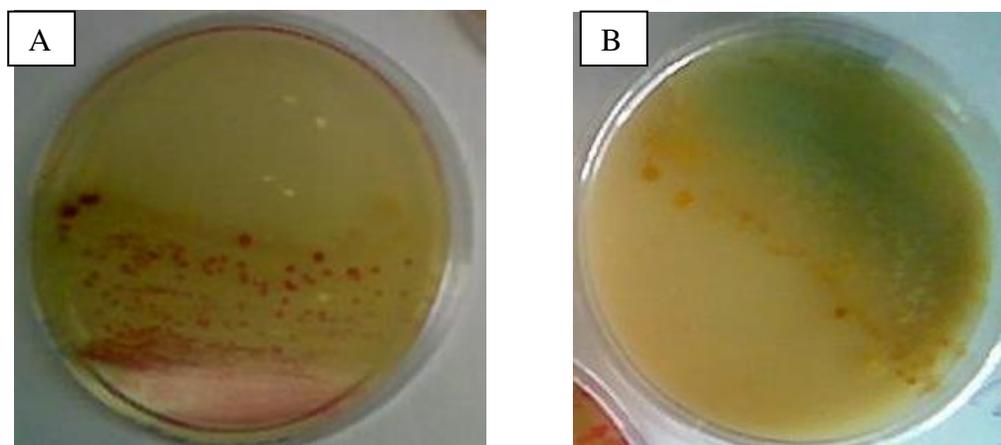


Figura 4.1. Exemplo de crescimento de diferentes linhagens a partir do ensaio de enriquecimento com d-limoneno. (A) representa crescimento das bactérias em meio agar de amostra inoculadas em condição estacionária e (B) representa crescimento das bactérias em meio agar em condição agitada.

4.2.1. Seleção dos microrganismos resistentes ao d-limoneno

Dentre todas as linhagens isoladas (56) foram selecionadas 10 linhagens que apresentaram maior crescimento em placa durante os 3 primeiros dias de incubação, para estudo de biodegradação do d-limoneno. Na Tabela 4.1 estão apresentadas as bactérias com suas respectivas nomenclatura designadas durante a pesquisa, características físicas e determinação da coloração de Gram.

Tabela 4.1. Características físicas e morfológicas das bactérias Gram positivas selecionadas resistentes ao d-limoneno.

| Nomenclatura | Estado de agitação | Etapa do enriquecimento | Características visuais das colônias de bactérias | Morfologia |
|--------------|--------------------|-------------------------|---|------------|
| 2BA verde | agitada | 1 ^a | colônias grandes e verdes | bastonetes |
| 3BA marrom | agitada | 1 ^a | colônias grandes e marrom | bastonetes |
| 1BP vermelha | estática | 2 ^a | colônias grandes, vermelhas | bastonetes |
| 3BP verde | estática | 2 ^a | colônias pequenas e verdes | bastonetes |
| 2BP vermelha | estática | 2 ^a | colônias pequenas vermelha | bastonetes |
| 1BA bege | agitada | 2 ^a | colônias grandes e beges | Cocos |
| 1BA 4 | agitada | 3 ^a | colônias pequenas e brancas | bastonetes |
| 3BA 1 | agitada | 3 ^a | colônias pequenas e brancas | bastonetes |
| 1BP 4 | estática | 3 ^a | colônias pequenas e bege | bastonetes |
| 1BP 9 | estática | 3 ^a | colônias pequenas e beges | bastonetes |

Em análise verifica-se que durante a seleção dos microrganismos, apenas bactérias Gram positivas foram resistentes ao d-limoneno a partir do lodo ativado da estação de tratamento. Porém, em literatura há relatos que bactérias Gram negativas apresentam mais resistência ao d-limoneno, como o exemplo da *Escherichia coli* (Falconi, 2003).

4.3. Ensaio de biodegradação do d-limoneno para microrganismos cultivados isoladamente

4.3.1. Ensaio de turbidez

Os microrganismos cultivados em condição agitada e em meios contendo 1%, 3% e 5% de d-limoneno, apresentaram diferenças no aumento de turbidez, que correlacionam crescimento bacteriano. O maior valor médio de turbidez foi do microrganismos 2BA verde, 1040 NTU, cultivado no meio mínimo de sais contendo 5% de d-limoneno, representando um aumento significativo ($P < 0,05$). As médias e os desvios padrões estão apresentados na Tabela 4.2. O meio contendo maior concentração de d-limoneno (5%), mostrou os maiores valores médios de turbidez quando comparado com o meio contendo 1% e 3% para todos os microrganismos testados, com exceção do microrganismo 3BA1, que apresentou maior valor médio de turbidez no meio contendo 3% de d-limoneno.

Tabela 4.2. Turbidez média (NTU) dos microrganismos cultivados em condição agitada à 30°C, após 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno.

| Microrganismos | Turbidez (NTU) | | |
|-------------------|--|-----------|------------|
| | Concentrações de d-limoneno no meio sais | | |
| | 1% | 3% | 5% |
| Branco | 10 ± 0,7 | 10 ± 0,4 | 10 ± 0,5 |
| 1 BA Bege | 12 ± 5,1 | 127 ± 2,8 | 544 ± 5,6 |
| 2BA verde | 33 ± 7,6 | 54 ± 5,0 | 1040 ± 7,8 |
| 3BA marrom | 104 ± 7,7 | 28 ± 3,5 | 347 ± 4,9 |
| 1BA4 | 59 ± 7,8 | 290 ± 7,0 | 644 ± 7,6 |
| 3BA1 | 48 ± 4,2 | 185 ± 6,3 | 124 ± 5,0 |

Quanto aos microrganismos cultivados na condição estática, também houve diferenças entre as médias de turbidez. O microrganismo que apresentou o maior valor médio de turbidez significativo foi o 2BP vermelha. De forma geral, todos os microrganismos, exceto 2BP vermelha, apresentaram aumento de turbidez significativo no meio contendo maior

concentração de d-limoneno, conforme pode ser observado valores médios e desvios padrões estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Turbidez média (NTU) dos microrganismos cultivados em condição estática à 30°C, após 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno.

| Microrganismos | Turbidez (NTU) | | |
|---------------------|---|-------------|------------|
| | Concentrações de d-limoneno no meio de sais | | |
| | 1% | 3% | 5% |
| 1BP vermelha | 88 ± 2,82 | 188 ± 2,82 | 455 ± 2,83 |
| 3BP verde | 95 ± 7,07 | 175 ± 3,54 | 935 ± 6,63 |
| 1BP4 | 79 ± 3,53 | 166 ± 2,82 | 221 ± 8,48 |
| 2BP vermelha | 155 ± 2,12 | 1022 ± 5,65 | 335 ± 3,54 |
| BP9 | 16 ± 2,12 | 493 ± 4,95 | 579 ± 2,12 |

Estudo realizado por Tavares *et al.*, 1998, evidenciou que o fungo *Penicillium citrinum*, quando cultivado em condição agitada e em meio de cultura utilizando “água amarela”, efluente industrial cítrico que apresentava em sua composição proteína, óleos essenciais, pectina, açúcares, ácidos orgânicos e sais, apresentou crescimento 50% inferior quando comparado com meio de cultura semi-sintético (meio composto por 5% de glicose, 0,5% de peptona e micronutrientes). Outros estudos que utilizaram d-limoneno para avaliar a taxa de crescimento dos microrganismos: *Candida albicans*, *Penicillium sp*, *Aspergillus sp.*, também mostraram que houve inibição quando comparado com o grupo controle (Omran *et al.*, 2011). De forma geral, neste trabalho o crescimento bacteriano dos microrganismos cultivados em condição agitada e em meio contendo 5% foram significativos comparados com o branco.

4.3.2. Ensaio de DQO

Os ensaios de DQO foram realizados nas amostras após cultivo no período de 5 dias, em diferentes meios de cultura (1%,3% e 5% de d-limoneno), em condição agitada e estática na temperatura de 30°C, com o intuito de avaliar a biodegradação do d-limoneno indiretamente. Todos os microrganismos apresentaram valores médios de remoção com diferenças significativas estatisticamente ($P < 0,05$).

