



**JACILENE MARQUES MACIEL**

**ESTUDO COMPARATIVO DA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL  
POR CULTURAS ISOLADAS E EM CONSÓRCIO**

**RECIFE  
AGOSTO/2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**ESTUDO COMPARATIVO DA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL  
POR CULTURAS ISOLADAS E EM CONSÓRCIO**

**JACILENE MARQUES  
MACIEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

**Área de Concentração:** Micologia Industrial

**Orientadora:** Norma Buarque de Gusmão

**Coorientadora:** Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa.

**RECIFE  
AGOSTO/2013**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Maciel, Jacilene Marques**

**Estudo comparativo da degradação de óleo diesel por culturas isoladas e em consórcio. / Recife: O Autor, 2013.**

**58 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Norma Buarque de Gusmão**

**Coorientadora: Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2013.**

**Inclui referências e anexo**

- 1. Biodegradação 2. Diesel 3. Testes de toxicidade I. Gusmão, Norma Buarque de (orient.) II. Sousa, Maria de Fátima Vieira de Queiroz (coorient.) III. Título**

**620.11223**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017- 455**

**ESTUDO COMPARATIVO DA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR  
CULTURAS ISOLADAS E EM CONSÓRCIO**

**JACILENE MARQUES MACIEL**

Dissertação defendida e aprovada em 15 de agosto de 2013.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**MEMBROS TITULARES**

---

Dr<sup>a</sup>. Norma Buarque de Gusmão (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa (Coorientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
Universidade Federal da Paraíba

---

Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza Motta  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Uided Maaze Tiburcio Cavalcanti (Suplente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Clarissa Daisy da Costa (Suplente)  
Universidade Católica de Pernambuco

A Vinícius, filho e amigo nos momentos  
difíceis.

**DEDICO**

## **Agradecimentos**

A Deus por tornar possível a conclusão deste trabalho e por ser uma luz em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Manoel Maciel e Jane Maciel, em especial à minha mãe, pela educação, dedicação e apoio.

A Edson Ribeiro pelo companheirismo, apoio e colaboração neste trabalho (in memoriam).

Ao meu filho Vinícius pelo carinho, admiração, amizade e por dar um sentido especial na minha vida, me fazendo sempre ir em busca dos meus objetivos.

À Prof<sup>a</sup> Norma Gusmão pela orientação, compreensão e oportunidade de crescimento.

À Prof<sup>a</sup>. Maria de Fátima pela coorientação e aprendizado.

A Raul Cavalcanti pelo importante auxílio na realização dos experimentos, amizade e momentos de descontração.

À Geórgia Gomes pela valiosa amizade, generosidade, incentivo e pelos momentos de alegria e dificuldades compartilhados.

A Erik Jonne e Flávia Arruda pelo carinho, atenção, explicações e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Às amigas Andresa Alves e Clarissa Gomes, que mesmo à distância sempre torceram e acreditaram em mim.

A Pérsio Silva pelo carinho e pelas análises cromatográficas.

A todos que fazem parte do LAFEA, pelo acolhimento e que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

À Jadson Bezerra e a Prof<sup>a</sup> Maria Jose Fernandes da URM, pelas identificações dos fungos.

Aos meus colegas do mestrado pelos momentos compartilhados.

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Departamento de Micologia e ao Departamento de Antibióticos por me acolherem na realização desta pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O petróleo e seus derivados são a principal fonte de energia em todo o mundo, porém as atividades que os envolvem podem causar sérios danos ao meio ambiente e à saúde humana. Neste contexto, é imprescindível o desenvolvimento de tecnologias que eliminem ou reduzam esses poluentes e conseqüentemente, sua toxicidade. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de micro-organismos, isoladamente e em consórcio, na degradação de óleo diesel. Inicialmente foram utilizados 6 fungos e 3 bactérias, e estes, foram submetidos ao teste que investiga o potencial de degradação de petroderivados pelos micro-organismos. Em seguida, estas culturas foram submetidas à concentrações crescentes de óleo diesel (1% a 10%) a uma temperatura de 30<sup>0</sup>C ( $\pm 2^{\circ}$ C) de forma estática. Com base nos resultados dos ensaios de aclimação, foram selecionadas as linhagens para a formação do consórcio. Após a seleção do consórcio microbiano, este foi submetido a uma aclimação e em seguida, a um planejamento experimental, em que foram utilizadas como variáveis: o inóculo, a concentração de nitrogênio e a temperatura, visando a obtenção das melhores condições favorecendo o processo de degradação. Dentre as bactérias, *Bacillus* sp. apresentou os maiores percentuais de degradação e entre os fungos, a levedura L24. Os resultados do planejamento experimental com o consórcio misto indicaram que, uma menor quantidade de inóculo (1 bloco/gelose) e uma maior concentração da fonte de nitrogênio (C:N 50:1) foi a condição que mais favoreceu a biodegradação da fonte oleosa. As culturas testadas isoladamente, apresentaram percentual de degradação acima de 70% enquanto que em consórcio os maiores valores foram de 30%. Nos ensaios de fitotoxicidade, todos os micro-organismos em consórcio, e isoladamente, apresentaram valores de redução da toxicidade do óleo diesel, sendo que, isoladamente mostraram-se mais eficientes, apresentando valores de IG entre 60% e 100%.

**Palavras-chave:** óleo diesel, biodegradação, bioaumentação, consórcio microbiano, fitotoxicidade.

## ABSTRACT

Oil and its derivatives are the main source of energy in the world, but the activities that involve them can cause serious damage to the environment and human health. In this context, it is essential to develop technologies that eliminate or reduce these pollutants and consequently its toxicity. This study aimed to evaluate the ability of micro-organisms, alone and in partnership, in the degradation of diesel oil. Initially we used 6 3 fungi and bacteria, and these were tested to investigate the potential of petroderivados degradation by micro-organisms. Then, these cultures were subjected to increasing concentrations of diesel oil (1% to 10%) at a temperature of 30<sup>0</sup>C statically. Based on the results of tests of acclimatization, the strains were selected for the formation of the consortium. After selecting the microbial consortium, has been subjected to an acclimatization and then the experimental design, in which were used as variables: the inoculum, nitrogen concentration and temperature in order to obtain the best conditions favoring the degradation process. Among bacteria, *Bacillus* sp. showed the highest percentage of degradation among fungi, yeast L24. The results of the experimental design with the mixed consortium indicated that a smaller amount of inoculum (1 block / agar) and a higher concentration of the nitrogen source (C: N 50:1) was the condition that most favored the biodegradation of oil supply. The cultures tested alone, had percentage of degradation is above 70% while the highest values in a consortium was 30%. In phytotoxicity tests, all micro-organisms in a consortium, and separated showed reduced toxicity values diesel oil, and, separately shown to be more effective, with GI values between 60% and 100%.

**Key-words:** diesel oil, biodegradation, bioaugmentation, consortium, phytotoxicity

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1 – Valores de biomassa obtidos durante ensaio de aclimatação.....	39
Figura 2 – Valores de pH obtidos durante ensaio de aclimatação .....	40
Figura 3 – Valores de degradação obtidos durante ensaio de aclimatação em 4% de óleo diesel.	41
Figura 4 – Valores de degradação obtidos durante ensaio de aclimatação em 10% de óleo diesel .....	41
Figura 5 – Índices de germinação obtidos durante ensaio de aclimatação.....	42
Figura 6 – Valores de biomassa do consórcio obtidos durante ensaio de aclimatação.....	43
Figura 7 – Valores de pH do consórcio obtidos durante ensaio de aclimatação.....	44
Figura 8 – Valores de degradação do consórcio obtidos durante ensaio de aclimatação em 4% de óleo diesel .....	45
Figura 9 – Valores de degradação do consórcio obtidos durante ensaio de aclimatação em 10% de óleo diesel .....	45
Figura 10 – Índices de germinação do consórcio obtidos durante ensaio de aclimatação.....	46
Figura 11 – Valores de degradação obtidos durante planejamento experimental.....	46
Figura 12 – Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial $2^3$ , tendo como variável de resposta a degradação do óleo diesel.....	47
Figura 13 – Gráfico de superfície de resposta: interação entre o inoculo e a fonte de N.....	48
Figura 14 – Índices de germinação do consórcio obtidos durante planejamento experimental	48

## Lista de tabelas

	<b>Pág.</b>
Tabela 1 – Tecnologias de tratamento de biorremediação .....	23
Tabela 2 – Níveis e valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> .....	35
Tabela 3 – Delineamento composto central DCC.....	36
Tabela 4 – Tempo de viragem do indicador DCPIP após incubação.....	37
Tabela 5 – Teste de antagonismo entre as linhagens de micro-organismos .....	38

## SUMÁRIO

	<b>Pág</b>
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. Origem do Petróleo.....	16
2.2. Óleo Diesel.....	17
2.3. Contaminação por Petróleo e seus Derivados.....	18
2.4. Toxicidade do Petróleo e seus Derivados.....	21
2.5. Biorremediação .....	21
2.6. Biodegradação de Hidrocarbonetos.....	24
2.7. Micro-organismos Degradadores.....	24
2.8. Consórcios Microbianos.....	26
2.9. Fatores que Influenciam a Biodegradação.....	28
3.0. Ecotoxicidade.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
3.1. Fonte de carbono.....	31
3.2. Micro-organismos Utilizados.....	31
3.3. Manutenção dos Micro-organismos utilizados.....	31
3.4 . Seleção das Linhagens .....	31
3.5. Teste de Antagonismo.....	32
3.6. Teste das Culturas em Teores Crescentes da Fonte Oleosa.....	32
3.6.1. pH.....	33
3.6.2. Biomassa.....	33
3.6.3. Análise da Degradação dos Constituintes do Óleo Diesel.....	33
3.6.4. Teste de Fitotoxicidade.....	34
3.7. Seleção do Consórcio.....	34
3.8. Planejamento Experimental.....	35
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Seleção dos Micro-organismos.....	37
4.2. Teste de Antagonismo.....	38
4.3. Teste das Culturas em Teores Crescentes da fonte Oleosa.....	38
4.3.1. Biomassa.....	38
4.3.2. pH.....	39

4.3.3. Percentual de degradação do óleo diesel 4% .....	40
4.3.4. Percentual de degradação do óleo diesel 10% .....	41
4.3.5. Fitotoxicidade.....	42
4.4. Seleção do Consórcio.....	43
4.5. Teste do Consórcio em teores Crescentes da Fonte Oleosa.....	43
4.5.1. Biomassa.....	43
4.5.2. pH.....	44
4.5.3. Percentual de Degradação do óleo Diesel 4% e 10%.....	44
4.5.4. Fitotoxicidade.....	45
4.6. Planejamento Experimental.....	46
4.6.1. Análises cromatográficas.....	46
4.6.2. Diagrama de Pareto.....	47
4.6.3. Teste de Fitotoxicidade do Planejamento Experimental.....	48
5.0. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
ANEXO A (Certificado de Ensaio) .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

O óleo diesel é um petroderivado constituído basicamente por uma mistura de hidrocarbonetos, além de nitrogênio, enxofre e oxigênio em baixas concentrações. A composição específica de um óleo diesel depende da fonte do petróleo bem como dos processos de destilação. É um produto inflamável, utilizado para movimentar automóveis, máquinas de grande porte e navios, termoelétricas entre outras aplicações. Porém, durante o seu processamento, transporte e armazenamento podem ocorrer vazamentos e derrames acidentais envolvendo grande risco ambiental (SOUZA, 2009).

Os vazamentos causam sérios problemas ao meio ambiente, por contaminarem rios, oceanos, solos e lençóis freáticos, gerando grande desequilíbrio ecológico, em decorrência do efeito tóxico sobre os seres vivos e consequências sócio-econômicas, como por exemplo, o comércio de peixes, moluscos e crustáceos.

Diante do exposto, faz-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de técnicas alternativas que eliminem estes poluentes dos ambientes. Dentre estas técnicas destaca-se a biorremediação por utilizar micro-organismos para degradar poluentes ambientais. Esta tecnologia é considerada promissora para a remoção de contaminantes, e se sobressai por ser fundamentada em métodos naturais, relativamente simples, menos agressivos e mais adequados para a manutenção do equilíbrio ecológico, além do baixo custo, quando comparados a outros. A biorremediação pode ser realizada *in situ*, ou seja, no local onde ocorreu a contaminação ou *ex situ*, quando ocorre a remoção do material contaminado para outra área (SOUZA et al. 2010).

Diversas espécies de fungos e bactérias têm sido utilizadas em processos de biorremediação por apresentarem potencial para transformar substâncias complexas e recalcitrantes em substâncias menos tóxicas e compatíveis do ponto de vista ambiental (PEREIRA Jr. et al. 2009). As bactérias apresentam grande atividade degradadora, pois entre suas principais características estão: a variabilidade genética, crescimento rápido e facilidade de se aclimatar em diversos ambientes. Já os fungos, resistem a condições adversas, como por exemplo, extremos valores de pH e baixo teor de umidade, além de não apresentarem preferência quanto ao ataque ao poluente. Brito et al. (2010), em uma revisão, citam que, segundo Bushnell e Haas (1941), um dos pesquisadores pioneiros nos estudos da utilização de hidrocarbonetos por micro-organismos foi Stormer (1908), capaz de isolar a bactéria *Bacillus hexabovorum*, que apresentou capacidade de crescer aerobiamente em meio contendo tolueno e xileno. Também segundo os autores, o

pesquisador Sohngen em 1913 relatou que gêneros microbianos como *Mycobacterium* e *Pseudomonas* poderiam oxidar o petróleo, e em 1971, Ahearn, Meyers e Standard isolaram espécies de *Candida* sp., *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces* sp., *Sporobolomyces* sp. e *Trichosporon* sp., todas capazes de metabolizar hidrocarbonetos. Em 2002, Araújo e colaboradores realizaram o isolamento e identificação de fungos filamentosos com capacidade de degradar o petróleo. A partir de um solo contaminado com petróleo foram obtidas 80 linhagens, das quais 60 apresentaram capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo. Dentre estas, foram identificados quatro gêneros fúngicos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*. Soares et al. (2011) citam a importância do desenvolvimento das técnicas de biorremediação e relatam a eficiência dos fungos nestes processos.

