



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

GEÓRGIA GOMES DA CRUZ

**TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÓLEO DIESEL POR
CONSÓRCIO FÚNGICO**



Recife, 2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

GEÓRGIA GOMES DA CRUZ

**TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO
FÚNGICO**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biologia Química para a Saúde

**Profª Drª Teresinha Gonçalves da Silva
Orientadora**

**Profª Drª Norma Buarque Gusmão
Co-orientadora**

Recife, 2017

TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO FÚNGICO

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Cruz, Geórgia Gomes da

Tratamento biológico de óleo diesel por consórcio fúngico / Geórgia Gomes da Cruz. – Recife: O Autor, 2017.

113 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Norma Buarque de Gusmão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Microbiologia, 2017.

Inclui referências e anexos

- 1. Biorremediação 2. Diesel 3. Fungos I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Gusmão, Norma Buarque de (coorient.) III. Título**

620.11223

CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2017-294

GEÓRGIA GOMES DA CRUZ

**TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO
FÚNGICO**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biologia Química para Saúde
Aprovada em 22/02/2017

Comissão examinadora:

Prof^a Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Jaciana dos Santos Aguiar
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Clarissa Daisy da Costa Albuquerque
Universidade Católica de Pernambuco

Prof^a Dr^a Maria de Fátima Vieira de Queiróz Sousa
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 2017

*O SENHOR é a minha força e o meu
escudo; nele confiou o meu coração, e fui
socorrido; assim o meu coração salta de prazer, e
com o meu canto o louvarei.*

Salmo 28:7

*A Deus, aos meus pais,
familiares e amigos que estiveram ao
meu lado em mais um passo da
caminhada de minha vida..*

Dedico

Agradecimentos

A Deus por ser meu refúgio e fortaleza, presente em todos os momentos, por guiar minha vida, sendo o maior responsável pela conquista dos meus sonhos, por ser a essência da minha vida, dando a ela um sentido para existir e ser feliz.

Aos meus pais, Luís e Luciene pelo apoio, toda dedicação e amor que me concederam. Portanto, posso considerá-los os melhores pais que Deus, em sua infinita bondade, me deu de presente.

A todos os meus familiares que me apoiaram e estiveram junto a mim, torcendo pela minha vitória.

Às professoras Norma Buarque e Teresinha Gonçalves pela oportunidade que me foi concedida, pela orientação e paciência dedicada, as quais somente Deus pode compensá-las.

À Jaciana Aguiar pela colaboração, ensino e paciência.

A todos os amigos que compartilharam momentos de alegria e de dificuldades comigo.

LISTA DE FIGURAS

Treatment of Diesel Oil by Fungi Isolated from Caatinga and Toxicity Evalution

Figura 1. Degradation percentage of diesel oil n-alkanes by microbial consortium in the trials of factorial planning 2^4 42

Figura 2. Pareto's diagram with significance level of 95% ($p= 0.05$) for factorial planning 2^4 , with the independent variables (1) *C. elegans*, (2) *R. arrhizus*, (3) *A. niger* and (4) glycerol.....43

Otimização da Biodegradação do Óleo Diesel e Avaliação da Toxicidade

Figura 1. Valores de pH durante os ensaios de aclimação.....56

Figura 2. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos do óleo diesel a 10%.....57

Figura 3. Diagrama de Pareto para o planejamento, cujo variável é a degradação 59

Figura 4. Resultados do teste de citotoxicidade do planejamento fatorial 2^3 61

Tratamento Biológico de Óleo Diesel por Consórcio Fúngico em Biorreator

Figura 1. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel a 10% no planejamento 2^275

Figura 2. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel em biorreator..... 76

Figura 3. Resultados do teste de citotoxicidade do planejamento fatorial (2^2).....79

Figura 4. Resultados do teste de citotoxicidade do biorreator.....79

LISTA DE TABELAS

Fundamentação Teórica

Tabela 1. Composição química do óleo cru	18
Tabela 2. Principais frações de petróleo	18
Tabela 3. Acidentes ambientais ocorridos no Brasil ocasionados por atividades petrolíferas.....	21
Tabela 4. Tecnologias de biorremediação.....	25
Tabela 5. Enzimas que atuam na degradação de lignoceluloses.	33

Treatment of Diesel Oil by Fungi Isolated from Caatinga and Toxicity Evalution

Tabela 1. Variables and levels utilized in full factorial planning 2 ⁴	39
Tabela 2. Germination rate obtained from the germination percentage and the radicle root growth of beans seeds.....	44

Otimização da Biodegradação do Óleo Diesel e Avaliação da Toxicidade

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo (2 ³).....	53
Tabela 2. Contagem de células viáveis (UFC/ml)	57
Tabela 3. Resultados do teste de fitotoxicidade planejamento 2 ³	61

Tratamento Biológico de Óleo Diesel por Consórcio Fúngico em Biorreator

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento 2 ²	71
Tabela 2. Resultados do teste de fitotoxicidade do planejamento 2 ²	78
Tabela 3. Resultados do teste de Fitotoxicidade do biorreator	78
Tabela 4. Resultados da atividade enzimática do biorreator	80

RESUMO

Pesquisas têm sido fomentadas em busca de alternativas ecologicamente e economicamente viáveis para tratar ambientes impactados por petroderivados, como a biorremediação. Este trabalho teve como objetivo investigar a capacidade de um consórcio fúngico que apresente potencial para degradar óleo diesel, estabelecendo as condições adequadas em processo de biorremediação *ex situ*. Para estabelecer condições mais promissoras de fatores nutricionais e físico-químicos foram utilizados planejamentos fatoriais, permitindo testar simultaneamente variáveis como: pH, concentrações de inóculo, glicerol e nitrato de amônia. Ao final dos ensaios foram avaliadas as variáveis resposta: a degradação de hidrocarbonetos por cromatografia gasosa e análise da toxicidade dos subprodutos sobre células vegetais e células humanas mononucleares de sangue periférico. Tendo conhecimento da melhor condição para o processo de biodegradação, essa foi aplicada em experimentos em biorreator para tratar um volume maior e em condições controladas. O consórcio foi formado pelos fungos *Cunninghamella elegans*, *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus niger*, pois, além da capacidade de degradação não apresentaram interação negativa. A melhor condição encontrada nos ensaios realizados em frascos (volume total 100mL), contendo 10% de óleo diesel, foi: 1 bloco de gelose de *Cunninghamella elegans*, 1 bloco de gelose de *Rhizopus arrhizus* e 2 blocos de gelose de *Aspergillus niger*, 1,5 g/L de NH_4NO_3 , 2 mL de glicerol, pH inicial de 8,5. A degradação do óleo diesel alcançou média de degradação de até 97,41% em biorreator, enquanto alguns hidrocarbonetos foram degradados completamente. A toxicidade do material residual do processo também foi reduzida quando comparada ao poluente, permitindo a germinação das sementes testadas e resistência das células mononucleadas do sangue periférico humano. Sendo assim, o consórcio fúngico apresenta potencial para ser utilizado em processos de biorremediação de locais contaminados por óleo diesel.

Palavras chave: Biotratamento. Óleo disel. Degradação. Toxicidade.

ABSTRACT

Research has been fostered in search of ecologically and economically feasible alternatives to treat environments polluted by petroderivatives, such as bioremediation. This work aimed to determine a fungal consortium that has the potential to degrade diesel oil, establishing the appropriate conditions in ex situ bioremediation process. In order to reach this objective, microorganisms that had petroderivative degradability were selected. Then, they were placed opposite each other in antagonistic tests to verify the interaction between them and the production of inhibitory metabolites, which would harm the assay in a consortium. In order to establish optimized conditions of nutritional and physical-chemical factors, factorial planning was used, allowing simultaneous testing of variables such as: pH, inoculum concentrations, glycerol and ammonium nitrate. At the end of the tests the response variables were evaluated: hydrocarbon degradation by gas chromatography and toxicity analysis of by-products on plant cells and human peripheral blood mononuclear cells. Knowing the best condition for the biodegradation process, this was applied in a experiment in bioreactor to treat a larger volume under controlled conditions. The consortium was formed by the fungi *Cunninghamella elegans*, *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillus niger*, because in addition to the degradation capacity did not present negative interaction. The best condition found in flask assays (total volume 100 mL), containing 10% diesel oil, was: 1 agar block of *Cunninghamella elegans*, 1 agar block of *Rhizopus arrhizus* and 2 agar blocks of *Aspergillus niger*, 1, 5 g/L de NH_4NO_3 , 2 ml glycerol, initial pH 8.5. The degradation of diesel oil was optimized, reaching degradation average of up to 97.41% in bioreactor, while some hydrocarbons were completely degraded. The toxicity of the waste material from the process was also reduced when compared to the pollutant, allowing the germination of the tested seeds and resistance of the mononuclear cells of the human peripheral blood. Therefore, the fungal consortium has the potential to be used in bioremediation processes of sites contaminated by diesel oil.

KEYWORDS: Biotreatment. Diesel Oil. Degradation. Toxicity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos.....	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1	Petróleo.....	17
3.2	Óleo Diesel.....	19
3.3	Degradação Ambiental.....	20
3.4	Técnicas de Limpeza de Áreas Contaminadas.....	22
3.5	Biodegradação De Hidrocarbonetos.....	26
3.6	Micro-Organismos Degradores.....	28
3.6.1	Fungos.....	31
3.7	Consórcios Microbianos.....	32
3.8	Produção Enzimática.....	33
3.9	Toxicidade E Mutagenicidade Do Petróleo E Derivados.....	34
4	TREATMENT OF DIESEL OIL BY FUNGI ISOLATED FROM CAATINGA AND TOXICITY EVALUTION.....	35
5	OTIMIZAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE.....	49
6	TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO FÚNGICO EM BIORREATOR.....	68
7	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXOS.....	105

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é uma fonte de energia de origem fóssil, constituída quimicamente por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Sua destilação resulta em combustíveis mais utilizados para movimentação de motores de carros, aviões, tratores, termelétricas, barcos, como: a gasolina, querosene e o óleo diesel. Este último é composto por uma mistura complexa de alcanos normais, ramificados e cíclicos e compostos aromáticos (BUCKER et. al., 2011), sendo considerado tóxico e recalcitrante para os ecossistemas.

As atividades que envolvem a utilização do petróleo e derivados, em processos desde a extração até a distribuição, têm grande potencial poluidor, devido ao grande volume em operação, podendo causar descargas de portes variáveis, desde as maiores proporcionadas por acidentes com navios petroleiros até as relativamente pequenas, por descargas operacionais. E mesmo diante do crescimento tecnológico, essas atividades ainda comprometem a integridade ambiental e a degradação ocasionada atinge: corpos de águas superficiais e subterrâneas, comunidades costeiras, praias, manguezais, animais marinhos, o turismo e a economia local, (GOIS et al., 2015; LUZ et al., 2016). Esses fatos ocorrem com frequência, devido à crescente demanda do do petróleo e sua utilização como fonte de energia (FILHO; CORIOLANO, 2016). Assim, novas técnicas foram desenvolvidas visando à descontaminação dessas áreas atingidas pelo petróleo e seus derivados (HEIDERSCHIEDT et al., 2016).

Diferentes processos são conhecidos e utilizados na remoção de hidrocarbonetos, os quais podem ser: químicos, físicos e biológicos (PIETROLETTI et al., 2010). Assim, as tecnologias que utilizam tratamentos químicos ou mesmo físicos, como contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes, adsorção por materiais naturais ou sintéticos, entre outros, não visam à degradação do poluente, apresentando altos custos e muitas vezes geram impacto sobre o ambiente (SRIDEVI et al., 2011). Entretanto, a aplicação de métodos biológicos no tratamento de locais contaminados com compostos orgânicos tóxicos e voláteis, têm sido considerada promissora, sendo econômica e ecologicamente viável, visto o apelo por tecnologias limpas que reduzam compostos recalcitrantes (MARIANO et al., 2007; VARSHA et al., 2011).

A biorremediação é definida como um conjunto de tecnologias, que utilizam processos biológicos, com o objetivo de recuperar ou remediar áreas contaminadas (SOUSA et al., 2016). Essa vem sendo utilizado há vários anos, demonstrando uma maior eficiência quando comparada às técnicas físicas e químicas (BANFORTH; SINGLETON, 2005).

Segundo Pinhati et al. (2014), este processo de limpeza do meio ambiente utilizando micro-organismos possibilita o aumento da degradação, tornando o processo mais eficiente e em alguns casos com total eliminação do contaminante no ambiente.

Esta técnica pode ser realizada “*in situ*”, onde o tratamento do material contaminado ocorre no próprio local do derrame ou “*ex-situ*” que consiste na remoção do material contaminado para local externo ao de sua origem (MAIER, 2000).

A biorremediação baseia-se no processo de degradação do poluente pela ação de organismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, onde uma grande parte desses micro-organismos utiliza os hidrocarbonetos do petróleo e derivados como fonte de carbono em seus processos vitais. As tecnologias de biorremediação devem incluir medidas necessárias para tornar o ambiente favorável ao desenvolvimento, estimulando a atividade dos micro-organismos que podem degradar os hidrocarbonetos de petróleo (LACATUSU et al., 2016).

Os micro-organismos mais eficientes e hábeis em degradar substâncias tóxicas e recalcitrantes são normalmente encontrados em efluentes de refinarias de petróleo, pois, já estão adaptados ao poluente. Cada organismo apresenta especificidade e susceptibilidade, que direciona para a necessidade da formação de consórcios microbianos. Para degradar fontes de carbono complexas, essas associações têm potencializados os processos de degradação quando comparada às culturas puras. Esse fato, possivelmente, ocorre devido à co-metabolização, na qual alguns micro-organismos se encarregam de transformar os constituintes do poluente, produzindo compostos intermediários que são, posteriormente, degradados por outros gêneros e espécies diferentes (CERNIGLIA, 1997; TIBURTIUS et. al., 2004).

Li et al. (2008) relataram a eficiência de um consórcio constituído por bactérias e fungos capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Radwan et al.(2005) relataram o desempenho superior da aplicação de consórcio microbiano que degradou petróleo no Golfo Pérsico quando comparado a utilização de culturas puras.

Diante do exposto, pesquisas nesse âmbito são fomentadas no sentido de obter consórcios microbianos potencialmente capazes de degradar petróleo ou derivados, determinando as melhores condições para a aplicação em processos de biorremediação de áreas impactadas por essas fontes oleosas.

Este estudo pretende avaliar a eficiência de um consórcio microbiano na biodegradação de óleo diesel, para sere aplicado em processos de biorremediação de áreas impactadas por essa fonte oleosa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar um consórcio fúngico que apresente potencialidade para degradar óleo diesel, estabelecendo as condições adequadas em processo de biorremediação *ex situ*.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar fungos que exibem potencial para degradar o óleo diesel;
- Determinar um consórcio a partir dos micro-organismos selecionados, para possível utilização na biorremediação de ambientes contaminados;
- Aclimatar os micro-organismos em concentrações crescentes do combustível;
- Investigar qual a melhor condição de degradação utilizando um planejamento fatorial 2^4 ;
- Estabelecer as melhores condições de fatores nutricionais e físico-químicos utilizando planejamento fatorial 2^3 ;
- Investigar a condição que promoveu maiores percentuais de degradação e menor toxicidade aplicando um planejamento fatorial 2^2 ;
- Realizar experimento em biorreator, empregando as condições otimizadas;
- Determinar a eficiência do consórcio através de avaliação química;
- Analisar a toxicidade do material residual do processo sobre células vegetais e células humanas mononucleares de sangue periférico.
- Verificar a produção e caracterizar enzimas do sistema lignolítico.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Petróleo

O petróleo é uma fonte energética de origem fóssil, oleoso, inflamável, normalmente menos denso que a água, apresentando odor característico e coloração que pode variar do incolor até o preto. Por ser uma fonte não renovável e possuir alto valor energético, o petróleo se tornou um produto estratégico para o desenvolvimento das nações, influenciando na política (ANP, 2016).

A utilização do petróleo e derivados é um fator significante na ocorrência de acidentes ambientais, devido, contaminações decorrentes do processo extração, produção de subprodutos, carga, descarga, transporte, estocagem, combustão e utilização. Além disso, ação antrópica tem sido responsável pela acelerada formação de compostos mais tóxicos e recalcitrantes que são lançados no meio ambiente (ATLAS; BARTHA, 1972; PETROBRÁS, 2003; PEDROZA et al., 2002), provocando efeitos catastróficos em comunidades biológicas (CRAPEZ, 2001)

O petróleo é derivado de diferentes tipos de matéria orgânica, sendo constituído basicamente por carbono e hidrogênio, sendo gerado por meio de processos bioquímicos, químicos e físicos (FILHO; CORIOLANO, 2016). Essa mistura complexa de hidrocarbonetos é constituída por: alcanos (parafinas), aromáticos, resinas (naftênicos ou cicloparafinas) e asfaltenos. Estes compostos orgânicos estão associados a substâncias que contém átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre e alguns constituintes organometálicos, especialmente complexos de vanádio e níquel (WETLER-TONINI et al., 2010).

Os mesmos hidrocarbonetos compõem os diferentes tipos de petróleo, variando somente em suas proporções. Essas variações na composição modificam as propriedades físicas dos diversos tipos de petróleo cru, como, a coloração e o odor (SZKLO, 2005).

Quanto à densidade, os diferentes tipos de petróleo variam em uma escala de leves a pesados. Conforme Thomas (2001) pode ser dividido em seis classes:

- **Classe parafínica:** são óleos leves, com baixa viscosidade, apresentando teor de resinas e asfaltenos inferior a 10%. Incluem a maior parte dos óleos produzidos no Nordeste.
- **Classe parafino-naftênica:** viscosidade e densidade moderadas, com teor de resinas e asfaltenos entre 5 e 15%. Incluem a maior parte dos óleos produzidos na Bacia de Campos.
- **Classe naftênica:** provenientes de alterações bioquímicas de óleos parafínicos e parafino-naftênicos. Pouco representativos em relação ao volume total de petróleo.

- **Classe aromática intermediária:** são óleos pesados, apresentando de 10 a 30% de asfaltenos. Encontrados no Oriente Médio e Venezuela, entre outras regiões.
- **Classe aromático-naftênica:** originam-se de processos de degradação de óleos parafínicos e parafino-naftênicos. Encontrados na África Ocidental.
- **Classe aromático-asfáltica:** originados de processos de biodegradação, gerando óleos pesados. Encontrados no Canadá ocidental, Venezuela e Sul da França.

A demanda do petróleo tende a ser cada vez maior, tanto na sua forma bruta quanto na refinada, devido ao crescimento populacional e ao desenvolvimento tecnológico.

Na tabela 1 está apresentada a composição química do óleo cru, que é a fração líquida do petróleo.

Tabela 1- Composição química do óleo cru

Composição	Óleo cru (%)
Carbono	82 – 87
Hidrogênio	12 – 15
Enxofre	0,1 - 5,5
Nitrogênio	0,1 - 1,5
Oxigênio	0,1 - 4,5

(Adaptado de HYNE, 1995).

A tabela 2 mostra as principais frações de petróleo obtidas por destilação, caracterizadas pelos intervalos de temperatura e pressão: gasolina, querosene, gás, óleo diesel leve e pesado e óleos lubrificantes e suas composições.

Tabela 2- Principais frações de petróleo

Produto (Fração Destilada)	Principais componentes
Gás	Alcanos de cadeia normal ou ramificada, com um a cinco átomos de carbono. Ex. etano, propano, butano.
Gasolina	Hidrocarbonetos de cadeia normal ou ramificada, com 6 a 10 átomos de carbono. Ciclanos e alquibenzenos estão presentes.
Querosene	Hidrocarbonetos com 11 a 12 átomos de carbono. N-alcanos são predominantes, alcanos ramificados, ciclo-

	alcanos, aromáticos e misturas de ciclanos com aromáticos. Baixos níveis de benzeno. Poucos poliaromáticos.
Óleo Diesel leve	Hidrocarbonetos com 12 a 18 átomos de carbono. Percentual de n- alcanos maior que o do querosene. Ciclanos, oleofinas, oleofinas aromáticas mistas estão presentes.
Óleo Diesel pesado	Hidrocarbonetos com 18 a 25 átomos de carbono.
Lubrificantes	Hidrocarbonetos com 26 a 40 átomos de carbono.
Asfálticos	Compostos policíclicos pesados.

Fonte: Adaptado de Baker; Herson (1994)

3.2 Óleo Diesel

O óleo Diesel é o principal combustível comercializado no mercado brasileiro, utilizado no transporte, na indústria, na geração de energia, atendendo as necessidades dos consumidores e as mais avançadas tecnologias em motores de combustão (PETROBRAS, 2016). Formado basicamente por alcanos de cadeias simples e ramificadas, além de compostos cíclicos e aromáticos, apresenta cadeias de que variam de C₉-C₂₈ (KNOTHE, 2010; BUCKER et al., 2011), e em baixas concentrações, enxofre, nitrogênio e oxigênio. Segundo Mariano et al. (2008) alguns dos compostos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) do óleo diesel estão entre os menos afetados pelo processo de intemperização, e por serem semivoláteis, com baixa solubilidade e características recalcitrantes podem persistir por um longo tempo no ambiente. A contaminação por hidrocarbonetos tem sido motivo de preocupação com o meio ambiente, pois, são substâncias que possuem alta toxicidade, podendo afetar humanos e animais, apresentando mutagenicidade e potencial cancerígeno (PEDROZA et al, 2009; SOUSA et. al, 2016).

É um produto inflamável, com nível médio de toxicidade, pouco volátil, sem material em suspensão, límpido, com cheiro forte e característico (CNT, 2012).

De acordo com o artigo 2º da Resolução n. 42, de 16 de dezembro de 2009, da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Bicomustíveis (ANP), os óleos diesel de uso rodoviário podem se classificar em:

I - óleo diesel A: produzido por processos de refino de petróleo e processamento de gás natural destinado a veículos com motores do ciclo diesel, sem adição de biodiesel.

II - óleo diesel B: produzido por processos de refino de petróleo e processamento de gás natural destinado a veículos com motores do ciclo diesel, com adição de biodiesel no teor estabelecido pela legislação vigente.

3.3 Degradação Ambiental

A indústria petrolífera tem grande contribuição na movimentação da economia, constituindo a principal fonte energética mundial (MARTINS et al., 2015).

Processos que englobam extração, armazenamento, transporte e o uso do petróleo e seus derivados, fazem com que os hidrocarbonetos destes compostos sejam considerados os principais contaminantes do meio ambiente (MEDAURA; ERCOLI, 2008; PASSOS, et al. 2009; TYAGI, 2011). A poluição provocada por esses contaminantes induzem mudanças importantes nos níveis dos organismos do solo, levando em alguns casos a extinção de algumas espécies, perturbando os ciclos de elementos biogeoquímicos, mineralização da matéria orgânica, podendo reduzir a fertilidade do solo (LACATUSU et al., 2016).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) presentes no petróleo e em seus derivados, como gasolina, óleo diesel e outros, possuem ligações duplas e simples que se alternam em anéis com seis átomos de carbono. Assim, constituem uma classe de poluentes orgânicos recalcitrantes, de importância ambiental e de interesse toxicológico por apresentarem propriedades mutagênicas e carcinogênicas. A presença desses hidrocarbonetos no ambiente é um perigo para a saúde e para os ecossistemas, devido a alta toxicidade, habilidade de bioacumular ao longo da cadeia alimentar, mobilidade e persistência no meio ambiente (TIBURTUIS et. al., 2004; LUZ et al., 2016). O metabolismo dos HPA's gera compostos epóxidos, com propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas, e têm sido associado a inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele (CHAKRADEO et al., 1993; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

Por estas razões, os HPA's representam a família de contaminantes orgânico mais abundante, despertando interesse nos últimos anos pelo impacto que provocam no meio ambiente (BIACHE et al., 2017).

A maior fonte de contaminação de HPA's (naftaleno, antraceno, fenantreno, etc.) no ambiente é devido a atividades relacionadas à extração, refino, transporte e utilização do petróleo e derivados (BARBOSA et al., 2009).

Segundo Cerqueira (2010), a poluição provocada por dutos e petroleiros, devido sua visibilidade, provoca maior comoção pública. No entanto, a maior parte do óleo que chega nos oceanos provêm de descargas menores e rotineiras (CRAIG et al., 2012).

A poluição de solos e das águas subterrâneas, provenientes de postos de distribuição de combustíveis, tem sido considerada outra importante fonte de contaminação de hidrocarbonetos derivados de petróleo, devido a derramamentos dos tanques de armazenamento e bombas ou vazamentos acidentais (UDIWALL e PATEL, 2010)

Devido o aumento da demanda por combustíveis, os acidentes ambientais envolvendo grandes derrames, tornaram-se frequentes. Esses poluentes, devido as suas características químicas e toxicológicas, podem acarretar danos ambientais irreparáveis, na sua grande maioria, atingindo vários segmentos como: turismo, economia, saúde e principalmente os ecossistemas.