Nos ensaios submetidos à condição agitada e no meio de cultivo que continha 5% de d-limoneno, os valores médios de remoção de DQO apresentaram valores muito próximos, exceto o microrganismo 3BA1, que apresentou o maior valor médio de remoção. Ressalta-se que todos os microrganismos mostraram menor remoção de DQO no ensaio contendo 1% de d-limoneno, quando comparado com os meios contendo 5% de d-limoneno, conforme Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Remoção de DQO média (%) dos microrganismos cultivados em condição agitada à 30°C, após 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno.

| Microrganismos | Remoção de DQO (%) | | |
|-------------------|---|-----------|-----------|
| | Concentrações de d-limoneno no meio de sais | | |
| | 1% | 3% | 5% |
| 1 BA Bege | 11 ± 2,82 | 35 ± 3,53 | 32 ± 0,71 |
| 2BA verde | 3 ± 0,71 | 41 ± 0,71 | 44 ± 2,12 |
| 3BA marrom | 3 ± 1,41 | 11 ± 2,83 | 36 ± 2,82 |
| 1BA4 | 0,0 | 0,0 | 38 ± 2,82 |
| 3BA1 | 24 ± 5,0 | 0,0 | 54 ± 0,71 |

Nos ensaios que foram inoculados os microrganismos isolados e cultivados em condição estática, apresentaram valores médios de remoção de DQO com diferenças significativas nos três meios de cultura, Tabela 4.5. O maior valor médio de remoção de DQO foi encontrado no cultivo com a bactéria BP9, que apresentou valor duas vezes superior as demais bactérias quando cultivadas em meio contendo 5% de d-limoneno.

Tabela 4.5. Remoção de DQO média (%) dos microrganismos cultivados em condição estática à 30°C, após 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno.

| Microrganismos | Remoção de DQO (%) | | |
|---------------------|---|-----------|-----------|
| | Concentrações de d-limoneno no meio de sais | | |
| | 1% | 3% | 5% |
| 1BP vermelha | 16 ± 4,95 | 0 | 54 ± 0,99 |
| 3BP verde | 0 | 0 | 36 ± 2,83 |
| 1BP4 | 0 | 10 ± 1,42 | 45 ± 1,56 |
| 2BP vermelha | 16 ± 0,71 | 0 | 39 ± 2,12 |
| BP9 | 50 ± 3,50 | 72 ± 1,42 | 89 ± 0,70 |

Conforme estudos encontrados em literatura, a remoção de DQO de efluentes cítricos podem apresentar boa eficiência quando controladas as concentrações de d-limoneno em sua composição (0,001% para sistemas aerados e 0,007% para sistemas anaeróbios). Estudo realizado por Falconi, 2001, evidenciou que efluente cítrico contendo 3% de d-limoneno foi capaz de apresentar redução 70% quando inoculada a bactéria *Pseudomonas sp* isoladamente. Em outro estudo, Tavares *et al*, 1998, o fungo *Penicillium citrinum* foi capaz de remover 55% de DQO de um efluente cítrico (contendo em média 0,001% de d-limoneno). De modo geral, observando os dados de remoção de DQO apresentados neste trabalho, verifica-se que todos os microrganismos foram capazes de utilizar o d-limoneno quando presentes em altas concentrações e como única fonte de carbono, destacando o microrganismo BP9, cultivado em condição estática. É válido ressaltar que os valores obtidos são significativos para inoculação futura destes microrganismos em processos biológicos para tratamento de efluentes cítricos, visto que a planta poderá receber altas cargas de d-limoneno esporádicas, sem comprometimento com a eficiência de remoção, considerando que estes microrganismos já estão aclimatados para efluentes com esta caracterização.

4.4. Formulação de consórcios com os microrganismos isolados para biodegradação do d-limoneno

Para a avaliação da biodegradação do d-limoneno utilizando os microrganismos em consórcios foram formulados os consórcios, como descrito no item 3.3.4, sendo: (1)

consórcio das bactérias cultivadas e isoladas em condição agitada, 1BA bege, 2BA verde, 3BA marrom, 1BA 4 e 3BA 1, (2) consórcio das bactérias cultivadas e isoladas em condição estática, 1 BP vermelha, 3BP verde, 1BP 4, 2 BP vermelha e BP9, e (3) consórcio de todas as bactérias selecionadas.

4.4.1. Ensaio de turbidez

A turbidez também foi determinada para avaliar o crescimento celular dos microrganismos cultivados em consórcios. Os consórcios (1) e (3) cultivados sob condição de agitação e em meios contendo 1%, 3% e 5% de d-limoneno, apresentaram diferenças no aumento de turbidez ($P < 0,05$), que correlacionam crescimento bacteriano. Conforme mostrado na Tabela 4.6, houve aumento de aproximadamente 31% do consórcio de microrganismos cultivados em meio contendo 3% de d-limoneno e 47% dos microrganismos cultivados em meio contendo 5% quando comparados com o branco. Desta forma, verifica-se que os microrganismos em consórcio também não apresentaram inibição ao d-limoneno em altas concentrações (5%) como os microrganismos cultivados isoladamente (descrito no item 4.3.1).

Tabela 4.6. Turbidez média (NTU) dos consórcios de microrganismos cultivados em condição sob agitação à 30°C, durante 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno

| Consórcios | Turbidez (NTU) | |
|--------------------|-----------------------------|-----------|
| | Concentrações de d-limoneno | |
| | 3% | 5% |
| Branco | 82,8 ± 0,9 | 83 ± 0,6 |
| Consórcio 1 | 108 ± 2,2 | 122 ± 1,2 |
| Consórcio 3 | 109 ± 1,4 | 116 ± 2,4 |

Da mesma forma, o consórcio 2, em que os microrganismos foram cultivados em condição estática, os valores de turbidez apresentaram aumento significativos. No meio contendo 3% de d-limoneno mostrou-se aumento de 14% e no meio contendo 5% mostrou aumento de 18% de aumento (Tabela 4.7).

Tabela 4.7. Turbidez média (NTU) do consórcios de microrganismos cultivados em condição estática à 30°C, durante 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno

| Consórcio | Turbidez (NTU) | |
|--------------------|-----------------------------|-----------|
| | Concentrações de d-limoneno | |
| | 3% | 5% |
| Branco | 82 ± 2,12 | 82 ± 1,42 |
| Consórcio 2 | 94 ± 0,9 | 97 ± 1,2 |

4.4.2. Ensaio de DQO

Através da determinação da DQO após a incubação dos consórcios 1 e 3 sob condição agitada e consorcio 2 sob condição estática à 30°C, durante 5 dias, nos meios de cultivos contendo as diferentes concentrações de d-limoneno, verificou-se que todas as amostras apresentaram remoções significativas de DQO ($P < 0,05$). O maior valor médio de remoção de DQO foi obtido nos ensaios com o consórcio 1, enquanto que a menor remoção foi com o consórcio 2. Quanto ao meio de cultivo contendo 3% de remoção, verificou-se que apenas o consórcio 2 apresentou remoção. Os valores médios de remoção de DQO dos consórcios estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Remoção média de DQO (%) dos consórcios de microrganismos cultivados em condição estática (consórcio 2) e sob agitação (consórcio 1 e 3) à 30°C, durante 5 dias de incubação em meio mínimo de sais contendo concentrações gradativas de d-limoneno.

| Consórcios | Remoção de DQO (%) | |
|--------------------|-----------------------------|-----------|
| | Concentrações de d-limoneno | |
| | 3% | 5% |
| Consórcio 1 | 0 | 77 ± 2,42 |
| Consórcio 2 | 39 ± 2,12 | 33 ± 1,20 |
| Consórcio 3 | 0 | 64 ± 3,53 |

De modo geral, nos ensaios com os microrganismos em consórcio, as bactérias crescidas em condição agitada e submetidas à concentração de d-limoneno de 5%,

apresentaram maior degradação (77%) que as bactérias cultivadas em condição estática (33%). Já o consórcio com todas as bactérias em condição agitada apresentou valor de 64% de remoção.