Porém, os micro-organismos isoladamente podem metabolizar um número limitado de hidrocarbonetos, sendo necessário o emprego de associações microbianas. Desse modo, uma espécie complementa a atividade metabólica de outra, ocorrendo ampliação da capacidade enzimática em degradar poluentes complexos. Leonel et al. (2010) afirmam que o emprego de consórcios microbianos é viável, podendo proporcionar uma completa degradação dos contaminantes. Dessa forma micro-organismos que não apresentam potencial para degradar completamente determinado composto, poderão transformá-lo em uma substância degradável por um segundo micro-organismo.

Nos últimos anos, tem sido dada atenção à obtenção de consórcios microbianos, que comparativamente às culturas puras, têm se mostrado mais efetivos na degradação de compostos orgânicos (PEDROTTI, 2007). Gallego et al. (2007) obtiveram os melhores resultados de biodegradação do petróleo utilizando um consórcio misto, quando comparados com micro-organismos isolados e Costa et al. (2007) relatam a eficiência de um consórcio constituído por fungos filamentosos, leveduras e bactérias em degradar constituintes do petróleo. Luz et al. (2010) investigando a potencialidade de um consórcio bacteriano em degradar óleo diesel, constataram que este mostrou-se eficiente no processo de biorremediação.

Portanto, estudos de biorremediação cada vez mais específicos têm se mostrado de extrema importância para o tratamento de ambientes impactados por petroderivados. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo, avaliar a biodegradabilidade do óleo diesel por determinados fungos e bactérias isolados e em consórcio e estabelecer as melhores condições físico-químicas e nutricionais para que ocorra a biorremediação.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Origem do Petróleo

A origem da palavra petróleo vem do latim *petra* (pedra) + *oleum* (óleo). O petróleo, ou óleo cru, é constituído, predominantemente, por mistura complexa de diversos hidrocarbonetos, além de enxofre, nitrogênio, oxigênio e menores quantidades de vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio. É um combustível fóssil que data desde a era paleozóica, no período permiano. Acredita-se que sua origem esteja relacionada ao processo de fossilização de animais e plantas, que há milhões de anos teriam sido soterrados e submetidos à ação de pressão e temperaturas extremamente elevadas, gerado a partir de material orgânico em decomposição sobre a superfície do planeta. Por esse motivo, o petróleo não é um recurso renovável ao longo da escala de tempo humana, ainda que ao longo de uma escala de tempo geológica esse combustível continue a ser formado pela natureza. As características do petróleo têm sido alteradas por processos geológicos ao longo dos séculos. Estas alterações têm contribuído para a evolução e adaptação de micro-organismos, tornando-os eficientes na degradação de hidrocarbonetos (ATLAS; BARTHA, 1972).

Segundo Thomas (2001), o registro da participação do petróleo na vida do homem remota de tempos bíblicos. Na antiga Babilônia, os tijolos eram assentados com asfalto e o betume era largamente utilizado pelos fenícios na calafetação de embarcações. Os egípcios o usaram na pavimentação de estradas, para embalsamar os mortos e na construção de pirâmides, enquanto gregos e romanos dele lançaram mão para fins bélicos. No Novo Mundo, o petróleo era conhecido pelos índios pré-colombianos, que o utilizavam para decorar e impermeabilizar seus potes de cerâmica. Os incas, os maias e outras civilizações antigas também estavam familiarizados com o petróleo, dele se aproveitando para diversos fins.

A partir do século XVIII o petróleo começou a ser utilizado comercialmente, na indústria farmacêutica e na iluminação, tornando-se, ao longo do tempo, uma eficaz fonte de energia. Com o surgimento da indústria petroquímica, os derivados do petróleo encontraram uma ampla aplicação, centenas de novos compostos são produzidos, como plásticos, borrachas sintéticas, tintas, corantes, adesivos, solventes, detergentes,

explosivos, produtos farmacêuticos, cosméticos, etc., favorecendo certa comodidade para a vida humana atual (MELO, 2005).

O primeiro poço de petróleo foi descoberto nos Estados Unidos, no ano de 1859, em uma região de pequena profundidade, cerca de 21cm. Os países que possuem maior número de poços de petróleo estão localizados no Oriente Médio, e por sua vez, juntamente com os Estados Unidos, são considerados os maiores produtores e exportadores mundiais. A história do petróleo no Brasil começou em 1858, quando o marquês de Olinda assinou o Decreto nº 2.266 concedendo a José Barros Pimentel o direito de extrair mineral betuminoso para fabricação de querosene, em terrenos situados às margens do Rio Maraú, na então província da Bahia. O primeiro poço brasileiro com o objetivo de encontrar petróleo, foi perfurado somente em 1897, por Eugênio Ferreira Camargo, no município de Bofete, no estado de São Paulo (SOUZA E LIMA, 2002).

## **2.2. Óleo Diesel**

É um petroderivado constituído basicamente por uma mistura de hidrocarbonetos ramificados e de cadeia aberta predominantemente alcanos e oleofinas, composto por átomos de carbono e hidrogênio, além de nitrogênio, enxofre e oxigênio em baixas concentrações. O óleo diesel é um produto inflamável, medianamente tóxico, pouco volátil, com odor forte e característico e sua cor varia do amarelo ao marrom (RAVATO, 2008). A composição de um óleo diesel específico depende da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação, podendo ainda, conter aditivos na sua composição final para melhorar a estabilidade e ignição (PETROBRÁS, 2003). O consumo do óleo diesel no Brasil pode ser dividido em três grandes setores: o de transportes, representando mais de 75% do total consumido; o agropecuário, representando cerca de 16% do consumo; e o de transformação, que utiliza o produto na geração de energia elétrica e corresponde à cerca de 5% do consumo total de diesel (BIODIESEL, 2012).

Atualmente, são definidos e especificados pelo Departamento Nacional de Combustíveis (DNC), quatro tipos básicos de óleo diesel (ANENG, 2012):

**Tipo A** – Utilizado em motores de ciclo diesel (ônibus, caminhões, carretas, veículos utilitários, etc.) e em instalações de aquecimento de pequeno porte. Este óleo caracteriza-se por possuir um teor de enxofre de, no máximo, 1,0%.

**Tipo B** – Conhecido como “metropolitano”. Tem a mesma aplicação do diesel tipo A diferindo dele por possuir, no máximo, 0,5% de enxofre.

**Tipo C** – Caracteriza-se, principalmente, por possuir, no máximo, 0,3% de enxofre. Outro item que diferencia este tipo de diesel dos demais é a temperatura necessária para destilação de 85% do seu volume: 360°C contra 370°C dos demais tipos.

**Tipo D** – Para uso marítimo. É produzido especialmente para a utilização em motores de embarcações marítimas. Difere do diesel Tipo A por ter especificado o seu ponto de fulgor em, no máximo, 60°C.

Com o aumento da população humana e o desenvolvimento tecnológico, há uma crescente demanda da utilização do petróleo e de seus derivados como fonte de energia, representando uma grande parcela para a economia mundial. No entanto, vem ocasionando sérios problemas ambientais, devido à introdução cada vez mais freqüente de petroderivados no meio ambiente (MELO, 2005).

### **2.3. Contaminação por Petróleo e seus Derivados**

A presença de hidrocarbonetos no ambiente, em geral, é um perigo para a saúde pública e para o ecossistema, devido a sua toxicidade e habilidade de bioacumular ao longo da cadeia alimentar (TIBURTIUS et al. 2004). O petróleo bruto constitui o maior componente de derrames que ocorrem no mar, pois é a carga principal dos navios cargueiros. Em um derrame de petróleo no mar ocorrem vários processos físicos, químicos e biológicos, alterando a composição original dos hidrocarbonetos. O despejo de petróleo em grandes quantidades afeta o ecossistema e o grau dessa alteração depende do tipo de óleo, da quantidade e do local do derrame. Em geral, os derrames catastróficos ocorrem nas regiões costeiras, afetando o ecossistema marinho e litorâneo. Inicialmente o petróleo se espalha pela superfície da água, evapora as frações voláteis e

seus componentes solúveis em água se dissolvem no oceano (ROSATO, 1997). Uma vez que os compostos mais tóxicos são os mais solúveis e voláteis, o impacto químico é maior nos primeiros dias após o derramamento.

Grande parte das descargas de petróleo e de seus derivados se dá por lavagens de tanques de navios em alto mar. Após a descarga do produto, os tanques são cheios com a água do mar (água de lastro), para que seja mantida a estabilidade do navio. Antes de fazer uma nova carga com produto, essa água é lançada no mar, e com ela são lançadas algumas dezenas de milhares de litros de petroderivados. Outra forma bem mais drástica, se dá pelo vazamento de produto por naufrágios decorrentes de rupturas na estrutura do navio. Em regiões próximas a terminais portuários há grande susceptibilidade a esses derrames (PEREIRA JR, 2009). Nos rios e lagos, o petróleo e seus derivados podem persistir por mais tempo, dependendo da natureza do óleo e da sua composição, além do tempo de residência da água, que nesses casos é bem maior que nos mares e oceanos. Por exemplo, os óleos leves, que são ricos em material tóxico constituído por aromáticos voláteis, permanecem menos tempo que os óleos pesados e os combustíveis marítimos. Os óleos crus, por sua vez, são menos susceptíveis à biodegradação do que os seus derivados (ATLAS & BARTHA, 1972).

Algumas das principais conseqüências sócio-econômicas dos vazamentos em ambientes aquáticos são: a redução da oxigenação, resultante da biodegradação do óleo e da proliferação de decompositores, redução de nutrientes essenciais como nitratos e fosfatos, aumento de micro-organismos heterotróficos, desaparecimento de peixes nas áreas atingidas. Isto acarreta a suspensão da pesca, morte de moluscos por substância tóxicas, tornando-se impróprios para o consumo humano e, conseqüentemente, causando prejuízos para as pessoas que vivem de sua comercialização (DELILLE, 1998; BURNS et al. 2000). Além desses efeitos, os derrames causam prejuízos financeiros às atividades industriais, pesqueiras e turísticas, pois estas dependem da qualidade do mar e dos riscos relacionados à saúde pública, causados pelo contato direto com o óleo.

Estima-se que 90% da descarga de contaminantes na natureza sejam de origem antropogênica e cerca de 70% de todos os contaminantes ambientais sejam hidrocarbonetos, sendo o solo a porção mais afetada pela contaminação por óleo (GOMES, 2011). As refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de derivados, que podem contaminar o ambiente, sendo os principais poluidores do solo e mananciais de água. O fundo dos tanques-reservatórios de combustíveis e das unidades de

tratamento são as principais fontes de contaminação, contribuindo significativamente para causar a poluição ambiental. A maior parte destes tanques de armazenamento encontra-se alocado no subsolo dificultando o monitoramento e o controle de vazamentos que, quando ocorrem, requerem medidas mitigadoras imediatas para evitar danos ao solo e contaminação de águas subterrâneas (CUNHA et al. 2008). Os postos de combustíveis também são responsáveis por casos de contaminação. Segundo a resolução n. 273 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA, 2000) toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Define que a localização, construção, instalação e operação de postos de combustíveis dependerão de prévio licenciamento do órgão ambiental competente, sem prejuízo de outras licenças legalmente exigíveis. O petróleo altera as propriedades do solo, reduzindo a disponibilidade de água, de nutrientes e de oxigênio. A composição dos dejetos varia de acordo com a origem, armazenamento e o histórico de tratamento (ROSATO, 1997).

Os principais riscos da contaminação no solo estão relacionados ao espalhamento vertical, conhecido como percolação, devido à possibilidade de atingir o lençol freático (CORSEUIL et al. 1997). A natureza físico-química do solo e o tamanho de suas partículas influenciam na percolação e na degradação do poluente (AMELLAL et al. 2001). De acordo com a Companhia de Tecnologia E Saneamento Ambiental (CETESB, 2010), ocorreram nas últimas décadas, inúmeros acidentes envolvendo atividades petrolíferas no Brasil e em todo o mundo. Em 1967 foi registrado o primeiro desastre ambiental mundial devido ao encalhe do petroleiro Torrey Canyon, entre a zona costeira da Inglaterra e da França, liberando 123.000 ton. de óleo, causando mortandade de aves e prejuízos à pesca e ao turismo. No Brasil, o primeiro grande derrame notificado ocorreu em 1974, quando o petroleiro *Takimyia Maru* chocou-se contra uma rocha no Canal de São Sebastião, causando vazamento aproximado de 6.000 ton. de petróleo. No entanto, a ocorrência de maior repercussão na mídia, devido ao impacto socioambiental gerado, foi o rompimento do oleoduto na Baía da Guanabara (2000), com vazamento de 1,3 ton. (POFFO, 2000; CETESB, 2010). Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais e Renováveis (IBAMA), em 2012, no Brasil, ocorreram dezenas de acidentes envolvendo vazamentos de petróleo e seus derivados.

## **2.4. Toxicidade do Petróleo e Derivados**

Além de contaminar ambientes aquáticos e terrestres, causando sérios danos aos ecossistemas, os hidrocarbonetos apresentam potencial toxicidade para o homem e outros organismos. A exposição a esses compostos por tempo prolongado pode causar efeitos crônicos, tais como: modificação no fígado, danos nos rins, coração, pulmões e sistema nervoso, aumento no desenvolvimento de células cancerosas, efeitos genotóxicos e fetotóxicos. Além de irritação nos olhos, pele e sistema respiratório (GOMES, 2004). Segundo Kabbur et al. (2001), Kanikkannan et al. (2001); Kanikkannan et al. (2002), a inalação desses poluentes provocam sintomas neurocomportamentais como: náusea, enxaqueca, fadiga e vertigem. Os efeitos dos hidrocarbonetos no ser humano já são bem conhecidos, porém, apesar dos estudos crescentes, pouca informação está disponível sobre os efeitos específicos destas substâncias nos organismos marinhos, especialmente após acidentes envolvendo vazamento de óleo no oceano (CETESB, 2012).