Os efeitos provocados por acidentes dessa natureza são dependentes dos seguintes fatores: clima, densidade populacional, taxa de liberação do poluente, sensibilidade e susceptibilidade das espécies receptoras, as reações do contato com o ar, solo, água e biota quanto à absorção, adsorção, e transformação dos poluentes (PASCHOAL, 1996).

Quando a contaminação ocorre em ambiente aquático, em especial o marinho, é bastante significativa. Isso geralmente é decorrente da grande atividade petrolífera e portuária da região costeira, causando prejuízos ambientais devido a derrames com petróleo e derivados. A costa brasileira, em toda sua extensão, tem sofrido vários acidentes provenientes de atividades petrolíferas (ZAGATO; BERTOLETTI, 2006).

De acordo com Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2015), num período de 6 meses já ocorreram 35 acidentes envolvendo vazamento de óleo diesel, que em alguns casos atingiu solo, água, ar, fauna e flora. Alguns estão citados abaixo com respectivas quantidades vazadas do combustível (Tabela 3):

Tabela 3- Acidentes com derrame de óleo diesel (jan-jun/2015).

Atividade	Município	Causa	Qtd	Meios Atingidos
Transporte rodoviário	Piquerobi (Interior)	Tombamento	5.000L	Ar/Flora
Transporte rodoviário	Santos (Litoral)	Tombamento	20.000L	Água/Ar/Fauna/Solo
Transporte rodoviário	Guarulhos (Metropolitana)	Colisão	42.600L	Água/Solo
Transporte rodoviário	Dracena (Interior)	Tombamento	44.000L	Solo
Transporte rodoviário	Buritizal (Interior)	Tombamento	500L	Solo
Outras	Campinas (Interior)	Incêndio	1.000L	Solo
Transporte ferroviário	Valparaíso (Interior)	Incêndio	5.000L	Solo

Fonte: CETESB (2015)

No Brasil, os avanços na criação de planos de contingência, para atender situações emergenciais de derrames de petróleo, ocorreram com a publicação da resolução do CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) nº293/2001 e o decreto Federal 4.871/2003. Essas legislações

dispõem, respectivamente, sobre os planos de emergência individual em portos organizados, instalações portuárias ou terminais, dutos e plataformas e sobre a instituição dos planos de áreas para o combate a poluição por óleo em águas sob jurisdição nacional. Devido ao intenso potencial poluidor de postos de combustíveis, também foi criada no ano de 2000, a Resolução 273 do CONAMA, a qual dispõe especificamente sobre a instalação, ampliação e operação de postos de combustíveis. Esta Resolução considera que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Para tal, considera que os vazamentos de derivados de petróleo e outros combustíveis podem causar contaminação de corpos d'água subterrâneos e superficiais, do solo e do ar e considera os riscos de incêndio e explosões, decorrentes desses vazamentos, entre outros (CONAMA, 2009). No entanto, as tecnologias de limpeza têm contribuído para a conservação e remediação do meio ambiente, dentre elas, tem grande destaque a biorremediação que não traz prejuízos ao meio ambiente.

3.4 Técnicas de limpeza de ambientes contaminados

Para minimizar os danos ambientais causados pelos derramamentos de óleo, alguns métodos de limpeza são utilizados. O método mais adequado é uma importante decisão, pois, a opção errada poderá maximizar os danos e essa escolha dependerá do ecossistema e suas características, tipo de óleo e fatores técnicos. As técnicas atualmente mais utilizadas para descarte de processos industriais envolvem a remoção do poluente para posterior tratamento químico ou físico e retorno ao ambiente (LUZ et al., 2016). De acordo com Sayara et al. (2011) cada tecnologia tem suas ótimas condições de operação, a quais são influenciadas pelas propriedades físico-químicas ou prevalecendo as condições ambientais.

Segundo Craig et al. (2012) existem várias técnicas de remoção:

As barreiras de contenção podem ser flutuantes ou físicas de superfície e servem para conter derramamentos de petróleo e derivados. Elas evitam a propagação da mancha de óleo, bloqueando ou direcionando para áreas biologicamente menos sensíveis, preservando locais de interesse ecológico ou socioeconômico ou ainda para locais onde ele possa ser recuperado.

Os “Skimmers” conjunto de dispositivos mecânicos como bombas, sistemas de vácuo, cilindros rotatórios, entre outros, que associado com a barreira de contenção promove a remoção da mancha. O sucesso da aplicabilidade está relacionado ao tipo de óleo, local, volume derramado e condições meteorológicas.

Dispersantes químicos são grupos de produtos de químicos, que ao serem pulverizado nas manchas de óleo, aceleram o processo de dispersão natural com o objetivo de remover o óleo da superfície. Estes produtos químicos têm dois componentes essenciais: surfactantes e solventes, que atuam como uma interface entre eles, reduzindo a tensão interfacial óleo-água, permitindo que sejam facilmente degradadas por micro-organismos. A eficácia da aplicação de dispersantes depende de vários fatores como: tipo de óleo, condições do tempo, dimensão e localização da mancha. A existência de agitação marítima também facilita a eficácia dos dispersantes.

A queima *in-situ* é uma técnica de recuperação térmica de óleo, onde o calor é produzido dentro do reservatório, em contraste com a injeção de fluidos aquecidos, onde o calor é gerado na superfície e transportado para o reservatório por meio de um fluido. Uma porção do óleo armazenado no reservatório entra em ignição, que é sustentada pela injeção contínua de ar. Este método ainda não foi regulamentado no Brasil, porém é utilizado há muitos anos em países como Suécia, EUA, Canadá e Inglaterra. As limitações desta técnica incluem o perigo da fonte de ignição, a formação de resíduos densos, que são viscosos e de difícil recuperação no mar e na costa. Alguns critérios devem ser levados em consideração, são eles: tipo de barreira que esta sendo utilizada; distância da mancha para embarcação; população residente próximo ao local; a toxicidade da fumaça gerada; condições de tempo; tipo de óleo derramado e os resíduos gerados.

Os materiais absorventes são indicados para recolhimento de combustíveis e óleos lubrificantes, com a vantagem de não absorverem água. Podem se apresentar na forma granulada, ou envolvida em tecidos porosos e são aplicados diretamente sobre o óleo. Podem ser sintéticos (mantas, almofadas e colchões de polipropileno) ou naturais (turfa e serragem).

A pressão dos órgãos regulamentadores ambientais e o interesse por tecnologias limpas que possam minimizar os impactos causados pelos poluentes no meio ambiente têm crescido e destacado a utilização de processos biotecnológicos, como a biorremediação. Essa se destaca como um método atrativo de remediação pelas seguintes características: simplicidade, tempo requerido na operação, mais segurança, ações menos impactantes ao meio ambiente, baixo custo comparado a outras técnicas (MELO et al., 2012). Entre outras vantagens, a biorremediação permite: a remoção completa de alguns hidrocarbonetos do petróleo, causando pouca alteração no ambiente físico, químico e biológico (LUZ et al., 2016); a biodegradação de substâncias ao invés de simplesmente transferir o contaminante de um meio para outro; redução do risco de contaminação de outras áreas e da possibilidade de atingir concentrações ambientalmente aceitáveis (LUZ et al., 2011; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2011).

Coutinho et al. (2015) destaca a importância ambiental da biorremediação por remover substâncias tóxicas e apresentar viabilidade técnica e econômica. Outros autores também afirmam ser

uma alternativa ecologicamente viável, de baixo custo, segura e eficaz de remoção de poluentes do ambiente (DÍAZ, 2004; YAKUBU, 2007).

A biorremediação é um conjunto de tecnologias que visa à recuperação de áreas contaminadas por substâncias químicas, sejam elas tóxicas ou recalcitrantes, onde micro-organismos ou seu potencial enzimático são utilizados nesse processo, acelerando a transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos ou inertes (BOOPATHY, 2000; WETLER-TONINI et al., 2010; SOARES et. al., 2011).

Esta técnica baseia-se no processo de degradação do poluente pela ação microbiana. Vários autores indicam a degradação biológica como principal mecanismo para a eliminação das características tóxicas de poluentes (BORÉM; SANTOS, 2004; BENTO et al., 2005).

Em alguns casos, esses tratamentos apresentam um período de tratamento prolongado quando comparado aos métodos físicos e químicos. No entanto, a biorremediação é iniciada após o contato do contaminante com os micro-organismos, sendo eficiente por, em alguns casos, promover a mineralização completa dos compostos (ZHANG et al, 2010; THAPA et al., 2012).

Para isso, utiliza micro-organismos, como: bactérias, fungos filamentosos e leveduras, os quais metabolizam poluentes ambientais, dos quais obtêm nutrientes e energia, visando minimizar ou eliminar o impacto ambiental provocado pelos poluentes, além de transformá-los em compostos mais simples (SEMPLE et al., 2001). A funcionalidade da comunidade microbiana depende principalmente da capacidade de reagir prontamente às alterações ambientais (CRISAFI et al., 2016).

Segundo Azambuja et al. (2000), o problema ambiental, tratado na sua devida escala, é tipicamente multidisciplinar e exige o domínio dos processos químicos e biológicos que estão inerentemente associados. Devido à compatibilidade da mistura, o grau de dissolução do poluente, e a heterogeneidade dos ambientes, o sucesso da biorremediação depende da interação de várias ciências, tais como: geologia, engenharia, ecologia, microbiologia e química (IAH; ANTAI, 2003).

A biorremediação possui variação quanto ao tipo de tratamento, estes podem ser “*in-situ*” ou “*ex-situ*”, podendo envolver diversos tipos de procedimentos (SOUSA et al., 2016).

A biorremediação “*in-situ*” é realizada para remediar o local onde ocorreu o derrame, utilizando os micro-organismos presentes no ambiente ou adicional ao processo de degradação, sendo mais benéfica que as estratégias tradicionais, ocorrendo sem a necessidade do transporte do material contaminado (SINGH; GUPTA, 2016).

A biorremediação “*ex-situ*” envolve a remoção do material contaminado para outro local, a fim de tratá-lo, tendo esta última um custo mais elevado (BOOPATHY, 2000; ZHANG et al., 2000). Esta tecnologia pode apresentar três estratégias: Bioatenuação, Bioestímulo e Bioaumento (FILHO; CORIOLANO, 2016).

A bioatenuação ou atenuação natural é uma biorremediação “in situ” que apresenta baixo custo, envolvendo a utilização de micro-organismos autóctones, sem qualquer interferência de outras tecnologias ativas de remediação, ocasionando numa redução da toxicidade ou mesmo do poluente (BENTO et al., 2003; COUTINHO et al., 2015).

O bioestímulo é a adição de agentes estimulantes, como nutrientes, oxigênio e surfactantes, em um local contaminado com o objetivo de estimular a atividade e o crescimento da microbiota existente no ambiente, que sejam degradadores naturais dos compostos (MROZIK e SEGET, 2010; EVANS e FURLONG, 2003; BENTO et al., 2005). Uma desvantagem é o fato de o processo apresentar um período de latência após a introdução dos nutrientes enquanto os micro-organismos se propagam (ALISI et al., 2009).

O bioaumento é a introdução de micro-organismos selecionados, como potencialmente capazes de degradar o poluente alvo. Esse processo pode ser realizado com micro-organismos endógenos inalterados, cultivados e adaptados ao poluente, ou mesmo alterados geneticamente para melhor desempenho no processo (EVANS e FURLONG, 2003). Esta estratégia apresenta a vantagem do processo iniciar imediatamente quando os micro-organismos são introduzidos no local a ser tratado, além do grande potencial em remediar compostos aromáticos (ALISI et al, 2009; MROZIK; SEGET, 2010). Na tabela 4 podemos observar a descrição de tecnologias de biorremediação.

Tabela 4- Tecnologias de biorremediação

Técnicas	Descrição
Bioaumento	Adição de micro-organismo ao meio contaminado; usada em biorreatores e em sistemas <i>in situ</i> .
Biofiltros	Uso de colunas de suspensão microbiana para tratar de emissões de gases.
Bioestímulo	Estimulação dos micro-organismos endógenos pela adição de nutrientes, podendo ser realizada em solo ou água.
Biorreatores	Biodegradação em um reator para tratar pastas ou líquidos contaminados.
Compostagem	Tratamento aeróbico, no qual o material contaminado é misturado com um agente espessantes, podendo ser utilizadas pilhas estáticas ou aeradas.
Landfarming	Sistema de tratamento para solos contaminados, podendo ser realizado <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> .
Bioventilação	Tratamento de solo contaminado através do estímulo do crescimento de micro-organismos por meio de injeção de oxigênio.

Adaptado de Baker; Herson(1994) e Boopathy(2000)

A escolha do processo mais adequado e eficiente dependerá do tipo e das características físico-químicas e toxicológicas dos poluentes; dos micro-organismos que existem no local; o volume do material que será tratado; tempo e custo para a utilização da tecnologia (WALTER; CRAWFORK, 1997).

A biorremediação apresenta vantagens e desvantagens, tais como, as apresentadas por Baker; Herson (1994) e Smith (1996), respectivamente:

1. Vantagens:

- ✓ Pode ser realizado no local;
- ✓ Mantém ruptura mínima do sítio poluído;
- ✓ Eliminação de custos de transporte;
- ✓ Eliminação de poluentes de modo permanente;
- ✓ Elimina persistência prolongada de determinados poluentes.

2. Desvantagens:

- ✓ Compostos orgânicos, em sua maioria, são resistentes a ação de micro-organismos;
- ✓ Pode ser lenta;
- ✓ Envolve a adição de dispersantes químicos que podem contaminar o ambiente.

3.5 Biodegradação de Hidrocarbonetos

A biodegradação de hidrocarbonetos é um processo de grande complexidade que depende da natureza e quantidade dos contaminantes presentes no ambiente poluído (WIDDEL; RABUS, 2001). Esse processo ocorre quando os micro-organismos utilizam como fonte de energia e carbono, para os seus processos vitais, os compostos orgânicos presentes no poluente. Estes são alterados quimicamente (biotransformação) ou quebrados em estruturas simples, como dióxido de carbono e água promovendo a mineralização total (ATLAS; BARTHA, 1996).

A habilidade de degradação de poluentes por micro-organismos foi descrita pela primeira vez por Miyoshi em 1895 (apud MULLER HURTIG et al., 1993). Essa biodegradação é realizada por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, onde cada espécie microbiana apresenta suas particularidades, eficiências e deficiências, cujas características são de grande importância na seleção dos micro-organismos para serem utilizados na biorremediação. Os hidrocarbonetos do petróleo não são metabolizados na mesma taxa, isso é dependente do grau de concentração do poluente e a habilidade das espécies utilizadas no processo de degradação (HEIDERSCHIEDT et al., 2016). Os micro-organismos podem atenuar naturalmente o ambiente contaminado, ou mesmo serem estimulados para tal finalidade. E a rota metabólica da degradação depende das características específicas de cada um e dos fatores do meio ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Parâmetros, como: pH, nutrientes, oxigênio, temperatura e outros, são de fundamental importância para a otimização do desempenho dos micro-organismos e eficiência do processo que

levará a mineralização do poluente, conduzindo a formação de CO₂ e água (FRANKERBERBER JR., 1992).

No geral, os fatores determinantes na biodegradação encontram-se ligados ao substrato, aos micro-organismos e ao meio ambiente, onde as condições bióticas e abióticas são fundamentais (JACQUES et al., 2010; ZHU et al. 2010). São eles, os quais contribuem para a eficácia e a velocidade da biodegradação:

1. Fatores relativos ao substrato:

- Concentração do substrato: estudos indicam que a taxa de biodegradação de determinado composto presente em alta concentração não se repete em concentração muito baixa, o que explicaria a persistência de níveis residuais de algumas substâncias biodegradáveis na água, ou até mesmo, no solo (NEILSON et al., 1985);
- Propriedades físico-químicas: volatilidade, solubilidade em água, tendência à sorção por sólido. Compostos xenobióticos em meio aquático aderem aos sólidos em suspensão, porque a configuração da molécula pode influenciar na velocidade de sua degradação microbiana (ZAGATO; BERTOLETTI, 2006).

2. Fatores relativos aos micro-organismos, segundo Zagato; Bertoletti (2006):

- Composição da população de micro-organismos: presença e densidade;
- Interações intra e interespecíficas;
- Exposição prévia: os micro-organismos podem desenvolver a habilidade de degradar certos poluentes, porém, estes compostos podem ser degradados por micro-organismos que tenham sido expostos ao poluente por períodos prolongados, e não por aqueles provenientes de sítios não poluídos.

3. Fatores relacionados ao meio ambiente (JACQUES et al., 2007; CORSEUL; ALVAREZ, 1996; ALVAREZ-COHEN, 1993):

- Temperatura, pH e tensão de oxigênio são parâmetros que afetam a atividade dos organismos degradadores;
- Natureza e concentração dos aceptores final de elétrons, que geralmente é o O₂ em processos aeróbicos;
- Presença de nutrientes, bem como a presença de microelementos necessários para a efetivação dos processos biológicos, além de serem constituintes de enzimas.

3.6 Micro-organismos Degradadores

Os principais micro-organismos responsáveis pela degradação são: os fungos filamentosos, as leveduras e as bactérias. De acordo com Soares et al.(2011) na literatura científica, esses organismos são citados como agentes transformadores eficazes, face à habilidade em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias

Isso é possível pelo fato deles utilizarem os hidrocarbonetos dos poluentes como fonte de carbono para produção de energia e biomassa, o catabolismo, ou por co-metabolismo, que acontece quando o composto é metabolizado diante de outra fonte de carbono primária (BOOPATHY, 2000).

Os micro-organismos podem utilizar várias fontes para suprir suas necessidades de carbono, como macromoléculas insolúveis, porém estas precisam ser degradadas em unidades monoméricas solúveis para permitir sua assimilação. E o sistema enzimático constituído por enzimas extracelulares inespecíficas tem um papel fundamental nesse processo (JOHNSEN et al., 2005; BONONI et al., 2008).

Muitos desses organismos passam por adaptações, alterações genéticas e a evolução, fatores que levam ao surgimento de novas populações resistentes ao contaminante e com potencial para degradar os xenobióticos (CRAWFORD, 2006).

Uma parte da microbiota de ambientes, contaminados com petróleo e derivados, cresce na presença desses poluentes produzindo biossurfactantes (VIRAMONTES-RAMOS et al., 2010). Esses são agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema por substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface diminuindo a tensão superficial e interfacial dos líquidos, que agem como emulsificantes (BUENO et. al., 2010). Essa propriedade aumenta a solubilidade e a disponibilidade de poluentes hidrofóbicos aos micro-organismos, aumentando o potencial de biodegradação (COSTA et al., 2010). Diversos micro-organismos são capazes de produzir biossurfactantes, tais como leveduras (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008) e fungos filamentosos (COLLA et al., 2010; MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

Na literatura são encontrados relatos da capacidade de degradação de micro-organismos:

Lima et. al.(2011) afirmam que os principais fungos degradadores, encontrados na literatura, são as espécies de *Penicillium sp.* e *Aspergillus niger*, porém muitas vezes, cada espécie é responsável em degradar um único componente do óleo, sendo necessário o uso de consórcios puros ou consórcios mistos para alcançar a eficiência no processo.

Isso é confirmado, quando outros autores citam que organismos como *Cunninghamella* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus niger* vem mostrando sua capacidade de degradar, principalmente, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) (SUTHERLAND, 1992; LAUNEN et al., 1995; SACK et al., 1997).

Silva e Esposito (2004) confirmam a eficiência de *Aspergillus niger* na degradação de compostos recalcitrantes. Um dos primeiros estudos desenvolvidos por Cerniglia e Perry (1973), apresentam o isolamento dos fungos *Aspergillus versicolor*, *Cephalosporium acremonium*, *Penicillium* sp. e *Cunninghamella elegans* como degradadores de hidrocarbonetos.

Lopez et al. (2008) realizando ensaios de degradação concluíram que os fungos *Rhizopus* sp., *P. funiculosum* e a *A. sydowii* podem ser mais uma alternativa a ser usado na biorremediação.

Outros autores citam *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Candida*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Rhodospiridium*, *Saccharomyces*, *Trichosporium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Rhizopus* que são os isolados mais comuns nestes ambientes (SANTOS; LINARDI, 2004; LOVAGLIO et al., 2005; LIMA et al., 2006).

Ahearn et al. (1971) isolaram espécies de *Candida*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sacharomyces*, *Sporobolomyces* e *Trichosporium*, e verificaram que todas eram capazes de metabolizar hidrocarbonetos. Algumas linhagens de *Candida* apresentaram a capacidade de degradar hidrocarbonetos lineares e aromáticos em óleo cru, em óleo Diesel e em outros petroderivados e os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são relatados como os fungos filamentosos mais eficientes na degradação de hidrocarbonetos (JUHASZ; NAIDU, 2000).

Os gêneros mais comuns de bactérias tanto no ambiente terrestre como no ambiente aquático são: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus* e *Aeromonas*. As linhagens de *Vibrio* são limitadas ao ambiente marinho (LEAHY; COWELL, 1990).

Algumas características desses micro-organismos contribuem para a eficiência nos processos de degradação. Em geral, as bactérias e leveduras mostram que sua capacidade de degradar cadeias de alcanos diminui com o aumento do número de carbono, enquanto os fungos filamentosos não demonstram preferência quanto ao tamanho das cadeias (SINGH, 2006).

Muitos estudos têm descrito a degradação sinérgica por fungos e bactérias, durante a biorremediação de solos contaminados com HPA's (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos), onde os fungos iniciam a clivagem dos anéis aromáticos, pois, apresentam grande potencial para tal ação, e em seguida as bactérias atuam na degradação dos metabólitos resultantes (LEBKOWSKA et al., 2011; ARUN e EYINI, 2011).

Há um consenso na literatura de que os fungos têm maiores possibilidades de realizarem a oxidação inicial dos HPA's (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos), devido as suas estruturas. As hifas fúngicas podem se alongar na direção destes compostos, aumentando a superfície de contato com o xenobiótico (TAVARES et al., 2006), além de produzir exoenzimas que são difundidas no ambiente contaminado, fazendo com que os intermediários oxidados resultantes do metabolismo fúngico dos HPA's (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos) fiquem disponíveis para as bactérias (JACQUES, 2005; ANDRADE, 2009).

Segundo Esposito; Azevedo (2004) os fungos destacam-se porque são considerados decompositores de substâncias naturais, como por exemplo, a celulose e a lignina; produzem enzimas extracelulares; capacidade de sobreviver em ambientes extremos, como baixos valores de pH, pobres em nutrientes e baixa atividade de água, como locais com clima árido e semi-árido (KASHANGURA et. al, 2006; ANDRADE, 2009).

As bactérias possuem outras características, além da sua atividade de degradação, como: variabilidade genética, rápida degradação e facilidade de adaptação em diversos ambientes. Além disso, as bactérias gram-negativas apresentam uma alta tolerância a solventes devido à sua membrana externa (ROSATO, 1998). Por outro lado, muitas delas são capazes de emulsificar hidrocarbonetos em solução através da produção de biossurfactantes, que são agentes tensoativos que favorecem a adesão das células à fase oleosa (RODRIGUEZ et al., 2001; MULLIGAN, 2005).

A capacidade de degradar compostos recalcitrantes pela ação microbiana é devido ao sistema enzimático e a variedade de substâncias naturais aptas para a transformação de moléculas orgânicas em outras bem distintas (ALEXANDER, 1999).

3.6.1 Fungos

São seres eucarióticos, heterotróficos, uni ou pluricelulares, na sua maioria são organismos aeróbios. Ocupam diferentes nichos ecológicos podendo ser saprófitos, parasitas ou mesmo simbiontes (ALEXOPOULOS et al., 1996). Estes organismos possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em diversos ambientes, como no ar atmosférico, na água, no solo, nos animais e alimentos (CARMO et al. 2007, FLORES; ONOFRE, 2010).

Os fungos filamentosos produzem filamentos chamados de hifas, cujo conjunto forma o micélio, enquanto as leveduras formam um pseudomicélio que pode se agrupar, porém nunca formando tecidos verdadeiros.

Apresentam uma parede celular formada essencialmente de celulose e quitina e o principal polissacarídeo armazenado é o glicogênio. Quanto à nutrição, podem ingerir substâncias por absorção, após ação de enzimas produzidas pelos próprios fungos, no exterior da parede celular. E esses nutrientes para que sejam absorvidos devem possuir um tamanho adequado para que possam ser assimilados e atravessar as camadas celulares: parede, membrana celular ou protoplasma antes de alcançar o citoplasma onde serão metabolizados (GRIFFIN, 1994; ALEXOPOULOS et al., 1996; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Segundo Benevides & Marinho (2015), eles necessitam de quatro elementos básicos: H, O, C e N, além de outros elementos em menor quantidade: P, S, Mg, Fe, Zn, Cu, Mb. De maneira geral, para o seu crescimento, necessitam de uma fonte orgânica de Carbono ou de uma fonte inorgânica de Nitrogênio.