Em literatura é encontrado valor de remoção de DQO de 90% em plantas de tratamento de efluentes cítricos de processos aerados (Falconi, 2001), porém com dosagem de d-limoneno restritivas (mil vezes inferior), o que demonstra que os dados do trabalho são significativos quanto à aplicação do consórcio formulado, principalmente por não apresentarem inibições, pois alguns autores relatam que a presença do d-limoneno apresenta efeito inibidor nos microrganismos devido a diminuição do processo de fosforilação oxidativa nas células (Chatterjee e Bhattacharyya, 2001). Porém é válido ressaltar a importância do controle refinado de carga de alimentação, pois o limite legislativo brasileiro (CONAMA 357) exige remoção de DQO maior que 80%, valor superior ao encontrado nos ensaios.

4.5. Identificações dos microrganismos

Conforme descrito no item 3.3.4.1, para a garantia de crescimento dos microrganismos após 24 horas, para posterior extração do DNA, foi determinada a curva de crescimento dos microrganismos isolados e selecionados. Na Figura 4.2 está mostrado que todos os microrganismos apresentaram crescimento celular, sendo que a bactéria que apresentou maior crescimento foi a 1BA bege no tempo de 24 horas, seguida das bactérias 1BP4, 3BA marrom, 1BP9, 1BA4, 1BP vermelha, 3BA, 1BP verde, 2BA verde e 2BP vermelha. As bactérias 1BP4, 3BA marrom, 1BP9, 2BP vermelha e 1BP vermelha apresentaram maior taxa de crescimento no tempo de 21 horas; a bactéria 1BP verde, 3BA1 e 2BA verde no tempo de 16 horas e 1 BP rosa e a bactéria 1BP9 juntamente com 1BA bege as maiores taxas de crescimento no tempo de 24 horas.

As identificações dos microrganismos foram realizadas conforme item 3.3.4.2 extração do DNA genômico dos microrganismos isolados e do item 3.3.4.3, ampliação da região 16S rDNA, utilizando o método PCR. Como resultados todas as bactérias foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*.

O gênero *Bacillus* apresenta a característica de produzir esporos e são muito resistentes a muitas condições adversas. Seu metabolismo pode ser aeróbio e ou facultativo e podem ser encontrados em água, solo, material fecal e diversos alimentos. O *B. anthracis*

e *B. cereus* são bactérias patógenas proveniente de material fecal, que possivelmente poderia ter sido isoladas do lodo ativado da estação de tratamento de esgotos. Quanto ao *B. stearothermophilus*, também pode ser encontrado em solo e água, e tem grande possibilidade de ter sido isolado, pois, conforme apresentado por Minessota, 2010, este microrganismo utiliza a 4ª via metabólica, produzindo α - terpinol, a partir do d-limoneno como fonte de carbono.

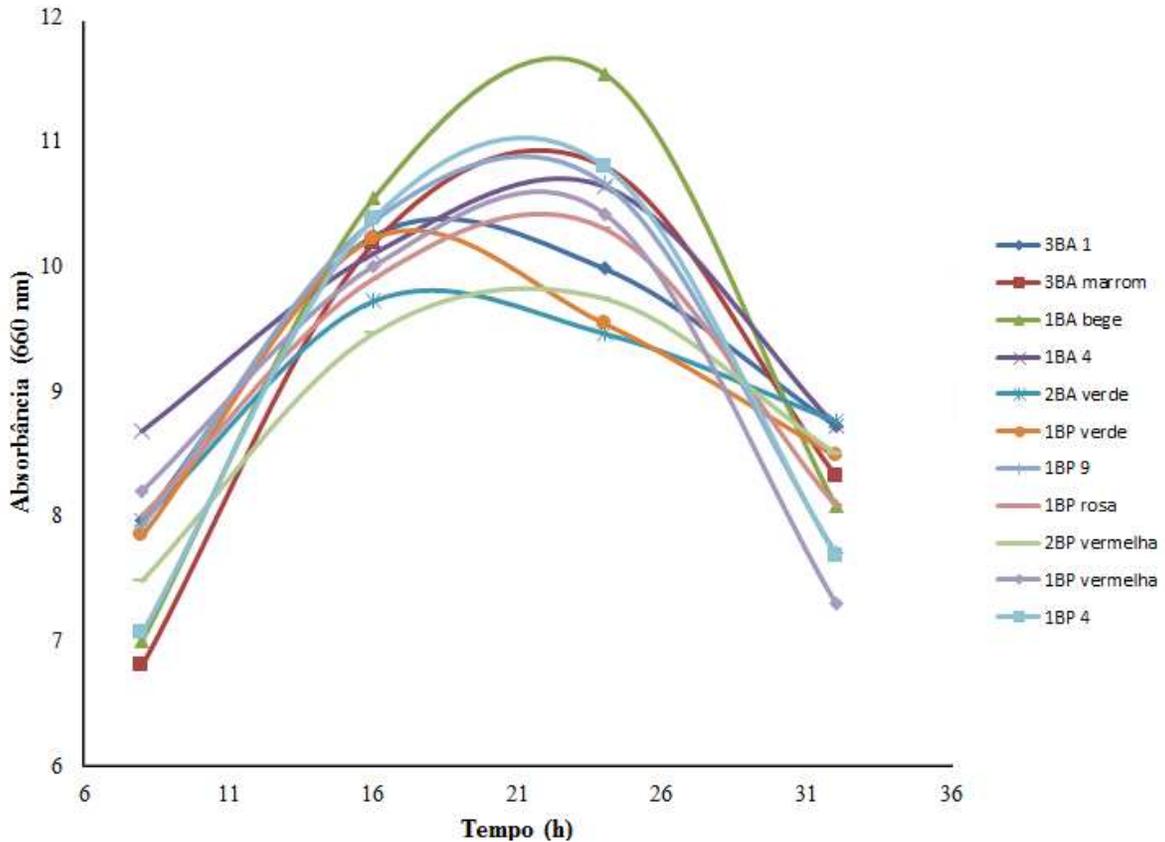


Figura 4.2. Curva de crescimento dos microrganismos isolados.

4.6. Avaliações dos produtos bioconvertidos pelos microrganismos cultivados isoladamente e em consórcios

As análises qualitativas das amostras para verificar a bioconversão do d-limoneno foram realizadas através da cromatografia gasosa com detecção de espectrometria de massa conforme descrito no item 3.3.6. Como foi realizado um branco (Figura 4.3), representando todas as condições das amostras desde a etapa de inoculação, foi possível comparar os cromatogramas qualitativamente, sendo que os picos foram identificados pelos espectrogramas.

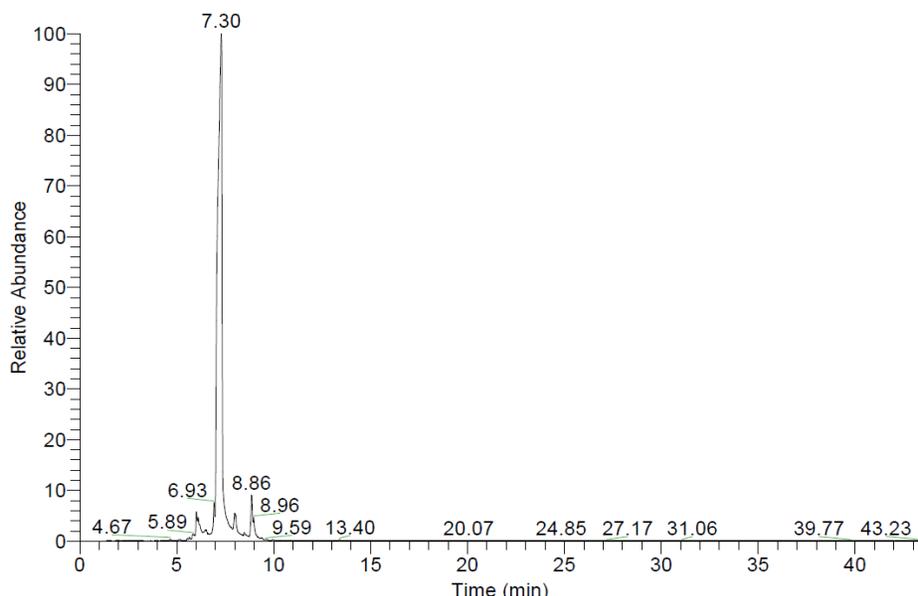


Figura 4.3. Cromatograma referente ao branco sem adição dos microrganismos. O pico apresentado no tempo 7,5 minutos foi qualificado como o d-limoneno.