Diante do exposto, conclui-se que os derrames de petróleo e derivados trazem graves danos ao meio ambiente, sendo extremamente necessário o desenvolvimento de tecnologias que eliminem ou minimizem os poluentes derramados na água e no solo.

## **2.5. Biorremediação**

A biorremediação pode ser definida como um conjunto de técnicas biológicas que visam a recuperação de ambientes poluídos por substâncias tóxicas e/ou recalcitrantes, de forma menos agressiva ao meio ambiente e mais adequada ao equilíbrio ecológico. A biorremediação baseia-se no processo de degradação do poluente por ação microbiana (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) sendo considerada uma estratégia ecologicamente viável, de alta eficiência e de baixo custo (CRUZ, 2012). Neste processo, os micro-organismos metabolizam substâncias orgânicas, das quais obtêm os nutrientes utilizando-os como fonte de carbono e energia, sendo capazes de minimizar ou eliminar o impacto dos poluentes (ALEXANDER, 1999b; SEMPLE et al. 2001). Para que a biorremediação seja efetuada, uma das etapas consiste na seleção dos micro-organismos adequados, sejam estes autóctones ou alóctones, os primeiros indícios podem ser obtidos através do estudo das colônias que

habitam os ambientes contaminados. Se um grupo de organismos consegue proliferar em um local com altas concentrações de uma espécie poluente, existe uma maior probabilidade de que possua um sistema que lhe permita metabolizar esse contaminante. Como em qualquer processo em que se empregam micro-organismos é fundamental a otimização dos parâmetros relacionados aos nutrientes, fornecimento de oxigênio, pH entre outros (BRITO, 2010).

Os processos de biorremediação têm como princípio propiciar um aumento na biodegradação e provocar um estímulo da atividade microbiana degradadora por diferentes mecanismos (ANDRÉA; NAKAGAWA, 2006). Em muitos casos é comum utilizar tecnologias de biorremediação concomitantemente com outras tecnologias de remediação. É preciso conhecer a natureza química bem como as características físico-químicas do contaminante e as características do ambiente contaminado. Assim, cada ambiente contaminado requer uma combinação de procedimentos que permitam a otimização do processo de remediação (PEREIRA Jr et al. 2009). O maior projeto de biorremediação da história foi o tratamento do petróleo derramado pelo navio-tanque *Exxon Valdez* no Alaska, em 1989. Foram adicionados fertilizantes contendo nitrogênio ao longo de mais de 100 quilômetros de litoral, estimulando, dessa maneira, o crescimento dos microrganismos nativos, incluindo os que eram capazes de degradar hidrocarbonetos (SANTOS, 2009). Nessa operação foi degradado tanto o petróleo da superfície quanto o das camadas adjacentes (BAIRD, 2002). A biorremediação pode ser classificada de acordo com o local onde ocorre:

**Biorremediação *in situ*** – é o tipo de biorremediação que ocorre no local onde houve o derrame e os micro-organismos presentes no sítio poluído conduzem o processo de biodegradação. Pode ser feito com a adição de nutrientes para aumentar a velocidade do processo, esse procedimento é chamado de **bioestímulo**; ou com a adição de micro-organismos exógenos à microbiota nativa, chamado de **bioaumento** (WALTER, 1997; KOWALICK, 1991).

**Biorremediação *ex situ*** – essa técnica consiste na remoção do material contaminado para outra área (GLAZER; NIKAIDO, 1995; ALEXANDER, 1994a).

A seguir estão descritas algumas das principais técnicas de biorremediação (BAKER; HERSON, 1994) (Tabela 1):

**Tabela 1** -Tecnologias de tratamento de biorremediação (BAKER; HERSON, 1994)

<b>TÉCNICA</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
<b>Bioaumento</b>	Adição de culturas bacterianas ao meio contaminado; usada em biorreatores e em sistemas ex situ.
<b>Biofiltros</b>	Uso de colunas de suspensão microbiana para tratar de emissões de gases.
<b>Bioestímulo</b>	Estimulação dos micro-organismos pela adição de nutrientes. Pode se feita <i>in situ</i> ou <i>ex situ</i> .
<b>Biorreatores</b>	Biodegradação em um container ou reator para tratar líquidos ou lodo contaminados. O emprego de reatores biológicos vem surgindo como um passo decisivo na biodegradação de muitos compostos sólidos ou extremamente viscosos tidos, ainda hoje, como recalcitrantes e altamente poluentes.
<b>Bioventilação</b>	O oxigênio é fornecido por meio de uma rede de tubos através da injeção ou extração de ar, em fluxo lento, para aumentar a aeração e estimular a atividade microbiana. Utilizado no tratamento de solos contaminados.
<b>Compostagem</b>	Tratamento aeróbico, no qual o material contaminado é misturado; é feito usando pilhas estáticas ou reatores de alimentação contínua.

As principais vantagens da biorremediação segundo Baker; Herson (1994):

- Pode ser feita no local;
- Mantém ruptura mínima no sítio poluído;
- Eliminação de custos de transportes;
- Eliminação de poluentes de forma permanente;
- Elimina persistência prolongada de determinados poluentes.

As desvantagens segundo Smith (1996):

- Muitos compostos orgânicos são resistentes a biodegradação;
- Pode ser lenta, quando comparada com métodos físico-químicos de limpeza;

- Envolvem adição de nutrientes e dispersantes químicos, fontes de contaminação ambiental;
- Concentração tóxica do poluente e presença de metais pesados podem inibir a atividade microbiana.

A escolha do processo mais adequado depende do objetivo a ser alcançado, das características físico-químicas dos poluentes, condições ambientais, biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, equipamentos necessários e o custo econômico.

## **2.6. Biodegradação de Hidrocarbonetos por Fungos e Bactérias**

A biodegradação dos hidrocarbonetos é um processo de grande complexidade que depende da natureza e quantidade de hidrocarbonetos presentes no ambiente poluído (MUSAT e WIDDEL, 2008). A biodegradação de materiais orgânicos no ambiente é mediada geralmente por bactérias e fungos. As bactérias possuem diversas características metabólicas, sendo considerados micro-organismos de grande atividade degradadora. Entre as principais características estão: a variabilidade genética, crescimento rápido e facilidade para se aclimatar em diversos ambientes, sendo portanto, fundamentais na seleção de micro-organismos para uso em processos de biorremediação. Os fungos são considerados mais eficientes sob condições adversas de processo, como por exemplo, valores extremos de pH e baixo teor de umidade, e também não apresentam preferência quanto ao ataque ao poluente (TRINDADE, 2002). Condições adequadas de nutrientes, pH, oxigênio e temperatura durante o processo, permitem um melhor desempenho dos micro-organismos na biodegradação, o que levará a mineralização do poluente com a produção de CO<sub>2</sub> e água (FRANKENBERGER Jr, 1992; ATLAS; BARTHA, 1972).

## **2.7. Micro-organismos Degradadores**

A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo e derivados é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias, fungos e leveduras;

entretanto, algas e mesmo protozoários também possuem essa capacidade (ROSATO, 1997). Os micro-organismos são conhecidos por serem os principais agentes da biodegradação de hidrocarbonetos e quando estes são isolados de solos expostos a poluição adquirem mecanismos de biodegradação, ao contrário dos isolados de ambientes sem nenhum histórico de tal poluição (SAADOUM et al. 2008).

Inúmeros trabalhos e revisões sobre micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo foram produzidos nas últimas décadas. Stormer (1908) isolou uma bactéria *Bacillus hexabovorum*, que apresentou capacidade de crescer aerobiamente em meio contendo tolueno e xileno. Komagata e colaboradores (1964) isolaram 56 espécies de leveduras capazes de utilizarem hidrocarbonetos, em que a maioria pertencia ao gênero *Candida*. Floodgate (1984) listou 25 gêneros de bactérias e 27 de fungos isolados de ambientes marinhos e Ridgway e colaboradores (1990) isolaram aproximadamente 300 bactérias de poços subterrâneos com a capacidade de degradar compostos de gasolina. Araújo e colaboradores (2002) realizaram o isolamento e identificação de fungos filamentosos com capacidade de degradação do petróleo. A partir de um solo contaminado com petróleo foram obtidas 80 linhagens, das quais 60 apresentaram capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo.

Segundo Rosato (1997) os gêneros de bactérias e leveduras que apresentam potencialidade em degradar hidrocarbonetos, mais comumente encontrados em ambientes aquáticos são: *Pseudomonas*, *Acchromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. Os gêneros mais importantes de bactéria, tanto em ambiente terrestre como em ambiente marinho são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas* spp. e os corineformes. Entre os fungos degradadores, os mais encontrados em ambientes marinhos são: *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* spp. e os mais comuns no solo são: *Trichoderma* e *Mortierella* spp.

Alguns micro-organismos possuem a capacidade de degradar compostos recalcitrantes, e isto é consequência da evolução dos aparatos enzimáticos presentes nas células junto a uma enorme variedade de substâncias naturais de origens diversas. Os fungos vêm se mostrando hábeis em degradar compostos xenobióticos e outros de grandes cadeias moleculares que, em geral, são de difícil degradação. Os atributos que

distinguem os fungos filamentosos das outras formas microbianas determinam porque estes micro-organismos são bons biodegradadores (ALEXANDER, 1999).

O crescimento micelial confere uma vantagem sobre os micro-organismos unicelulares, bactérias e leveduras, especialmente no que concerne à colonização de substratos insolúveis. Os fungos filamentosos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o através da secreção de enzimas extracelulares, disponibilizando, desta forma, o acesso para o ataque bacteriano. Estes fungos, aparentemente, toleram maiores concentrações de produtos tóxicos no microambiente externo do que no seu interior. São capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como em meios com baixos valores de pH, por exemplo, e ainda suportar meios pobres em nutrientes (ANDRADE, 2009). Maciel et al. (2013) e Arruda (2011), relatam a potencialidade de *Penicillium* spp. em degradar compostos de querosene e óleo diesel respectivamente. Singh (2006) apud Soares e colaboradores (2011), em seu livro intitulado: “Mycoremediation: fungal bioremediation”, salientou que, por serem exímios biodegradadores de uma vasta variedade de compostos, os fungos são organismos promissores, que estão gerando cada vez mais resultados positivos para a recuperação de áreas degradadas por meio do processo de biorremediação.

Para a efetuação de processos de biorremediação é imprescindível a detecção da capacidade de biodegradação de derivados do petróleo por micro-organismos isolados de ambientes contaminados por este óleo. A cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) têm sido duas técnicas utilizadas por diversos autores para a análise de biodegradação de hidrocarbonetos (BARROS et al. 2005; TEIXEIRA; BENTO, 2007).

Os micro-organismos isoladamente podem metabolizar um número limitado de hidrocarbonetos, sendo necessária uma mistura de populações com capacidade enzimática ampliada para a degradação de misturas complexas de hidrocarbonetos (LEAHY e COLWELL, 1990; URURAHY, 1998). Essas associações de micro-organismos são chamadas de consórcios microbianos.

## **2.8. Consórcios Microbianos**

A biodegradação do petróleo em ambientes naturais ou em laboratório, não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído

por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum micro-organismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com micro-organismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo. A maior eficácia dos consórcios com relação às culturas puras é evidenciada, provavelmente, pela ocorrência do cometabolismo, fenômeno no qual, alguns micro-organismos são considerados primários, sendo responsáveis pelo ataque inicial ao poluente, produzindo compostos intermediários que serão em seguida assimilados por outros gêneros e espécies diferentes, denominados micro-organismos secundários. Nos últimos anos, diversas pesquisas começaram a se voltar ao estudo de tais consórcios, que têm demonstrado maior eficiência do que as culturas puras na degradação de poluentes do petróleo, podendo mineralizar totalmente estes compostos devido à complementaridade metabólica entre seus membros (CRAPEZ et al. 2002, VAN HAMME et al. 2003, TIBURTIUS et al. 2004, JACQUES et al. 2007, LEONEL et al. 2010, MELO 2011, SILVA 2012).

Essa complementaridade metabólica em consórcios microbianos é essencial para a degradação de alguns hidrocarbonetos, uma vez que estes podem apresentar toxicidade para certos micro-organismos e, em contrapartida, servir de fonte de carbono para outros. Assim, o metabolismo de compostos tóxicos por alguns microrganismos resistentes, gera subprodutos que serão utilizados por outras espécies como substrato de crescimento (VAN HAMME et al. 2003, TIBURTIUS et al. 2004). Mariano et al. 2008, afirmam que a estratégia baseada na utilização de consórcios é mais eficiente, pois mesmo culturas reconhecidamente capazes de degradar hidrocarbonetos podem falhar quando aplicadas isoladamente. Boonchan et al. (2000) constataram que a inoculação de consórcios microbianos pode melhorar significativamente a degradação de compostos tóxicos em solos contaminados. Maciel (2009), investigando o potencial de degradação de querosene, por duas leveduras e uma bactéria, isoladamente e em consórcio, verificou que as taxas de degradação do poluente foram maiores quando os micro-organismos estavam associados.

A interação entre diferentes micro-organismos, em condições de consórcio, como o cometabolismo ou antagonismo pode ser importante, e a biodegradação de compostos orgânicos tóxicos como hidrocarbonetos pelo consórcio poderiam ser diferentes das de uma única cultura (FERNANDEZ-SANCHEZ, 2001). Portanto, a

utilização de consórcios microbianos em processos de biorremediação, para obter-se um resultado mais eficiente, é aconselhável e viável, segundo os autores citados anteriormente.

## **2.9. Fatores que Influenciam a Biodegradação**

Diversos fatores ambientais que abrangem pH, temperatura, umidade, atividade de água, oxigênio dissolvido, nutrientes, fontes de carbono e energia e a presença de co-metabólitos influenciam a utilização de poluentes pelos micro-organismos (BOOPATHY 2000, VAN HAMME et al. 2003, JACQUES et al. 2007, SEO et al. 2009).