Os fungos apresentam grande importância econômica, sendo utilizados: na alimentação, produção de medicação, controle de pragas, bioindicadores de poluição; produção de enzimas, fermentação alcoólica, degradação, entre outros (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; RODRIGUES; MARINHO, 2012). Esta última atividade dos fungos merece destaque, pois, são considerados biodegradadores eficientes de polímeros de plantas naturais como lignina e celulose, além de outros tipos de moléculas orgânicas tais como, ceras, borrachas, fenol, benzeno, tolueno, xileno e xenobióticos (BENEVIDES; MARINHO, 2015).

Segundo Soares et al.(2011), o emprego dos fungos na remoção dos poluentes começou a ser estudado nos últimos trinta anos do século XX. Singh (2006) afirma que os fungos são promissores nos processos de remediação, alcançando cada dia mais resultados positivos.

3.7 Consórcios Microbianos

Os micro-organismos apresentam especificidade e susceptibilidade, motivando a utilização de suas associações por mostrarem maior eficiência quando comparada às culturas puras. Esse fato, possivelmente, é devido a ocorrência da co-metabolização que permite que alguns micro-organismos, considerados primários encarregam-se do ataque inicial aos constituintes do poluente, metabolizando o substrato principal, produzindo compostos intermediários que são, posteriormente, assimilados por outros gêneros e espécies diferentes, considerados micro-organismos secundários.

As bactérias, fungos filamentosos e leveduras são agentes transformadores eficazes, devido à sua habilidade em degradar ampla gama de substâncias orgânicas, utilizando-as como fontes de carbono e energia durante o crescimento. Devido à complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação do petróleo e derivados, apenas consórcios de microrganismos com diferentes gêneros e espécies conseguem degradar as frações do óleo (TIBURTIUS et al., 2004).

Crisafi et al.(2016) verificaram em experimentos de biorremediação que as culturas utilizadas de forma isoladas não foram tão eficientes quando como foram utilizadas em consórcio.

Leonel et al. (2010) também afirmam que o emprego de consórcios microbianos é viável, podendo proporcionar uma completa degradação dos contaminantes.

Luz et al. (2011) investigando a potencialidade de um consórcio microbiano em degradar óleo diesel, constataram que este se mostrou eficiente no processo de biorremediação.

Costa et al., (2007) estudando um consórcio de microrganismos constituído por fungos e bactérias, visando à maior eficiência do processo, verificaram que o consórcio apresentou potencial de aplicação em processos de biodegradação de petróleo e derivados.

Confirmando essa teoria, Mariano et al., (2008) afirmam que a melhor estratégia seria aquela baseada na injeção de consórcios, pois mesmo culturas com reconhecida capacidade de biodegradar hidrocarbonetos podem falhar quando aplicadas isoladamente, pois, algumas espécies são capazes de degradar apenas frações dos poluentes. Desta forma, o emprego de consórcios microbianos contribui no sentido de ampliar sistemas enzimáticos distintos, necessários à metabolização completa do poluente. Assim, micro-organismos que não apresentam capacidade para degradar de forma completa um composto específico, poderão transformá-lo em um composto intermediário degradável por outro micro-organismo. Há uma grande diversidade de organismos viáveis a serem aplicados em processos de biorremediação e com base nas afirmativas citadas anteriormente é aconselhável a utilização de consórcios microbianos para obter um processo eficiente.

3.8 Produção Enzimática

O uso de enzimas é visto como um dos maiores setores da indústria biotecnológica. A obtenção é de origem animal e vegetal, ou pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (MACIEL et al., 2010).

Os fungos são considerados maiores produtores das enzimas lignolíticas, e esses se destacam por apresentarem alto potencial de degradação de compostos xenobióticos (VAN DEN BRINK et al., 1998).

Muitos microrganismos apresentam a capacidade de realizar a bioconversão desses substratos lignocelulósicos em compostos de fácil assimilação para o seu metabolismo, envolvendo as enzimas hidrolíticas, cujo papel é de fundamental importância nessa conversão (VALASKOVÁ, 2005). As maiores famílias dessas enzimas são: lacases, lignina peroxidases e manganês peroxidases (D'SOUSA et al. 1999). Por falta de especificidade pelo substrato, elas são empregadas na degradação de diversos compostos com aplicação na indústria química, alimentícia, agrícola, de papel, têxtil, além de setores da indústria de cosméticos (BONUGLI-SANTOS et al., 2010).

Tabela 5. Enzimas que atuam na degradação de lignoceluloses.

Nome recomendado	Nome sistemático	Reação
Lacase	Benzenodiol: oxigênio oxiresutase	4-Benzenodiol+O ₂ =4-benzosemiquinona+H ₂ O
Lignina peroxidase	Diarilpropano O ₂ , H ₂ O ₂ oxidoreductases	Catalisa várias oxidações em cadeia lateaisl alquil, quebra de ligações C-C.
Manganês peroxidase	Mn(II):H ₂ O ₂ oxiredutase	Cataliticamente depende de H ₂ O ₂ e íons Mn ²⁺

Fonte: Adaptado de LEONOWICZ et al. (1999).

3.9 Toxicidade e mutagenicidade do petróleo e derivados

Além de causar danos ao meio ambiente, o petróleo e seus derivados são considerados ameaçadores aos seres vivos, pois, são constituídos por hidrocarbonetos altamente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (LUZ et al., 2016), sendo também considerados perigosos pela sua potencialidade de causar leucemia (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996). Segundo Chen et al. (2008), afirmam ser considerados genotóxicos para linfócitos humanos, porque induz uma variedade de danos no DNA, detectados pelo ensaio do cometa em experimentos realizados. No geral, podem ser letais a curto prazo, ou provocar alterações de comportamento, reprodução, crescimento e alimentação (SOUZA, 2010).

Pedrozo et al. (2002) e Rosato (1997) afirmam que os subprodutos formados durante o processo de degradação podem se tornar mais tóxicos ou mutagênicos que o produto original, portanto, é necessário o monitoramento e avaliação do processo de biodegradação.

Os testes de toxicidade são ferramentas úteis para definição de diretrizes que estimam as concentrações de um determinado composto tóxico, sendo importante na avaliação da eficiência dos processos tecnológicos aplicados na melhoria das condições ambientais (CAPUZZO et al., 1988; MAILA; CLOETE, 2005). Alguns parâmetros são utilizados para quantificar os efeitos desses poluentes sobre a biota afetada, como: número de organismos, taxa de reprodução, comprimento, massa corpórea, anomalias, alterações fisiológicas, densidade e diversidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Plaza et al. (2005) dizem que o uso de bioensaios combinados com análises químicas apresentam resultados mais confiáveis para análise de riscos genotóxicos, sendo portanto indicados para a avaliação da efetividade de processos de biorremediação.

Desta forma, pesquisas nesse âmbito são atualmente fomentadas no sentido de obter consórcios microbianos potencialmente capazes de degradar petroderivados, para que estes sejam utilizados em processos de biorremediação de áreas impactadas por fontes oleosas.

4 TREATMENT OF DIESEL OIL BY FUNGI ISOLATED FROM CAATINGA AND TOXICITY EVALUATION

Manuscrito submetido ao periódico: International Biodeterioration & Biodegradation
Fator de impacto: 2.429
Qualis: B1

Normas do periódico:

<https://www.elsevier.com/journals/international-biodeterioration-and-biodegradation/0964-8305/guide-for-authors>

Treatment of diesel oil by fungi isolated from Caatinga and toxicity evaluation

Geórgia Gomes da Cruz^{*1}, Jaciana dos Santos Aguiar², Jacilene Marques Maciel¹, Cacio Magno Barbosa Gonçalves¹, Ana Lúcia Gonçalves da Silva¹, Augusto Alencar e Silva¹, Erik Jonne Vieira de Melo¹, Pêrsio Alexandre da Silva¹; Norma Buarque Gusmão¹ e Teresinha Gonçalves Da Silva²

¹ Environmental and Industrial Microbiology Laboratory, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Avenue Prof. Arthur de Sá, s/n, University City, Brazil.

² Cell Culture Laboratory, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Avenue Prof. Arthur de Sá, s/n, University City, Brazil.

*Corresponding author. Tel./fax: +55 (81) 2126 8366.

E-mail address: georgia.cruz@ufpe.br (Geórgia Gomes da Cruz).

Abstract

Research has been carried out to the search for ecologically and economically viable alternatives, such as bioremediation, to treat environments polluted by oil-derived products. The present study aimed to evaluate the effectiveness of fungal diesel oil degradation. Factorial planning (2⁴) was carried out and analyzed statistically using the Statistic 8.0 software package. Different inoculums of three microorganisms were tested (*Cunninghamella elegans*, *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillus niger*) in a range of concentrations of glycerol, with hydrocarbon degradation and the analysis of the toxicity of the byproducts the response variables used. The tests were statically performed in Erlenmeyer flasks for 15 days and at temperatures of 28 ± 2°C. The simultaneous variation of the tested factors allowed the performance of the fungus in the degradation of hydrocarbons to be verified. Gas chromatography showed the highest degradation percentage in the 15-day test, reaching peaks of up to 98%. All the tested microorganisms had diesel oil degradation potential. The biodegradation process was improved when the *A. niger* inoculum and the glycerol concentration were increased, although this resulted in greater toxicity. Thus, other tests should be performed with the objective of maintaining the degradation rates and reducing the production of toxic metabolites.

Keywords: Bioremediation; consortium; fungus; diesel oil; cytotoxicity; phytotoxicity

1 Introduction

The oil industry contributes significantly to the global economy, and due to its size requires a sectoral structure, increasing concerns regarding its potential for environmental contamination (Brito et. al., 2010). Diesel oil, for example, is an oil-derived product that is used on a large scale and is formed by compounds which are considered harmful, such as benzene, cycloalkanes, polycyclic aromatic hydrocarbons, which can be toxic in high concentrations (Mhatre and Kunde, 2014).

While the oil industry brings numerous benefits to society, it is globally recognized as an economic activity with high environmental impact (Cerqueira et al., 2011). Activities involving the extraction, refining, transport and use of oil and its derivatives have an elevated pollution potential. They represent high environmental risks as they can cause discharges on a range of scales, from tanker accidents to operational discharges, including leaks due to improper storage.

The pressure from environmental regulatory bodies has encouraged companies to develop clean technologies, notably bioremediation (Fernández-Luqueño et al., 2011), which has the purpose of recovering areas affected by chemical pollutants. Filho et. al. (2015) considers a technique of natural attenuation, at which the pollutant remains in the affected site, and through processes such as biodegradation, and among others, is the decontamination of the environment. This is a highly recommended technique as it is based on a pollutant degradation process through the action of microorganisms, especially fungi and bacteria.

A large number of these microorganisms use the hydrocarbons present in oil as a carbon source in their processes, contributing to the degradation process. However, each organism has a certain specificity, making the use of microbial consortium important, as these associations have shown greater efficiency in degradation processes than pure cultures. Confirming this theory, Mariano et al. (2008) stated that the best strategy would be based on consortiums, as even cultures with a recognized ability to degrade hydrocarbons may fail when applied in isolation.

According to Ghazali et al. (2004) isolated microorganisms can metabolize only a limited quantity of substrates, while microorganism groups with high enzymatic capacity allow a high rate of biodegradation. The complete and efficient degradation of petroleum hydrocarbons and their derivatives requires the active presence of a variety of metabolic pathways in the microbiological community (Kauppi et al., 2011), and the resulting products of the decomposition should be limited to water and carbon dioxide. Thus, in addition to chemical evaluations, bioassays are necessary to assess the effectiveness of the bioremediation process, as they provide more consistent and reliable data, enabling greater recognition of the cytotoxicity of metabolites formed during the process (Reusser et al. 2002; Plaza et al. 2005). Given the growing demand for efficient treatment technologies in

environments contaminated by hydrocarbons derived from petroleum, and the focus given to bioremediation processes, the present study proposed to evaluate the diesel oil degradation capacity by filamentous fungi associated in consortiums, as well as the toxicity of the waste generated by this process.

1 Materials and methods

a. Diesel oil characterization

The diesel oil used in this study was collected from tanks at the port terminal of Suape, Pernambuco, Brazil, provided by the Companhia de Petróleo Brasileiro (Petrobras SA). Elemental analysis of carbon, hydrogen, and nitrogen was carried out in the laboratories at Petrobras Petroleum Co, using a gas chromatograph, the GC 5890 (HewlettePackard, serial number II) equipped with a flame ionization detector.

b. Microorganisms

Seven fungi from the culture collection of the Catholic University of Pernambuco were used. They were isolated from Caatinga (PROCESSO SISBIOTA Project N°. 563382 / 2010-4).

c. Selection of microbial consortium

The microorganisms were selected according to the method of Hanson et al. (1993), a qualitative test used to determine the degradation of diesel oil by microorganisms. The principle of this test is that during the microbial oxidation of the hydrocarbons, occur the transfers of electrons and reduces the 2,6-dichlorophenol indophenols (DCPIP), electron acceptors. It can be used to investigate the consumption of hydrocarbons as substrate by a color change from blue to colorless (blue shows oxidized while colorless indicates reduced conditions). Into each Erlenmeyers flasks of, 49,5 ml of Bushnell Haas (BH) medium was added with 0,5 ml oil diesel oil, 0,5 ml of DCPIP and 2 agar blocks (8mm diameter) of the tested microorganism.

The antagonism test was performed to analyze the interaction between them, using the method of Bauer et al. (1966). In the test, the microorganisms were grow on Petri dish containing the culture medium nutrient (Sabouraud Dextrose Agar) and incubated at 32 ± 1 °C for 48 h. Following this period, the formation or absence of halos, which are indicative of growth inhibition, is verified.

d. Acclimatation of the microorganisms

Before of the biodegradability trials, the fungi were subjected to acclimatization in Erlenmeyer flasks with Bushnell Haas mineral medium containing increasing concentrations of diesel oil (1%, 4%, 7%, and 10% v v⁻¹) every 48 h and inoculated with microorganisms sown in blocks of agar (8 mm in diameter), maintained at a temperature at $28 \pm 2^\circ \text{C}$.

e. Full Factorial Design

After the microorganisms had been defined, 2⁴ full factorial design involving two levels and four variables was performed, totaling 16 tests and 3 central points.

Table 1 displays the matrix of trials utilized, to assess effects of: glycerol concentration (0mL, 2mL e 4mL) and inocula quantity (0, 1 or 2 blocks of gelose per microorganism). The response variable was percentual biodegradation. Analysis was carried out using the Statistic 8.0 software package.

Table 1

Independent variables and levels utilized in full factorial design 2⁴.

Variables	(-)	(0)	(+)
1-Inoculum (<i>C. elegans</i>)	0 block	1 blocks	2 blocks
2-Inoculum (<i>R. arrizhus</i>)	0 block	1 blocks	2 blocks
3-Inoculum (<i>A. niger</i>)	0 block	1 blocks	2 blocks
4-Glycerol	0 mL	2 mL	4mL

The tests were statically performed in Erlenmeyer flasks (500ml) for 15 days and subjected to a temperature of $28 \pm 2^\circ \text{C}$. Each flask contained 90 mL of mineral medium BH and 10 mL of diesel oil. Different inoculums of selected microorganisms were tested (*C. elegans*, *R. arrhizus* and *Aspergillus niger*) in various concentrations of glycerol, with the response variable being the hydrocarbon degradation determined by gas chromatography.

f. Gas chromatography

The degradation of the aliphatic hydrocarbon of the diesel oil was analyzed by gas chromatography through the reduction in the concentration peaks of the fuel constituents compared with retention time. A gas chromatographer-mass spectrometer (GC-MS), ShimadzuTM model 17A/QP 5050^a with a chromatographic column VB-5 (5% of diphenyl and 95% of dimethylpolysiloxane) size 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm was used to analyze samples. Temperature was set to vary linearly from 40 °C to 270 °C at a rate of 10 °C min⁻¹, and maintained for 22 min. Helium gas was the transport, and the interface temperature was 280 °C. Injection of samples in the GC-MS system was performed in triplicate.

g. Analysis of toxicity

The toxicity of the waste generated in the degradation process was analyzed by phytotoxicity (plant cells) and cytotoxicity (mononuclear cells from human peripheral blood) tests. Using the method of Tiquia et al. (1996), the phytotoxicity test used Petri dishes containing double filter paper soaked with 5 ml of bio-processed diesel oil, free of cells, and ten beans (*Phaseolus vulgaris* L.) which were placed equidistantly on each plate. At the same time, negative control plaques were made using 5 ml of the oil source and the positive control plates with 5ml sterile distilled water. All tests were performed in triplicate at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for seven days. Subsequently, the percentage of germination and root growth percentage was measured in order to obtain the germination index value. the germination percentage (average of trial seeds germinated divided by the average of seeds germinated in controls with water), root system lengthening (the root system growth average in the trial seeds divided by the average growth of the root system in control with water) and the germination index (seeds germination multiplied by the root system growth).

Cytotoxic evaluation was carried out on mononuclear cells from human peripheral blood (PBMC) by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)- 2,5-diphenyl-212 tetrazolium bromide] colorimetric method (Mosmann, 1983). The collection of peripheral blood was performed by trained professionals using sterile disposable 10 ml syringes. As inclusion criteria ten healthy non-smoking adult volunteers, aged 20 to 30 years with no history of recent illness and no recent exposure to radiation, drug or alcohol were selected. The project was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Universidade Federal de Pernambuco corresponding to Ethical Consideration Certificate number 30731814.8.0000.5208.

The peripheral blood mononuclear cells were isolated from a sample of 3 ml of peripheral blood, plus 5 ml of phosphate buffered saline (PBS). This mixture was added to a Falcon tube with 2 mL of

Ficoll and subjected to centrifugation for 30 minutes at 2000 rpm. Then, the region between the red cells and serum, known as the cell cloud (PBMC), was aspirated and added to a third tube. Subsequently, the sample was completed with phosphate buffered saline (PBS) to a volume of 11 ml and the tube was centrifuged at 1500 for 20 minutes. The supernatant was discarded and the PBMC *pellet* was re-suspended in 2 ml PBS. The cells were removed, washed with phosphate buffer and re-suspended in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium supplemented with 20% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (penicillin and streptomycin), to a final concentration of 3×10^5 cells / ml. Phytohemagglutinin (3%) was added to induce the proliferation of peripheral mononuclear cells. The cells were incubated in a greenhouse at 37°C with an atmosphere of 5% CO₂ for 24 hours before the addition of samples. The cytotoxic activity of the samples was evaluated after an incubation period of 24, 48 and 72 hours. They were tested in quadruplicate and the inhibition percentage was calculated using the *GraphPad Prism* software version 5.0. demo.

2 Results and discussion:

a. Diesel oil characterization

Analysis of hydrocarbons produced a profile with a carbon chain varying from nC9 to nC36, with n-alkanes predominating from nC11 to nC17. Branched alkanes, such as pristanes and phytanes, were detected at trace levels. Diesel oil elemental analysis displayed the following results: 85.9% (ww⁻¹) of carbon, 13.1% (ww⁻¹) of hydrogen, and <0.3% (ww⁻¹) nitrogen (Silva et al., 2015).

b. Selection of microbial consortium

The Hanson et al. (1993) test indicated the degradation potential of the selected micro-organisms: *Cunninghamella elegans*., *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillus niger*. The tests with fungi exhibited positive results, obtained from visual observation of the complete discoloration of the medium after 3, 8 and 10 days, respectively. Maciel et al. (2013), using kerosene as substrate, verified that the tested fungi promoted oxidation of DCPIP, which occurred after 14 hours for *Penicillium griseofulvum*-UFPEDA880, after 20 hours for *Penicillium aurantiogriseum*-UFPEDA-884 and after 25 hours for *Penicillium Corylophilum*-UFPEDA 886. Silva et al. (2015), using diesel oil as a substrate for the cultivation of the bacteria *Staphylococcus saprophyticus*-UFPEDA 800 and *Serratia marcescens*-UFPEDA 839, and the yeasts *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 and *Candida ernobii* UFPEDA 862, promoting reduction the indicator in 16-24 h. The halo formation, indicative of growth inhibition, was not observed. This suggests that the interaction between the fungi is positive, as

inhibition of the same did not occur, and is therefore ideal for the formation of a fungal consortium. According to Silva et al. (2015), this test is an important criterion as it allows an efficient consortium with the ability to grow and to act synergistically.

c. Chromatographic analysis

Factorial design which tested the simultaneous variation of the factors, reveals the performance of fungi in the degradation of diesel oil hydrocarbons. Figure 1 shows the effects of treatment on the degradation process, Among the hydrocarbons present in diesel oil, 13 n-alkanes, nC9 to nC21 in length, were investigated.

However, gas chromatography exhibited higher percentages of degradation in tests 14, 15 and 16, with peaks of up to 98%. The average percentage of the total degradation of n-alkanes from oil diesel in these trials were 83,9%, 95,45% and 92,3%, respectively. The condition of the assay 15 was determined to be the best condition: inocula with two blocks of gelose of the *Rhizopus arrizhus*; two blocks of gelose of *Aspergillus niger* and 4mLof glycerol concentration. This assay showed the following hydrocarbons were partially removed: nonano (98,3%), decane (96,8%), undecane (96,6%), dodecane e tridecane (96,5%), tetradecane (96,4%),pentadecane (94,1%). hexadecane (95,8%), heptadecane (95,6%), octadecane (96%), nonadecane (95,1%), heicosane (92,1%) and heneicosane (90,8%)(See figure 1).

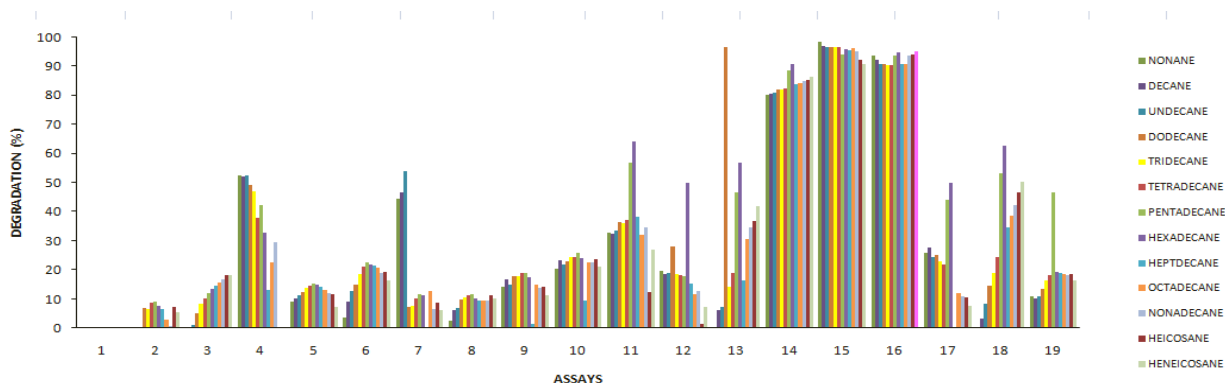


Fig 1. Degradation percentage of diesel oil n-alkanes by microbial consortium in the trials of factorial planning 2⁴.

Maciel et al. (2013) observed that the largest degradation percentage of these hydrocarbons occurred over 29 days: with 93% of nonane degradation, 57% of undecane, 40% of penta and tridecane, 33% of dodecane and decane and 22% of tetradecane. Silva et al. (2015), in diesel oil degradation tests in a bioreactor, found that the nonane was completely removed by the consortium. The following hydrocarbons, meanwhile, were partially removed: decane (96%), heneicosane (90%) eicosane (89%), undecane (86%), nonadecane (85%), octadecane (80%), heptadecane (77%), dodecane

(76%), hexadecane (76%), tridecane (71%), tetradecane (70%) and pentadecane (69%). According to Deon et al. (2012) microorganisms start to use the pollutant organic compound as a carbon source, and thus cause a reduction in pollutant concentration over time. Li et al. (2009), using a mixed consortium to treat contaminated soil, found a hydrocarbon degradation rate of 41.3% over an incubation period of 64 days.

The Pareto's diagram and the effects of each one of the variables tested in relation to bio-removal efficiency. In the present study, the tests with the highest degradation rates had higher concentrations of the *Aspergillus niger* microorganism (two blocks of gelose) and used glycerol (4mL) as an additional carbon source, produced a positive effect in degradation. The *Aspergillus niger* inoculum concentrations and the interaction between *Aspergillus niger* and glycerol concentration were statistically significant. The effects were considered significant only if they attained a confidence level of 95% ($p = 0.05$) which is represented by the dotted line (Figure 2).