Percebe-se que nos demais cromatogramas (Figuras 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7) há diferentes picos, conseqüente da bioconversão do d-limoneno.

Na Figura 4.4 que representa a amostra do consórcio (3) de todos os microrganismos cultivados em condição agitada, houve a conversão do d-limoneno em terpinol (pico 9.33 min), e também outros produtos como o álcool ciclodecanol (pico 13.34 min) e o expóximo undecano (pico 17.45 min).

Na Figura 4.5 é demonstrado o cromatograma referente à amostra incubada com o consórcio todos os microrganismos em condição estacionária. A amplitude do pico 7.20 min apresentou-se menor que no cromatograma do branco, (Figura 4.3), significando que uma maior concentração da substância (d-limoneno) foi consumida. Também observa-se que o cromatograma apresentou novos picos, 9,33min (2-ciclohexenone), 13,36min (decanal) e 15,21min (1, 2 metil-5 metiletinil), confirmando a bioconversão do d-limoneno.

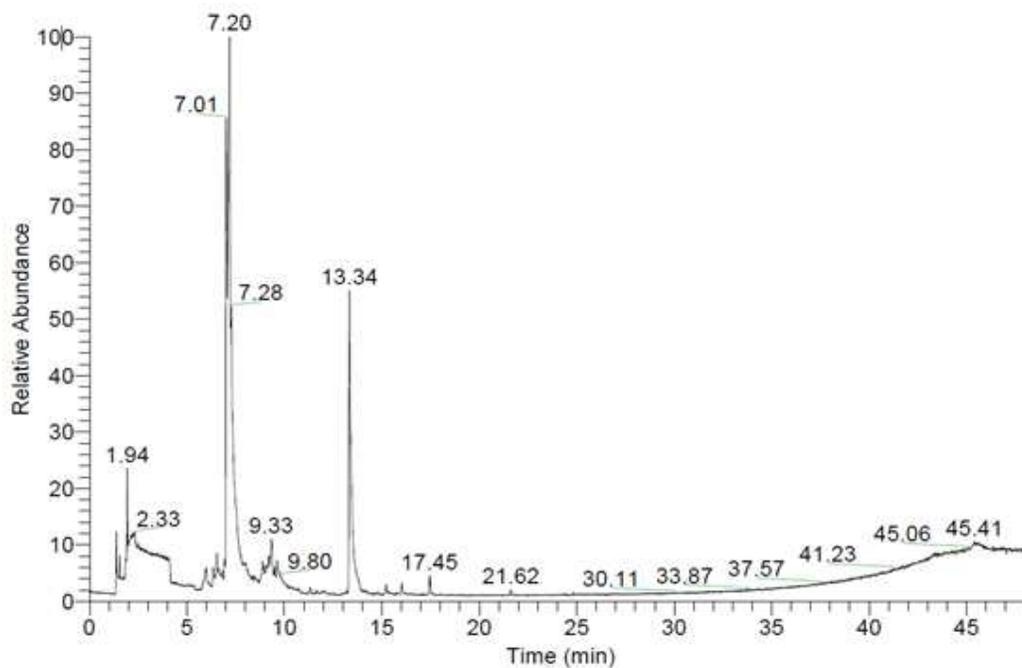


Figura 4.4. Cromatograma referente à amostra incubada com todas as bactérias em estado agitado. Identificação dos picos: 7.28 min, d-limoneno; 9.33 min, ciclodecanol ou 2,3 octanediol; 13.34 min, decanal e 17.45 min, epoxi-undecano.

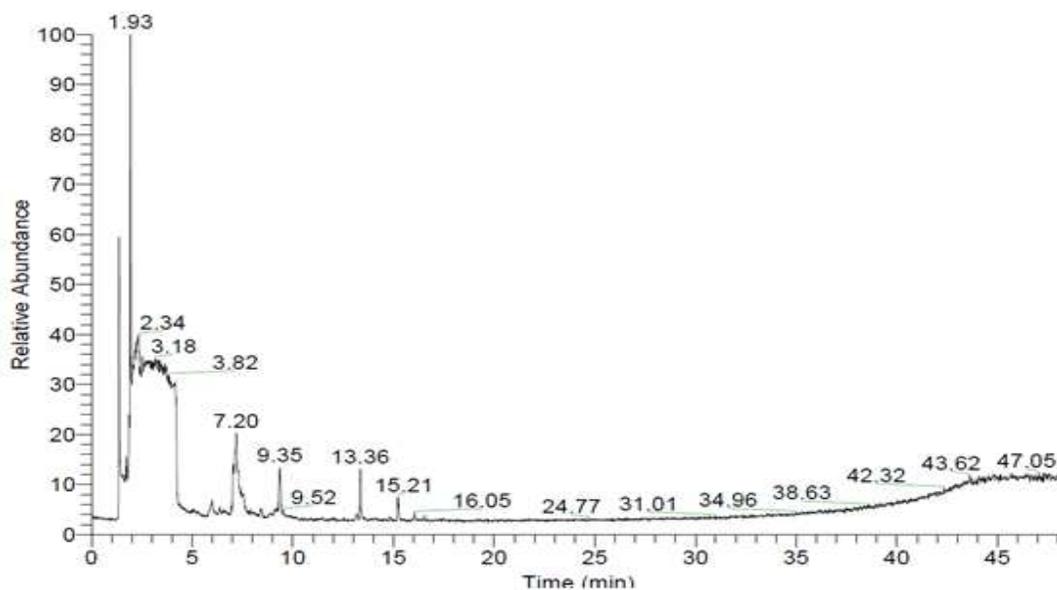


Figura 4.5. Cromatograma referente a amostra incubada com todas as bactérias em estado estático. Identificações dos picos: 7.20 min, d-limoneno; 9.35 min, ciclodecanol ou 2,3 Octanediol ; 13.36 min, decanal e 15.21 min, 2-ciclohexenone 1, 2 metil-5 metiletinil.

As amostras incubadas com as bactérias isoladamente BP 9 em condição estática (Figura 4.6) e 3BA1 marrom em condição agitada (Figura 4.7), também apresentaram a bioconversão do d-limoneno nos mesmos produtos obtidos através do consórcio (3). Ressalta-se, entretanto que a bactéria BP9 apresentou maior concentração de ciclodecanol (maior amplitude do pico 13.35 min na Figura 4.6).