O pH é um fator que influencia no desenvolvimento dos micro-organismos, atuando como agente selecionador da microbiota. Em valores baixos, predominam fungos filamentosos e leveduras, enquanto em limites superiores, actinobactérias são favorecidas. As bactérias heterotróficas, em geral, preferem valores de pH próximos à neutralidade, que corresponde a faixa entre 6,0 e 8,0 (GOMES, 2004). No processo de degradação, é necessário que o pH seja compatível ao crescimento dos micro-organismos. Os valores de pH podem variar de acordo com o tipo de solo, estendendo-se desde 2,5 em solos ácidos a 11,0 em solos alcalinos (ATLAS, 1998c).

A temperatura influencia no processo de biodegradação pelo efeito que causa na natureza física e química da fonte oleosa, bem como pela alteração na população microbiana. Geralmente, em baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta, o que leva a um processo de biodegradação mais lento, devido à redução na atividade enzimática. O aumento da temperatura favorece a dissolução das substâncias, facilitando a assimilação destes compostos à ação microbiana. Temperaturas ideais para a biodegradação estão situadas na faixa entre 20° e 35° C (LEAHY; COLWELL, 1990).

Os micro-organismos necessitam de um suprimento adequado de água para a ocorrência de uma boa degradação do poluente. Geralmente, em solos contaminados com óleo cru, obtêm-se taxas ótimas de biodegradação quando o teor de umidade do solo está com o percentual entre 30% e 90% da capacidade de absorção de água do mesmo, porém, o valor ótimo de umidade depende das propriedades do solo e do poluente em questão (ALEXANDER, 1999b; SOHRABI; MOGHAREI, 1999).

O oxigênio é necessário para o processo de biodegradação, pois os passos iniciais no catabolismo dos hidrocarbonetos envolvem a oxidação dos mesmos por oxigenases (ATLAS, 1984a). No solo, a disponibilidade do oxigênio é dependente das taxas de consumo pelos microrganismos, do tipo de solo, da saturação do solo com água e da presença de outras substâncias que podem ser assimiladas, acarretando uma diminuição nos níveis de oxigênio (LEAHY; COLWELL, 1990).

O petróleo é composto principalmente de hidrocarbonetos que podem servir como fonte de carbono para o desenvolvimento de micro-organismos. No entanto, há a necessidade de outros nutrientes como, o nitrogênio e o fósforo que são requeridos em maior quantidade. O nitrogênio é indispensável à síntese protéica, um constituinte essencial às células, uma vez que é necessário a formação de aminoácidos e ácidos nucleicos, enquanto o fósforo é umas das peças-chave do mecanismo de acúmulo de energia a nível celular. As fontes de nitrogênio mais utilizadas nos protocolos de biorremediação são ureia, cloreto de amônio e nitrato de amônio. Há também uma demanda por micronutrientes, como: enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio. A disponibilidade desses elementos varia em diferentes ambientes e eles podem ser adicionados para estimular a biodegradação. No solo, o ajuste das relações C:N:P pode ser facilmente efetuado pela adição de fertilizantes, porém, em ambiente aquático, o ajuste dessas relações oferece maiores problemas, pois deve ser efetuado de forma criteriosa de modo a não ser dissipado na interface óleo-água (ROSATO, 1997).

E para minimizar as interferências provocadas por diversos fatores (pH, temperatura, oxigênio, nutrientes) nos processos de degradação de substâncias poluentes é possível observar que a exposição prévia de micro-organismos aos compostos orgânicos atuam como importante fator de favorecimento e melhor eficiência do consumo de tais poluentes por via microbiana, gerando um aumento nas taxas de biodegradação (URURAHY, 1998; GOMES, 2004). Portanto, antes de se iniciar o emprego de uma técnica biorremediadora, é necessário analisar e ajustar fatores como, pH, temperatura, quantidade de inóculo e nutrientes, entre outros, para que ocorra a efetividade do processo de biodegradação.

Além dos fatores mencionados, pode-se ainda citar, um importante fator biótico: a predação por protozoários. Alguns protozoários são predadores naturais de bactérias e muitas vezes, sua presença é inevitável em um ambiente que precisa ser biorremediado (RAMADAM et al. 1990).

### 3.0. Ecotoxicidade

Os ambientes contaminados por substâncias tóxicas, e posteriormente submetidos a alguma técnica de remediação necessitam ser analisados quanto à ecotoxicidade. Rosato (1997) afirma que os subprodutos formados durante o processo de degradação podem tornar-se mais tóxicos ou mutagênicos que o produto original, portanto, é necessário o monitoramento e avaliação do processo de biodegradação. Segundo Chapman (2002) os estudos ecotoxicológicos tem como objetivo analisar os efeitos de substâncias tóxicas nas comunidades naturais sob condições reais de poluição. Essa avaliação é feita através de testes específicos, com organismos padrão (plantas, sementes, crustáceos, microalgas, entre outros), selecionados de acordo com os seguintes critérios: ampla disponibilidade e importância em um grupo ecológico.

Entre estes métodos, encontra-se a fitotoxicidade que utiliza sementes como bioindicadores. As sementes são excelentes organismos para bioensaios porque, enquanto estiverem desidratadas, permanecem dormentes e podem ser armazenadas por longos períodos, sem perder a viabilidade. Contudo, uma vez reidratadas, entram no processo de germinação, durante o qual, sofrem mudanças fisiológicas, tornando-se altamente sensíveis ao estresse ambiental (RODRIGUES, 2003).

Estudos tem demonstrado espécies de feijão, pepino, couve, tomate, espinafre, repolho, agrião, alface e soja, como bons indicadores da toxicidade de determinados hidrocarbonetos (OECD, 1984; TIQUIA et al. 1996; GUNDERSSON et al. 1997; HELFRICH et al. 1998). Maciel et al. 2010 em ensaios de fitotoxicidade com fungos filamentosos, com querosene nas concentrações de 1% a 30%, utilizou sementes de *Brassica oleraceae* var. *capitata* (repolho-roxo). A fitotoxicidade destaca-se como uma das metodologias da ecotoxicidade, por ser cada vez mais empregada na avaliação de impactos causados por substâncias tóxicas em um ambiente e por apresentar vantagens como método simples, rápido e baixo custo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Fonte de Carbono

O óleo diesel foi utilizado como fonte de carbono neste trabalho. A amostra foi cedida pela Petrobrás Transporte S.A. – TRANSPETRO/SUAPE – Complexo Industrial Porto de Suape/Ipojuca – PE. (Anexo A).

#### 3.2. Micro-organismos Utilizados

Foram utilizadas três linhagens bacterianas *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides* e *Bacillus* sp. e seis linhagens fúngicas, sendo três leveduras registradas como L1, L3 e L24 e três fungos filamentosos *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium commune* e F9, isolados de uma área localizada na Região Portuária de Suape – PE. As culturas foram mantidas no banco de Culturas do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas – UFPE.

#### 3.3. Manutenção dos Micro-organismos

Para a manutenção das culturas fúngicas foram efetuados repiques mensais, em placas de Petri contendo meio sólido Ágar Sabouraud - SAB (15g de peptona, 40g de glicose, 15g de Agar para 1L de água destilada) e meio sólido Yeast Peptone Dextrose - YPD (10g de peptona, 10g de glicose, 10g de extrato de levedura e 15g de ágar para 1L de água destilada). Para as bactérias foi utilizado o meio sólido de Triplic Soy Agar – TSA (15g de tripticase, 5g de peptona, 5g de NaCl, 15g de ágar para 1L de água destilada). As culturas foram mantidas sob refrigeração (8° C) para ensaios posteriores.

#### 3.4. Seleção das Linhagens

Inicialmente as culturas foram submetidas a uma pré-seleção, empregando-se a metodologia de Hanson et al. (1993), adaptada por Gomes (2004), para investigação do potencial de degradação do petróleo e seus derivados. Para cada cultura foi utilizado um frasco de Erlenmeyer de 250 ml contendo 49,5 ml de meio mineral Bushnell Haas (BH), 0,5ml de óleo diesel e três blocos de gelose (8mm de diâmetro) do micro-organismo, além do controle biótico (meio BH, inóculo e glicose) e controle abiótico (meio BH e

óleo diesel). Após 12 horas de aclimação foi adicionado a cada frasco 0,02ml do indicador redox-2,6- diclorofenol-indofenol (DCPIP), que atua comoceptor final de elétrons. Se a cultura testada apresenta potencialidade em degradar a fonte oleosa, ocorre a mudança de coloração do meio de cultura de azul para incolor.

### **3.5. Teste de Antagonismo**

O teste de antagonismo foi realizado segundo (BAUER et al. 1966), utilizando-se placas de Petri contendo o meio Sabouraud para os fungos e TSA para as bactérias. Cada micro-organismo foi repicado em forma de tapete com o auxílio de “*swab*”, após seu crescimento foram retirados blocos de gelose e transferidos para placas contendo outro micro-organismo, os blocos foram posicionados de forma equidistante. Desse modo, cada cultura foi colocada frente à outra, para observação da formação de halo de inibição. As placas foram incubadas a uma temperatura de 30<sup>0</sup>C por 48 horas e a leitura foi realizada a cada 24 horas, considerou-se como inibição qualquer tamanho de halo produzido.

### **3.6. Teste das Culturas em Teores Crescentes da Fonte Oleosa**

Nesta etapa, as linhagens selecionadas passaram por um período de adaptação ao poluente, isoladamente e em consórcio. A aclimação foi realizada em frascos de Erlenmeyer (500mL), contendo o meio mineral Bushnell-Haas-BH (1g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,20g de MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0,05g de FeCl<sub>3</sub> e 0,02g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O para 1L de água destilada), 3 blocos de gelose (Ø 8mm) de cada cultura e concentrações crescentes de óleo diesel (1%, 4%, 7% e 10%) como fonte de carbono, totalizando um volume de 100mL. Inicialmente foi preparado um pré-inóculo em forma de tapete em placas de Petri, contendo meio de cultura apropriado e 1% óleo diesel, após 48h foram retirados 3 blocos de gelose (Ø 8mm) e transferidos para os frascos, que foram mantidos em condições estáticas por 48h, sob temperatura de 30<sup>0</sup> C. Em seguida, foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura específico e 4% de óleo diesel e incubadas por 48h. Este procedimento foi repetido para cada transferência da concentração do combustível. A aclimação é uma etapa de grande importância no processo de biodegradação, pois culturas expostas previamente a um determinado poluente apresentam maiores taxas de degradação.

De cada concentração foram retiradas alíquotas para avaliação do pH e biomassa pelo método de peso seco (g/L). Das concentrações de 1%, 4% e 10% foram retiradas amostras para avaliação da fitotoxicidade do material biodegradado seguindo o método de Tiquia et al. (1996). A quantificação da degradação por análise cromatográfica (CG-MS), foi realizada nas concentrações de 4% e 10%.

### **3.6.1. pH**

As medições de pH durante os experimentos foram realizadas utilizando o potenciômetro digital DIGIMED modelo DM-1.

### **3.6.2. Biomassa**

A biomassa foi avaliada através do método de peso seco, obtido pela diferença entre o peso final e o peso inicial, após filtrar 20mL do meio biodegradado. A amostra foi centrifugada, lavada com detergente para retirada do óleo, e em seguida filtrada em bomba a vácuo. A massa de células foi pesada em membrana filtrante de porosidade ( $\emptyset$ ) 0,22 $\mu$ m e ( $\emptyset$ ) 0,45 $\mu$ m para bactérias e fungos, respectivamente, para avaliação do crescimento microbiano por gravimetria (g/L).

### **3.6.3. Análise da Degradação dos Constituintes do Óleo Diesel**

Ao final dos ensaios empregando as concentrações de 4% e 10% de óleo diesel foi determinada a degradação do poluente por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM modelo SHIMADZU<sup>®</sup>), através do decaimento dos picos de concentração dos constituintes do óleo diesel em função da degradação. Inicialmente, as fases aquosas e oleosas das amostras foram separadas por três extrações consecutivas (líquido-líquido), com diclorometano em funis de separação e filtradas em papel de filtro. Foi utilizado sulfato de sódio anidro para total retirada da água residual, proveniente do processo de extração, e em seguida, as amostras foram injetadas no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectômetro de massa (CG-EM).

Nesse ensaio o cromatógrafo foi ajustado para a temperatura de injeção e de interface de 290°C, utilizando uma coluna cromatográfica OV-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) de dimensões 30  $\mu$ m x 0,25 $\mu$ m. O volume injetado foi de 1 $\mu$ L com

split de 1:98 e fluxo de gás hélio de 1 mL min<sup>-1</sup> e a temperatura programada para variar linearmente de 40°C a cada 4 minutos, a 290°C por 8 minutos com taxa de aquecimento de 4° C min<sup>-1</sup>. O espectrômetro de massa com ionização elétrica e detector do tipo Multiplicador secundário de Elétrons (70 EV) operou com uma temperatura da fonte de íons de 290°C e varredura de 35 a 500 m/z. A identificação dos hidrocarbonetos alifáticos foi realizada por comparação dos espectros de massa dos constituintes do querosene com os da Biblioteca de Compostos Wiley tm.

#### 3.6.4. Teste de Fitotoxicidade

Para avaliação do efeito tóxico do material biodegradado pelas linhagens selecionadas, foram realizados ensaios de fitotoxicidade de acordo com a metodologia de Tiquia et al. (1996). Nesses testes foram utilizadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio e água destilada. Dez sementes foram distribuídas de forma equidistantes em placas de Petri forradas com papel de filtro duplo esterilizados e impregnados com 5mL do líquido residual biodegradado. Paralelamente, foram empregadas placas controle contendo 5mL de água destilada esterilizada, além de uma placa contendo 5mL de óleo diesel. Estes ensaios foram realizados em triplicata, sob temperatura de 25° C por sete dias. Após esse período, foram avaliados os percentuais de germinação, crescimento da raiz e índice de germinação, de acordo com as equações abaixo:

$$\text{(Eq.1) Percentual de germinação (\% G)} = \frac{\text{Média de sementes testes germinadas}}{\text{Média de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

$$\text{(Eq.2) Crescimento da raiz (\% CR)} = \frac{\text{Média do crescimento da raiz das sementes}}{\text{Média do crescimento das raízes no controle}} \times 100$$

$$\text{(Eq.3) Índice de germinação (IG)} = \frac{(\text{Germinação da semente}) \times (\% \text{ Crescimento da raiz})}{100}$$

#### 3.7. Seleção do Consórcio

O consórcio microbiano misto foi formado com base nos resultados obtidos durante as aclimações das culturas isoladamente. Em seguida, foi submetido a uma

aclimação e posteriormente usado como inóculo em ensaios de um planejamento experimental.