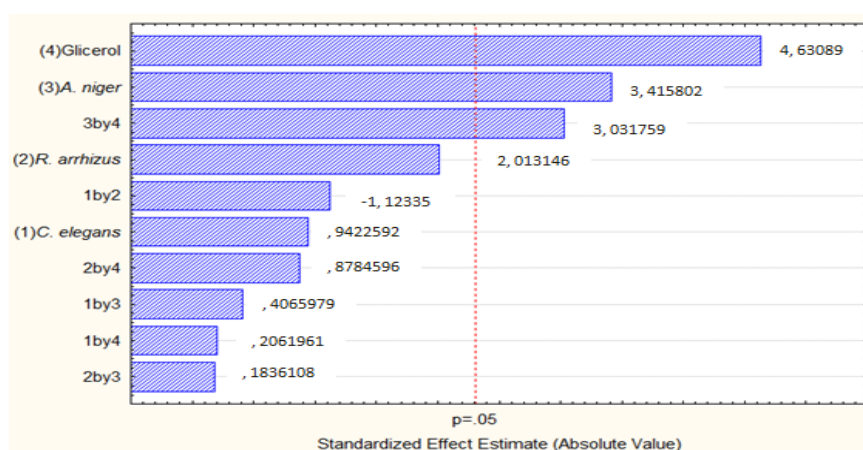


Fig 2. Pareto's diagram with significance level of 95% ($p = 0.05$) for factorial planning 2^4 , with the independent variables (1) *C. elegans*, (2) *R. arrhizus*, (3) *A. niger* and (4) glycerol.

The use of glycerol favors a further reduction in diesel fuel concentration. According to Passo et al. (2009), the increase of the degradation rate by using a higher concentration of glucose in the medium is explained by the fact that glucose is a compound preferably assimilated by yeast, favoring the formation of biomass, and its presence in the substrate does not imply that other compounds cannot be used. The biostimulation process consists of introducing additional nutrients into the contaminated area, encouraging the growth of microorganisms capable of degrading the pollutants in the medium, promoting an increase in microbial population and consequently a faster degradation of the contaminant (Miller, 2010; Kanissery and Sims, 2011).

d. Toxicity test

The phytotoxicity test results revealed lower toxicity and higher germination index in assays 4, 5, 6, 7 and 8, where beans seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) showed percentage of 96,7%, 86,02%, 96,7%, 100% and 100%, respectively (Table 2).

Table 2 showed the seeds beans after being exposed to waste material of degradation which there were not toxic in sufficient concentrations to hinder germination and root growth.

The control plates containing water in contact with seeds beans showed that there germination and root growth. The control plates containing diesel oil, there was no germination after seven days, confirming its toxicity.

Table 2

Germination rate obtained from the germination percentage and the radicle root growth of beans seeds.

Essays	Germination(%)	Root growth(%)	Germination index
1	0	0	0
2	81,7	69,5	56,8
3	60,2	39,9	24,0
4	96,0	100	96,0
5	86,0	100	86,0
6	96,7	100	96,7
7	100	100	100
8	100	100	100
9	70,9	14,1	10,0
10	64,5	11,7	7,6
11	67,7	9,4	6,3
12	56,9	7,8	4,5
13	75,2	8,6	6,5
14	89,2	8,0	7,1
15	92,5	11,0	10,2
16	60,2	5,9	3,6
17	89,2	15,9	14,2
18	88	16,7	14,7
19	89,2	16,2	14,4

The statistical analysis showed that the glycerol concentration and the interaction between this and the *Aspergillus niger* inoculum were negatively significant, regarding the influence on waste toxicity. The greater the concentration of these factors, the smaller the germination index, as shown in assay 16 with a value of 3.59. Silva et al. (2015), who performed similar assays in which lettuce seeds (*L. sativa*) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.) exhibited germination rates of 41% and 54% respectively after being exposed to the degradation residue material. Plants are considered excellent test organisms for environmental monitoring. This characteristic is due to the responses these organisms display when faced with environmental change, as high rates of aberrant cells are frequently associated with genetic instabilities due to the exposure of the organisms to unfavorable environmental conditions (Bezrukov and Lazarenko, 2002).

The cytotoxicity, the assays (2, 3, 5, 6, 7, 8 and 10) showed low levels of inhibition (< 50%), after 72 hours of exposure to residual metabolites of the degradation process. The assays (12, 13, 14, 15, 16 and 17) exhibited high cell growth inhibition rates (> 90%) at the end 72 hours, indicating the production of toxic metabolites in these assays. The control test containing diesel oil had a 93% inhibition index, showing very toxic to the cells tested. The significant factors were the concentration of glycerol and the interaction of the inoculum of *Aspergillus niger* with glycerol. Thus, when these factors are present in larger concentrations, the cell growth inhibition index is greater. The assessments by Mazzeo (2009) indicated that biodegradation by fungi was effective in the biodegradation of an aqueous mixture of BTEX (Benzene, Toluene, Xylene), as it decreased the genotoxic and mutagenic effects, indicating that the compounds of the mixture were degraded into non-toxic metabolites by cells. Phillips et al. (2000) observed in their study on bioremediation that although there was a reduction in total petroleum hydrocarbons, there was an increase in toxicity, observed by seed germination and toxicity with earthworms, and concluded that intermediate toxic metabolites may have been formed during the process. According to Maila and Cloete (2005), the use of biological activities such as bio-indicators for the removal of organic pollutants can be a complement to existing traditional tools, enabling, due the biological responses provided by bio-indicators, a more accurate assessment of the efficiency of technological processes applied to improve environmental conditions.

3 Conclusion

All the tested microorganisms exhibited potential for diesel oil degradation. The diesel biodegradation encreased when the *Aspergillus niger* inoculum and the glycerol concentration were increased. However, an increase in degradation also brought about an increase in the toxicity of the waste generated by the process. Further studies are therefore recommended, seeking to maintain the level of degradation without resulting in toxic products, providing a more effective process.

4 Acknowledgment

The authors would like to thank the Science Technology Ministry of Brazil and Federal University of Pernambuco for the support received.

5 References

1. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol* 45, 493e496.
2. Bezrukov, V. F., Lazarenko, L. M, 2002. Environmental impact on age-related dynamics of karyotypical instability in plants. *Mutation Research, Amsterdam*, v. 520, p. 113-118.
3. Brito, G. C. B., Souza, D. B., Vasconcelos, F. C. W., Braga, L. C, 2010. A Importância Da Bioprospecção De Microrganismos Em Áreas Contaminadas Com Produtos Derivados Do Petróleo. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.3, n.3, p. 291-310, set./dez. 2010 - ISSN 1981-9951.
4. Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M.H., Camargo, F.A.O., Peralba, M.C.R., Bento, F.M. 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures *Bioresource Technology* v.102 p. 11003–11010.
5. Deon, M. C., Rossi, A., Dal'magro, C., Reinehr, C. O., Colla, L. M., 2012. Bioremediation of Contaminated Soil with Oils Residuals through Bioaugmentation and Natural Attenuation, *Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina*, v. 33, n. 1, p. 73-82, jan./jun.
6. Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-Núñez, E., Dendooven, L., 2011. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil – possibilities and challenges: a review. *Environmental Science Pollution Resolution*, n.18, p.12–30.
7. Filho, S. T., Almeida, T. M., Paixão, C. P. S., Marques, M. R. C., Silva, E.R., 2015. Passive bioremediation: a preliminary study on waste vegetable oil. *Ciência e Natura, Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM*, v.37 n.2. p. 401 – 404, mai.- ago.
8. Ghazali, F. M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A. B., Basri, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, n.54, p.61–67.

9. Hanson, K. G., Desai, J. D., Desai, A. J., 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*, v. 7, p. 745-748.
10. Kanissery, R. G., Sims, G. K., 2011. Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. *Applied and Environmental Soil Science*, v. 2011, Article ID 843450, 10 pages.
11. Kauppi, S., Sinkkonen, A., Romantschuk, M., 2011. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, n.65, p.359-368.
12. Li, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, Y., Zhou, P., Wen, S., 2009. A national survey of polychlorinated dioxins, furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) in human milk in China. *Chemosphere* 75, 1236 e1242.
13. Mhatre, B.A., Kunde, R., 2014. Biodegradation of diesel using microbes from a clam (*Meretrixmeretrix*) shell. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 43, 877e 881.
14. Maciel, C. C. S., Souza, C. S., Silva, P. A., Sousa, M. F. V. Q., Gusmão, N. B., 2013. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *Revista Brasileira Biociências*, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 39-42.
15. Silva, D. S. P., Cavalcanti, D. L., Melo, E. J. V., Santos, P. N. F., Luz, E. L. P., Gusmão, N. B., Sousa, M. F. V. Q., 2015. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 97 (2015) 85 and 89.
16. Maila, M. P., Cloete, T. E. 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Barking, v. 55, p. 1-8.

17. 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.
18. Mazzeo, D. E. C., 2009. Avaliação dos efeitos citotóxicos, Genotóxicos e mutagênicos do btex, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro.
19. Miller, H. 2010. Bioestimulation as a form of bioremediation of soil pollutants. *Basic Biotechnology Journal, LOCAL*, v. 6, n. 1, p. 7-12.
20. Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55 – 63.
21. 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. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 4, 950-954.
22. Phillips, T. M., Liu, D., Seech, A. G., Lee, H., Trevors, J. T. 2000. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analyses and toxicity tests. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 24, p. 132-139.
23. Plaza, G., Nalecz-Jawecki, G., Ulfig, K., Brigmon, R. L. 2005. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 62, p. 415-420.
24. Reusser, D. E., Istok, J. D., Beller, H. R., Field, J. A. 2002. In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology*, Easton, v. 36, p. 4127-4134.
25. Tiquia, S. M., Tam, N. F. Y., Hodgkiss, I. J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*; 93 (3): 249-256.

5 BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL POR FUNGOS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Manuscrito a ser submetido ao periódico: International Biodeterioration & Biodegradation
Fator de impacto: 2.429
Qualis: B1

Normas do periódico:

<https://www.elsevier.com/journals/international-biodeterioration-and-biodegradation/0964-8305/guide-for-authors>

BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL POR FUNGOS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Geórgia Gomes da Cruz^{*1}, Jaciana dos Santos Aguiar², Jacilene Marques Maciel¹, Cacio Magno Barbosa Gonçalves¹, Ana Lúcia Gonçalves da Silva¹, Augusto Alencar e Silva¹, Erik Jonne Vieira de Melo¹, Pêrsio Alexandre da Silva¹; Norma Buarque Gusmão¹ e Teresinha Gonçalves Da Silva²

¹ Environmental and Industrial Microbiology Laboratory, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Avenue Prof. Arthur de Sá, s/n, University City, Brazil.

² Cell Culture Laboratory, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Avenue Prof. Arthur de Sá, s/n, University City, Brazil.

*Corresponding author. Tel./fax: +55 (81) 2126 8366.

E-mail address: georgia.cruz@ufpe.br (Geórgia Gomes da Cruz).

Resumo

A indústria do petróleo traz inúmeros benefícios à sociedade, por outro lado as atividades que envolvem a utilização do petróleo e derivados geram impactos ambientais. Com a finalidade de recuperar áreas impactadas, pesquisas têm sido fomentadas em busca de alternativas viáveis, como a técnica de biorremediação. Este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação do óleo diesel pelo consórcio fúngico, aplicando um planejamento experimental para verificar a condição que proporciona uma degradação eficiente. Foi realizado um planejamento fatorial completo (2^3), onde as variáveis independentes utilizadas foram: a concentração da fonte de Nitrogênio (NH_4NO_3), a concentração de fonte de carbono adicional (glicerol) e pH. O planejamento revelou que as condições químicas e nutricionais mais favoráveis a biodegradação e redução da toxicidade, foram obtidas quando a fonte de nitrogênio (1g/L) e o glicerol (2mL) estavam em suas menores concentrações e o pH básico (8,0). Sendo assim, o consórcio formado pelos fungos filamentosos (*Cunninghamella elegans*, *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus niger*) é promissor para degradar o óleo diesel, recomendando o aperfeiçoamento do processo para reduzir os resíduos tóxicos gerados no processo.

Palavras-chave : Otimização; biodegradação; toxicidade.

1 Introdução

A indústria do petróleo traz inúmeros benefícios à sociedade, no entanto, é reconhecida como uma atividade econômica com grandes impactos ambientais (Cerqueira et al., 2011). Isso se deve aos danos causados ao meio ambiente, provocados pelas atividades que envolvem a exploração, utilização e transporte do petróleo ou seus derivados quando ocorrem derrames acidentais (Filho; Coriolano, 2016). Com a finalidade de recuperar áreas impactadas por substâncias químicas, sejam tóxicas ou recalcitrantes, pesquisas têm sido fomentadas em busca de alternativas viáveis e ecologicamente corretas para tratar esses ambientes poluídos por petróleo e seus derivados. A biorremediação é uma técnica que tem se destacado, pois, visa recuperar áreas contaminadas, baseando-se na degradação do poluente pela ação de organismos, como bactérias e fungos.

Segundo Mhatre e Kunde (2014), a biorremediação é um conjunto de ações que promovem a remoção de contaminantes ou reduzem sua toxicidade, sendo considerada uma tecnologia limpa e de baixo custo (Saxena; Bharagava, 2016).

Os fungos filamentosos não demonstram preferência quanto ao tamanho das cadeias de hidrocarbonetos (Singh, 2006), sendo considerados excelentes degradadores. Esses apresentam características particulares, que faz com que alguns deles se destaquem no processo. Assim, diversos autores concordam que os micro-organismos devem ser utilizados em consórcio para uma maior eficiência no processo de biodegradação (Silva et al., 2015; Costa et al., 2007 Luz et al., 2011). Leonel et al. (2010) também afirmam que o emprego de consórcios microbianos é viável, podendo proporcionar uma completa degradação dos contaminantes.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação do óleo diesel pelo consórcio fúngico, aplicando um planejamento experimental para verificar a condição que proporciona uma degradação eficiente e redução da toxicidade.

2 Materiais e Métodos

a. Fonte de Carbono

O óleo diesel foi a fonte de carbono utilizada nesse trabalho, cedida pela Petrobras Transporte S/A (TRANSPETRO).

b. Micro-organismos

Foram utilizadas linhagens de fungos filamentosos (*Cunninghamella elegans*, *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus niger*), isolados durante o desenvolvimento do projeto da REDE NORTE NORDESTE DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLOS DA CAATINGA E DA AMAZÔNIA (RENNOFUN) financiados pelo CNPq e FACEPE para mitigar os possíveis impactos gerados por acidentes na Refinaria Abreu e Lima. Essas linhagens foram selecionadas previamente pelo teste qualitativo, realizado de forma adaptada com base na metodologia preconizada por Hanson et al. (1993), que é uma técnica que investiga a potencialidade de micro-organismos em degradação do petróleo ou derivados.

c. Aclimação do Micro-organismos

Os micro-organismos selecionados foram aclimatados ao petroderivado combustível. Esta etapa foi realizada de forma isolada, para cada fungo, em frascos de Erlenmeyer (500mL), contendo o meio mineral de Bushnell Haas-BH, 2 blocos de gelose (Ø8mm) para cada micro-organismo e concentrações crescentes (1%, 4%, 7% e 10%) de óleo diesel (fonte de carbono).

Para o aumento das concentrações de óleo diesel foi realizado um pré-inóculo das culturas crescidas em placas de Petri contendo o meio Sabouraud, e após o período de 48 horas, 2 blocos de gelose com 8 mm de diâmetro foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyer (500mL) contendo o caldo mineral Bushnell-Haas mais 1% de óleo diesel. Os frascos foram incubados a temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em condições estáticas por 48 horas. Em seguida, foram repicados para placas de Petri com meio de cultura com concentração de óleo diesel de 4%. Este procedimento foi repetido para todas as concentrações do combustível. A cada 48h horas após a transferência para concentrações maiores de óleo diesel foram avaliados os parâmetros: pH e células viáveis. Para a avaliação do pH durante os ensaios foram realizadas medições do potencial de hidrogênio, utilizando o potenciômetro digital DIGIMED® modelo DM-21. Quanto às células viáveis, foi realizada pelo método direto de espalhamento na superfície de uma placa contendo meio Sabouraud, a uma diluição de 10^{-5} . A contagem foi realizada após 48 horas de incubação em estufa de crescimento microbiano.

d. Planejamento Fatorial completo (2^3)

Foi realizado um planejamento fatorial completo (2^3), envolvendo 2 níveis e 3 fatores, formando 8 ensaios incluindo 3 repetições no ponto central. Para tornar o processo eficiente, aumentando o percentual de degradação dos hidrocarbonetos e reduzindo a toxicidade residual, as variáveis independentes utilizadas foram: a concentração da fonte de nitrogênio (NH_4NO_3), a concentração de fonte de carbono adicional (glicerol) e valor do pH, conforme a Tabela 1. A variável resposta do planejamento foi o percentual de degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel a 10%.

Tabela 1

Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo (2^3).

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	(-1)	(0)	(+1)
1- NH_4NO_3 (g/L)	1	2	3
2-GLICEROL (mL)	2	4	6
3-pH	6	7	8

Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyers (500 ml), de forma estática, durante 15 dias e submetidos a uma temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Em cada frasco continha: 90 ml do meio mineral BH, 10 ml de óleo diesel, 1 bloco de gelose de *C. elegans*, 1 bloco de gelose de *R. arrhizus* e 2 blocos de gelose de *A. niger*. Ensaios abióticos com o mesmo petroderivado foram realizados a fim de estimar a volatilidade do mesmo durante o experimento. Os resultados do planejamento fatorial foram analisados pelo programa Statistic 8.0

A variável-resposta considerada para a análise foi a degradação do óleo diesel por cromatografia gasosa. Ao final dos ensaios foi analisado o efeito da toxicidade do material residual do processo sobre células vegetais e células humanas mononucleares de sangue periférico.

e. Cromatografia gasosa

A biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-ME, SHIMADZU®), através do decréscimo dos picos de concentração dos constituintes do óleo diesel em função do tempo de retenção. Após os ensaios descritos nos itens anteriores, as amostras foram extraídas 3 vezes consecutivas com diclorometano, em seguida, a fase oleosa foi separada da fase aquosa em funil de separação e injetadas no cromatógrafo de fase gasosa, acoplado a espectrometria de massa (CG-EM).

Nesses ensaios, 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 µm x 0,25µm. O volume injetado foi de 1µL com split de 1:98 e fluxo de gás hélio de 1 mL min⁻¹ 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⁻¹. 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 óleo diesel com os da Biblioteca de Compostos Wileytm.

f. Toxicidade

A toxicidade dos resíduos gerados no processo de degradação foi analisada através de testes de fitotoxicidade e citotoxicidade.

Fitotoxicidade

O efeito da toxicidade do material residual, proveniente da biodegradação do óleo diesel pelo consórcio fúngico, foi analisado utilizando sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) segundo a metodologia de Tiquia et al. (1996). Foram utilizadas placas de Petri contendo papel de filtro duplo embebidos com 5 mL do material biodegradado. Dez feijões foram colocados em cada placa de modo equidistante, previamente desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% e água destilada estéril. Paralelamente, foram feitas placas de controle negativo empregando 5 mL da fonte oleosa e placas de controle positivo com 5 mL de água destilada esterilizada. Todos os testes foram realizados em triplicata, sob a temperatura de 22 ± 2 °C, durante sete dias. Após esse tempo, foram quantificados: percentual de germinação (média de sementes testes germinadas x 100/ média de sementes germinadas no controle positivo) e o percentual de crescimento da raiz (média de crescimento de raiz das sementes testes x 100/ média de crescimento de raiz das sementes do controle positivo), para obtenção do valor do índice de germinação (percentual de germinação x percentual de crescimento de raiz/100).

Avaliação citotóxica em células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC)

A avaliação citotóxica foi realizada em células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC) pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol, 2-yl)- 2,5-difenil-212 brometo de tetrazólio] (Mosmann, 1983). A coleta do sangue periférico foi realizada por profissionais capacitados,

utilizando-se seringas esterilizadas e descartáveis de 10 mL. Para tanto, como critério de inclusão, foram escolhidos voluntários adultos saudáveis, na faixa etária de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, sem exposição recente a radiações, a medicamentos ou álcool. Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco sob o número 30731814.8.0000.5208.

O sangue utilizado no experimento foi obtido por meio da punção venosa, sendo transferido para tubos de coleta contendo anticoagulante heparina. As células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC) foram isoladas a partir da amostra coletada (3 mL de sangue periférico) acrescida de 5 mL de tampão fosfato-salino (PBS). Essa mistura foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2 mL de Ficoll e submetida à centrifugação por 30 minutos a uma força gravitacional de 672 g. Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro, chamada de nuvem de células PBMC foi aspirada e colocada em um terceiro tubo, o qual foi posteriormente, completado com o tampão fosfato-salino (PBS) até o volume de 11 mL e o tubo foi centrifugado por 20 minutos a uma força gravitacional de 378 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet de PBMC foi ressuspendido em 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS).

As células foram removidas, lavadas com tampão fosfato e re-suspendidas em meio RPMI 1640 (Instituto de Roswell Park Memorial) suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina) para uma concentração final de 3×10^5 células/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação das células periféricas mononucleadas. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas antes da adição das amostras. Essas foram avaliadas após um período de incubação de 24, 48 e 72 horas. Foram testadas em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism versão 5.0. demo.

3 Resultados e discussão

a. Condições de crescimento e pH durante a aclimação

Com relação aos valores pH, pode-se verificar na Figura 1 que não houve grandes variações, apenas pequenas oscilações que ficaram num intervalo de: 6,20 a 6,69 para *C. elegans*; 6,26 a 6,95 para *R. arrhizus* e 6,09 a 6,80 para *A. niger*.

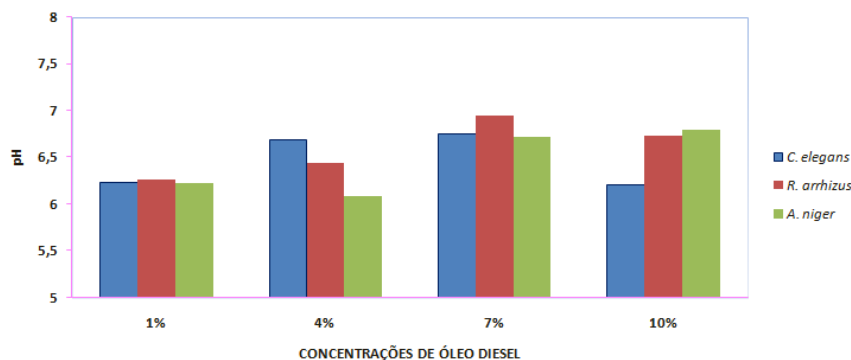


Figura 1. Valores de pH durante os ensaios de aclimação.

Pode-se observar ainda na Figura 1 que mesmo com o aumento das concentrações de óleo diesel, os micro-organismos isolados mantiveram seus valores de pH numa faixa próximo à neutralidade a levemente ácida, variando no geral entre 6,09 a 6,95.

Silva et al.(2015) encontraram resultados semelhantes, em estudos de degradação de óleo diesel por consórcio microbiano, verificando que o pH estava em um intervalo de 7,0 a 5,7. Possivelmente esses metabólitos ácidos foram formados com mais tempo de exposição ao combustível, quando de fato se deu início a degradação. Maciel et al.(2010) encontraram em ensaios semelhantes, utilizando óleo diesel, valores de pH que variaram de 6,0 a 6,8, próximo da neutralidade.

Confirmando esse fato, Kumar et al. (2005) afirmam que a acidificação pode ser causada pela formação de produtos ácidos resultantes da degradação dos hidrocarbonetos por micro-organismos.

Leahy e Colwell (1990) sugerem que valores de pH entre 6 e 8 são os mais favoráveis à ação de micro-organismos degradadores de petróleo, sendo que os fungos são mais tolerantes a condições ácidas. Thapa et al.(2012) concordam e afirmam que os valores de pH entre 6,5-8,0 são favoráveis a biodegradação de hidrocarbonetos de petroderivados.

Com relação às células viáveis, houve um aumento de unidades formadoras de colônias (UFC), mesmo aumentando a concentração de óleo diesel, indicando que os micro-organismos em questão foram capazes de utilizar o combustível como única fonte de carbono e adaptaram-se de forma que não houve impedimento para o seu crescimento. Inicialmente, os fungos *Cunninghamella elegans* e *Rhizopus arrhizus* apresentaram pequenas quantidades de unidades formadoras de colônias (UFC), indicando que estavam em processo de adaptação à fonte oleosa. Após um período de 96 horas, estes micro-organismos aumentaram o número de colônias de forma progressiva até tornarem-se incontáveis. O fungo *Aspergillus niger* apresentou um perfil diferenciado, que indicou uma adaptação mais rápida, pois, num período mais curto (48 horas) houve crescimento significativo, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2

Contagem de células viáveis (UFC/ml) após 96 horas

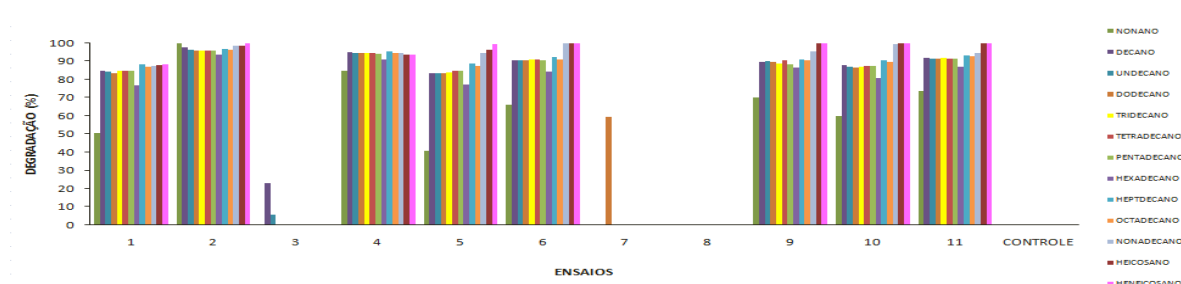
Concentrações (óleo diesel)	<i>C. elegans</i>	<i>R. arrhizus</i>	<i>A. niger</i>
1%	2.10 ⁵	4.10 ⁵	29.10 ⁵
1%(após 48h)	5.10 ⁵	12.10 ⁵	224.10 ⁵
4%	468.10 ⁵	584.10 ⁵	++++++
7%	++++++	++++++	++++++
10%	++++++	++++++	++++++

++++++ Incontáveis

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.