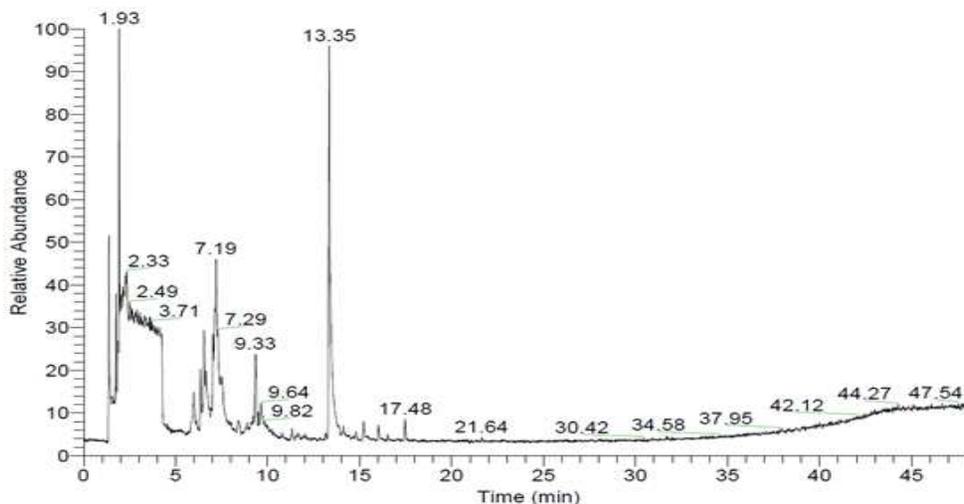


Figura 4.6. Cromatograma referente a amostra incubada com a bactéria 1BP9 em estado estático. Identificações dos picos: 7.20 min, d-limoneno; 9.35 min, ciclodecanol ou 2,3 Octanediol ; 13.36 min, decanal e 15.21 min, 2-ciclohexenone 1, 2 metil-5 metiletinil.

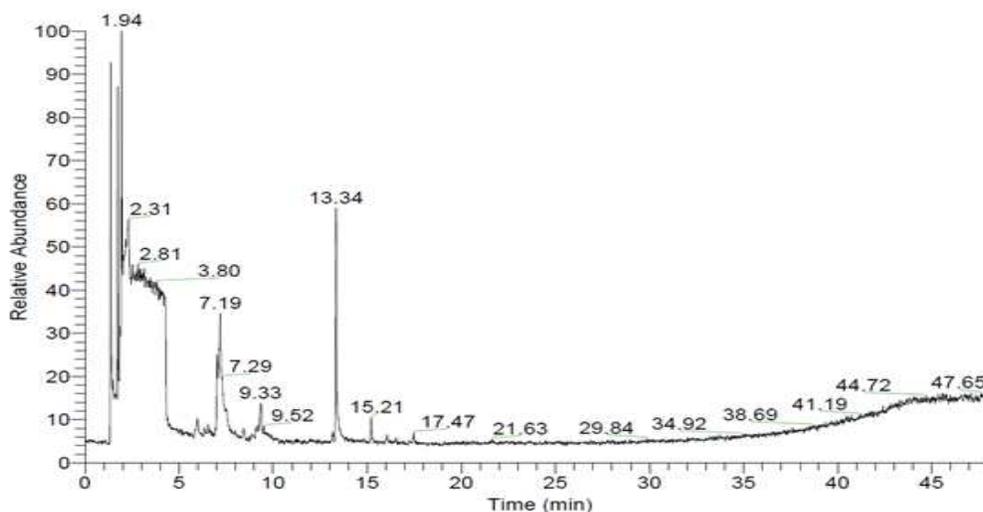


Figura 4.7. Cromatograma referente à amostra incubada com a bactéria 3BA1 marrom em estado agitado. Identificações dos picos: 7.19 min, d-limoneno; 9.33 min, ciclodecanol ou 2,3 octanediol; 13.34 min, decanal e 15.21 min, 2-ciclohexenone 1, 2 metil-5 metiletinil.

Os principais produtos obtidos durante a bioconversão do d-limoneno foram α -terpineol e alcoóis como ciclodecanol e octanediol, além do decanal e epoxi-undecano. Estes produtos apresentam menor toxicidade do que o d-limoneno, além de valor agregado de mercado.

O produto α -terpineol foi obtido através da ocorrência da 4ª via metabólica por *Bacillus*, pela conversão do anel da dupla ligação do d-limoneno para diol. Este resultado concorda com o mapeamento gráfico das vias metabólicas do d-limoneno publicado no banco de dados da Universidade Minnesota (2010), em que a 4ª via metabólica é realizada por *Bacillus stearothermophilus*. Em literatura, além dos microrganismos do gênero *Bacillus*, também foi reportada a bioconversão do d-limoneno em α -terpineol por *Penicillium digitatum* com rendimento de reação de 99%. (Tan *et al.*, 1998 e Adams, *et al.*, 2002).

Outra via metabólica que pode ser referenciada com os dados obtidos e o estudo realizado por Maróstica e Pastore, 2007, é a 2ª via, devido à obtenção de epóxido e álcoois através da epoxidação de dupla ligação do d-limoneno em unidades de isoprenil.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

- a) As bactérias isoladas e selecionadas a partir do lodo ativado de uma estação de tratamento de esgoto foram bactérias Gram positivas com morfologia de bastonetes, com exceção da 1BA bege identificada como cocos.
- b) Nos ensaios de biodegradação do d-limoneno, as bactérias e os consórcios, cultivados tanto estaticamente quanto sob condição de agitação, apresentaram valores médios de turbidez significativamente maiores que o controle, evidenciando que o crescimento de todos os microrganismos estudados não apresentaram inibição quando cultivados em meios contendo altas concentrações de d-limoneno. O maior valor médio de turbidez foi da bactéria 2BA verde ($1040 \pm 7,8$ NTU) e do consórcio 1 ($122 \pm 1,2$ NTU), ambos cultivados sob agitação e no meio contendo 5% de d-limoneno (única fonte de carbono).
- c) Quanto a eficiência na remoção de DQO, todos os microrganismos isolados e consórcios apresentaram os maiores valores de remoções quando cultivados nos meios contendo 5% de d-limoneno, com exceção do consórcio 2 que apresentou a maior remoção no meio contendo 3% de d-limoneno. Nos ensaios sob condição de agitação, os microrganismos que apresentaram as maiores remoções de DQO foram a bactéria 3BA 1 ($54 \pm 0,71\%$) e os consórcio 1 ($77 \pm 2,42\%$). Quanto aos

microrganismos cultivados em condição estática o maior valor médio de remoção de DQO foi da bactéria BP9 ($89 \pm 0,7\%$).

- d) As linhagens foram identificadas como gênero *Bacillus*, que demonstraram resistência às altas dosagens de d-limoneno.
- e) Os produtos obtidos durante a bioconversão do d-limoneno foram α -terpineol, álcoois, como ciclodecanol e octanediol, e epóxi-undecano.

Estes estudos indicam que os processos biológicos submetidos a efluentes cítricos com altas concentrações de d-limoneno, poderão apresentar boa aclimatação e resistência a inibição da toxicidade quando microrganismos, como *Bacillus* sp selecionados e identificados neste estudo, forem introduzidos no tratamento.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Sugerem-se para trabalhos futuros formular consórcios com as bactérias isoladas neste trabalho juntamente com outras já descritas na literatura como degradadoras do d-limoneno e inocula-las em escala real nas plantas de tratamentos de efluentes cítricos para potencializar a tratabilidade do efluente industrial e sua disposição adequada no corpo d'água.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. Disponível em: <www.abecitrus.com.br>. Acesso em: 08/08/2010.

ADAMS, A., DEMYTTENAERE, J.C.R., KIMPE, N., 2002. Biotransformation of (R) – (+) – and (S) – (-) limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions. *Journal of Food Chemistry*, v. 80, p. 525-534.

ADAMSE, A. D.; DEINEMA, M.H.; ZEHNDER, A. J. B., 1994. Studies on bacterial activities in aerobic and anaerobic waste water purification. *Antoine van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 50, p. 665-682.

ALMEIDA, C. O., 2004. Agronegócio citrícola no Brasil. *Revista Bahia Agrícola*, v.6, p. 27-33.

ALVAREZ, F. R., SHAUL, G.M., KRISHNAN, E.R., PERRIN, D.L, RAHMNAN, M., 1999. Fate of terpene compounds in activated sludge wastewater treatment system. *Journal Air & Waste Manage*, v. 49. P. 734-739, 1999.

APHA, 2005. *Standard Methods for examination of Water and Wastewater*, 21 ed. American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environmental Federation Washington , DC, USA.

AUTHEUNISSE, J.; KOENE, J. I. A., 1987. Alteration of the aerobic and facultative anaerobic bacteria flora of the A/B purification process caused by limited oxygen supply. *Journal of Water Research*, v. 21, n. 1, p. 129-131.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46., p. 446 – 475.