### 3.8. Planejamento Experimental

Um planejamento fatorial completo  $2^3$ , formado por 11 ensaios, incluindo 3 repetições no ponto central, tendo como variáveis independentes a quantidade de inóculo, a temperatura e a concentração de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e como variáveis respostas o percentual de degradação e o índice de germinação foi delineado.

Os valores das variáveis independentes foram estabelecidos com base em ensaios preliminares realizados com as culturas isoladas, estes valores estão apresentados na Tabela 2. Foram utilizados frascos de Erlenmyer (250mL), contendo meios BH modificados, em que as relações de C:N foram de 50:1, 100:1 e 150:1, blocos de gelose/micro-organismos e a fonte oleosa. Os ensaios foram realizados durante oito dias, de forma estática. Ao final dos ensaios foram retiradas alíquotas para determinação da biodegradação por análise cromatográfica (CG-MS) e teste de fitotoxicidade. A análise estatística dos resultados do delineamento experimental foi realizada usando o software Statistica® 6.0.

**Tabela 2.** Níveis e valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial completo  $2^3$

Variáveis	Nível		
	-1	0	+1
Inóculo (blocos- Ø 8mm)	1	3	5
Temperatura	25 <sup>0</sup> C	30 <sup>0</sup> C	35 <sup>0</sup> C
Fonte de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ),	1,6362g/L (150:1)	2,4543 g/L (100:1)	4,908g/L (50:1)

Para efeito de cálculo da relação C:N na amostra, considerou-se a massa total de carbono determinada pela análise elementar do óleo diesel metropolitano. A amostra continha 85,9% de carbono; concentrações inferiores a 0,3% de nitrogênio e 13,1% de hidrogênio. A massa de nitrato de amônio a ser utilizada na composição do meio de cultivo que contém aproximadamente 35% de nitrogênio puro. Os ensaios foram realizados com meio mineral BH complementado com 10% de óleo diesel, no qual as massas de nitrato de amônio utilizadas foram de 4,9086g para se obter uma relação C:N

de 50:1; 2,4543g para a obtenção da relação de 100:1 e 1,6362 g de nitrato de amônio para a obtenção de uma relação de 150:1 para 1 litro de BH.

**Tabela 3.** Delineamento composto central (DCC)

	Temperatura	Inóculo	Fonte de N
1	-1(25)	-1 (1 bloco)	-1 (150:1)
2	1 (35)	-1 (1 bloco)	-1 (150:1)
3	-1(25)	1 (5 blocos)	-1(150:1)
4	1 (35)	1 (5 blocos)	-1(150:1)
5	-1(25)	-1 (1 bloco)	1 (50:1)
6	1 (35)	-1(1 bloco)	1 (50:1)
7	-1(25)	1(5 blocos)	1 (50:1)
8	1(35)	1(5 blocos)	1 (50:1)
9 (C)	0 (30)	0 (3 blocos)	0 (100:1)
10 (C)	0 (30)	0 (3 blocos)	0 (100:1)
11 (C)	0 (30)	0 (3 blocos)	0 (100:1)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Seleção dos Micro-organismos

Dentre os 9 micro-organismos testados pela técnica do indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol em frascos, observou-se que quatro deles (*Bacillus* sp., L3, L24 e *Penicillium aurantiogriseum*) apresentaram os melhores resultados, os quais promoveram a completa redução do indicador, em até 24 horas, como pode ser observado na Tabela 4. Os frascos do controle abiótico mantiveram-se sem alterações de coloração, como previsto.

Estes resultados foram semelhantes aos resultados obtidos por Silva (2012) que, empregando a técnica do indicador DCPIP para investigar o potencial de bactérias e fungos em degradar o óleo diesel, selecionou duas bactérias e dois fungos por promoverem a descoloração do meio de cultivo em até 24 horas e Melo (2011), que ao empregar a mesma técnica em ensaios com petróleo, selecionou quatro bactérias e três fungos filamentosos. Cavalcanti (2012), em ensaio de investigação da potencialidade de degradação de óleo diesel por uma levedura, utilizando o mesmo indicador, observou mudança de coloração após 12 horas.

**Tabela 4.** Tempo de viragem do indicador DCPIP após incubação.

LINHAGENS	TEMPO DE VIRAGEM (horas)
<i>Bacillus</i> sp.	14h
<i>Bacillus subtilis</i>	239h
<i>Bacillus mycoides</i>	261h
Levedura L24	30 min
Levedura L3	19h
Levedura L1	305h
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	17h
<i>Penicillium commune</i>	66h
Fungo F9	160h

Com base nos resultados obtidos do tempo de viragem do indicador, *Bacillus* sp., L3, L24 e *Penicillium aurantiogriseum* foram selecionados para os testes seguintes, juntamente com *Bacillus subtilis* e *Penicillium commune*. Enquanto *Bacillus mycoides*, L1 e o fungo F9 foram desprezados para os testes posteriores.

## 4.2. Teste de Antagonismo

Como pode ser observado na Tabela 5, todos os micro-organismos foram capazes de interagir entre si, com exceção da levedura L3, que formou halo de inibição (4mm de diâmetro) durante seu crescimento, quando colocada frente aos outros micro-organismos estudados, indicando que esta cultura produz substâncias antimicrobianas. Por este motivo, esta cultura foi desprezada para os ensaios posteriores.

**Tabela 5.** Teste de antagonismo entre as linhagens de micro-organismos

Linhagens	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Levedura L3	Levedura L24	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	<i>Penicillium commune</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	NR	-	+	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp	-	NR	+	-	-	-
Levedura L3	-	-	NR	-	-	-
Levedura L24	-	-	+	NR	-	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	+	-	NR	-
<i>Penicillium commune</i>	-	-	+	-	-	NR

(+) Com halos de inibição

(-) Sem halos de inibição

(NR) Não realizado

## 4.3 Teste das Culturas em Teores Crescentes da Fonte Oleosa

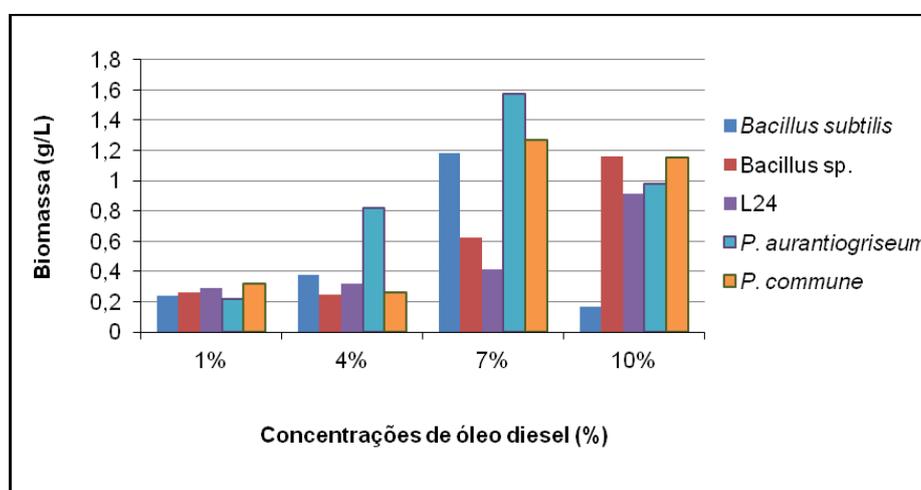
### 4.3.1 Biomassa

Todos as culturas foram capazes de produzir biomassa em todas as concentrações testadas, sugerindo que os micro-organismos assimilaram constituintes do óleo diesel, uma vez que este petroderivado era a única fonte de carbono no meio de cultura (Figura 1), com destaque para *P. aurantiogriseum* que produziu aproximadamente 1,6 g/L de biomassa, seguido do *P. commune* com 1,2 g/L, ambos em

7% de fonte oleosa. Silva e Rondon (2013) em um estudo de biorremediação de ambiente contaminado por óleo diesel, entre outros contaminantes, constataram que o fungo utilizado no experimento foi capaz de produzir biomassa nos 30 dias de experimento, em ambiente poluído por este petroderivado.

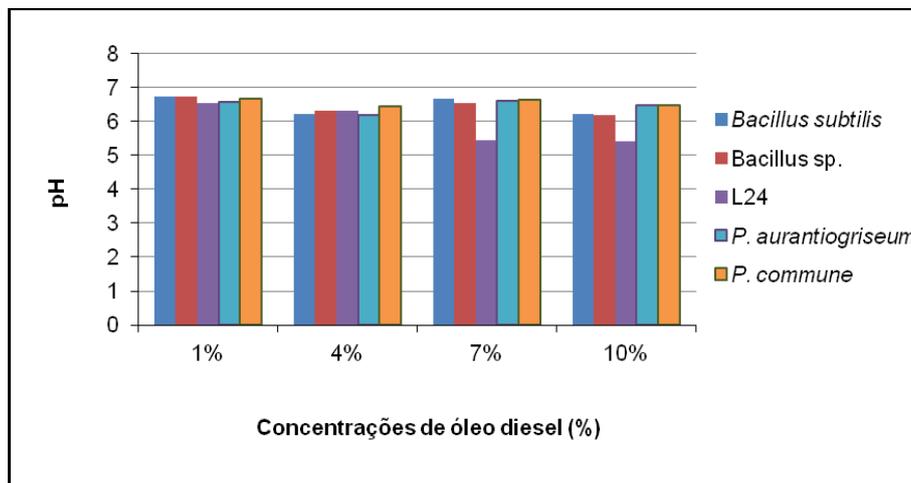
De acordo com Passos et al. (2009) e Kataoka (2001), a biodegradação ocorre de forma mais eficaz quando os micro-organismos envolvidos neste processo são submetidos previamente a uma fase de adaptação ao poluente, aumentando a taxa de degradação e tolerância ao mesmo.

**Figura 1.** Valores de biomassa obtidos após ensaios de aclimação



#### 4.3.2 pH

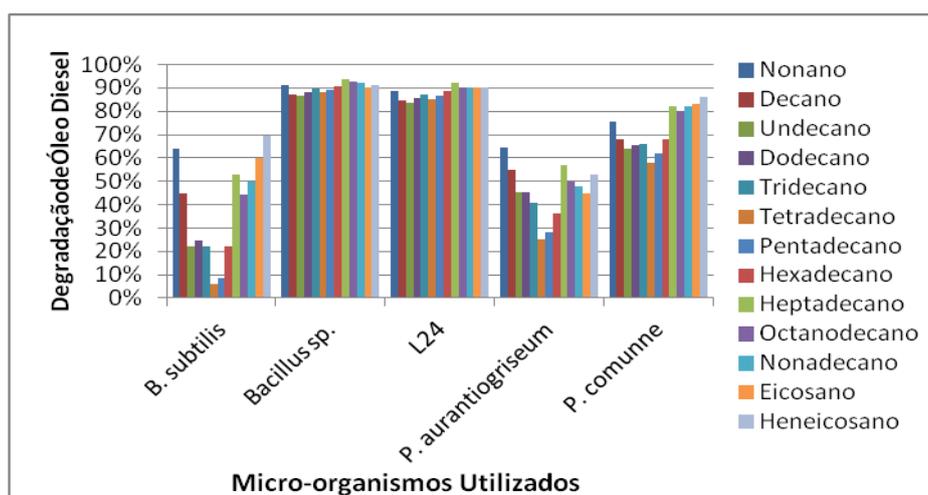
Os valores de pH mantiveram-se na faixa entre 6,0 e 7,0, durante todo o ensaio, apenas o meio com a levedura L24 mostrou-se levemente ácido (Figura 2). De acordo com Pereira Jr. (2009) e Leahy e Colwell (1990), a faixa de pH mais favorável ao crescimento da maioria dos micro-organismos envolvidos em processos de biodegradação situa-se entre 6,0 e 8,0, sendo os fungos mais tolerantes a condições ácidas. Segundo Rao (2005) e Aislabie et al. (2006) sugerem que a acidez pode ser justificada pela produção de ácidos orgânicos e maior atividade microbiana, indicativos indiretos da biodegradação.

**Figura 2.** Valores de pH obtidos após ensaios de aclimação

#### 4.3.3 Percentual de Degradação do Óleo Diesel 4%

Na Figura 3 observa-se que todos os micro-organismos testados foram capazes de degradar hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel, na concentração de 4%. Dentre as bactérias, *Bacillus sp.* apresentou os maiores percentuais de degradação com uma média 90%. Com relação aos fungos, a levedura L24 apresentou a maior taxa de degradação, aproximadamente 90%, seguido do *P. commune*, que apresentou percentuais de degradação entre 60% e 80%, indicando que estes micro-organismos apresentam grande potencialidade em degradar constituintes do óleo diesel. De acordo com April et al., (2000) experimentos de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, que compõem o petróleo e seus derivados, tem demonstrado que os fungos degradam mais facilmente os compostos alifáticos e com menor eficiência a fração aromática, por ser a fração mais recalcitrante. Resultados similares foram obtidos por Souza (2008), que aclimatando fungos em 24% de óleo diesel verificou uma redução de 70% a 80% para os hidrocarbonetos alifáticos e Miranda (2007) utilizando leveduras em processos de degradação de óleo diesel na concentração de 12%, obteve valores de degradação entre 21,4% e 93%. Enquanto Deon et al. (2012), em ensaios de biorremediação por bactérias de solo contaminado com 10% óleo diesel, obteve taxas de redução deste poluente, entre 7% e 18%.