Segundo Passos et al.(2009), a etapa de adaptação do micro-organismo ao poluente é essencial, pois, aumenta a taxa de degradação e tolerância, tornando o processo mais eficiente. Esses autores afirmam também a presença de uma fonte adicional de carbono facilmente assimilável, garante produção inicial de biomassa para a biodegradação.

b. Análises Cromatográficas

**Figura 2.** Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos do óleo diesel a 10%.

A cromatografia gasosa revelou altos percentuais de degradação obtidos nessa etapa, com exceção dos ensaios 3, 7, 8 e o controle. O objetivo deste conjunto de ensaios foi alcançado, pois, a variação simultânea dos fatores testados permitiu verificar o desempenho do consórcio fúngico na degradação do óleo diesel, quando submetidos a estímulos nutricionais diferentes. Os índices aumentaram significativamente, alcançando picos de 100% de degradação de alguns hidrocarbonetos alifáticos, como: nonano, octadecano, nonadecano, heicosano e heneicosano. Nos ensaios 2, 5, 6, 9, 10 e 11 apresentaram os maiores percentuais referente à degradação do heneicosano (C₂₁), com valores de 100%, 99,3%, 100%, 100%, 100%, e 100%, respectivamente. Sendo considerados ótimos resultados,

levando em consideração que são as cadeias mais longas de alifáticos que foram analisadas. A média geral dos percentuais de degradação dos ensaios 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10 e 11, foram 82,6%, 97%, 93,5%, 83,7%, 90,6%, 90,2%, 88% e 91,6%, respectivamente.

Maciel et al.(2013) trabalhando com querosene de aviação e *Penicillium sp.* observaram que os maiores percentuais de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos ocorreram com 29 dias de processo: 93% de degradação de nonano, 57% de undecano, 40% de penta e tridecano, 33% para decano e dodecano e 22% para tetradecano.

Silva et al.(2015) em ensaios de degradação de óleo diesel, em biorreator, verificaram que o nonano foi completamente removido pelo consórcio microbiano misto; os seguintes hidrocarbonetos foram parcialmente removidos: decano (96%), heneicosano (90%), heicosane (89%), undecano (86%), nonadecano (85%), octadecano (80%), heptadecano (77%), dodecano (76%), hexadecano (76%), tridecano (71%), tetradecano (70%), e pentadecano (69%).

Ramasamy; Arumugam; Chandran (2017) verificaram em experimentos de biodegradação do óleo diesel, por *Enterobacter cloacae*, percentuais de degradação de 99,71%, 99,23%, 99,66% e 98,34%, respectivamente para hexadecano, heptadecano, tridecano e docosano

O ensaio 2 planejamento foi considerado o mais promissor, com relação ao percentual de degradação, pois, apresentou maior média (97%) de degradação do hidrocarboneto alifáticos analisados. Nesse ensaio a degradação dos hidrocarbonetos (nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, nonadecano, heicosano e heneicosano) foi: 100%, 97,7%, 96,1%, 95,7%, 95,9%, 95,9%, 95,8%, 93,7%,96,7%, 96,2%, 98,6%, 98,4% e 100%, respectivamente. Essa condição continha: maior concentração de nitrato de amônia (3mg/L); menor concentração de glicerol (2mL) e menor pH (6,0).

Ramasamy; Arumugam; Chandran (2017) verificaram em experimentos de biodegradação do óleo diesel, que a eficiência do processo foi aumentada em 36,78%, utilizando o pH=7 e a concentração de glicose de 5%.

Segundo alguns autores, as concentrações de nutrientes influenciam diretamente na degradação, podendo ser limitantes (Das & Chandran, 2011; Liang et al., 2012)

Ameen et al. (2015) avaliaram a capacidade de degradação do óleo diesel utilizando cinco fungos após 30 dias de incubação, verificaram a necessidade de um período maior para a degradação de frações mais pesadas do combustível e que a taxa de degradação aumentou quando os micro-organismos foram utilizados em consórcio.

Em experimentos de biorremediação utilizando consórcio microbiano para remover o óleo diesel, usando a técnica de bioaumento, vários autores afirmam que obtiveram sucesso no processo de degradação (Taccari et al., 2012; Cunningham e Philp, 2000; Lin et al., 2009).

Villela et al. (2008) em ensaios de biodegradação de óleo diesel a 12%, observaram taxas de degradação superiores a 70% para vários compostos deste poluente.

Bento e Gaylarde (2001) encontraram entre outros, o fungo *Aspergillus fumigatus* em refinarias e sistemas de distribuição de combustível, demonstrando que o mesmo tem grande aptidão para usar o óleo diesel como fonte de carbono.

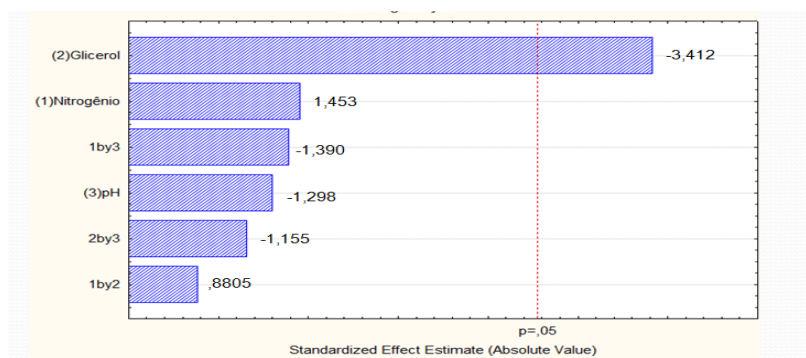


Figura 3. Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial 2^3 , cuja variável resposta é a degradação.

Como pode ser observado no diagrama de Pareto (Figura 3), para um nível de confiança de 95% ($p=0.05$), a única variável significativa para o processo de degradação foi o glicerol, que exerceu um efeito negativo sobre a biodegradação de óleo diesel nos ensaios 3, 7 e 8, onde a concentração de glicerol foi maior, correspondente a 6 mL, os índices de degradação dos hidrocarbonetos avaliados não foram significantes, apresentando uma média geral de degradação de 2,21%, 4,57% e 0%, respectivamente. No geral, a adição de glicerol estimulou o processo de degradação, mas quando esta foi utilizada em sua maior concentração apresentou efeito negativo. Confirmando esse fato, Ostberg et al. (2007) afirmam que a adição de uma fonte de carbono de fácil assimilação pode encurtar o tempo de degradação e estimular a biodegradação do óleo diesel, e isso pode estar relacionado ao aumento da biomassa ou disponibilidade do substrato. Muitos estudos relatam que a degradação de hidrocarbonetos provenientes do petróleo pode ser otimizada pela adição de fonte de carbono suplementar ou outros nutrientes, promovendo a estimulação do crescimento microbiano (Cai et al., 2017).

Bento et al. (2005) confirmam que alguns micro-organismos apresentam a habilidade em degradar frações alifáticas e aromáticas de hidrocarbonetos simultaneamente, no entanto, as adições de determinados compostos, ou mesmo a composição de misturas podem influenciar no processo de degradação, como o que pode ter acontecido com o glicerol quando adicionado em uma concentração maior. Nikolopoulou e Kalogerakis (2009) explicam esse fato quando dizem que a aplicação de uma quantidade excessiva de nutrientes sobre as necessidades metabólicas de micro-organismos podem

resultar em diminuição da atividade de biodegradação. A concentração da fonte de nitrogênio (NH_4NO_3) não influenciou no processo, pelo menos nas concentrações testados nesse experimento. Diferente dos resultados encontrados por Silva et al.(2015), onde a relação entre o carbono e o nitrogênio (C:N) testada por meio de variações nas concentrações de nitrato de amônia (NH_4NO_3) foi considerada a variável dependente que mais influenciou na remoção do óleo diesel pelo consórcio microbiano misto. No entanto, deve-se ter cuidado com a suplementação da fonte de nitrogênio, pois, este pode ter efeito inibitório no processo (Trindade et al., 2002, Walworth et al., 2007; Martins et al., 2012).

c. Avaliação de toxicidade

Fitotoxicidade

Os resultados dos ensaios (Tabela 3), quando o material residual do processo de degradação foi testado em vegetais, apresentaram percentuais de germinação consideravelmente ótimos, atingindo valores de 100%, 88,45%, 96,19%, 84,29%, 92,38%, 96,19% e 92,38% para os ensaios 2, 5, 6, 7, 9, 10 e 11, respectivamente. Os percentuais de crescimento de raiz não seguiram o mesmo padrão, reduzindo o índice de germinação dos ensaios. Assim, as condições testadas ainda apresentaram indícios de toxicidade, pois, segundo Tiquia et al. (1996) afirmam que quando o índice de germinação é maior que 80, é um indício que desapareceu a toxicidade do composto.

No entanto, os maiores índices de germinação (IG) encontrados foram os dos ensaios 2 e 5 com valores de 38,8 e 35,26, respectivamente. As condições destes ensaios tinham em comum a menor concentração de glicerol (2 mL), e mesmo não atingindo o índice de 80, que seria o ideal, os metabólitos gerados não foram capazes de inibir a germinação. Silva et al.(2015) realizando ensaios semelhantes, onde sementes de alface (*Lactuca sativa*) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) mostraram as taxas de germinação de 41% e 54%, respectivamente, depois de serem expostos ao material residual da degradação, chegando a mesma conclusão, que não havia compostos tóxicos nas concentrações suficientes para impedir a germinação e alongamento radicais de raízes.

Tabela 3Resultados do teste de fitotoxicidade planejamento 2³.

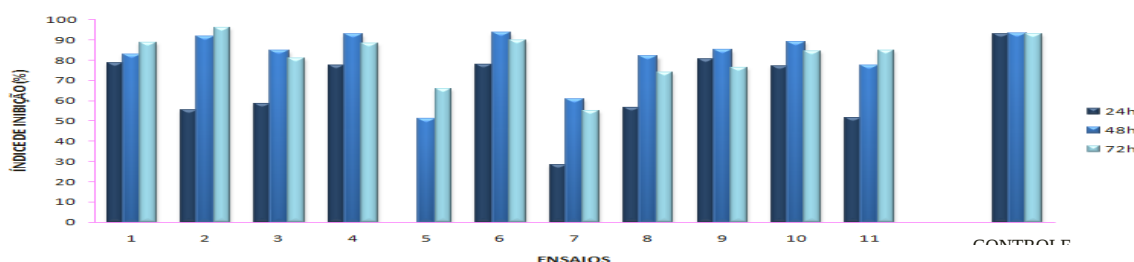
Ensaio	Germinação (%)	Crescimento de raiz (%)	Índice de germinação
1	76,9	43,3	33,3
2	100	38,88	38,88
3	65,36	20,09	13,13
4	53,81	22,55	12,13
5	88,45	39,87	35,26
6	96,19	31,04	29,86
7	84,29	24,67	20,79
8	57,74	20,58	11,88
9	92,38	22,87	21,13
10	96,19	24,35	23,42
11	92,38	14,91	13,77

Os ensaios 3, 4, 8 e 11 foram os que apresentaram os menores índices de germinação, cujos valores são 13,1; 12,1 e 11,9, respectivamente. Esses ensaios apresentavam uma condição em comum, as maiores concentrações de glicerol (6mL). Outro agravante para as condições dos ensaios 3 e 8, além da sua toxicidade, foi o fato da degradação ter sido insignificante, tendo consequentemente a fonte poluente ainda presente no meio.

Phillips et al. (2000) observaram em suas pesquisas de biorremediação, que embora houvesse a redução dos hidrocarbonetos totais de petróleo, ocorria um aumento na toxicidade, concluindo que metabólitos tóxicos intermediários poderiam ter sido formados durante o processo.

Alguns compostos policíclicos aromáticos são formados como intermediários, podendo se acumular no meio após tratamentos, sendo importante obter informações sobre resíduos gerados durante os tratamentos (Biache et al., 2017).

Citotoxicidade

**Figura 4.** Resultados do teste de citotoxicidade do planejamento fatorial 2³.

Os resultados da toxicidade frente a células humanas mononucleadas apresentaram valores de inibição variados. No entanto, verificou-se que houve uma redução da toxicidade do material residual do processo de degradação nos ensaios 5 e 7 nos três tempos analisados (24h, 48h e 72). O ensaio 5 destacou-se, porque nas primeiras 24 horas não apresentou nenhuma toxicidade para as células testadas. Houve um aumento para 50, 7% em 48 horas e ao final de 72 horas o percentual de inibição

alcançou 65,8%. Nas avaliações feitas por Mazzeo (2009) os resultados indicaram que o processo de biodegradação por fungos foi eficiente, por diminuir os efeitos genotóxico e mutagênico dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, indicando que os compostos foram degradados em metabólitos não tóxicos para as células.

O resultado do ensaio 5 foi favorável, levando em consideração que os percentuais de inibição atingiram mais de 80% em alguns ensaios (1, 2, 3, 4, 6, 10 e 11) e a toxicidade inicial testada do controle foi de 93%. O pH e a fonte de nitrogênio do ensaios 5 e 7 que apresentaram as menores taxas de inibição foram iguais, sendo o pH de 8 e a concentração do Nitrato de amônia de 1g/L. No caso do ensaio 5 a concentração de glicerol foi a menor testada (2mL). Luz et al. (2016) afirma que testes de ecotoxicidade são importantes para avaliar os níveis de contaminação e qualidade do sistema alcançado após o tratamento biológico. Para que ocorra a quebra de um anel benzênico e ocorra degradação total de um contaminante, é necessária a conversão em CO₂ e água, ocorrendo a mineralização. No entanto, pode ocorrer a degradação parcial ou biotransformação do composto aromático, podendo tornar-se mais tóxico que o contaminante primário (Kalbitz et al., 2003). Justificando assim, o fato de alguns ensaios apresentarem uma toxicidade alta, não sendo interessante para o processo.

4 Conclusão

O processo desvendou algumas condições químicas e nutricionais favoráveis a biodegradação. Ficou evidente a contribuição do glicerol, como fonte adicional de carbono, sendo que este pode tornar-se um fator negativo e inibitório quando excede o valor de 2 mL, para as condições testadas nesse experimento. Com relação à fitotoxicidade residual, os índices de germinação não atingiram 80, no entanto, não foi tóxico o suficiente para inibir a germinação total das sementes, como o que acontece com o óleo diesel sem o tratamento. Quanto à citotoxicidade, o índice de inibição foi reduzido quando comparado ao valor inicial. A condição mais favorável para o experimento foi encontrada no ensaio 5, onde a fonte de nitrogênio (1g/L) e o glicerol (2mL) estavam em suas menores concentrações e o pH básico no valor (8). Sendo assim, o consórcio formado pelos fungos filamentosos (*Cunninghamella elegans*, *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus niger*) são eficientes e promissores para degradar o óleo diesel, recomendando a otimização do processo e diminuição da toxicidade.

5 Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Ministério de Tecnologia da Ciência do Brasil e à Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio recebido.

6 Referências

1. Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., Al-Sabri, A.E. 2015. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
2. Barros-Neto, B. de, Scarminio, I.S., Bruns, R. E. 1995. Planejamento e otimização de experimentos. 2^a ed. Editora da UNICAMP.
3. Bento, F. M.; Camargo, F. A.O.; Okeke, B.C.; Fankenger, W.T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1049-1055.
4. Bento, F. M.; Gaylarde, C.C. 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.47 p.107–112.
5. Biache, C.; Ouali, S.; Cébron, A.; Lorgeoux, C.; Colombarod, E.; Faure, P. 2017. Bioremediation of PAH-contaminated soils: Consequences on formation and degradation of polycyclic aromatic compounds and microbial community abundance. *Journal of Hazardous Materials* 329, 1–10.
6. Cai, D.; Yang, X.; Wang, S.; Chao, Y.; Morel, J.L.; Qiu, R. 2017. Effects of dissolved organic matter derived from forest leaf litter on biodegradation of phenanthrene in aqueous phase. *Journal of Hazardous Materials* 324 -516–525.
7. Cerqueira, V.S.; Hollenbach, E.B.; Maboni, F.; Vainstein, M.H.; Camargo, F.A.O.; Peralba, M.C.R.; Bento, F.M. 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures *Bioresource Technology* v.102 p. 11003–11010.

8. Costa, A. 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. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. *Revista Ciências & Tecnologia*. Ano 1, n.1., 2007.
9. Cunningham, C.J. And Philp, J.C. 2000. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination & Reclamation*, n8.
10. Das, N., Chandran, P. 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants:Na Overview. *Biotechnology Research International*, v.2011, p.1-13.
11. Filho, M. C. M.; Coriolano, A. C. F. 2016. Biorremediação, Uma Alternativa na Utilização em Áreas Degradadas pela Indústria Petrolífera. *HOLOS*, Ano 32, Vol. 7.
12. Hanson, K. G.; Desai, J. D.; Desai, A. J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*; v. 7, nº 10, 745-748.
13. Kalbitz, K.; Schwesig, D.; Schmerwitz, J.; Kaiser, K.; Haumaier, L.; Glaser, B.;Ellerbrock, R.; Leinweber, P. 2003. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil Biol. Biochem*, 35, 1129-1142.
14. Kumar, A., Kumar, S., Kumar, S., 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.* 22, 151e159.
15. Leahy, J. G.; Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, p. 305-315.
16. 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.
17. Liang, Y.; Zhang, X.; Wang, J.; Li, G.; 2012. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil explorin fields across China. *Journal of Hazardous Materials*, v. 241-242, p.371-378.

18. Lin, Ta-Chen; Shen, Fo-Ting; Chang, Jo-Shu; Young, Chiu-Chung; Arun, A.B.; Lin, Shi-Yao; Chen, Tien-Lai. 2009. Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from oil-contaminated soil. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, n.40, p.580–582.
19. Luz, C. C.; Santos, E. A.; Santos, M. O. S.; Mussy, M. Y.; Yamashita, M.; Bastos, W. R.; Brucha, G.; Reis, M. M.; Reis, M.G. 2011. Estudos de Biodegradação de Óleo Diesel por Consórcio Microbiano Coletado em Porto Velho – Ro, Amazônia. *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5.
20. Luz, E. L. P; Silva, D. S. P.; Medeiros, M. C.; Bezerra, A. P. X. G.; Lorena, E. Maria G.; Santos, Í.G. S. 2016. Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation. *Revista Geama*, v.7, n.1, oct.-dec.
21. Maciel, C. C. S.; Souza, C. S.; Silva, P. A.; Sousa, M. F. V. Q.; Gusmão, N. B. 2013. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 39-42.
22. Maciel, C. do C. S., Takaki, G.M.C., Gusmão, N. B. 2010. Potencialidade de Fungos Filamentosos em Degradar Óleos Lubrificantes, *Revista Eletrônica de Biologia, REB Volume 3* (1): 58-64, ISSN(1983-7682).
23. Martins, F.F., Ferreira, T.F., Azevedo, D.A., Coelho, M.A.Z., 2012. Evaluation of crude oil degradation by *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Eng. Trans.* 27, 223 e 228.
24. Mhatre, B.A., Kunde, R., 2014. Biodegradation of diesel using microbes from a clam (*Meretrix meretrix*) shell. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 43, 877e881.
25. Mazzeo, D. E. C. 2009. Dissertação: Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por micro-organismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro Rio Claro : [s.n.], 143 f.

26. Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55 – 63.
27. Nikolopoulou, M.; Kalogerakis, N. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology's*. v.84, p.802–807, 2009.
28. Ostberg, T.L.;Jonsson, A.P.;Bylund, D.; Lundstro, U.S. 2007. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil,v.60, p.334-341.
29. Ramasamy, S.; Arumugam, A.; Chandran, P. 2017. Optimization of *Enterobacter cloacae* (KU923381) for diesel oil degradation using Response Surface Methodology (RSM). *Journal of Microbiology* (2017) Vol. 55, No. 2, pp. 104–111.
30. 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.
31. Phillips, T. M.; Liu, D.; Seech, A. G.; Lee, H.; Trevors, J. T. 2000. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analyses and toxicity tests.*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 24, p. 132-139.
32. Saxena, G.; Bharagava, R.N. 2016. Ram Chandra: advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. *Clean Techn Environ Policy* (2016) 18:979–980.
33. Silva, D. S. P., Cavalcanti, D. L., Melo, E. J. V., Santos, P. N. F., Luz, E. L. P., Gusmão, N. B., Sousa, M. F. V. Q., 2015. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 97 (2015) 85 and 89.

34. 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.
35. Singh, H. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. New Jersey: John Wiley & Sons, 592p. S, 2006.
36. Taccari, Manuela; Milanovic, V.; Comitini, F.; Casucci, C.; Ciani, M. 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial Community. *International Biodeterioration & Biodegradation* n.66, p.39–46.
37. Thapa, B.; Kumar, A.K.C.; Ghimire, M. 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, v. 164-170.
38. Tiquia, S. M.; N. F.; Hodgkiss, I. J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*; 93 (3): 249-256.
39. Trindade, P.V.O., Sobral, L.G., Rizzo, A.C.L., Leite, S.G.F., Lemos, J.L.S., Millioli, V.S., Soriano, A.U. 2002. Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. In: 9th International Petroleum Environmental Conference, New Mexico, USA.
40. 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.
41. Walworth, J., Pond, A., Snape, I., John, R., Ferguson, S., Harvey, P., 2007. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. *Cold Regions Sci. Technol.* 48, 84e91.

6 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO FÚNGICO EM BIORREATOR

Manuscrito a ser submetido ao periódico: International Biodeterioration & Biodegradation
Fator de impacto: 2.429
Qualis: B1

Normas do periódico:

<https://www.elsevier.com/journals/international-biodeterioration-and-biodegradation/0964-8305/guide-for-author>

Tratamento Biológico de Óleo Diesel por Consórcio Fúngico em Biorreator

Geórgia Gomes da Cruz^{*1}, Jaciana dos Santos Aguiar², Jacilene Marques Maciel¹, Cacio Magno Barbosa Gonçalves¹, Ana Lúcia Gonçalves da Silva¹, Augusto Alencar e Silva¹, Erik Jonne Vieira de Melo¹, Pêrsio Alexandre da Silva¹; Norma Buarque Gusmão¹ e Teresinha Gonçalves Da Silva²

¹ Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Proferssor Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Brasil.

² Laboratório de Cultura de Células, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Proferssor Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Brasil.

*Corresponding author. Tel./fax: +55 (81) 2126 8366.

E-mail address: georgia.cruz@ufpe.br (Geórgia Gomes da Cruz).

RESUMO

Os métodos que envolvem a utilização de processos biológicos destacam-se por serem considerados ecologicamente viáveis, como o caso da biorremediação. Entre as técnicas biológicas mais utilizadas, encontram-se os biorreatores, onde a degradação do contaminante de forma controlada, com a finalidade de aumentar a eficiência do processo. Este trabalho teve como objetivo verificar a degradação do óleo diesel por um consórcio fúngico em biorreator, através de avaliação química e análise de toxicidade, empregando condições mais favoráveis, previamente estabelecidas em ensaios realizados em frascos. O ensaio foi realizado durante 15 dias, sendo aplicadas as seguintes condições: temperatura de 28 ± 2 °C, sem agitação, vazão de ar de 3.000 ml/min. Os demais parâmetros foram estabelecidos de acordo com os resultados preliminares dos planejamentos fatoriais, como: concentração de glicerol; pH; concentração da fonte de nitrogênio (NH_4NO_3) e inóculo dos micro-organismos. O experimento realizado em biorreator indica que o consórcio, formado por *Cunninghamella elegans*, *Rhizopus arrhizus* e *Aspergillus niger*, promove a degradação total de alguns hidrocarbonetos alifáticos analisados, produzindo resíduos que não foram capazes de impedir a germinação dos feijões e nem impedir a sobrevivência das células mononucleadas do sangue humano. O consórcio foi considerado promissor, sendo assim recomendado para aplicação em processo de biorremediação.

Palavras-chave: Biorreator; Biorremediação; Degradação; Fungos; Óleo disel.