BALLAL, N. R, BHATTACHACHARYYA, P. K., 1967. Perillyl alcohol dehydrogenase from a soil pseudomonas. *Biochemistry Biophys*, v. 23, p. 473-478.

BAPTISTELLA, L. B. H., IMAMURA, P. M., MELO, L. V., CASTELLO, C., 2009. Preparação do (+)- α -terpineol a partir do (+)-limoneno: monoterpenos de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. *Química Nova*, v. 32, n. 4, 1069-1071.

BAUER, K., GARBE, D., SURBURG, H., 2001. Common fragrance and flavor materials. 4th edition, Wiley - VCH, p. 178 – 189.

BAVUTTI, H. F. R., 2001. Isolamento, seleção e estudo de microrganismos ligninolíticos degradadores de chorume. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 168 p., Tese (Doutorado).

BEILEN, J. B., HOLTACHERS, R., LUSCHER, D., BAUER, U., WITHOLT, B. DUETZ, A. W., 2004. Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium sp.* Cytochrome P450) alkane Hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1737-1744.

BENEDICT, R. G., CARLSON, D. A., 1971. Aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. *Water Research*, v. 5, p. 1023-1030.

BENEDITTI, S., REZZADORI, K., 2009. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. Em 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production, São Paulo.

BICAS, J. L., QUADROS, C. P., SANTOS, R., BARROS, F. C. F., DIONÍSIO, U. M., NERI, I. A., PASTORE, G. M., 2007. Isolation and screening of R-(+)-limonene-resistant microorganisms. *Journal of Biotechnology*, v.131, p. 211-241.

BICAS, J. L., FONTANILLE, P., PASTORE, G. M., LARROCHE, C., 2008. Characterization of monoterpene biotransformation in two *Pseudomonas*. *Journal of Applied Microbiology*, v.105, p. 2001.

BIZZO, A. R., REZENDE, C. M., HOVELL, A. C. M., 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 588-594.

BOUWMEESTER, H. J., GERSHENZON, J., KONINGS, M. J. C. M., CROTEAU, R., 1998. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. *Plant Physiology*, v. 117, p. 901-9128.

BRADDOCK, R. J, 2006. Ultrafiltration and OR recovery of limonene from citrus processing waste streams. *Journal of Food Science*, v. 47, p. 946-948.

BURDOCK, G. A., 1995. Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients, CRC Press, Boca Raton, p. 107 – 109.

CADWAKKADER, K. R., BRADDOCK, R. J., PARISH, M. E., HIGGINS, D. P., 1989. Bioconversion of d-limonene by *Pseudomonas gladioli*, *Journal Food Science*, v. 54, p. 1241 – 1245.

CARTER, O. A., PETERS, J. R., CROTEAU, R., 2003. Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. *Phytochemistry*, v. 64, p. 425-433.

CHANG, H. C., ORIEL, P., 1994. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearotherophilus*. *Journal Food and Science*, v. 59, p. 660 – 662.

CHANG, Y. C., KARLBERG, A. T., MAIBACH, H. I., 1997. Allergic contact dermatitis from oxidized d-limonene. *Contact Dermatitis*, v. 37, n. 6, p. 308-309.

CHATTERJEE, T. & BHATTACHARYYA, D.K., 2001. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 55, p. 541-546.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB), 2001. *Microbiologia de lodos ativados*. Apostila CETESB, São Paulo.

CORCHNOY, S. B., ATKINSON, R., 1990. Kinetics of the gas-phase reactions of OH and NO, 3 radicals with 2-carene, 1,8- cineole, p-cymene, and terpinolene. *Environmental Science and Technology*, v. 24, p. 1497 – 1502.

CROWELL, P. L., 1997. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast cancer research and treatment*, v. 46, p. 191-197.

CROWELL, P.L., 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition*, v. 129, p. 775–778.

DAVALIKAR, R., S., RANGACHARI, P.N., 1966. Microbiological transformations of terpenes IX Pathways of degradation of limonene in a soil pseudomonas. *Journal Biochemical*, v.3, p. 158 – 164.

DUETZ, A. W., BOUWMEESTER, H., BEILEN van J. B., WITHOLT, B., 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts and plants. *Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 61, p. 269-277.

DUETZ, A. W., FUALLMAN, A. M. H., REN, S., JOURDAT, C., WITHOLT, B., 2001. Biotransformation of d-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. *Applied Environmental Microbiology*, v. 67, p. 2829-2832.

FALCONI, F. A., 2003. Seleção de microrganismos capazes de degradar monoterpenos para aplicação no tratamento de efluente de indústria cítrica. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 126 p., Tese (Doutorado).

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: < www.fao.org >. Acesso em: 18/09/2010.

FILIPSSON, F., A., BARD, J., KARLASSON, S., 1998. Limonene. Concise International Chemical Assessment Document 5., World Health Organization , 31 páginas.

FISCHBACH, R. J., ZIMMER, R. S., PICHNER, A., SCHNITZLER, J., 2000. Monoterpene synthase activities in leaves *Picea abies*. *Phytochemistry*, v. 54, p. 257-265

GROSJEAN, D., WILLIAMS II, E.L., GROSJEAN, E., ANDINO, J. M., SEINFELD, J. H., 1993. Atmospheric oxidation of biogenic hydrocarbons: reaction of oxone with β -pinene, d-limonene e trans caryophyllene. *Environmental Science Technology*, v. 27, p. 2754-2758.

GU, P., MORRAL, J., WANG, J., ROZENSKI, J., BUSSON, R., AERSHOT, A. V., CLERCQ, E., HERDEWIJN, P., 2003. Synthesis and antiviral activity of a series of new cyclohexenyl nucleosides. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, v. 14, p.31-37.

GUIMARÃES, J. J., 1998. As indústrias de frutas cítricas da região do Matão e a influencia das descargas de seus despejos líquidos na qualidade da água do rio São Lourenço (Bacia do Tietê Médio Inferior). São Carlos, São Paulo. Universidade de São Paulo, dissertação (Mestrado).

HAMADA, H., KONDO, Y., ISHIHARA, K., NAKAJIMA, N., HAMADA H., KURIHARA, R., HIRATA, T., 2003. Stereoselective biotransformation of limonene and limonene oxide by *cyanobacterium*, *Synechococcus sp.* PCC 7942. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, p. 581-584.

HAMER, G., 1997. Microbial consortia for multiple pollutant biodegradation. *Pure and Applied Chemistry*, v. 89, n. 11, p. 2343-2356.

van HAANDEL, MARAIS, G., 1999. O comportamento do sistema de lodo ativado: teoria e aplicações para projetos e operações. Edição Lein, P. R., Campina Grande, p. 9-182.

HARDMAN, D. J., 1987. Microbial control of environmental pollution: the use of genetic techniques to engineer organism with novel catabolic capabilities. *Environmental Biotechnology*, p. 295 – 317.

HESPANHOL, I., 2008. Water reuse: an international survey of current practice. IWA Publishing, London U.K, v.26, p.467-481.

HYATT, D. C., YOUN, B., ZHAO, Y., SANTHAMMA, B., COATES, R. M., CROTEAU, R. B., KANG, C., 2007. Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 104, n.13, p. 5360-5365.

HOHL, R. J., 1996. Monoterpenes as regulators of malignant cell proliferation. *Advanced Medicine Biology*, v. 401, p. 137-146.

IBGE – Pesquisa de Orçamentos Familiares. Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso em: 24/07/2008.

LEE, S., TSAO, R., PETERSON, C., COATS, R. J., 1997. Insecticidal activity of monoterpenoids to west corn rootworm (Coleoptera: chrysomelidae), two spotted spider mit (Acari: Tetranychidae), and the house fly (Diptera: Muscidae). *Journal Economy Entimology.*, v. 90, p. 883-892.

LI, P. H., CHIANG, B. H., 2012. Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrasonic Sonochemistry*, v. 19, 192 – 197.