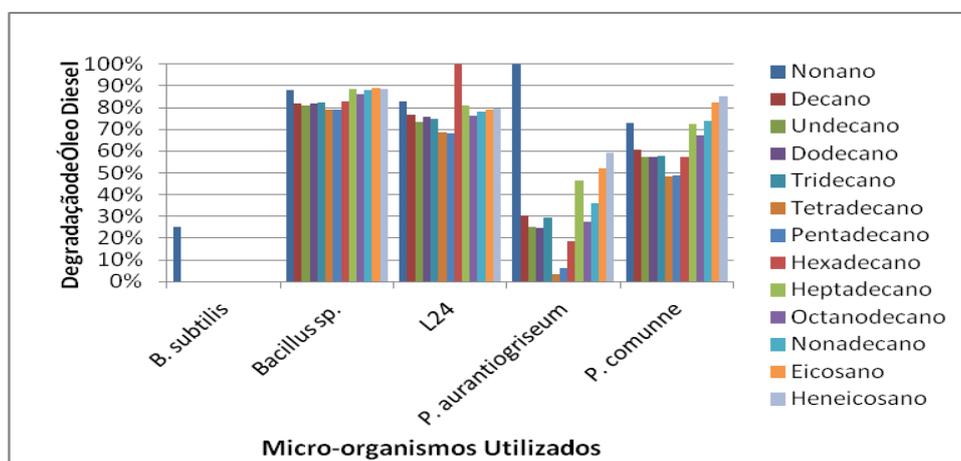
**Figura 3.** Valores de degradação obtidos após ensaios de aclimatação em 4% de óleo diesel



#### 4.3.4 Percentual de Degradação do Óleo Diesel 10%

Nesta concentração do poluente, com exceção da bactéria *Bacillus subtilis*, todas as culturas degradaram compostos alifáticos do óleo diesel, como mostra a Figura 4. Neste ensaio, novamente as linhagens que se destacaram por apresentarem os maiores percentuais de degradação, foram a bactéria *Bacillus sp.* e a levedura L24, apresentando taxas entre 70% e 100%. Melo (2011) investigando o potencial de degradação do petróleo na concentração de 10%, por uma bactéria e um fungo filamentoso, observou percentuais de degradação de 32,43% e 66,05% respectivamente. Villela et al. (2008) em ensaios de biodegradação de óleo diesel a 12%, utilizando uma bactéria, observou taxas de degradação superiores a 70% para vários compostos deste poluente.

**Figura 4.** Valores de degradação obtidos após ensaios de aclimatação em 10% de óleo diesel

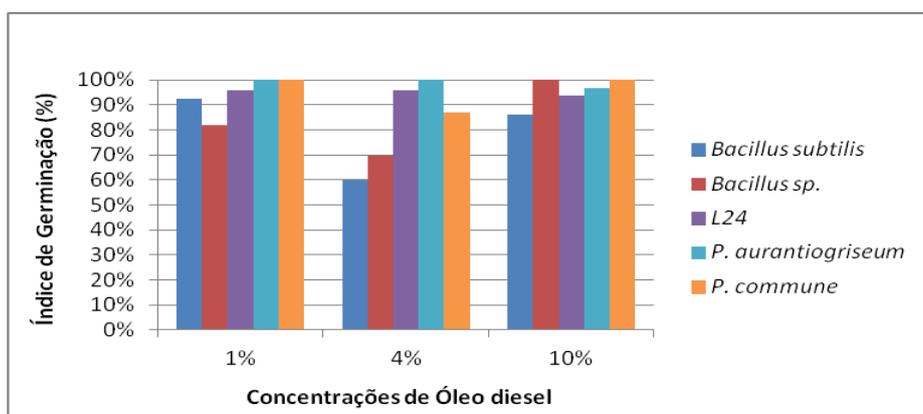


### 4.3.5 Fitotoxicidade

Ao final dos ensaios de aclimação nas concentrações 1%, 4% e 10% de óleo diesel, foram realizados testes de fitotoxicidade, e estes revelaram índices de germinação entre 60% e 100%, indicando que os micro-organismos além de serem capazes de degradar o óleo diesel, também reduziram sua toxicidade (Figura 5). Nas concentrações de 1% e 4%, os resultados demonstram que o fungo *P. aurantiogriseum* reduziu a toxicidade do óleo diesel em 100%, bem como o fungo *P. commune* nas concentrações de 1% e 10% do óleo diesel. Também foi observado que a levedura L24 apresentou índices de germinação superiores a 90% nas três concentrações analisadas e que a bactéria *Bacillus* sp. apresentou valores entre 70% e 100%. Estes resultados foram semelhantes aos de Cruz (2009), que em ensaios de fitotoxicidade do material residual de óleo diesel e gasolina biodegradados por uma levedura, verificou índices de germinação de 100%.

Maciel et al. (2010) analisando a fitotoxicidade do material residual proveniente da degradação do querosene por uma espécie de *Penicillium*, também observaram índices de germinação de 100%, indicando que este fungo reduziu significadamente a toxicidade do querosene. Segundo Tiquia et al. (1996) quando o índice de germinação é superior a 80%, é um indício que a toxicidade do composto diminuiu significativamente.

**Figura 5.** Índices de germinação obtidos após ensaios de aclimação



#### 4.4 Seleção do Consórcio

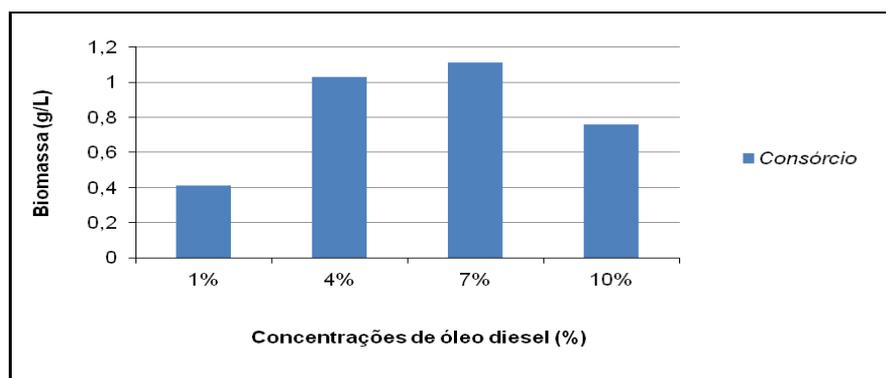
Com base nos resultados de pH, biomassa, degradação e fitotoxicidade, obtidos durante ensaios de aclimatação com as culturas isoladas, três micro-organismos foram selecionados para a formação do consórcio misto: a bactéria *Bacillus* sp., a levedura L24 e o fungo filamentosso *Penicillium commune*. Este consórcio foi submetido a uma aclimatação e posteriormente usado como inóculo de um planejamento experimental, para a obtenção das melhores condições nutricionais e físico-químicas a serem empregadas em processos de biorremediação.

#### 4.5. Teste do Consórcio em teores Crescentes da Fonte Oleosa

##### 4.5.1 Biomassa

Os resultados mostraram que o consórcio produziu biomassa mesmo com o aumento das concentrações de óleo de até 7%. Na concentração de 10% de óleo diesel os valores de biomassa decresceram (Figura 6). Gomes (2004), Melo (2005) e Santos (2009), trabalhando com petroderivados, utilizando consórcios microbianos em frascos agitados, observaram comportamento semelhante em relação ao perfil de biomassa. Inicialmente ocorreu uma quantificação crescente e em seguida, essa quantificação decresceu. Goldstein et al. (1985) atribuem o declínio de biomassa à formação de metabólitos tóxicos, esgotamento de nutrientes ou a oxigenação superficial em frascos deixou de ser eficaz. Cruz et al. (2010) sugerem que as oscilações nos valores de biomassa em ensaios de degradação devem-se provavelmente a um período de adaptação às condições adversas, já que a fonte oleosa apresenta toxicidade e à produção de metabólitos ácidos.

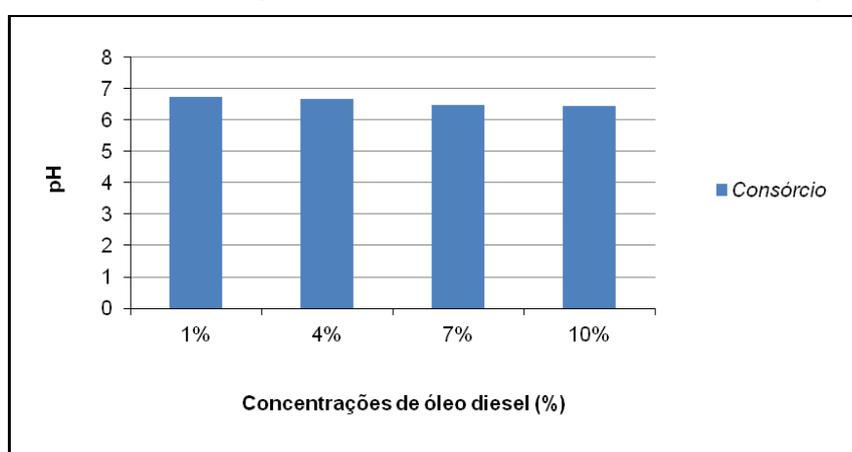
**Figura 6.** Valores de biomassa do consórcio obtidos durante ensaio de aclimatação



### 4.5.2 pH

A Figura 7 mostra que os valores de pH avaliados durante a aclimação do consórcio, mantiveram-se próximos a neutralidade, entre 6,0 e 7,0 ao longo de todo o experimento. Mariano (2006), trabalhando com biorremediação de óleo diesel, utilizando bactérias e consórcios bacterianos de culturas obtidas de solo e água subterrânea, observou que o pH manteve-se neutro em todos os tratamentos.

**Figura 7.** Valores de pH do consórcio obtidos durante ensaio de aclimação

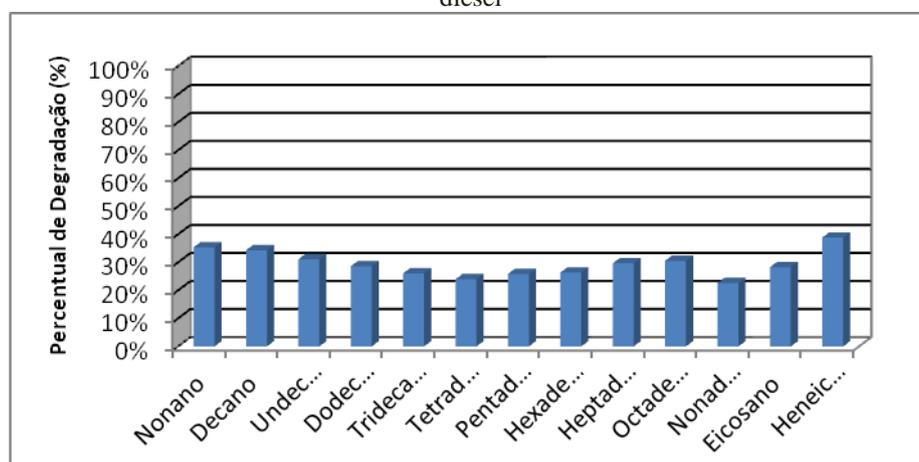


### 4.5.3 Percentual de Degradação do Óleo Diesel a 4% e 10%

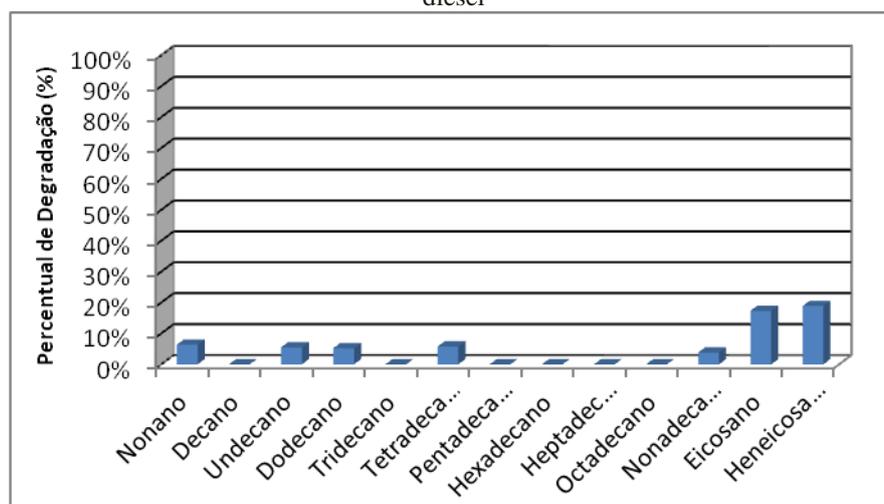
Na Figura 8 pode-se observar que os micro-organismos associados apresentaram valores de degradação do óleo diesel inferiores a 40%, em 4% do referido petroderivado. E na concentração de 10%, ao final do experimento, os percentuais de degradação foram inferiores a 20% (Figura 9), diferindo dos resultados de degradação obtidos por estas culturas isoladas. Cruz (2012), obteve resultados semelhantes, utilizando um consórcio misto em ensaios de degradação de querosene em concentrações de 4% e 10%, verificando percentuais de degradação inferiores a 5%. Assim como, Arruda (2011) em ensaios de degradação de óleo diesel, utilizando *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus* e *Cunninghamella echinulata* observou que estes interagiram no teste de antagonismo, porém quando utilizados em consórcio diante da fonte oleosa e em outras condições de cultivo suas interações não foram tão eficientes no processo de degradação. Estes resultados sugerem que houve uma possível

competição por nutrientes entre estes micro-organismos, reduzindo assim, o potencial de degradação destas culturas, em consórcio.