1 Introdução

O investimento nos setores produtivos constitui-se uma estratégia fundamental, e entre as alternativas para superar as crises econômicas nacionais e internacionais, acarreta um aumento no consumo de energia (Locatelli et al., 2015). Consequentemente, a demanda por combustíveis derivados do petróleo cresce e representa a maior parte da energia produzida no mundo, mesmo diante da busca por fontes de energias renováveis. O crescimento da economia vinculado a esse setor traz preocupações com relação aos impactos ambientais irreversíveis. As operações de exploração, armazenamento e transporte relacionadas a esses petroderivados são identificadas como os pontos críticos para a ocorrência de acidentes catastróficos e fontes potenciais de poluição crônica (Cappello et al., 2012).

Diante desse fato, existe a necessidade de remediar locais poluídos por esses combustíveis. Os métodos utilizados podem ser físicos, químicos e biológicos ou mesmo a junção de todos com o objetivo de promover a limpeza do ambiente.

Os métodos que envolvem a utilização de processos biológicos destacam-se por serem considerados ecologicamente viáveis, como o caso da biorremediação. Segundo Nikakhatari et al. (2010), cada vez mais tem sido utilizado micro-organismos nesses processos de remediação, e esta técnica direciona o potencial desse organismo na degradação dos hidrocarbonetos por meio da ação enzimática, devido a sua utilização como fonte de carbono (Maciel et al., 2010).

A biorremediação tem sido empregada há anos em vários países, apresentando muitas vezes menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes quando comparadas as técnicas físicas e químicas, sendo atualmente utilizada em escala comercial (Bamforth; Singleton, 2005).

Esta é uma tecnologia limpa e apesar de todos os benefícios nem sempre promove a mineralização do contaminante, mas pode promover a degradação de forma que os poluentes sejam reduzidos a concentrações baixas, não sendo perceptíveis, ou dentro dos limites toleráveis.

Entre as técnicas biológicas mais utilizadas nos processos “*ex-situ*” encontram-se os biorreatores (Gaylarde et al, 2005). De acordo com Boopathy (2000), o termo biorreator refere-se a um recipiente onde ocorre a degradação biológica do contaminante de forma isolada e controlada, com a finalidade de aumentar a eficiência do processo.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação do óleo diesel pelo consórcio fúngico em biorreator, através de avaliação química e análise de toxicidade, empregando condições melhoradas.

2 Materiais e métodos

a. Planejamento Composto Central

Foi realizado um planejamento composto central rotacional com 2 fatores, totalizando 8 ensaios, incluindo 3 repetições no ponto central foi realizado. As variáveis independentes utilizadas foram: a concentração da fonte de nitrogênio (NH_4NO_3) e o pH. Os níveis dos fatores (Tabela 1) foram estabelecidos usando informações de experimentos anteriores. A variável-resposta foi a porcentagem de degradação do poluente determinado por análise cromatográfica gasosa. Ao final dos ensaios foi analisado o efeito da toxicidade do material residual do processo sobre células vegetais e células humanas mononucleares de sangue periférico, para assim verificar o ensaio que apresentou a condição ideal para ser aplicada no tratamento em biorreator.

Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyers (500 ml), de forma estática, durante 15 dias e submetidos a uma temperatura de 28 ± 2 °C. Cada frasco continha: 90 ml de meio mineral BH, 10 ml de óleo diesel, 2 mL de glicerol, 1 bloco de gelose de *Cunninghamella elegans*, 1 bloco de gelose de *Rhizopus arrhizus* e 2 blocos de gelose de *Aspergillus niger*. Ensaios abióticos com o mesmo petroderivado foram realizados a fim de estimar a volatilidade do mesmo durante o experimento. Os resultados do planejamento foram analisados pelo programa Statistic 8.0.

Tabela 1

Variáveis e níveis utilizados no planejamento de delineamento composto central (2^2).

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
1- NH_4NO_3 (g/L)	0,15	0,9	1	1,5	1,85
2-pH	7,15	7,5	8	8,5	8,85

b. Biorreator

Um biorreator de bancada, modelo BioFlo 110, da New Brunswick, dotado de controles de aeração, agitação, nível de espuma, temperatura e pH, através dos quais foi possível manter algumas condições de processo. Pela possibilidade de controle de algumas condições consideradas importantes no processo de biodegradação e com o objetivo de elevar a taxa de degradação do óleo diesel pela ação dos micro-organismos consorciados, foram aplicadas as melhores condições obtidas em experimentos preliminares do planejamento realizado em frascos de Erlenmyer. Nesse ensaio em bioreator foi tratado um volume de 3 litros cujo contaminante (óleo diesel) estava presente na concentração de 10%.

O ensaio foi realizado durante 15 dias, sendo aplicadas as seguintes condições: temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sem agitação, vazão de ar de $3.000 \text{ cm}^3/\text{min}$. Os demais parâmetros foram estabelecidos de acordo com os resultados preliminares dos planejamentos realizados anteriormente, como: concentração de glicerol (60 mL) e inóculo dos micro-organismos (30 blocos de gelose de 8mm de diâmetro dos fungos *R. arrhizus* e *C. elegans* e 60 blocos de gelose para *A. niger*); pH (8,5) e a concentração da fonte de nitrogênio- NH_4NO_3 (1,5 g/L). Essas condições, consideradas ótimas para o processo, foram mantidas durante todo o experimento. O monitoramento do tratamento biológico do óleo diesel pelo consórcio em biorreator foi realizado através de: verificação da degradação do poluente por análise de cromatografia gasosa; teste de produção enzimática e avaliação da toxicidade do material residual do processo sobre células vegetais e células humanas mononucleares de sangue periférico, ao longo do tratamento.

c. Determinações Analíticas

Extração e Análise de degradação dos constituintes do óleo diesel

A biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-ME, SHIMADZU®), através do decréscimo dos picos de concentração dos constituintes do óleo diesel em função do tempo de retenção. Após os ensaios descritos nos itens anteriores, as amostras foram extraídas 3 vezes consecutivas com diclorometano, em seguida, a fase oleosa foi separada da fase aquosa em funil de separação e injetadas no cromatógrafo de fase gasosa, acoplado a espectrometria de massa (CG-EM).

Nesses ensaios, 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 $30 \mu\text{m} \times 0,25 \mu\text{m}$. O volume injetado foi de $1 \mu\text{L}$ com split de 1:98 e fluxo de gás hélio de 1 mL min^{-1} 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^{-1} . 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 óleo diesel com os da Biblioteca de Compostos Wileytm.

f. Toxicidade

A toxicidade dos resíduos gerados no processo de degradação foi analisada através de testes de fitotoxicidade e citotoxicidade.

Fitotoxicidade

O efeito da toxicidade do material residual, proveniente da biodegradação do óleo diesel pelo consórcio fúngico, foi analisado utilizando sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) segundo a metodologia de Tiquia et al. (1996). Foram utilizadas placas de Petri contendo papel de filtro duplo embebidos com 5 mL do material biodegradado. Dez feijões foram colocados em cada placa de modo equidistante, previamente desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% e água destilada estéril. Paralelamente, foram feitas placas de controle negativo empregando 5 mL da fonte oleosa e placas de controle positivo com 5 mL de água destilada esterilizada. Todos os testes foram realizados em triplicata, sob a temperatura de 22 ± 2 °C, durante sete dias. Após esse tempo, foram quantificados: percentual de germinação (média de sementes testes germinadas x 100/ média de sementes germinadas no controle positivo) e o percentual de crescimento da raiz (média de crescimento de raiz das sementes testes x 100/ média de crescimento de raiz das sementes do controle positivo), para obtenção do valor do índice de germinação (percentual de germinação x percentual de crescimento de raiz/100).

Avaliação citotóxica em células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC)

A avaliação citotóxica foi realizada em células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC) pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol, 2-yl)- 2,5-difenil-212 brometo de tetrazólio] (Mosmann, 1983). A coleta do sangue periférico foi realizada por profissionais capacitados, utilizando-se seringas esterilizadas e descartáveis de 10 mL. Para tanto, como critério de inclusão, foram escolhidos voluntários adultos saudáveis, na faixa etária de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, sem exposição recente a radiações, a medicamentos ou álcool. Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco sob o número 30731814.8.0000.5208.

O sangue utilizado no experimento foi obtido por meio da punção venosa, sendo transferido para tubos de coleta contendo anticoagulante heparina. As células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC) foram isoladas a partir da amostra coletada (3 mL de sangue periférico) acrescida de

5 mL de tampão fosfato-salino (PBS). Essa mistura foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2 mL de Ficoll e submetida à centrifugação por 30 minutos a uma força gravitacional de 672 g. Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro, chamada de nuvem de células PBMC foi aspirada e colocada em um terceiro tubo, o qual foi posteriormente, completado com o tampão fosfato-salino (PBS) até o volume de 11 mL e o tubo foi centrifugado por 20 minutos a uma força gravitacional de 378 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet de PBMC foi ressuspensionado em 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS).

As células foram removidas, lavadas com tampão fosfato e re-suspensionadas em meio RPMI 1640 (Instituto de Roswell Park Memorial) suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina) para uma concentração final de 3×10^5 células/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação das células periféricas mononucleadas. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas antes da adição das amostras. Essas foram avaliadas após um período de incubação de 24, 48 e 72 horas. Foram testadas em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism versão 5.0. demo.

Caracterizações enzimáticas

Foram retiradas amostras do biorreator a cada 48 horas, e realizada a filtração para determinar a produção das enzimas lacase-LaC, lignina peroxidase-LiP e manganês peroxidase-MnP, através da verificação em espectrofotômetro da oxidação do ABTS (450 nm), álcool veratrílico (310 nm) e vermelho de fenol (610 nm), respectivamente.

Atividade da Lacase (Lac): A atividade da lacase foi determinada seguindo a metodologia descrita por Buswellet *al.* (1995), na qual se usa 0.1mL de tampão acetato de sódio a 0.1M (pH 5.0), 0.8mL de uma solução de ABTS (2.2-azino-bis-etilbentiazolina) a 0.03% (m/v) e 0.1mL do extrato enzimático, fazendo-se a leitura da absorbância a 450nm.

Atividade da Lignina Peroxidase (LiP): A atividade enzimática foi avaliada pela oxidação do álcool veratrílico de acordo com a metodologia determinada por Buswellet *al.* (1995). A mistura continha 1mL de tampão tartarato de sódio 125mM (pH3.0), 500µL de álcool veratrílico 10mM, 500µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 500µL de extrato enzimático. Com a adição do peróxido de hidrogênio a reação, fez a leitura a 310nm.

Atividade da ManganêsPeroxidase (MnP): Seguindo a metodologia descrita por Bonugli-Santos *et al.* (2010), a mistura reativa continha meio de cultivo 500µL, vermelho de fenol 100µL, lactato de sódio 250mM 100µL, albumina bovina 0,5% 200µL, sulfato de manganês 2mM 0,5µL e peróxido de hidrogênio 2mM 0,5 µL preparado em tampão succinato de sódio 20mM, (pH 4,0). As reações ocorreram a 30°C, durante 5 minutos e foram interrompidas pela adição de NaOH 2N 40µL. A leitura foi feita a 610nm.

3. Resultados

a. Análises cromatográficas

Planejamento Composto Central

Na Figura 1 pode ser observado que os percentuais de degradação de n-alcenos nos ensaios foram superiores a 60%.

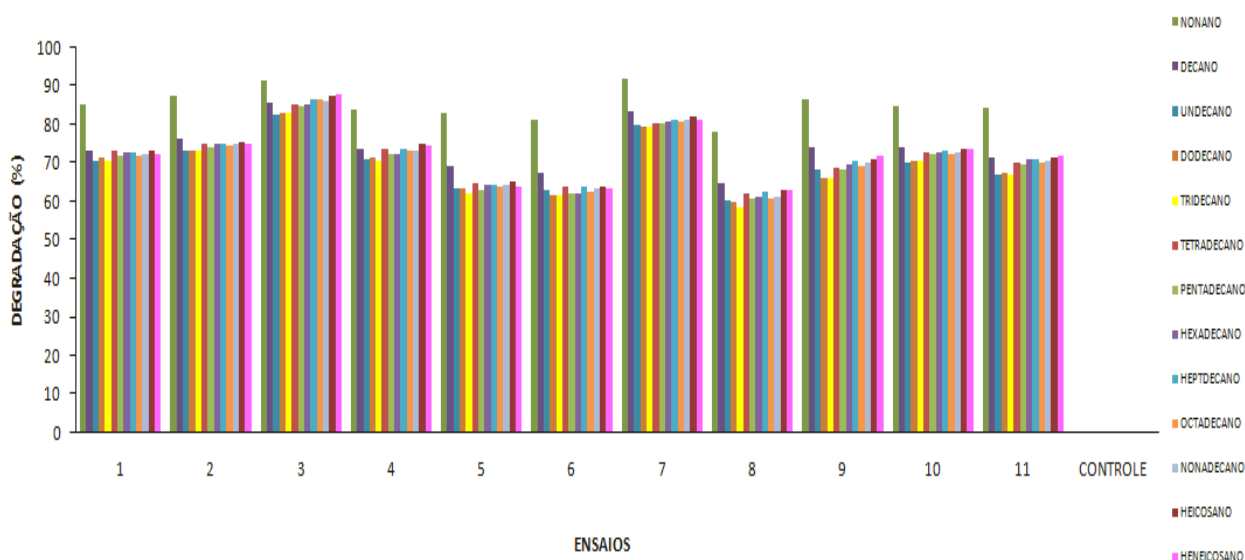


Figura 1. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel a 10% no planejamento (2^2).

A degradação da fonte oleosa nos ensaios em frascos no planejamento fatorial foi muito significativa em todas as condições testadas, mostrando a adaptação e a eficiência do consórcio fúngico em degradar o óleo diesel. A média de degradação dos ensaios (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) foi: 73,2%, 75,6%, 85,9%, 73,7%, 65,8%, 64,7%, 81,7%, 62,8%, 70,8%, 73,4%, 71,04%, respectivamente.

A degradação de n-alcenos presentes no óleo diesel é possível, devido ao aparato enzimático dos micro-organismos envolvidos, que são capazes de converter o óleo diesel em fonte de carbono e energia (Nwaugu, 2008).

Nkem et al.(2016) verificaram em estudos de biodegradação, utilizando o óleo diesel como única fonte de carbono, que os micro-organismos apresentaram potencial para biorremediação, pois, degradaram em média 64,4% dos alcanos do óleo diesel em 10 dias.

Safdari et al.(2017) em estudos de biodegradação do óleo diesel, verificaram degradação cerca de 87% do hidrocarbonetos totais, em frascos contendo 2% do contaminante, diminuindo essa eficiência quando aumentou para 5%.

Yanto; Hidayat; Tachibana (2017) em processos de biodegradação do petróleo utilizando fungos e aplicando técnicas de bioestimulação e bioaugmentação, verificaram que houve um estímulo na degradação do poluente. Chiu et al.(2017) avaliando eficácia e os mecanismos de biorremediação sobre os hidrocarbonetos do petróleo, verificaram taxas de decaimento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, indicando que a biorremediação desempenhou papel importante na remoção de contaminantes.

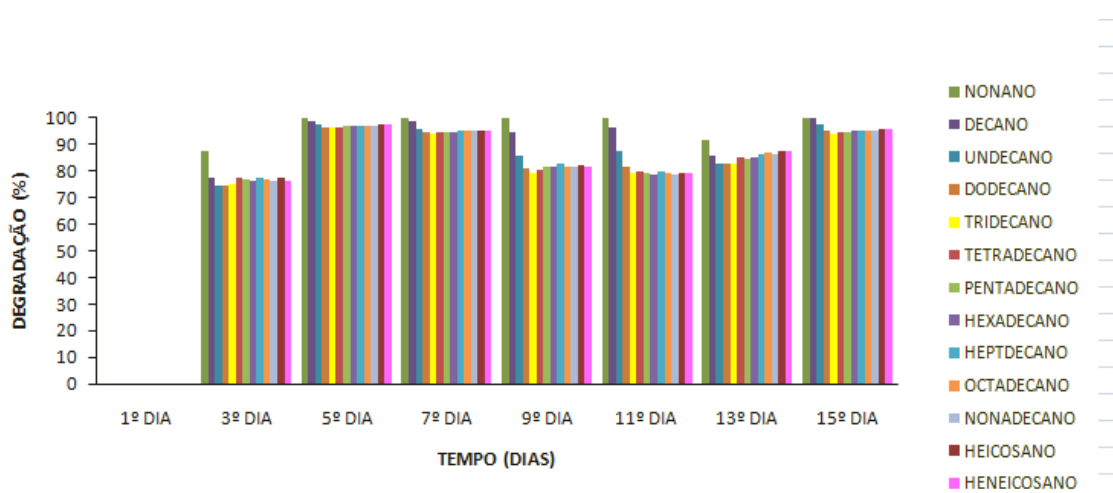


Figura 2. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel em biorreator.

A figura 2 mostra a degradação dos hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel ocorrida no ensaio em biorreator. A cromatografia revelou percentuais médios de degradação, dos hidrocarbonetos alifáticos analisados (C_9 - C_{21}), de 77,3% nas primeiras 48h. No quinto dia o valor chegou ao máximo de degradação atingida nesse ensaio, onde a média foi de 97,4% e ao o décimo quinto dia percentual foi de 96,1%. Com o planejamento realizado previamente em frascos de Erlenmeyer, os fatores foram melhorados e isso pode ser constatado com o aumento de 81,7% (maior média de degradação em frascos) para 97,4% (maior degradação em ensaio no biorreator). A avaliação realizada ao longo do experimento revelou que o tratamento não precisa se prolongar por 15 dias, pois, já obteve excelentes

resultados no quinto dia (97,4%), alcançando assim os objetivos em um tempo menor, para o caso dos hidrocarbonetos alifáticos.

Ameen et al. (2015) avaliaram a capacidade de degradação do óleo diesel utilizando cinco fungos após 30 dias de incubação, verificando a necessidade de um período maior para a degradação de frações mais pesadas do combustível. Em bioprocessos é fundamental a otimização dos parâmetros relacionados aos nutrientes, pH, entre outros (Brito, 2010).

Silva et al.(2015), realizando ensaios semelhantes aos desse trabalho, verificaram que os resultados de degradação do óleo diesel em biorreator foram melhores que os resultados dos ensaios em frascos. Com exceção dos resultados do tetradecano (70%) que foram semelhantes para os dois ensaios, concluindo também que o controle de alguns fatores e condições influenciam na degradação da fonte oleosa. Zhao et al. (2011) selecionaram um consórcio de micro-organismos que removeu aproximadamente 52,1% do petróleo em um período de 7 dias.

Luz et al.(2011) monitorando a biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano verificou a diminuição na concentração de hidrocarbonetos. Durante os 7 primeiros dias o experimento resultou em uma redução em vários hidrocarbonetos, sendo a percentagem total de degradação, durante este período, de 13%. No décimo quinto dia a percentagem de degradação foi de 33%. Guo et al. (2010), realizaram estudos semelhantes de degradação de hidrocarbonetos, no qual o micro-organismo do gênero *Sphingomonas* atingiu valores de 79% de degradação em 7 dias de ensaio.

Gomes e Junior (2007) verificaram em ensaios de degradação de óleo diesel utilizando biorreator, por um tempo total de 330 horas, com ciclos de 110 horas, que a eficiência da degradação atingiu uma média de 35% no final do primeiro ciclo, 93,7% ao final do segundo ciclo e 97,8% ao final do terceiro ciclo. Marchal et al. (2003), na investigação da biodegradabilidade do óleo diesel por vários micro-organismos do meio ambiente, observaram considerável degradação do óleo diesel (60 a 73%). Crisafi et al.(2016) em estudos de biorremediação confirmou o potencial desta tecnologia na descontaminação de ambientes poluídos com petróleo e derivados.

b. Fitotoxicidade

Como pode ser observado na tabela 2, no planejamento fatorial, os percentuais de germinação foram superiores a 85% em todos os ensaios, com exceção do ensaio 7, cuja condição apresentou a segunda maior média de degradação, podendo ter produzido metabólitos tóxicos durante o processo.

Tabela 2Resultados dos testes de fitotoxicidade do planejamento 2².

Ensaio	Germinação (%)	Crescimento de raiz (%)	Índice de germinação
1	95	27,95	26,55
2	95	16,86	16,02
3	95	33,45	31,77
4	95	56,14	53,33
5	70	16,6	11,62
6	100	21,57	21,57
7	50	8,54	4,27
8	85	22,7	19,29
9	95	63,53	60,35
10	95	60,5	57,5
11	95	54,13	51,42

O percentual de crescimento de raiz, apresentou resultados razoáveis em alguns ensaios (4, 9, 10 e 11), com os respectivos valores: 56,14%, 63,53%, 60,5% e 54,13%. Com essa redução do crescimento de raiz, e sendo esta um parâmetro que influencia diretamente na avaliação do índice de germinação, como o previsto houve uma redução desse índice atingindo valores máximos de: 53,3 no ensaio 4; 60,35 no ensaio 9; 57,5 no ensaio 10 e 51, 42 no ensaio 11, considerados ensaios com moderada toxicidade, não impedindo a germinação das sementes de feijão.

No ensaio realizado em biorreator, como mostra a tabela 3, os percentuais crescentes de germinação mostraram que a partir do terceiro dia, não houve produção de toxicidade suficiente para inibir a germinação das sementes.

Tabela 3

Resultados do teste de fitotoxicidade do biorreator.

Tempo (Dias)	Germinação (%)	Crescimento de raiz (%)	Índice de germinação
Controle	0	0	0
3º DIA	70	34,5	24,1
5º DIA	90	60,5	54,4
7º DIA	90	54,3	48,8
9º DIA	85	50,4	42,9
11º DIA	90	57,3	51,6
13º DIA	90	56,4	50,8
15º DIA	100	70,05	70,05

No entanto, o crescimento de raiz, só apresentou resultado acima de 50%, a partir do quinto dia. Os índices de germinação apresentaram variações entre os valores 24,15 e 70,05. Apesar dos índices de germinação apresentarem valores abaixo de 80, os resultados obtidos são considerados relativamente bons, pois, esses processos conseguiram elevar a degradação e reduzir a toxicidade. Segundo Ogbo (2009) o óleo diesel é tóxico para as plantas em concentrações relativamente baixas.

Silva et al.(2015) realizando ensaios semelhantes com feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) mostraram taxa de germinação de 54%, depois de serem expostos ao material residual da degradação, chegando a

mesma conclusão, que não havia compostos tóxicos em concentrações suficientes para impedir a germinação e alongamento radicais das raízes.

Segundo Rivera-Cruz e Trijillo-Narcia (2004), a inibição da germinação de sementes e a redução do crescimento vegetal são indicadores da toxicidade dos hidrocarbonetos.

c. Citotoxicidade

Os resultados de toxicidade dos subprodutos da degradação do óleo diesel (Figura 3), sobre as células mononucleadas do sangue humano, nos ensaios pertencentes ao planejamento experimental 2², mostraram que houve uma redução dos metabólitos tóxicos em alguns ensaios (3, 4 e 5).

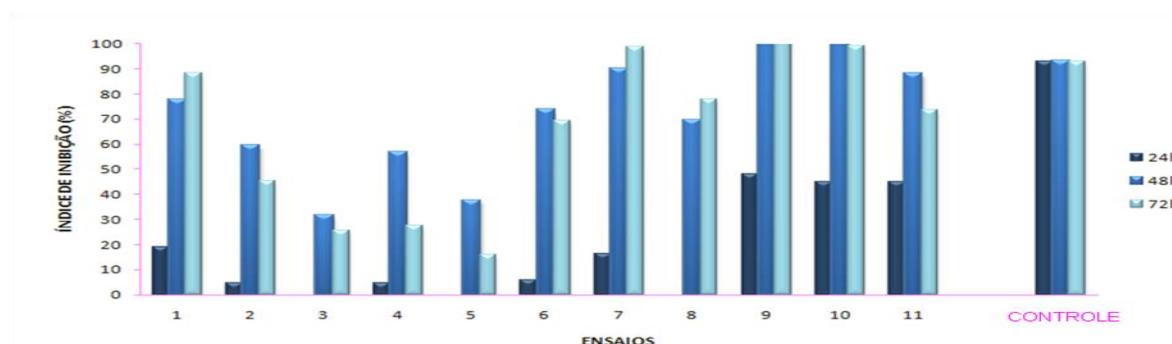


Figura 3. Resultados dos testes de citotoxicidade do planejamento 2².

Destes, os ensaios 3 e 5 não apresentaram nenhuma inibição nas primeiras 24 horas. O ensaio 4, embora tenha apresentado inibição de 4,5% nesse mesmo tempo, essa foi considerada insignificante diante dos resultados do controle. Ao final do décimo quinto dia, os ensaios 3, 4 e 5 foram considerados menos tóxicos, apresentando valores médios de 19,1%, 29,6% e 17,8%, respectivamente. Como exposto na Figura 4, a citotoxicidade em ensaio no biorreator apresentou percentuais médios de inibição (24h, 48h e 72h) de 42,8%; 19,7%, 73,1%, 11,1%, 11,3%, 17,1% e 67%, respectivamente para o 3^o, 5^o, 7^o, 9^o, 11^o, 13^o e 15^o dia.