LIBRANDO, V., TRINGALI, G., 2005. Atmospheric fate of OH initiated oxidation of terpene. Reaction mechanism of α -pinene degradation and secondary organic aerosol formation. *Journal of Environmental* v. 75, p. 275-282.

MACHADO, S. F., 2009. Avaliação do pré-tratamento do efluente de indústria química com adição de linhagens microbianas especializadas em degradação de compostos tóxicos. São Paulo, São Paulo: Faculdade de biomédicas da Universidade de São Paulo, 114p., Dissertação (Mestrado).

MADONI, P.; DAVOLI, D.; CHIERICI, E. , 1993. Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *Water Research*, v.9, n.27, p. 1485-1491.

MARIET J., van der WERF, KEIJZER, J. M., Van der SCHAFT, H. P., 2000. *Xanthobacter sp.* C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. *Journal of Biotechnology*, v. 84, p. 133-143.

MARIET, J. van der WERF, SWARTS, H. J., BONT, J. M. A., 1999. *Rhodococcus erythropolis* CL 14 Contains a novel degradation pathway for limonene. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n. 5, p. 2092-2102

MARÓSTICA M.R, ROCHA T.A.A, FRANCHI, G.C., NOWILL, A., PASTORE, G. M., HYSLOP, S., 2009. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. *Food Chemistry*, v.116, p. 8-12.

MARÓSTICA, M. R., PASTORE, G. M., 2007. Biotransformação do limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Química Nova*, v. 20, n.2, p. 382-387.

MARS, A. E., GORISSEN, J. P. L., van der BELD, I., EGGINK, G., 2001. Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pseudomonas putida GSI* in a fed-bach reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 101-107.

MENÉNDEZ, P., GARCIA, C., RODRIGUEZ, P., MOYNA, P., HEINZEN, H., 2002. Enzymatic systems involved in d-limonene biooxidation. *Brazilian Archives of Biology and Technolgy* v. 45, p. 111-114.

MESQUITA, R. A., ANZAI, E. K., OLIVEIRA, R. N., NUNES, F. D., 2001. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesquisa Odontologia Brasileira*, v.15, n. 4, p. 314-319.

METCALF e EDDY, 2005. *Wastewater engineering: Treatment Disposal Reuse* – McGraw-Hill, USA , 4th edition, p. 359 - 434.

MELCHIOR, S. C., PELEGRINI, R. T. Influência do ambiente químico na microbiota nos processos de tratamentos biológicos. Disponível em: <www.ceset.unicamp.br/Ita> Acesso em: 30/07/2011.

MISRA, G., PAVLOSTATHIS, S. G., PERDUE, E. M., ARAUJO, R., 1996. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, 831-838.

MDIC, Ministério do Desenvolvimento, Indústria de Comercio Exterior. Disponível em: <[HTTP://www.mdic.gov.br](http://www.mdic.gov.br)> Acesso em: 08/08/2010

NAVARRO, A. R., LOPEZ, Z. O., MALDONADO, M. C., 2008. A pilot plant for the treatment of lemon industry wastewater. *Clean technology environmental policy*, v. 10, p. 371-375.

OMRA, M. S., MOODI, A. M., MOHAMMAD, S., AMIRI, N. B., MOSAVI, J. S., GHAZI, M. M. A. S., SAEED, M., SHIADE, J. M. S., KHERADI, E., SALEHI, M., 2011. The effects of limonene and orange peel extracts on some spoilage fungi. *Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, p. 82-86.

ONKEN, J., BERGER, R. G., 1999. Effects of r-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, v. 69, p. 163-168.

ORIEL, J. P., SAVITHIRY, J. S., CHANG, H. C., 1997. Process for the preparation of monoterpenes using bacterium containing recombinant DNA, U. S, patent 5, p. 663-688.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM., P., SOCCOL, T. V., VANDENBERGHE, S. P. L., MOHAN, R., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, p. 81-87.

Park, J.K., Wang, J., and Novotney, G., 1997. Wastewater Characterization for Biological Phosphorus Removal. Wisconsin Department of Natural Resources Research Report 174 p.29.

PATTNAIK, S., SYBRAMANYAM, R. V., BAPAJI, M., KOLE, R. C., 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, v. 89, p. 39-46.

PESCHECK, M., MIRATA, M. A., BRAUER, B., KRINGS, U., BERGER, R. G., SCHRADER, J., 2009. Imptobrf monoterpene biotransformation with *Penicillium* sp by use of a closed gas loop bioreactor. *Journal Microbiology Biotechnoly*, v. 6, p. 827-836.

PONEZI, A. N., DUARTE, M. T. C., FILHO, B. C., FIGUEIREDO, R. F., 2005. Análise da biodegradação dos componentes do óleo cítrico por CG/EM e análise da população microbiana de um reator de lodo ativado no tratamento de água residuária de uma indústria cítrica. *Engenharia Sanitária. Ambiental*, v. 10, n. 4, p. 278-284.

QUARLES, W., MASHEK, B., 2008. Orange oil for drywood termites: magic or marketing madness? *The IPM Practitioner: Monitoring the Field of Pest Management*, 30th, n.1/2.

RIVAS, B., TORRADO, A., TORRES, P., CONVERTI, A., DOMINGUES, J. M., 2008. Submerged citric acid fermetation on Orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington. v. 56, p. 2380-2387.

RUIZ, F., M., B. , PATIÑO, R., J., D., VIDAL, P., A., 2009. Effect of limonene on anaerobic co-digestion of citrus waste. *Internationale Wissenschaftstagung. Biogas Science*, v.17, p. 485 – 490.

SCHUTZ, S., REINHOLD, D., SCHMIDT, ANSORGE, S., HOLT, V., 1997. Perillic acid Inhibits Ras/MAPkinase driven IL-2 production in human T lymphocytes. *Biochemistry Biophs*, v. 241, p. 720-725.

SEIGLER, D., 1998. *Plant secondary metabolism*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, p. 759.

SPEELMANS, G., BIJLSMA, A., EGGINK, G., 1998. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, p. 538-544.

SPOSITO, R. D., 2006. Definição de alternativas de pré-tratamento de efluentes não domésticos em sistemas públicos de esgotos, utilizando o teste de avaliação da toxicidade refratária. São Paulo, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 221 p., Dissertação (Mestrado).

TAN, Q., DAY, D. T., 1998. Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, p. 96-101.

TAVARES, V. B., SIVIERI, K., CERON, R. C., SILVA, R. TRABUCO, E., 1998. Utilização do resíduo líquido de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium Citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. *Química Nova*, v. 21, p. 722-725.

TOMAS, V., IRENA, V., TOMAS, V., 1999. Biotransformation of (S) – (-) and (R)m- (+) – limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* plant cells. *Phytochemistry*, v. 50, p. 1347-1351.

TRYTEK, M., FREDUREK, J., 2005. A novel psychrotrophic fungus, *Mostierella minutíssima* for limonene biotransformation. *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 149-152.

TSUTYA, M., 2000. Alternativas de disposição final de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgoto. Impacto ambiental do uso agrícola de lodo de esgoto. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, v.4, p.69-106.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. Biocatalysis/ Biodegradation Database. Disponível em: <<http://umbbd.msi.umn.edu>> . Acesso em: 09/04/2010.

URIBE, S., PENA, A., 1990. Toxicity of metabolismo f monoterpenes – recent developments. *Biodegradation*, v. 1, p.93-105.

VALLILO, M. I., BUSTILLOS, O. V., AGUIAR, T. O., 2006. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cabessédes) *O.Berg-Myrtaceae*. Revista do Instituto Florestal, v. 18, n. único, p. 15-22.

VIGUSHIN, D. M., POON, G. K., BODDY, A., ENGLISH, J., RALBERT, G. W., PAGONES, C., JARMAN, M., COOMBERS, R. C., 1998. Pharmacokinetic study of d-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, v. 42, p. 111-117.

VON SPERLING, M., 2002. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 2ª edição, Belo Horizonte: DESA-UFMG, v.4, p.428.