**Figura 8.** Valores de degradação do consórcio obtidos durante ensaio de aclimação em 4% de óleo diesel



**Figura 9.** Valores de degradação do consórcio obtidos durante ensaio de aclimação em 10% de óleo diesel



#### 4.5.4. Fitotoxicidade

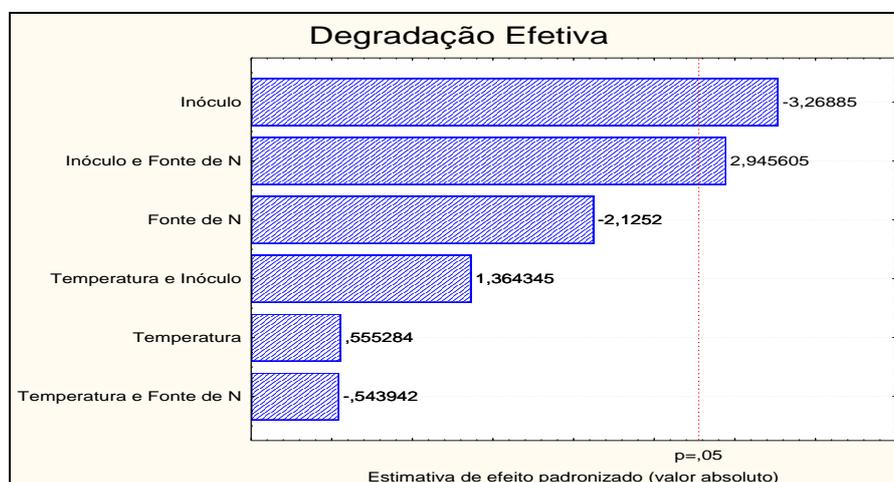
Os resultados dos ensaios de fitotoxicidade apresentaram índices de germinação superiores a 70% em todas as concentrações testadas, com destaque na concentração de 10% do óleo diesel, a qual o consórcio reduziu em aproximadamente 90% a toxicidade deste petroderivado (Figura 10). De acordo com Melo (2004) os compostos presentes no meio biodegradado são potenciais influenciadores do desenvolvimento das raízes,



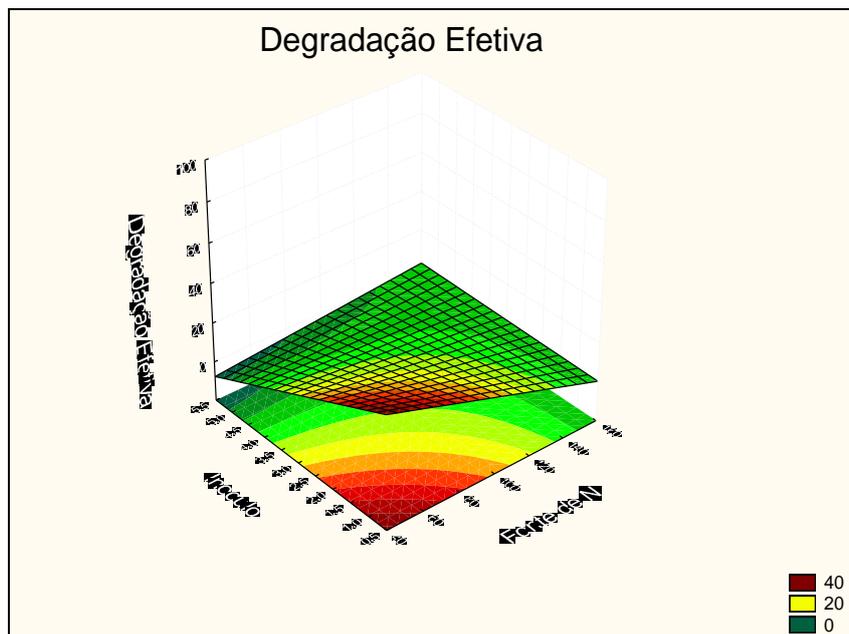
#### 4.6.2 Diagrama de Pareto

Observando as Figuras 12 e 13, pode-se confirmar que a quantidade do inóculo, bem como a interação entre esta e a concentração de nitrogênio, foram as variáveis independentes que exerceram influência estatisticamente significativa 95% ( $p=0,5$ ). O aumento do número de blocos de gelose usado como inóculo (ou seja, a concentração celular) exerceu efeito negativo, porém a interação do inóculo com a fonte de nitrogênio exerceu um efeito positivo sobre o percentual de degradação de óleo diesel. Observou-se também que a temperatura isoladamente e a interação desta com a concentração celular não exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre a biodegradação. Segundo Barros-Neto et al. (1995) nem sempre todas as variáveis analisadas apresentam influência significativa com relação as variáveis de resposta, desta forma é necessário fazer uma triagem e descarte das variáveis não significativas visando a racionalização do experimento. Estes resultados estão de acordo com Silva (2012) que, utilizando um consórcio misto em ensaios de degradação de óleo diesel a 10%, observou que as maiores taxas de degradação ocorreram no meio BH em que a relação de C:N era de 50:1 e Silva (2008) realizando ensaios de bioestímulo na degradação de óleo diesel por leveduras, também obteve os maiores percentuais de degradação quando foi empregada a relação C:N de 50:1. Xia et al. (2006) e Maciel et al. (2013) ressaltam a importância da adição de nitrogênio ao crescimento microbiano e investigação das relações nutricionais ideais para cada micro-organismo, estando estas relacionadas ao aumento da degradação de hidrocarbonetos.

**Figura 12.** Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial  $2^3$ , tendo como variável de resposta a degradação do óleo diesel



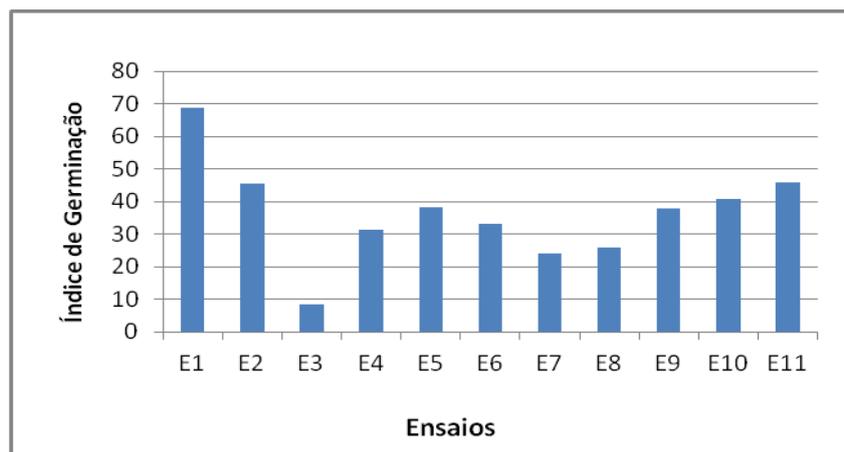
**Figura 13.** Gráfico de superfície de resposta: interação entre o inoculo e a fonte de N.



#### 4.6.3 Teste de Fitotoxicidade do Planejamento Experimental

Os resultados dos ensaios de fitotoxicidade do planejamento experimental mostraram que o consórcio reduziu parcialmente a toxicidade do óleo diesel em todas as condições testadas, com destaque para o ensaio E1 que apresentou o maior índice de germinação: 67,5% (Figura 14). Segundo Rivera-Cruz; Trijillo-Narcia (2004), a inibição da germinação de sementes e a redução do crescimento vegetal são indicadores da toxicidade dos hidrocarbonetos. De acordo com Maranhão et al. (2006) e Bona et al. (2011), espécies vegetais expostas à poluição por petroderivados apresentam alterações estruturais e funcionais durante o desenvolvimento.

**Figura 14.** Índices de germinação do consórcio obtidos durante planejamento experimental



## 5. CONCLUSÕES

- ❖ Todos os micro-organismos testados isoladamente são capazes de degradar constituintes do óleo diesel e reduzir significadamente sua toxicidade nas concentrações ensaiadas;
- ❖ *Penicillium commune*, *Bacillus* sp. e a levedura L24, apresentaram maior potencialidade em degradar o óleo diesel;
- ❖ Foi observado que a quantidade de inóculo e a relação C:N são os fatores que influenciam no processo de degradação do óleo diesel pelo consórcio. O acréscimo da relação C:N é favorável a este processo, enquanto o aumento da quantidade de inóculo influencia negativamente a biodegradação;
- ❖ *Bacillus* sp., L24 e *P. commune* não produzem substâncias tóxicas e apresentaram maiores índices de degradação do óleo diesel isoladamente do que em consórcio, mostrando-se promissores em processos de biorremediação de ambientes poluídos por óleo diesel.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahearn, D. G.; Meyers, S. P.; Standard, P. G. 1971. The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. *Developments in Industrial Microbiology*, v. 12, p. 126-134.
- Aislabie, J.; Saul, D. J.; Foght, J. M. 2006. Biorremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10, 171-179.
- Alexander, M. Environmental effects. 1994 *In:\_\_\_\_\_*. Biodegradation and Biorremediation. 2 ed. New York: *Academic Press*. Cap.14, p.269-298.
- Alexander, M. 1999. Effect of chemical structures on biodegradation. *In:\_\_\_\_\_*. Biodegradation and Biorremediation. 2 ed. New York: *Academic Press*. Cap.11, p.177-194.
- Amellal, N.; Portal, J., m.; Berthelin, J. 2001: Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry*. V. 16, p. 1611-1619.
- Andrade E, D. M. 2008. Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental na área de Poluição Atmosférica) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- Araujo, F. S.M.; Lemos, J. L. S. 2002. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. In: X Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral-CETEM/MCT.
- Arruda, F.V.F. 2011. Degradação de óleo Diesel por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*. Dissertação (mestrado) Pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco.
- Atlas, R. M.; Batha, R. 1972: *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. Menlo Park, California. Benjamin/Cumins Publishing Company.
- Atlas, R. M. 1998. Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of spill. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 52, p. 149-156.
- Baird, C. 2002. *Química Ambiental*. Tradução de M. A. L. Recio e L. C. M. Carrera.
- Baker, K. H.; S. Herson.1994. *Bioremediation*. New York. McGraw-Hill, inc. 375p.
- Barros-Neto, B. de, Scarminio, I.S., Bruns, R. E. 1995. Planejamento e otimização de experimentos. 2ª ed. Editora da UNICAMP.

- Baur, A. M.; Kirby, M. N.; Sherris, J.C.;Turck, M.B. 1966. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, Philadelphia, v.45, p.493-496.
- Bento, F. M. et al. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology, v. 96, p. 1049-1055.
- Bona,C.; Silva. B.Y.M.; Rezende, Y.M.; Santos, G.O.; Souza, L.A.; Inckot, K.C. 2011. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (*Euphorbiaceae*) e *Schinus terebinthifolius* (*Anacardiaceae*). Acta Botanica Brasilica 25 (2): 277.285.
- Boonchan, S.; Britz, M.L.; Stanley, G.A., 2000. Degradation and mineralisation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Applied and Environmental Microbiology 66, 10.
- Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology. v.74, p. 63, 2000.
- Brito, G. C. B.; Souza, D. B.; Vasconcelos, F. C. W.; Braga, L. C. 2010. A importância da bioprospecção de micro-organismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente. v.3, n.3, p. 291-310.
- Burns, K. A.; Codi, S.; Duke, N. C. Gladstone, 2000 Austrália fields studies: weathering and degradation of hydrocarbon in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol. Marine Pollution Bulletin, v.41, n.712, p. 395-40.
- Cavalcanti, R.F.N. 2012. Abordagem proteômica de *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 na biodegradação de combustíveis derivados de petróleo. Monografia da graduação em Ciências Biológicas. UFPE. Recife – PE.
- Chapman, P. M. 2002. Integrating toxicology and ecology; putting the “eco” into ecotoxicology. Marine Pollution Bulletin. p. 44; -15.
- Corseuil, H. X.; Hunt, R. S.; Santos, R. C. F.1997. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTEX biodegradation. Water Research. V.32 p. 2065 – 2072.
- Costa, F. S.; Silva, J. R. R.; Santos, R. C. M. M.; Farias, C. B. B.; Sarrubo, L. A.; Jordão, R. C. C.; Salgueiro, A. A. 2007. Obtenção de consórcio microbiano a partir de amostra de petróleo. Ciência & Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, ano 1, n. 1.
- Crapez, M.A.C.; Borges, A.L.N.; Bispo, M.G.S. & Pereira, D.C. 2002. Biorremediação: Tratamento para Derrames de Petróleo. Ciência Hoje. V.30, p. 32-37.

- Cruz, G. G. 2012. Degradação de Querosene por Consórcio Microbiano. Dissertação de Mestrado. UFPE – Recife.
- Cruz, G.G. 2009. Degradação de gasolina, óleo Diesel e querosene por *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845. Monografia da graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Cruz, G.G.; Villela, A. L.S.; Silva, D.P.S.; Santos, B.R.T.; Maciel, J.M.; Silva, P.A.; Sousa, M.F.V.Q. 2010. Estudo comparativo da degradação de petróleo por consórcios bacterianos. Cobeq. Foz do Inguaçú – PR.
- Cunha, C. D. 2008. Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. Rio de Janeiro, RJ: CETEM/MCT.
- Dellile, D.; Basséras, A.; Dessommes, A.; Rosiers, C. 1998. Influence of daylight on potential biodegradation of diesel and crude oil in antarctic seawater. Marine Environmental Research, v.45, n.3, p.249-258.
- Deon, M.C.; Rossi, A.; Magro, C.D.; Reinehr, C.O.; Colla, L.M. 2012. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através da bioestimulação e atenuação natural. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina. V.33, n.1, p.73-82.
- Fernando-Sanchez, J.M.; Ruiz- Aguiar, G. M.L.; Kane, S.R.; Kim, D.; Alvarez, P.J.J. 2001. Biodegradation in aged contaminated soil: interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. Science and Health, v.9 p. 105-114.
- Floogate, G. D. The fate of petroleum in marine ecosystem. In: ATLAS, R. M. Petroleum Microbiology. New York: MacMillan, 1984. p. 355-397.
- Frankenberguer Jr., W.T. 1992: The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In: Hydrocarbon contaminated soils and groundwater. Boca Raton. E.J. Calabrese and P.T. Kosteki eds. p. 237-293.
- Gallego, J. L. R.; Loredó, J.; Llamas, J. F.; Vásquez, F.; Sánchez, J. 2007. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. Biodegradation, v.12, p.325-335.
- Glazer, A.N.; Nikaido, H. 1995. Microbial Biotechnology: Fundamentals Applied Microbiology. New York: W. H Freeman and Company.
- Goldstein, R. M.; Mallory, L. M.; Alexander, M. 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. Applied and Environmental Microbiology 50, 977-983.
- Gomes, E. B. 2004. Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário de Suape – PE. Dissertação de Mestrado – UFPE – Recife.