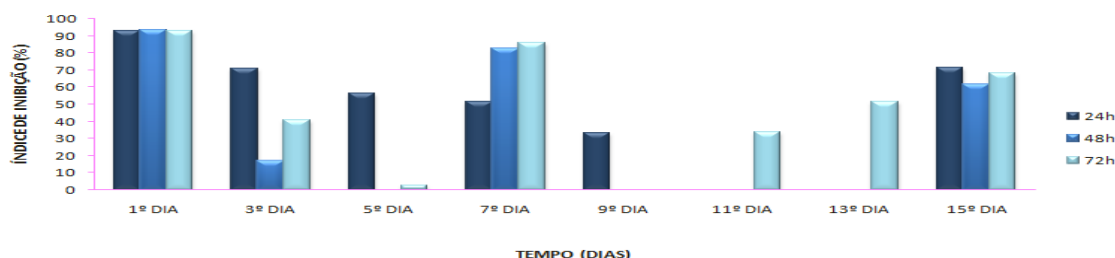


Figura 4. Resultados dos testes de citotoxicidade do biorreator.

Houve variações desses índices de inibição ao longo dos 15 dias de ensaio, pois, a dinâmica do processo de degradação provavelmente gerou em alguns momentos metabólitos mais tóxicos e esses

em outros foram reduzidos pela ação do consórcio fúngico utilizado. Para alguns tempos, os subprodutos da degradação até as 48 horas, não foram considerados inibidores das células mononucleadas do sangue periférico humano. No entanto, com o aumento do tempo de exposição, estes se tornaram tóxicos. Comparando-se aos resultados anteriores o objetivo foi alcançado, ocorrendo o aumento da degradação e redução da toxicidade.

As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de mamíferos são ideais para se testar uma substância quanto à sua capacidade em produzir aberrações cromossômicas (Natarajan; Obe, 1980). Supondo-se que haja uma correlação entre o dano induzido no sangue e em outras células somáticas, as células tipo PBMC serviriam como um sistema sentinela para grupos de alto risco (Nordenson et al., 1984). A importância da realização de testes de toxicidade para o acompanhamento da biorremediação, a qual deve estar atrelada a análises químicas tradicionais, pois metabólitos não detectáveis ou novos compostos são formados durante esse processo podendo prejudicar a biorremediação (Plaza et al., 2005). Luz et al. (2016) afirmam que testes de ecotoxicidade são importantes para avaliar os níveis de contaminação e a qualidade do sistema alcançado após o tratamento biológico. Alguns compostos policíclicos aromáticos são formados como intermediários, podendo se acumular no meio após tratamentos, sendo importante obter informações sobre resíduos gerados durante os tratamentos (Biache et al., 2017).

d. Caracterização enzimática

As três classes de enzimas estudadas formam o complexo das fenoloxidasas. Lacases são responsáveis pela oxidação de fenóis e estruturas ligninolíticas fenólicas, já manganês peroxidase e lignina peroxidase têm papel na oxidação de outros substratos.

Tabela 4

Resultados da atividade enzimática do biorreator.

Tempo	Lacase (U/L)	Lignina Peroxidase (U/L)	Manganês Peroxidase (U/L)
1º DIA	0	0	0
3º DIA	0	0	12,29
5º DIA	0	4,30	6,73
7º DIA	0	37,63	36,14
9º DIA	0	20,43	28,34
11º DIA	0	23,65	50,13
13º DIA	0	18,28	50,13
15º DIA	0	13,98	29,24

As três classes de enzimas estudadas formam o complexo das fenoloxidasas. Lacases são responsáveis pela oxidação de fenóis e estruturas ligninolíticas fenólicas, já manganês peroxidase e lignina peroxidase têm papel na oxidação de outros substratos. A lacase não apresentou atividade, isso pode ser explicado pelo fato do óleo diesel conter quantidades baixas de compostos fenólicos e aromáticos, tendo em sua constituição compostos alifáticos em sua maioria, explicando a atividade de manganês peroxidase e lignina peroxidase. Essas duas últimas oxidam compostos fenólicos e não fenólicos, sendo utilizadas na biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) (Hamid; Rehman, 2009; Husain et al., 2009).

No caso específico do co-metabolismo, caso não haja o substrato principal, ou seja, fontes preferenciais de carbono, a degradação mediada pelos micro-organismos não ocorre para um dado componente, definido como “contaminante cometabolizado”. Por outro lado, neste caso específico, na presença de uma fonte de carbono, a metabolização do substrato primário poderá gerar enzimas capazes de atuar na degradação do contaminante de interesse (Garnier et al., 2000).

Apenas a partir do terceiro dia houve produção de manganês peroxidase atingindo um valor máximo (50,13 U/L) no décimo primeiro dia. Anastasi et al.,(2009) encontrou resultados superiores, em testes de degradação utilizando fungos, produzindo em torno de 124 U/L. Maciel et al.(2010) verificou em ensaios semelhantes com óleo diesel, destaque na produção de manganês peroxidase (60U/L+ 8) produzidos por F25-*Penicillium sp.*

Somente a partir do quinto dia houve produção de lignina peroxidase, alcançando um máximo de 37,63 U/L no último dia. Anastasi et al.,(2009) em ensaios semelhantes encontraram produção de 19 U/L e enquanto Gomes et al.,(2009) obtiveram 9 U/L em 5 semanas de incubação. Maciel et al.(2010) em ensaios semelhantes encontraram resultados, estatisticamente semelhantes para produção de lignina peroxidase, foram os seguintes: F11-*Paecilomyces sp.* (94 U/L +9), F21-*Penicillium sp.* (100 U/L + 22), F24- *Aspergillus sp.* (100 U/L+ 14) e F25-*Penicillium sp.*

O fato de não ter sido detectado produção enzimática inicialmente, pode ter ocorrido pela necessidade dos micro-organismos de um período de adaptação ao óleo diesel. Pois, essa aclimação permite, por parte deles, a produção de metabólitos como enzimas lignolíticas utilizando os substratos presentes no meio, como fonte de carbono (Mancera-Lopez et al,2008; Wang et al.,2009). A utilização de petroderivados, como tal fonte, induz a produção de enzimas otimizando a síntese das mesmas para que sejam aplicadas em processos de biorremediação entre outros (Feng et al., 2009).

A estrutura da lignina é similar a estrutura de alguns compostos sintéticos orgânicos. Então, a produção da enzima lignina peroxidase pode ser responsável, pelo menos em parte, pela degradação de alguns compostos poluentes orgânicos presentes no óleo diesel (Ballaminut e Matheus, 2007; Mariano et al. 2009).

4 Conclusões

O planejamento fatorial conseguiu revelar condições mais favoráveis para a degradação do óleo diesel, alcançando bons resultados, quando foi utilizado o biorreator e nas condições controladas. No geral, a citotoxicidade foi reduzida com relação aos resultados iniciais obtidos em experimentos preliminares. A fitotoxicidade mostrou que apesar dos índices de germinação não terem alcançados o valor de referência 80, a toxicidade foi reduzida, quando comparado ao poluente sem o tratamento. O experimento realizado em biorreator, com as condições otimizadas aplicadas de forma controlada, proporcionou um aumento significativo na degradação do óleo diesel. O consórcio, formado por *A. niger*, *C. elegans* e *R. arrhizus*, promoveu a degradação total de alguns hidrocarbonetos, sendo promissor para processos de biorremediação, produzindo resíduos que não foram capazes de impedir a germinação de feijões e nem impedir a proliferação das células mononucleadas do sangue humano, sendo assim recomendado para ser aplicado em processo de biorremediação.

5 Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Ministério de Tecnologia da Ciência do Brasil e à Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio recebido.

6 Referências

1. Anastasi, A.; Coppola, T.; Prigione, V.; Varese, G. C. 2009. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, p. 1229-1233.
2. Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., Al-Sabri, A.E. 2015. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
3. Ballaminut, N.; Matheus, D.R. 2007. Characterization of fungal inoculums used in soil bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p. 248-252.

4. Bamforth, S.; Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.80, n.7, p.723-736.
5. Biache, C.; Ouali, S.; Cébron, A.; Lorgeoux, C.; Colombarod, E.; Faure, P. 2017. Bioremediation of PAH-contaminated soils: Consequences on formation and degradation of polar-polycyclic aromatic compounds and microbial community abundance. *Journal of Hazardous Materials* 329 (2017) 1–10.
6. Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, EUA, v.74, p. 63-67.
7. 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.
8. Buswell, J.K.; Cai, Y.J.; Chang, S. T. 1995. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128:81-88.
9. Cappello, S.; Genovese, M.; Torre, C.D.; Crisari, A.; Hassanshahian, M.; Santisi, S.; Calogero, R.; Yakimov, M. 2012. Effect of bioemulsificant exopolysaccharide (EPS2003) on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: A microcosm study. *Marine Pollution Bulletin*, v.64, p.2820- 2828.
10. Chiu, H. Y.; Verpoort, F.; Liu, J. K.; Chang, Y. M.; Kao, C. M. 2017. Using intrinsic bioremediation for petroleum–hydrocarbon contaminated groundwater cleanup and migration containment: Effectiveness and mechanism evaluation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 1–9.
11. Crisafi, F.; Giuliano, L.; Yakimov, M.M.; Azzaro, M.; Denaro, R. 2016. Isolation and degradation potential of a cold-adapted oil/PAH-degrading marine bacterial consortium from

- Kongsfjorden (Arctic region). *Environmental Changes In Arctic. Rend. Fis. Acc. Lincei*, 27 (Suppl 1):S261–S270.
12. Feng, Q. X.; Ma, X. P.; Zhou, L.H.; Shao, D. B.; Wang, X.L.; Qin, B.Y. 2009. EOR pilot tests with modified enzyme. *SPE Reservoir Evaluation and Engineering*, 12(1):79-87.
 13. Gaylarde, C. C.; Bellinaso, M. L.; Manfio, G. P. 2005. Biorremediação – Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. n.34, p.36-43, janeiro-junho.
 14. Garnier, P. M.; Auria, R.; Augur, C.; Revah, S. 2000. Metabolic degradation of methyl tert-butyl ether by a soil consortium: effect of components present in gasoline. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 46:79-84.
 15. Gomes, E.; Aguiar, A.P.; Carvalho, C.C.; Bonfá, M.R.B.; Silva, R.; Boscolo, M. 2009. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of microbiology*, 40:31-39.
 16. Gomes, E.B.;Junior, N.P. 2007. Avaliação de Biodegradabilidade de resíduo oleoso, em biorreator, por batelada simples e batelada sequencial. *Diálogos & Ciência-Revista da Rede de Ensino FTC*. AnoV, n.12, dezembro.ISS 1678-0493.
 17. Guo, C.; Dang, Z. Wong, Y.; Tam, N.F. 2010. Biodegradation ability and dioxigenase genes of PAH-Degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.30, p.1-8.
 18. Hamid, M., Rehman, K.U. 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115:1177-1186.

19. Husain, Q. Husain, M. Kulshrestha, Y. 2009. Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(2):94-119.
20. Locatelli, G. O.; Nunes, L. S.E.S.; Sousa, M.F.V.Q.; Lopes, C.E.; Inkler, C.L.L. 2015. Predição de um modelo de percolação de óleo diesel em areias da praia do Porto de Suape-Pe, Brasil. *Revista de Geologia*, Vol. 28, nº 1, 15 – 26.
21. Luz, C. C.; Santos, E. A.; Santos, M. O. S.; Mussy, M. Y.; Yamashita, M.; Bastos, W. R.; Brucha, G.; Reis, M. M.; Reis, M.G. 2011. Estudos de Biodegradação de Óleo Diesel por Consórcio Microbiano Coletado em Porto Velho – Ro, Amazônia. *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5.
22. Luz, E. L. P; Silva, D. S. P.; Medeiros, M. C.; Bezerra, A. P. X. G.; Lorena, E. Maria G.; Santos, Í.G. S. 2016. Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation. *Revista Geama*, v.7, n.1, oct.-dec.
23. Maciel, C. C.S.; Souza, M.A.; Gusmão, N. B.; Takaki, G.M.C. 2010. Production of lignolytic system enzymes by filamentous fungi isolated from oil derivatives impacted sites. *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305.
24. Mancera- López, M. E.; Esparza –García, F.; Chávez-Gomes, B.; Rodríguez-Vazquez, R.; Saucedo-Castañeda, G.; Barrera-Cortés, J. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61:151-160.
25. Marchal, R.; Penet, S.; Solano-Serena, F.; Vandecasteele, J. P. 2003. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science Technology*– v.58, p.441-448.
26. Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55 – 63.

27. Natarajan, A. T.; Obe, G. 1980. Screening of Human Populations for Mutations Induced by Environmental Pollutants: Use of Human Lymphocyte System. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 4, p. 468-481.

28. Nkem, B.M.; Halimoon, N.; Yusoff, F.Md.; Johari, W.L.W.; Zakaria, M.P.; Medipally, S.R.; Kannan, N. 2016. Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach, Malaysia. *Marine Pollution Bulletin* 107, 261–268.

29. Nwaogu, L.A.; Onyeze, G.O.C.; Nwabueze, R.N. 2008. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology*. Vol.7(12), pp.1939-1943, 17 june.

30. Nikakhtari, H.; Wanning, S.; Kumar, P.; Hill, G.A. Scale up of Diesel oil biodegradation in a baffled roller bioreactor. *Chemosphere*, v.79, p.1010-1016, 2010.

31. Nordenson, I. et al. 1984. Chromosomal Aberrations and Cancer Risk. *Human Heredity*, n. 34, p. 76 -81.

32. Ogbo, E.M., 2009. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants – *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology* 8, 250-253.

33. Plaza, G., Nalecz, J., Ulfig, K., Brigmon, R. L., 2005. The application of biossays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, Oxford, 59:289-296.

34. Rivera-Cruz, M. C.; Trujillo-Narcía, A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal em suelos com petróleos nuevo e intemperizado. *Interciênc.*; v. 29, p. 369-376.

35. Safdari, M-S; Kariminia, H-R.; Nejad, Z.G.; Fletcher, T.H. 2017. Study Potential of Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in Bioremediation of Diesel-Contaminated Water. *Water Air Soil Pollut*, 228: 37.

26. Silva, D. S. P., Cavalcanti, D. L., Melo, E. J. V., Santos, P. N. F., Luz, E. L. P., Gusmão, N. B., Sousa, M. F. V. Q. 2015. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 97 (2015) 85 and 89.
36. Tiquia, S. M.; N. F.; Hodgkiss, I. J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*; 93 (3): 249-256.
37. Wang, H.; Ye, Q.; Yue, L.; Yu, Z.; Han, A.; Yang, Z.; Lu, L. 2009. Kinetics of extractable residue, bound residue and mineralization of a novel herbicide, ZJ0273, in anaerobic soils. *Chemosphere*, 76:1036-1040.
38. Yanto, D.H.Y.; Hidayat, A.; Tachibana, S. 2017. Periodical biostimulation with nutrient addition and bioaugmentation using mixed fungal cultures to maintain enzymatic oxidation during extended bioremediation of oily soil microcosms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 116, 112e123.
39. Zhao, D.; Liu, C.; Liu, L.; Zhang, Y.; Liu, Q.; Wu, W-M. 2011. Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.65 p.1244–1248.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- Os micro-organismos isolados, que foram selecionados, mostraram capacidade de degradar o óleo diesel, utilizando-o como única fonte de carbono; A interação entre os eles foi positiva, não sendo detectada a presença de antagonismo;
- Os micro-organismos mostraram tolerância às concentrações crescentes da fonte oleosa até a concentração testada de 10%;
- A biodegradação do óleo diesel no planejamento fatorial 2^4 foi favorecida quando se acrescentou uma fonte de carbono alternativa, como o glicerol;
- O *Aspergillus niger* mostrou-se eficiente na degradação dos constituintes do óleo diesel onde houve maior concentração de glicerol, sendo assim significativa para o processo;
- No planejamento fatorial 2^3 , o glicerol, como fonte de carbono, foi considerado favorável para a degradação até certas concentrações, pois, em quantidades excessivas ele tornou-se um fator negativo para o processo; No geral, a citotoxicidade foi reduzida com relação aos resultados iniciais e a fitoxocidade mostrou que apesar dos baixos Índices de Germinação, a toxicidade foi reduzida, quando comparado ao poluente sem o tratamento. No entanto, algumas alterações no processo devem ser avaliadas, a fim de reduzir a toxicidade, tornando o tratamento eficaz.
- O planejamento fatorial 2^2 otimizou a degradação, alcançando bons resultados quando foi aplicada ao biorreator onde o tratamento ocorreu com condições controladas. A citotoxicidade foi reduzida com relação aos resultados iniciais obtidos em experimentos preliminares. A fitotoxicidade mostrou que a toxicidade foi reduzida, quando comparado ao poluente sem o tratamento.
- O consórcio, formado por *A. niger*, *C. elegans* e *R. arrhizus*, promove a degradação total de alguns hidrocarbonetos, sendo promissor para processos de biorremediação, produzindo resíduos que não foram capazes de impedir germinação dos feijões e nem impedir a sobrevivência das células mononucleadas do sangue humano, assim recomendado para biorremediação.

REFERÊNCIAS

1. AHEARN, D. G.; MEYERS, S. P.; STANDARD, P. G. The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. *Developments in Industrial Microbiology*, v. 12, p. 126-134, 1971.
2. ALEXANDER, M. Effect of Chemical Structures on Biodegradation. In: *Biodegradation na Biorremediation*. 2 ed. New York: Academic Press; cap. 11, p.177-194, 1999.
3. ALEXOPOULOS, C.J., MINS, C.W.; BLACWEL, M. *Introductory Mycology*. 4. P. 26-60. J. Wlew & Sons, New York, 1996.
4. ALISI, C.; MUSELLA, R.; TASSO, F.; UBALDI, C.; MANZO, S.; CREMISINI, C.; SPROCATI, A. R. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*, n.407, p.3024–3032, 2009.
5. ALVAREZ-COHEN, L. Engineering challenges of implementing in situ bioremediation. In: *NATIONAL RESEARCH COUNCIL, In situ bioremediation: When does it work?* National Academy Press, Washington, D.C., p.136-152, 1993.
6. ANDRADE, B. N. Biorremediação de solos contaminados por óleo diesel com uso da microbiota nativa-Trabalho de conclusão de curso-Curso Biotecnologia, Centro Universitário Estadual da Zona oeste, Rio de Janeiro, 2009.
7. ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em:< <http://www.anp.gov.br>> Acesso em: Novembro de 2016.
8. ARUN, A.; EYUNI, M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes Fungi. *Bioresource Technology*, 102, 8063-8070, 2011.

9. ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Menio Park, California. Benjamin Cumins Publishing Company, 1972.
10. ATLAS, R.M.BARTHA, R. Microbial Ecology-Findamentals and Applications.3.ed. Redwood:Benjamim Cummings, 1992.563p., 1996.
11. AZAMBUJA, E.; CANCELIER, D.; NANNI, A. S. Contaminação dos solos por LNAPL: Discussão sobre diagnóstico e remediação. In: II SIMPÓSIO DE PRÁTICA DE ENGENHARIA GEOTÉCNICA DA REGIÃO SUL, Porto Alegre. p. 185-202, 2000.
12. BAKER, K. H.; HERSON, D. S. Bioremediation of surface and subsurface soils. In: BAKER, K. H;. HERSON, D. S. (ed). Bioremediation, McGraw Hill, Inc: USA, p. 203-259, 1994b.
13. BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.
14. BARBOSA, B. C. A; SIQUEIRA, J. P; MOREIRA, I. C. Q; MARINHO. G. RODRIGUES, KA. Remoção niger AN400 de compostos BTX em água residuária sintética por Aspergillus. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 2009.
15. BENEVIDES, J. A. J; MARINHO, G.M. Degradação de pesticidas por fungos-uma revisão. Holos, Ano 31, Vol. 2, 2015.
16. BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A.O.; OKEKE, B.C.;FANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaumentation. Bioresource Technology, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
17. BIACHE, C.; OUALI, S.; CÉBRON, A.; LORGEUX, C.; COLOMBANOD, E.; FAURE, P. Bioremediation of PAH-contaminated soils: Consequences on formationand degradation of polar-polycyclic aromatic compounds and microbial community abundance. Journal of Hazardous Materials 329, 1–10, 2017.

18. BONONI, V.L.; MACHADO, K.M.; MATHEUS, D.R.; VITALI, V.M. Capítulo 12. Biodegradação de Organoclorados no Solo por Basidiomicetos Lignocelulotíticos. In: Microbiologia Ambiental, 2ªed. Re. Ampl.-Jaguariúna: Emprapa meio Ambiente, p.547-570, 2008.

19. BONUGLI-SANTOS R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganeseperoxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine derived fungi. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010.

20. BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation techonologies. *Bioresource Technology*, EUA, v.74, p. 63-67, 2000.

21. BORÉM, A.; SANTOS, F. R. BIORREMEDIAÇÃO. In: Borém, A.; Santos, F. R. *Biotecnologia Simplificada*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 179-187, 2004.

22. BUENO, S. M.; SILVA A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

23. BUCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; JACQUES, R.J.S.; PERALBA, M.C. R.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F. M. Impacto f biodiesel on biodererirotation of stored Brazilian diesel oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Brasil, v. 65, p.172-178, 2011.

24. CAPUZZO, J.M.; MOORE, M. N.; WIDDOWS,J. Effects of toxic chemicals in the marine environment: predictions of impacts from laboratory studies. *Aquatic Toxicology* 11:303-311, 1988.

25. CARMO, E.S., BELÉM, L.F., CATÃO, R.M.R., LIMA, E.O., SILVEIRA, I.L. & SOARES, L.H.M. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande - PB. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 39(3): 213-216, 2007.

26. CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v.19, n.5-6, p.324–333, 1997.
27. CERNIGLIA, C.E.; PERRY, J.J. Crude oil degradation by microorganisms isolated from the marine environment. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie*, v.13, n.4, p. 299-306, 1973.
28. CERQUEIRA, P. R. O. Proteção e limpeza de ambientes costeiros da ilha de Boipeba contaminados por petróleo: o uso alternativo da fibra de coco como barreiras e sorventes naturais. Universidade Católica do Salvador, 2010.
29. CETESB: Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/> acessado em 09 de junho de 2015.
30. CHAKRADEO, P.P.; KAYAL, P.P.; BHIDE, S.V. Effect of benzo(a)pireno and methyl (acetoxymethyl) nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. *Cellular Biology International*, v.17, n.7, p. 671-676, 1993.
31. CHEN, H.; RUPA, D.S.; TOMAR, R.; EASTMOND, D.A. Chromosomal loss and breakage in mouse bone marrow and spleen cells exposed to benzene in vivo. *Cancer Research*, Baltimore, v.54. p.3533–3539, 2008.
32. COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid state bioprocess. *Bioresource Technology*, Essex, v. 101, p. 8308-8314, 2010.
33. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Disponível em: <www.conama.com.br>. Acesso em 28/11/2016.

34. COSTA, A. 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. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. *Revista Ciências & Tecnologia*. Ano 1, n.1., 2007.
35. COSTA, L.; DELLAMATRICE P. M.; DE SOUSA M. V.; SILVA, G. M. M. Biorremediação de uma área contaminada com o inseticida metamidofós por *Corynebacterium* sp. *Conexão Ciência e Tecnologia*, Aracati, v. 4, n. 1, p. 17-23, 2010.
36. CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. *Water Science & Technology*, Oxford, v. 34, p.311-318, 1996.
37. COUTINHO, P. W. R. Alternativas de remediação e descontaminação de solos – Biorremediação e Fitorremediação. *Nucleus*, v. 12, n. 1, p. 59-68, abr. 2015.
38. CRAIG, A. P. L.; SENA, E.; MAGALHÃES, L.; KRAUSE, M. C.; NEVES, P. R.; SILVA, M. J. Técnicas de Limpeza de Vazamentos de Petróleo em Alto Mar. *Cadernos de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas*, Sergipe. v. 1, n.15. p. 75-86, 2012.
39. CRAPEZ, M.A.C. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na biota marinha. In: MORAES, R. et. al.(org.) *Efeitos de poluentes em organismos marinhos*, Rio de Janeiro, p. 255-269, Arte e Ciência Villipress, 2001.
40. CRAWFORD, R.L. Bioremediation. In: *Prokaryotes* v. 1. Edited by Dworkin M. New York: Springer-Verlag Inc. pg. 850–863, 2006.
41. CRISAFI, F.; GIULIANO, L.; YAKIMOV, M.M.; AZZARO, M.; DENARO, R. Isolation and degradation potential of a cold-adapted oil/PAHdegrading marine bacterial consortium from Kongsfjorden (Arctic region). *Environmental Changes In Arctic. Rend. Fis. Acc. Lincei* 27 (Suppl 1):S261–S270, 2016.
42. CONFEDERAÇÃO NACIONAL DE TRASNPORTE (CNT). O impacto da má qualidade do óleo diesel brasileiro. 28p.: Despoluidor-Programa Amiental do Transporte. Brasília, 2012.

