GEÓRGIA GOMES DA CRUZ

DEGRADAÇÃO DE QUEROSENE POR CONSÓRCIO MICROBIANO MISTO

RECIFE

FEVEREIRO/2012

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

DEGRADAÇÃO DE QUEROSENE POR CONSÓRCIO MICROBIANO MISTO

GEÓRGIA GOMES DA CRUZ

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

Área de Concentração: Micologia Industrial

Orientador: Profª Drª Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Profª Drª Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa

RECIFE

FEVEREIRO/2012

Cruz, Geórgia Gomes da
Degradação de querosene por consórcio microbiano misto/ Geórgia Gomes da Cruz. – Recife: O Autor, 2011.

76 folhas : il., fig., tab.
Orientadora: Norma Buarque de Gusmão
Coorientadora: Maria de Fátima Vieira Queiroz de Sousa
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2012.
Inclui bibliografia

1. Biodegradação 2. Petróleo- derivados 3. Toxicidade I. Gusmão, Norma Buarque de II. Sousa, Maria de Fátima Vieira Queiroz de III.Título.

620.11223 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2012-127

DEGRADAÇÃO DE QUEROSENE POR CONSÓRCIO MICROBIANO MISTO

GEÓRGIA GOMES DA CRUZ

Data da defesa:15/02/2012

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

_____

Profª Drª Norma Buarque de Gusmão

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª Drª Cristina Maria de Souza Motta

Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profª Drª Carla do Couto Soares Maciel

Faculdade de Tecnologia Intensiva de Fortaleza

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 e Maria de Fátima pela oportunidade que me foi concedida, pela orientação e paciência dedicada, as quais somente Deus pode compensá-las.

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

RESUMO

As atividades que envolvem a utilização do petróleo ou de seus derivados têm sido motivo constante de preocupação pelos danos causados ao ecossistema. No entanto, com avanço de tecnologias restauradoras de ecossistemas, técnicas corretivas e de controle, que sejam atraentes economicamente e ecologicamente viáveis, têm sido pesquisadas, destacando-se a biorremediação. Esta técnica tem como base, a degradação dos hidrocarbonetos pelos micro-organismos, que os utilizam como fonte de carbono. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar um consórcio misto de fungos e bactérias que apresente potencialidade para degradar querosene, estabelecendo as condições adequadas em processo de biorremediação *ex situ*. As linhagens, previamente selecionadas, foram aclimatadas isoladamente e em consórcio à concentrações crescentes de querosene (1% a 10%). Um ensaio em pararelo foi realizado adicionando-se glicerol para avaliar sua influência no processo de degradação por meio de análises cromatográficas e teste de fitotoxicidade. Em seguida foi aplicado um planejamento experimental, variando o inóculo, concentração de glicerol e fonte de nitrogênio, a fim de obter as condições ideais para o ensaio em biorreator. Nesse ensaio as condições foram controladas para otimização do processo de biodegradação, que ao final para avaliar sua eficiência foi realizado testes de toxicidade. Os resultados obtidos nos ensaios indicaram que o glicerol proporcionou o aumento da degradação e menor produção de metabólitos tóxicos. E as melhores condições encontradas no planejamento fatorial para a degradação, foram: menor inóculo, menor concentração de nitrogênio e uma maior concentração de glicerol. O ensaio em biorreator revelou que houve um aumento na degradação do querosene, já que o ensaio foi realizado em condições otimizadas e controladas, no entanto, a toxicidade dos subprodutos formados foi aumentando afetando a germinação e crescimento da raiz do vegetal testado.

Palavras-chave: Biodegradação, Querosene, Consórcio, Toxicidade.

ABSTRACT

Activities involving the use of oil or its derivatives have been constant cause of concern for damage to the ecosystem. However, with advancement of technologies for restoring ecosystems, control and corrective techniques that are economically attractive and environmentally viable, have been investigated, emphasizing the bioremediation. This technique is based on the degradation of hydrocarbons by microorganisms, which use them as carbon source. Thus, this study aimed to determine a mixed consortium of fungi and bacteria that have the potential to degrade kerosene, establishing the right conditions in the process of ex situ bioremediation. The strains, previously selected, were acclimated individually and in consortium with increasing concentrations of kerosene (1% to 10%). A test was conducted were parallel by adding glycerol to evaluate its influence on the degradation process by means of chromatographic analysis and testing of phytotoxicity. Then an experimental design was applied by varying the inoculum concentration of glycerol and nitrogen sources, in order to obtain the ideal conditions for the test in a bioreactor. In this assay conditions were controlled to optimize the biodegradation process, which at the end to evaluate its toxicity testing was conducted. The test results obtained indicated that glycerol provided the increased degradation and reduced production of toxic metabolites. And the best conditions found in the factorial design for degradation were lower inoculum, the lower concentration of nitrogen and a higher concentration of glycerol. The bioreactor test revealed that there was an increase in the degradation of kerosene, as the experiment was performed under optimized conditions and controlled, however, the toxicity of products formed was affecting increasing germination and root growth of the plant tested.