WAGNER, H. K., ELMADFA, I., 2003. Biological relevance of terpenoids. *Annals Nutrition & Metabolism*, v. 47, p.95-106.

WENTZEL, M. C., MBEWE, A., LAKAY, M. T, EKAMA,G. A., 1999. Batch test for characterization of the carbonaceous materials in municipal wastewaters. *Water SA*, v. 25, n. 3, p. 327-336.

WERF van der J. M., SWARTS, J. H., BONT de M. A . J, 1999. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 Contains a novel degradation pathway for limonene. *Applied and Environmental Microbiology* v. 65, n. 5, p. 2092-2102.

WERF van der J. M., KEIJZER, P. M., SCHAFT van der, 2001. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. *Journal of Biotechnology*, v. 84, p. 133- 143.

YAMANAKA, T. H., 2005. Sucos cítricos: Série Produção mais limpa. CETESB, Edição ISBN, 47 páginas. Disponível em: < www.cetesb.sp.gov.br >. Acesso em: 14/04/2010.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZHENG, Q. G., KENNEY, M. P., LAM, K. L., 1992. Anethofuran, carvone, and limonene: potential cancer chemo preventive agents from dill weed oil and caraway oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 58, p. 338-341.

Apêndice I – Resultados das identificações dos microrganismos isolados – análise filogenética**Bacteria 1 (3BA - 1)****Resultado:**

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis*

Sequência 16S (10 a 782):

TTTGWGWTGTTKKRWYYCTRACTSAGTGAYCGTAACGMYGGGGCGTCTATACT
GCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG
GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTT
TCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCT
GGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG
GTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGT
GTAGCGGTRAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTT
TCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGGAAAACGWGGGGGAGCAAACAGGA
TAGAWWWMCCCTKGRKTGAAA

Bacteria 2 (3BA – marrom)**Resultado:**

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis* ou
- *Bacillus mycodesi* ou
- *Bacillus weihenstephanensis*

Sequência 16S (10 a 782):

TTTTTKAGTTTGATYCCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACAT
GCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCG

GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTT
TCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCT
GGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG
GTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTT
TCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGGAGCAACAGGAWT
AAAWWCCCTGGGTYATATAA

Bacteria 3 (1BA – Bege)

Resultado:

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis* ou
- *Bacillus mycodes*

Sequência 16S (10 a 782):

TTTTTTACCCAGGGGTATTATCTGTTTGCTCCCCGTTTTTCGCGCTCAGTGTC
GTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTACGCA
TTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTT
TCCAATGACCCTCCASGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACC
ACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTAT
TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAA
GGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACACAGAGTTTTACGA
CCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTG
CGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCC
AGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCG
TTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGA
AGCCGCCTTTCGAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCC
CGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCAC
CCGTCGCGGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTGC
ATGTATTAGCACGCCGCCAGCGKTCATCCTGAGCAGGRATAAMWYCAAAAA
AA

Bacteria 4 (1BA4)

Resultado:

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis*

Sequência 16S (10 a 782):

TAGGTSCGGCCTCCCWARACTGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGSTC
 TTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGATRACRCGTAGCGGTAACCTGCCATAA
 GACTGGGATAACTCCGGGAAAWTGAGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACC
 GCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGAYYYGC
 GTCRCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC
 CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAMGCAAAGTCTGACGGAG
 CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGG
 AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAA
 GCCACGGCTAACTACGYGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
 WTYMGATAGTATWGARGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATR
 TGAAAGACCCACGGCTCAMCCGTGGAGGGTCATTCYACMCTKKAGACTTGAGT
 GCAGAAGAGGAAAGTGAATTACCATKTGCGCMTAAATGCGTAGAGATATGG
 AGGAACWCCAGTGGMGAAGGCGACTTTMTGGTCTGTAACCTGACACYKAGGCG
 CRAAAAAGGGGAAWAAT

Bacteria 5 (2BA – verde)**Resultado:**

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis* ou
- *Bacillus mycoides*

Sequência 16S (10 a 782):

TTTTGTGRAKTTTGATTCCTGCTCAGGATGAACGSTGGCGGCGTGCTAATACAT
 GCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCG
 GCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
 AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
 ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
 TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTT
 TCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCT
 GGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
 GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGG
 GTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTT

TCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATAG
 WWACCTGGGTAAAAA

Bacteria 6 (3BP – verde)

Resultado:

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis* ou
- *Bacillus mycoides* ou
- *Bacillus weihenstephanensis*

Sequência 16S (10 a 782):

TTTACCAGGGKWATCTAATCCTKTTGCTCCCCACGCCTTTCGCGCCTCGTGTCAG
 GTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCA
 TTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGT
 TTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAC
 CACCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTA
 TTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCCTGGTTAGGTACCGTCA
 AGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACG
 ACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATT
 GCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCC
 CAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCC
 GTTACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCG
 AAGCCGCCTTTCAATTTTCGAACCATGCGGTTCAAAAATGTTATCCGGTATTAGCC
 CCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA
 CCCGTCCGCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTG
 CATGTATAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCAGGAATCAACTCCAGA

Bacteria 7 (1BP – verde)

Resultado:

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis* ou
- *Bacillus mycoides* ou
- *Bacillus weihenstephanensis*

Sequência 16S (10 a 782):

TTTATACCCAGGTWWCTAATCTGTTTGGTCCCCATTTTCGCGCCTCAGTGTCAG
 TTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCAT
 TTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTT
 TTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACC

ACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTAT
TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAA
GGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGA
CCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTG
CGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCC
AGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCG
TTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGA
AGCCGCCTTTCAATTTTCGAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCC
CGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCAC
CCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGC
ATGTATTAAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCAGGAWCAAAMTCYAYA
AAA

Bacteria 8 (1BP 9)

Resultado:

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis* ou
- *Bacillus mycoides* ou
- *Bacillus weihenstephanensis*

Sequência 16S (10 a 782):

AGCTTTGAGGTTGATCCTGGCTCAGGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC
ATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGG
CGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
CTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAG
CTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
GGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGA
CTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACASGA
TTAGATACCCTGGTAAAA

Bacteria 9 (2BP – vermelha)

Resultado:

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis* ou
- *Bacillus mycoides* ou
- *Bacillus weihenstephanensis*

Sequência 16S (10 a 782):

TTTMACCCRGGGRWWTYTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTCAGT
 GTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTA
 CGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCC
 CAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAG
 AAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTA
 CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACC
 GTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTT
 TACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTC
 CATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCA
 GTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGTTGCCTTGGTG
 AGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACA
 GCCGAAGCCGCTTTC AATTCGAACCATGCGGTTCAAAATGTTATCCGGTATT
 AGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTA
 CTCACCCGTCCGCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTCGCTCGA
 CTTGCATGTATTAGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGAATMAAMACT
 CAAAAA

Bacteria 10 (1BP – vermelha)

Resultado:

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis* ou
- *Bacillus mycoides* ou
- *Bacillus weihenstephanensis*

Sequência 16S (10 a 782):

TGTTTRGTTTKRTWYCCTGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGC
 AAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGG
 TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
 GGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGC
 TTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
 CGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
 TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
 CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC

GGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGG
CACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG

CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTC
TGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATWACCCTGGTTAAA

Bacteria 11 (1BP4)

Resultado:

- *Bacillus thuringiensis* ou
- *Bacillus cereus* ou
- *Bacillus anthracis*

Sequência 16S (10 a 782):

ACGGGGKGGGGCGCCTAWAGTGC GTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCKCCACT
GGWGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTC
CTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTG
GGCTTTCACATCARACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATT
CCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC
GTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGT
TCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCG
TTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGMCTCCCGT
AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGYCGATCACCTCTCAGGTCGG
CTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGC
GGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTCAATTCTMGAACCATGCG
GTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTAT
GGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCA
AGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTG CATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCA
TCCTGAGCCAGGATCAA ACTCTA

Cladograma

(Sugerido pelo programa ClustalW)

APÊNDICE