43. COUTINHO, P. W. R., CADORIN, D. A., NORETO, L. M., GONÇALVES JR., A.C.. Alternativas de remediação e descontaminação de solos: biorremediação e fitorremediação. Nucleus (Online), Ituverava, v.12, n.1, p. 59-68, 2015.
44. DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. International Microbiology, 7:173-180, 2004.
45. D'SOUSA, T. M.; MERRIT, C. S.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. Applied and environmental Microbiology, v. 65, n. 12, p. 5307-5313, 1999.
46. ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs; p. 510, 2004.
47. ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ªed. Revisada. Caxias do Sul: Educs, 2010.
48. EVANS, GARETH; FURLONG, JUDITH C. Environmental biotechnology: theory and application. New York: John Wiley & Sons, 2003.
49. FILHO, M. C. M.; CORIOLANO, A. C. F. Biorremediação, Uma Alternativa na Utilização em Áreas Degradadas pela Indústria Petrolífera. HOLOS, Ano 32, Vol. 7, 2016.
50. FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; VALENZUELA-ENCINAS, C.; MARCH, R.; MARTINEZ-SUÁREZ, C.; VÁZQUEZ-NÚÑEZ, E.; DENDOOVEN, L. Microbial communities to mitigate contaminatin of PAHs in soil-possibilities and challenges:a review. Environmental Science Pollution, n.18, p.12-30, 2011.
51. FLORES, L.H. & ONOFRE, S.B. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em unidade de saúde da cidade de Francisco Beltrão - PR. Revista de Saúde e Biologia, 5(2): 22-26, 2010.
52. FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de Biossurfactantes por levedura. Química Nova, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

53. FRANKENBERGER JR., W. T. 1992. The Need for a Laboratory Feasibility Study in Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. In: Hydrocarbons Contaminated Soils and Groundwater. Boca Raaton. E. J.; Calabrese and P. T. Kostecki Eds. P. 237-293.
54. GRIFFIN, D. Fungal Physiology. New York: Wiley Liss. 39, 1994.
55. GOIS, T. S.; BARBOSA, M. S.; FILHO, J. H. B. A.; GONZAGA, I. M. D.; SOUZA, E. E. S. In: I Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Campina Grande, Levantamento de impactos ambientais causados pela indústria do petróleo e gás Offshore, 2015.
56. HEIDERSCHIEDT, D.; PEREIRA, J.; BURGHARDT, J. E.; SILVA, L. A. S.; OLIVEIRA, C. Conceitos aplicados à poluição do solo decorrente do derrame de petróleo e seus derivados. Revista Maiêutica, Indaial (Online), v. 4, n. 1, p. 7-14, 2016.
57. HYNE, N. J. The nature of oil and gas. 1995. IN: Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling and production. Oklahoma: Pennwell Publishing Company; p.11-23, 1995.
58. IJAH, U. J. J.; ANTAL, S. P. "Removal of Nigerian light Crude Oil in Soil Over a 12-month Period". International Biodeterioration and Biodegradation. v. 51, 93-99, 2003.
59. JACQUES, R. J. S. Biorremediação de Antraceno, Fenantreno e Pireno em um Argissolo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (RS) Brasil, 2005.
60. JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural. vol.37, nº.4, p. 1192-1201, 2007.
61. JACQUES, R.J.S.; SILVA, K.J.; BENTO, F.M. CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de um solo contaminado com antaceno sob diferentes condições física e químicas. Ciência Rural, v. 40, p. 310-317, 2010.
62. JOHNSON, A.R. ET AL. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution, v. 133, n. 1, p. 71-84, 2005.

63. JUHASZ, A.L.; NAIDU, R. Bioremediation of molecular polycycle weigh aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] peryne. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.42, p.57-88, 2000.
64. KAHANGURA, C.; HALLSWORTH, J.E.; MSWAKA, A.Y. Phenotypic diversity amongst strains of *Pleurotus sajos-caju*: implications for cultivation in arid environments. *Mycological Research*, v.110, p.312-317, 2006.
65. KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, v.36, p.364-373, 2010.
66. LĂCĂTUȘU, A.R.; LĂCĂTUȘU, R.; DUMITRU, M.; MORARU, I.R.; VRÎNCEANU, A.; BĂLĂCEANU, C.; BURTAN, L. Decontamination of a Petroleum Hydrocarbons Polluted Soil by Different Bioremediation Strategies. *Analele Universității din Craiova, seria Agricultură – Montanologie – Cadastru (Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series) Vol. XLVI*, 2016.
67. LAUNEN, L.; PINTO, L.; WIEBE, C.; KIEHLMANN, E.; MOORE, M. The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, v.41, p. 477–488, 1995.
68. LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, p. 305-315, 1990.
69. ŁEBKOWSKA, MARIA; ZBOROWSKA, E.; KARWOWSKA, E.; MIASKIEWICZ-PESKA, E.; MUSZYNSKI, A.; TABERNACKA, A.; NAUMCZYK, J.; JECZALIK, M. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. *Ecological Engineering*, n.37, p.1895–1900, 2011.
70. LEONEL, L. V.; NASCIMENTO, E.G.; BERTOZZI, J.;BÔAS, L.A.V.; BÔAS, G.T.V. Biorremediação do solo. *Terra e Cultura – n0 51 - Ano 26* , 2010.
71. LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: Properties and activity on lignin, *J. Basic Microbiol.* v.41, p.185-227, 2001.

72. LI, X.; LI, P.; LIN, X.; ZHANG, C.; LI, Q.; GONG, Z. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *Journal of Hazardous Materials*. 150 (1): 21–26, 2008.

73. LIMA, M.; PRIMAZ, A.L.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação de resíduos de petróleo e óleo vegetal. In: *Congresso De Iniciação Científica E Tecnológica Em Engenharia - CRiCTE*, 21, Anais... [S. l.]: 2006.

74. LIMA, D. F.; OLIVEIRA, O. M. C; CRUZ, M.J.M. Utilização dos Fungos na Biorremediação de Substratos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte. *Cadernos de Geociências*, v. 8, n. 2, novembro, 2011.

75. LOVAGLIO, R. B. et al. Biodegradação da gasolina por leveduras isoladas da Região Portuária de Suape - PE. *SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS*, 15, 2005, Recife. Anais... Recife, PE: [S. n.], 2005.

76. LOPEZ, M.- M. E. ; GARCIA, E.F. ; GOMEZ, C. B. ; VAZQUEZ, R. R. ; CASTANEDA, S. G. ; CORTES, B. J. Bioremediation of an aged hydrocarbon contaminated soil by a combined system of biostimulation bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.61 , p.151–160, 2008.

77. LUZ, C. C.; SANTOS, E. A.; SANTOS, M. O. S.; MUSSY, M. Y.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W. R.; BRUCHA, G.; REIS, M. M.; REIS, M.G. Estudos de Biodegradação de Óleo Diesel por Consórcio Microbiano Coletado em Porto Velho – Ro, Amazônia. *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5, 2011.

78. LUZ, E. L. P; SILVA, D. S. P.; MEDEIROS, M. C.; BEZERRA, A. P. X. G.; LORENA, E. MARIA G.; SANTOS, Í.G.S. Pollution mitigation for hydrocarbons of petroleum through the bioremediation. *Revista Geama*, v.7, n.1, oct.-dec., 2016.

79. MACIEL, C. C.S.; SOUZA, M.A.; GUSMÃO, N. B.; TAKAKI, G.M.C. Production of lignolytic system enzymes by filamentous fungi isolated from oil derivatives impacted sites. *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.

80. MAIER, R. M. Microorganisms and organics Pollutants. In: MAIER, R.M.; PEPPER, I.L. E GERBA, C.P. Environmental Microbiology. New York: Academic Press; cap.16, p.363-402, 2000.
81. MARIANO, A. P., BONOTTO, D. M., ANGELIS, D.F. PIRÔLLO, M.P. S., CONTINIERO, J. Use of Weathered Diesel Oil as Low-Cost Raw material for Biosurfactant Production, Brazilian Journal of Chemical Engineering 25(02):269-274, 2008.
82. MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D.F.; PIRÔLLO M. P. S; CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. Brazilian Journal of Microbiology, n.39, p.133-142, 2008.
83. MARIANO, P.A.; ANGELIS, F.D.; BONOTTO, M.D. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. Brazilian journal of Microbiology, V.38, p.346-353, 2007.
84. MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Lipases and biosurfactant production by solid state fermentation for utilization in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbons. Química Nova, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.
85. MARTINS, S. S. S.; SILVA, M. P.; AZEVEDO, M. O.; SILVA, V. P. Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. Holos (Online), Ano 31, Vol. 6, p. 54-76, 2015.
86. MEDAURA, M. C.; ERCOLI, E. C. Bioconversion of petroleum hydrocarbons in soil using filter cake. Brazilian Journal of Microbiology. v. 39, p. 427-432, 2008.
87. MELO, W. J. et al. Manejo de solos degradados por ação antrópica. In: ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. (Org.). Meio Ambiente e sustentabilidade. Porto Alegre: Bookman, 2012. p. 238-282.
88. MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Ed. UFLA, 2002.

89. MROZIK, AGNIESZKA; PIOTROWSKA-SEGET, ZOFIA. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research* v.165 p. 363-375, 2010.
90. MULLER-HURTING, R.; WAGNER, F.; ROMAN, B.; KOSARIC, N. *Biosurfactants: Production-Properties-Applications*. New York: Marcel Dekker, INC. Cap. 17, p.447-469, 1993.
91. MULLIGAN, C.N. Environmental Applications for Biosurfactants. *Environmental Pollution*; v.133, p.183-198, 2005.
92. NEILSON, A. H.; ALLARD, A. S.; REIMBERGER, M. Biodegradation and Transformation Of Recalcitrant Compounds. In: *The Handbook of Environmental Chemistry-Reactions and Processes*. Vol 2, Part C. Edº H, 1985.
93. 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.
94. PIETROLETTI, M.; CAPOBIANCHI, A.; RAGOSTA, E.; MECOZZI, M. Preliminary evaluation of hydrocarbon removal Power of *Caulerpa racemosa* in seawater by means of infrared and visible spectroscopic measurements. *Spectrochimica Acta Part A*, v.77, p.673-679, 2010.
95. PEDROZA, S.; FLORENCIO, L.; KATO, M. T; PAIM, A. P.S. GAVAZZA, S. Remoção Anaeróbia dos Componentes BTEX de Água Contaminada por Gasolina. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*. v.14 p.61- 67, 2009.
96. PINHATI, F. R.; AGUILA, E. M. D. ; TÔRRES, A. P. R.; SOUSA, M.P.; SANTIAGO, V. M. J.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. 2014. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. *Quím Nova* 8:1269-1274.

97. PLAZA, G., NALECZ-JAWECKI, G., ULFIG, K., BRIGMON, R. L. 2005. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 62, p. 415-420.
98. RADWAN, S.S.; AL-HASAN, R.H.; ALI, N.; SALAMAH, S.; KHANAFER, M. Oil consuming microbial consortia floating in the Arabian Gulf. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 56: 28–33, 2005.
99. RODRIGUES, K. A.; MARINHO, M. M. S. *Fungos e Águas Residuárias Industriais: Nova Tecnologia*. Recife: Imprima, 2012.
100. RODRIGUEZ JR., M.; KLASSON, T.; DAVISON, B. H. Enhancement of the Biochemistry and Biothechnology; v. 91-93, p. 195-203, 2001.
101. ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: Melo I. S; Azevedo, J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, São Paulo; Cap.14, p.307-334, 1997.
102. ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: MELO I. S; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariuna. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria;Cap.14, p.307-334, 1998.
103. SANTOS, V. L.; LINARD, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potential. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1001-1006, 2004.
104. SAYARA, TAHSEEN; BORRÀS, E.; CAMINAL, G.; SARRÀ, M.; SÁNCHEZ, A. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (2011) 859-865.

105. SACK, U.; HEINZE, T.M.; DECK, J.; CERNIGLIA, C.E.; CAZAU, M.C.; FRITSCH, W. Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 2906– 2909, 1997.

106. SEMPLE, R. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R. Review: Impact of Contamination Strategies on the Treatment of Soils Contaminated with Organic Pollutants. *Environmental Pollution*; v.112, p.263-283, 2001.

107. SILVA, M.; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Espósito, E.; AZEVEDO, J.L. (orgs). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, p. 337 –378, 2004.

108. SINGH, H. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. New Jersey: John Wiley & Sons, 592p. S, 2006.

109. SINGH, S.; GUPTA, V.K. Biodegradation and bioremediation of pollutants: perspectives strategies and applications. In. *J. pharmacol. Bio. Sci.* Vol, 10(1), 53-65, 2016.

110. SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.78, n.2, p.341-350, 2011.

111. SOUZA, E.C. P.M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil.2010. In: NASCIMENTO, I.A.; SOUZA, E.C.P.M.; NIPPER, M. *Métodos em Ecotoxicologia marinha*. São Paulo, Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda.p.9-14, 2002.

112. SOUSA, K. C.; TANABE, A. K. R.; SABONARO, D. Z.; SMITH, W. S. Biorremediação de Solos Contaminado por Hidrocarbonetos Utilizando Fungos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 14, n. 2, p. 43-52, ago./dez. 2016

113. SPEIGHT, J.G. The Chemistry and Technology of Petroleum. Chemical Industries CRC Press. 4ª edição, p. 984, 2006.
114. SRIDEVI, V.; LAKSHMI, M.V.V.C.; SWAMY, A.V.N., RAO, M.N. Implementation of response surface methodology for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM2102), Journal of bioremediation and Biodegradation, v.2, p.1-7, 2011.
115. SUTHERLAND, J.B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. Journal of Industrial Microbiology, v.9, p.53–62, 1992.
116. SZKLO, A.S. Fundamentos do Refino do Petróleo. Editora Interciência. Rio de Janeiro - RJ, PETROBRAS, 2005.
117. TAVARES, A.P.M.; COELHO, M.A. Z.; AGAPITO, M.S.M.; COUTINHO, J. A. P.; XAVIER, A.M.R.B. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. Journal Applied Microbiology and Biotechnology, 134; 233-248, 2006.
118. THAPA, B.; KUMAR, A.K.C.; GHIMIRE, M. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology, v. 164-170, 2012.
119. THOMAS, J.E. (ORGANIZADOR). Fundamentos de Engenharia de Petróleo. Editora Interciência. Rio de Janeiro - RJ, PETROBRAS, 2001.
120. TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. Química Nova. v. 27, n. 3, p. 441-446, 2004.

121. TYAGI, M. M.; MANUELA, R. F.; CARA, C. C. R. C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. v.22, p.231–241, 2011.
122. TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRAVITOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, Rio de Janeiro, v.14, n.4, p. 1027-1035, dez. 2010.
123. VALASKOLÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimulation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, 2005.
124. VARSHA, Y.M.; DEEPTHI, N.; CHENNA, S. An Emphasis on Xenobiotic Degradation in Environmental Clean up. *Bioremediation and Biodegradation*, v. 2, S11-001, 2011.
125. VIRAMONTES-RAMOS, S.; PORTILLO-RUIZ, M. C.; BALLINAS-CASARRUBIAS, M. L.; TORRES-MUÑOS, J. V.; RIVERA-CHAVIRA, B. E.; NEVÁRES-MOORILLÓN, G. V. Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon contaminated Soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 41, p. 668-675, 2010.
126. WETLER TONINI, R. M.C. ; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: Revisão. *Oecologia Australis* 14(4): 1025-1035, Dezembro, 2010.
127. WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic Biodegradation of Saturated and Aromatic Hydrocarbons. *Biotechnonology*; 12, 259-276, 2001.
128. YAKUBU, M.B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, 6 (24):2735-2739, 2007.
129. ZHANG, C.; HUGHES, J.B.; NISHINO, S.F.; SPAIN, J.C. Slurry-phase biological treatment of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene: role of bioaugmentation and effects of high

- dinitrotoluene concentrations. *Environmental Science and Technology*, v.34, n. 13, p.2810-2816, 2000.
130. ZAGATO, P. A; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações*. São Carlos, SP. RIMA, pp 96, 2006.
131. ZHU, L.; LU, L.;ZHANG, D. Mitigation and remediation technologies for organic contaminated soils. *Frontiers of Environmental Science e Engineering in China*, v. 4, p. 373-386, 2010.

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Potencial de fungos isolados da caatinga em degradar óleo diesel, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Jaciana dos Santos Aguiar, com endereço Departamento de Antibióticos, Avenida Prof. Artur de Sá, Cidade Universitária, s/n e CEP: 50740-520 – Telefone: 8401-1192/2126-8866 e-mail para contato jacianaaguiar@gmail.com. Também participam desta pesquisa: Teresinha Gonçalves da Silva, Telefone: 8847-0065; Norma Buarque de Gusmão, Telefone: 8848-5127; Geórgia Gomes da Cruz, Telefone: 8524-7497; Cácio Magno Barbosa Gonçalves, Telefone: 8807-7310.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Descrição da pesquisa: Objetivo - Investigar a citotoxicidade das amostras sobre células mononucleares de sangue periférico através do teste de MTT; A coleta do sangue periférico será realizada por profissionais capacitados, utilizando-se seringas esterilizadas e descartáveis de 10 mL. Após a coleta serão isoladas as células mononucleadas do sangue para serem cultivadas *in vitro* e submetidas a testes de citotoxicidade com várias amostras, com o objetivo de selecionar produtos não tóxicos
- Esclarecimento do período de participação do sujeito na pesquisa: A coleta será feita em 10 minutos.
- Especificação dos riscos diretos para o participante: poderá sentir um leve desconforto no local da punção (ponto de retirada do sangue) e existe risco ser gerado uma vermelhidão local que será tratada com compressas de gelo.

(prejuízo, desconforto, constrangimento, lesões que podem ser provocados pela pesquisa) informar as formas de amenizar os riscos bem como indenização, ressarcimento de despesas em caso de dano.

➤ Não estão previstos benefícios diretos, entretanto o benefício indireto será de contribuir para a comunidade científica através da avaliação da citotoxicidade em células mononucleadas do sangue do material residual, proveniente da biodegradação do óleo diesel pelo consórcio microbiano misto.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade de Jaciana dos Santos Aguiar, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, Anderson de Azeite, CPF 05591206884 abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Potencial de fungos isolados da caatinga em degradar óleo diesel, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do/a participante: Anderson

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: CRISTIANE RAMOS

Assinatura: Cristiane Ramos

Nome: PATRICIA AREIAS FEITOSA NEVES

Assinatura: Patricia Areias

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Potencial de fungos isolados da caatinga em degradar óleo diesel, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Jaciana dos Santos Aguiar, com endereço Departamento de Antibióticos, Avenida Prof. Artur de Sá, Cidade Universitária, s/n e CEP: 50740-520 – Telefone: 8401-1192/2126-8866 e-mail para contato jacianaaguiar@gmail.com. Também participam desta pesquisa: Teresinha Gonçalves da Silva, Telefone: 8847-0065; Norma Buarque de Gusmão, Telefone: 8848-5127; Geórgia Gomes da Cruz, Telefone: 8524-7497; Cácio Magno Barbosa Gonçalves, Telefone: 8807-7310.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Descrição da pesquisa: Objetivo - Investigar a citotoxicidade das amostras sobre células mononucleares de sangue periférico através do teste de MTT; A coleta do sangue periférico será realizada por profissionais capacitados, utilizando-se seringas esterilizadas e descartáveis de 10 mL. Após a coleta serão isoladas as células mononucleadas do sangue para serem cultivadas *in vitro* e submetidas a testes de citotoxicidade com várias amostras, com o objetivo de selecionar produtos não tóxicos
- Esclarecimento do período de participação do sujeito na pesquisa: A coleta será feita em 10 minutos.
- Especificação dos riscos diretos para o participante: poderá sentir um leve desconforto no local da punção (ponto de retirada do sangue) e existe risco ser gerado uma vermelhidão local que será tratada com compressas de gelo.

(prejuízo, desconforto, constrangimento, lesões que podem ser provocados pela pesquisa) informar as formas de amenizar os riscos bem como indenização, ressarcimento de despesas em caso de dano.

➤ Não estão previstos benefícios diretos, entretanto o benefício indireto será de contribuir para a comunidade científica através da avaliação da citotoxicidade em células mononucleadas do sangue do material residual, proveniente da biodegradação do óleo diesel pelo consórcio microbiano misto.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade de Jaciana dos Santos Aguiar, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, Patrícia Aneia Furtosa Neves, CPF 08827450424, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Potencial de fungos isolados da caatinga em degradar óleo diesel, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do/a participante: Patrícia Aneia

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: CRISTIANE RAMOS

Assinatura: Cristiane Ramos

Nome: Regina Ribeiro Santos

Assinatura: Regina

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Título da Pesquisa: POTENCIAL DE FUNGOS ISOLADOS DA CAATINGA EM DEGRADAR ÓLEO

Pesquisador: Jaciana dos Santos Aguiar

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30731814.8.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

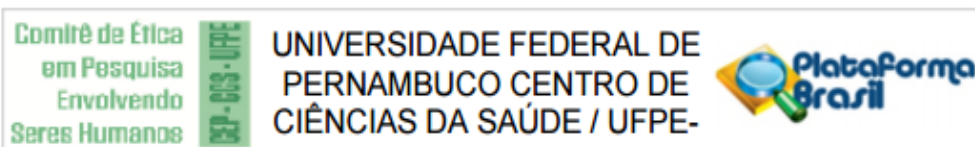
Número do Parecer: 741.131

Data da Relatoria: 06/08/2014

Apresentação do Projeto:

O óleo Diesel é um petroderivado constituído por uma mistura complexa de alcanos normais, ramificados e cíclicos e compostos aromáticos, embora muito utilizado como combustível é considerado tóxico e recalcitrante. Enquanto isso, o biodiesel é uma mistura de mono-álquil ésteres de cadeia longa de ácidos graxos, derivado de gordura animais e óleos vegetais, apresentando características que permitem que seja adicionado ao Diesel. No Brasil, o biodiesel é usado como combustível alternativo a uma concentração de 5% e sua utilização tornou-se obrigatória a partir de janeiro de 2008, sendo adicionado um percentual ao diesel de acordo com os regulamentos da Agência Nacional do Petróleo. Isso torna maiores as possibilidades de degradação, pois, autores afirmam que o óleo Diesel/biodiesel apresenta uma maior biodegradabilidade. As atividades que envolvem a utilização do petróleo ou de seus derivados, em processos que vão desde a extração até a distribuição dos mesmos, as ocorrências de derrames acidentais caracterizam um fator de relevante preocupação no que se refere ao ambiente. Embora, seja de fundamental importância para a economia mundial, as atividades petrolíferas têm ocasionado sérios danos ambientais que são irreparáveis, em sua grande maioria, atingindo diversos segmentos como: estética, economia, saúde e principalmente os ecossistemas. Mas, tecnologias restauradoras de ecossistemas têm sido pesquisadas, pois, a aplicação de métodos biológicos no tratamento de locais contaminados com compostos orgânicos tóxicos e voláteis,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 741.131

particularmente hidrocarbonetos do petróleo, tem se mostrado promissores, economicamente e politicamente atraentes, destacando-se a biorremediação que utiliza micro-organismos para degradar poluentes ambientais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Selecionar fungos isolados da Caatinga com potencial em degradar óleo diesel com baixos teores de toxicidade para utilização em processo de biorremediação ex situ ou in situ.

Objetivo Secundário:

Selecionar fungos com potencial para degradar óleo Diesel; Estabelecer os limites de tolerância do fungo selecionado à fonte oleosa mediante o aumento das concentrações do poluente; Determinar a eficiência do fungos através de avaliação química do material biodegradado; Investigar a citotoxicidade das amostras sobre células mononucleares de sangue periférico através do teste de MTT.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O doador poderá sentir um leve desconforto no local da punção (ponto de retirada do sangue) e ainda causar vermelhidão no local que será tratada com compressas de gelo. Esses riscos serão minimizados, pois a coleta será feita por profissionais especializados usando o equipamento de proteção individual. O descarte será feito em embalagem para perfurocortantes e sacos brancos.

Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos, entretanto o benefício indireto será de contribuir para a comunidade científica através da avaliação da citotoxicidade em células mononucleadas do sangue do material residual, proveniente da biodegradação do óleo diesel pelo consórcio microbiano misto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores buscam encontrar fungos que possibilitem uma melhor degradação do óleo diesel utilizado como combustível. Os resultados deveram colaborar para a manutenção do ecossistema.

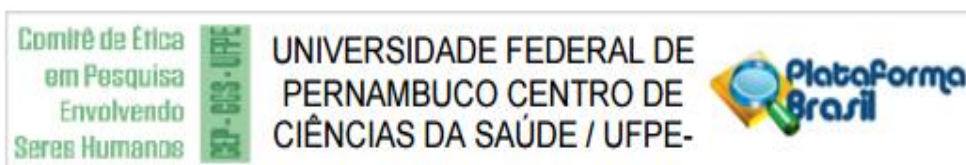
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta toda a documentação necessária.

Recomendações:

Nenhuma.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 741.131

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 06 de Agosto de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
 (Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br