- Gomes, U. V. R. 2011. Tratamento microbiológico sequencial de solo proveniente de unidade de dessorção térmica. Tese de Doutorado. UFPE. Recife – PE.
- Gundersson, C. A.; Kostuk, J. M.; Mitcell, H. G.; Napolitano, G. E.; Wicker, L. F.; Richmond, J. E.; Sterwart, A. J. 1997. Multispecies toxicity assessment of compost produced in bioremediation of an explosives-contaminated sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v.16, p.2529-2537.
- Hanson, K. G.; Desai, J. D.; Desai, A. J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganism. *Biotechnology Technique* 7, 10, p.745-748.
- Helfrich, P.; Chefetz, B.; Hadar, Y.; Chen, Y.; Schnabl, H. A novel method for determining phytotoxicity in compost. *Compost Science and Utilization*. v.6, p.6-13, 1998.
- Jacques, J. S.; Bento, F. M.; Antonioli, Z. I.; Camargo, F. A. O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n.4, p.1192-1201, julho-agosto.
- Kabbur, M. B., Rogeras, J. V., Gunasekar, P. G., Garret, C. M., Geiss, K. T., Brinkley, W. W., Mcdougal, V. 2001. Effect of JP-8 jet fuel on molecular and histological parameter related to acute skin irritation. *Toxicology and applied pharmacology*. V. 175, p.83-88.
- Kanikkannan, N.; Locke, B. R.; Singh, M. 2001: Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). *Toxicology*. v.161, p.1-11.
- Kanikkannan, N.; Locke, B. R.; Singh, M. 2002: Effect of Jet Fuels on the skin morphology and irritation in hairless rats. *Toxicology*. v.175, p.37-47.
- Kataoka, A. P. A. G. 2001. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por micro-organismos isolados de “landfarming”. Tese (Doutorado)– Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro.
- Komagata. K. T. 1964. Assimilation of hydrocarbons by yeasts: preliminary screening. *Journal of General Microbiology*, v. 10, p. 313-321.
- Kowalick, W. W., JR. 199. Removing impediments to the use of bioremediation and other innovative technologies *in: Environmental Biotechnology for waste Treatment*. New York. G. S. Sayler, R. Fox, and J. W. Blackburns editors. *Plenum Press*, p. 53-60.
- Leahy, J. G. e Colweel, R. R. 1990. “ Microbial degradation of hydrocarbons in the environment”. *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315.
- Leonel, L. V.; Nascimento, E.G.; Bertozzi, J.; Bôas, L.A.V.; Bôas, G.T.V. 2010. Biorremediação do solo. *Terra e Cultura – nº 51 - Ano 26* .

- Luz, C.C.; Brucha, G.; Reis, M. M.; Reis, M.G. 2010. Estudo de biorremediação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia. *Química Nova*, vol.XI, n.0, p.1-5.
- Maciel, C.C.S. ; Souza, C.S.; Silva, R.; Villela, A.L.S.; Souza, M.F.V.Q.; Gusmão, N.B.2010. Degradação de querosene de aviação por *Penicillium* spp. *Diálogos &Ciência*, ano IV, no 14.
- Maciel, C.C.S. ; Souza, C.S.; Silva, P.A.; Souza, M.F.V.Q.; Gusmão, N.B. 2013. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.11, n.1, p.39-42.
- Maciel, J. M. 2009. Biodegradação de querosene por culturas isoladas e em consórcio, aplicando a técnica de bioestimulação. Monografia da graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Maranho, L. T.; Galvão, F.; Preussler, K. H.; Muniz, G.I. B.; Kunioshi, Y.S. 2006 Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. *Acta bot. Brás.*, v.20, p.615-624.
- Mariano, A. P. 2006. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 162p. Tese (Doutorado em Geociências e Ciências Exatas) - Universidade Estadual Paulista.
- Mariano, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D.F. Pirôllo, M.P. S., Continiero, J. 2008. Use of weathered diesel oil as low-cost raw material for biosurfactante Production, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 25(02):269-274.
- Mathew, M. et al. 2006. Bioremediation of 6% diesel-contaminated Mainland soil in Singapore; comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Engineering Life Science*, v. 6, n. 1, p. 63-67.
- Melo, E. J. V. 2005; Biodegradabilidade de naftaleno por Linhagens de Bactérias isoladas do terminal portuário de Suape- PE.
- Melo, E. J. V. 2011. Degradação de petróleo por cultura mista de fungos e bactérias. Dissertação (mestrado)-Pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco.
- Miranda, R.C.; Souza, C.S.; Gomes, E.B.G.; Lovaglio, R.B.; Lopes, C.E.; Sousa, M.F.V.Q., 2007. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape port in the state of Pernambuco - Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50, 147-152.
- Musat, F. and Widdel, F. 2008. Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype. *Environmental Microbiology*, 10: 10-19.

- Nakagama, L. E.; Andrea, M. M. 2006. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v. 30, p. 575-582.
- Passos, C.T., Burkert, J. F. M, Kalil, S.J., Burkert, C.A.V. 2009. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do Sul do Brasil. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 4, 950-954.
- Pedrotti, G. I. 2007. Ensaio de Biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos – ES. Dissertação de Mestrado – Vitória.
- Pereira Jr., N.; Gomes, E. B.; Soriano, A. U. 2009. Biodegradação de hidrocarbonetos. Rio de Janeiro: Escola de Química/ UFRJ.
- PETROBRÁS. Disponível em [www.br.com.br](http://www.br.com.br). Acessado em 02 de janeiro de 2009.
- Ramadam, M. A.; EL-Tayer, O. M. E Alexander, M 1990. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*. V.56, p.1392-1396.
- Rao, K.R.; Rashmi, K.; Latha, J.N.L.; Mohan, P.M., 2005. Bioremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waste. *Indian Journal of Biotechnology* 4, 139-143.
- Ridgwai, H. et al. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 3565–3575.
- Rivera-Cruz, M. C.; Trujillo-Narcía, A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal em suelos com petróleos nuevo e intemperizado. *Interciência*. v. 29, p. 369-376.
- Rodrigues, M. T. T.2003. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes toxicos ambientales. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. v.41, n.3, p.2-3.
- Rosato, Y.B. 1997 Biodegradação do Petróleo. In: MELO I.S & AZEVEDO, J.L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cap.14, p.307-334.
- Saaddoum, I. et al.2008. Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia region). *Braz. J. Microbiol* 39, pp. 453-456.
- Santos, B. R. T. 2009. Degradação de petróleo por micro-organismos consorciados: uma contribuição à remediação de locais contaminados. Monografia de Graduação de Ciências Biológicas/Ciências Ambientais. UFPE. Recife - PE.
- Semple, K. T.; Reid, B. J.; Fermor, T. R. 2001. Impact of contamination strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Rev. Envir. Pollut.*, v. 112, p. 269-283.

- Seo, J.; Keyn, Y.; LI, Q. X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. v.6, p.278- 309.
- Shreve, R. N.; Brink Jr., J. A. Produtos carboquímicos e refinação do petróleo. *In: Indústrias de Processos Químicos*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1977, p. 59-71 e 583-614 *apud* MOREIRA, V. S. F. D. Biodegradação de Naftaleno, 1999.
- Silva, D.S. P. 2012. Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído. Dissertação de Mestrado. UFPE. Recife – PE.
- Silva, M.B.; Rondon, J.S. 2013. Utilização de fungo de bambu na biorremediação de solo contaminado. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, vol. 10, n.10, p.2175-2184.
- Singh, Harbhajan. 2006. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. New Jersey: John Wiley & Sons, 592p.
- Smith, J. E. 1996. *Environmental Biotechnology*, 3 ed. England: Ed. Cambridge University Press, 236p.
- Soares, I.A.; Flores, A.C.; Mendonça, M. M.; Barcelos, R.P.; Baroni.S. 2011. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.78, n.2, p.341-350.
- Sohrabi, M. ; Moghrei, A. 1999. “Some aspects of bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons”. *Afinidad LVI*, 483, Sept-Oct.
- Souza, C.S. 2008. Degradação de óleo diesel por fungos. Dissertação de Mestrado. UFPE. Recife – PE.
- Souza, D. B.; Brito, G. C. B.; Vasconcelos, C. W.; Braga, L. C. 2010. Estudo de microorganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de Estudos Ambientais*. v. 12, p.38-46.
- Souza, F. A. S. D. 2009. Biodegradação de Óleo Diesel por *Candida lipolytica* em água do mar. PE. Dissertação de Mestrado – Recife.
- Souza, P.J.B. e Lima, V.L. 2002. Avaliação das técnicas de disposição de rejeitos da perfuração terrestre de poços de petróleo. Monografia de Especialização. Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia. Salvador – BA.
- Teixeira, A. S.; Bento, F. M. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial. 2007. Dissertação de Mestrado - Universidade federal do Rio Grande do Sul.
- Thomas, José Eduardo. 2001. *Fundamentos de Engenharia de Petróleo*. Rio de Janeiro: Interciência.

- Tiburtius, E. R. L.; Peralta-Zamora, P.; Leal, E. S. 2004. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*. v. 27, n. 3, p. 441-446
- Tiquia, S. M.; TAM, N. F. Y.; Hodgkiss, I. J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *R. Environmental. Pollution.*, v. 93, p. 249-256.
- Trindade, P.V. O.; 2002. Avaliação das Técnicas de Bioaumentação e Bioestimulação no Processo de Biorremediação de Solo Contaminado por Hidrocarbonetos de Petróleo. Dissertação de Mestrado. UFRJ.
- Ururahy, A. F. P. 1998. Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo. Tese de doutorado em Ciências. Escola de Química, UFRJ. Rio de Janeiro.
- Van Hamme J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.67, p.503–549.
- Villela, A. L. S.; Pereira, D. S.; Melo, B. J. M.; Silva, P. A.; Sousa, M. F. V. Q. 2008. Biorremediação de *Ex-Situ* de óleo diesel por bactéria. Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Cobeq, Set, Recife- PE.
- Walter, M. V. 1997. Bioaugmentation. In: *Manual of Environmental Microbiology*. Washington. American Society for Microbiology – ASM. P. 753-57.
- Xia, W. X. Li, J. C., Zheng, X. L. Bi, X.J., Shao, J. L. 2006. Enhanced biodegradation of diesel oil in seawater supplemented with nutrients. *Engineering in Life Sciences*, 680-85.
- ANENG. Disponível em <http://www.aneng.com.br/>. Acesso em 08 de novembro de 2012.
- BIODIESEL. Disponível em [www.biodiesel.com](http://www.biodiesel.com). Acesso em 23 de novembro de 2012.
- CETESB. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 12 de novembro de 2012.
- CONAMA. Disponível em [www.conama.com.br](http://www.conama.com.br). Acesso em 15 de agosto de 2009.
- IBAMA. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/>. Acesso em 03 de dezembro de 2012.
- PETROBRÁS. Disponível em [www.br.com.br](http://www.br.com.br). Acessado em 02 de janeiro de 2009.
- RAVATO. Disponível em [www.ravato.com.br](http://www.ravato.com.br) Acessado em 06 de fevereiro de 2009.



# CERTIFICADO DE ENSAIO

CÓPIA

Produto: OLEO DIESEL A S1800

Código: 65S

Local de amostragem: TQ 330831303

Data/hora Amostragem: 10/03/2010 17:30

Data/hora Recebimento: 10/03/2010 17:40

Laboratório: Transpetro/Lab Suape

Endereço: Comp. Ind. Porto Suape Rod PE000  
Ipojuca - PE CEP 55590-000

Telefone: (011) 3527-8338 Fax: (011) 3527-8338

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
ASPECTO	VIS 000	PASS (1)	PASS	
COR	VIS 000	INAM (2)	INAM	
COR ASTM	D 1500	3,0 max	12,9	
ENXOFRE TOTAL	D 4294	1800 max	1640,0	mg/kg
10% RECUPERADOS	D 98	Anotar	185,1	grau C
50% RECUPERADOS	D 98	245,0 a 310,0	278,9	grau C
85% RECUPERADOS	D 98	370,0 max	358,4	grau C
90% RECUPERADOS	D 98	Anotar	378,5	grau C
MASSA ESPECÍFICA A 20 GC	D 4062	820 a 880	841,1	kg/m3
AGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,06 max	0,050	% volume
PONTO DE FULGOR	D 93	35,0 min	47,0	grau C

**Notas:**

(1) PASS/PASSA=Limpido e sem de impurezas.

(2) Incolor e amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e amarelo-avermelhado.

- Todos os limites especificados são valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29.

- Cor Vermelha - Corante adicionado na entrega do Produto.

- Atende a Resolução ANP Nº42, de 16 de Dezembro de 2009, Regulamento Técnico ANP Nº 5/2009, Resolução nº 6 do CNPE, de 16 de setembro de 2009.

- APÓS DESLOCAMENTO DE LINHA DO NT PIQUETE VGM 532 CT.

Tipo de Amostragem: AMOSTRA CORRIDA

Tipo de Operação: Descarga de navio

Data de Emissão: 10/03/2010 20:16:28 Página 1 de 1

Os resultados desta Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada.  
 Este certificado só pode ser reproduzido integralmente, com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.

Original Assinado Por:

Responsável:

 Luciana Vilarim Fernandes Epitacio  
 CRQ: 1404182