Key-words: Biodegradation, Kerosene, Consortium, toxicity

Lista de figuras

Figura 1 – Biorreator de bancada 39
Figura 2- Cromatográfo Gasoso acoplado ao Espectrofotômetro de Massa utilizado no ensaio em biorreator 40
Figura 3- Teste de descoloração do DCPIP em frascos utilizando querosene como fonte de carbono. A) Controle Abiótico, B) *Aspergillus tamarii* UFPEDA 870; C) *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845; d) *Bacillus cereus* UFPEDA 838 42
Figura 4-Placas de Petri contendo os micro-organismos do teste de antagonismo:(a) Placa da bactéria *Bacillus cereus versus Aspergillus tamarii* e *Rhodotorula aurantiaca* (b)Placa do fungo filamentoso *Aspergillus tamarii versus Bacillus cereus* e *Rhodotorula aurantiaca* e (c) Placa da levedura *Rhodotorula aurantiaca versus Aspergillus tamarii* e *Bacillus cereus* 43
Figura 5- Valores de pH e biomassa da *Rhodotorula aurantiaca* crescida em meio contendo querosene e outro com querosene mais glicerol 43
Figura 6- Valores de pH e biomassa do *Aspergillus tamarii* crescido em meio contendo querosene e outro com querosene mais glicerol 44
Figura 7- Valores de pH e biomassa da bactéria *Bacillus cereus* crescido em meio contendo querosene e outro com querosene mais glicerol 44
Figura 8- Valores de pH e biomassa do consórcio *R. aurantiaca, A. tamarii* e *B. cereus* em meio contendo querosene e outro com querosene mais glicerol 44
Figura 9. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos do querosene na concentração de 4% 47
Figura 10. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos do querosene na concentração de 10% 48
Figura 11. Placas do teste de fitotoxicidade com material biodegradado e placas controles 50
Figura 12. Percentuais de degradação dos ensaios do planejamento experimental 51
Figura 13. Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial 2^3, cuja variável resposta é a degradação dos hidrocarbonetos do querosene 52
Figura 14. Gráficos de superfície de resposta(a)Interação entre glicerol e inóculo; (b) Interação entre glicerol e NH_4NO_3 ; (c) Interação entre inóculo e NH_4NO_3 53
Figura 15. Perfil de crescimento da massa seca obtida pelo consórcio 55

Figura 16. Teste de emulsificação utilizando: (a) óleo automotivo queimado, (b) óleo lubrificante automotivo, (c) querosene, (d) óleo de soja e (e) óleo Diesel 55
Figura 17. a)Índices de emulsificação obtidos com a suspensão microbiana do consórcio e os diversos óleos testados. b)Percentual de óleo emulsificado e c) Percentual de óleo não emulsificado 56
Figura 18. Perfil de degradação dos hidrocarbonetos saturados do querosene nos 5º e 9º dias de ensaios 57
Figura 19. Placas do teste de fitotoxicidade do experimento em biorreator: (a) Placa controle com água destilada esterilizada; (b) Placa teste com 1 dia de ensaio ; (c) Placa teste com 5 dias de ensaio; (d) Placa teste com 9 dias de ensaio 58

Lista de tabelas

Tabela 1 – Efeitos do derrame de petróleo em comunidade biológicas 16
Tabela 2 – Composição química do óleo cru 17
Tabela 3 - Principais frações de petróleo 18
Tabela 4. Características do querosene 19
Tabela 5. Acidentes ambientais ocorridos no Brasil ocasionados por atividades petrolíferas 21
Tabela 6. Tecnologias de biorremediação 25
Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial 37
Tabela 8. Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 38
Tabela 9. Valores dos parâmetros de fitotoxicidade 47
Tabela 10. Teste de fitotoxicidade aclimatação dos micro-organismos na concentração de 10% do querosene 51
Tabela 11. Resultado do teste de fitotoxicidade do planejamento fatorial 54
Tabela 12. Parâmetros de fitotoxicidade avaliado ao longo do ensaio em biorreator 58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....12
2. OBJETIVOS.....15
2.1. Objetivo geral.....15
2.2. Objetivos específicos.....15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....16
3.1. Petróleo.....16
3.2. Querosene.....18
3.3. Degradação ambiental causada por derrame de petróleo e derivados.....20
3.4. Biorremediação.....24
3.5. Biodegradação de hidrocarbonetos.....26
3.6. Biosurfactantes.....28
3.7. Micro-organismos degradadores.....29
3.8. Consórcios microbianos.....31
3.9. Toxicidade e mutagênicidade do petróleo e derivados.....32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....34
4.1. Fonte de Carbono.....34
4.2. Micro-organismos Utilizados.....34
4.3. Manutenção dos micro-organismos.....34
4.4. Seleção das linhagens isoladas.....34
4.5. Teste de antagonismo.....35
4.6. Ensaios de aclimatação.....35
4.7. Planejamento fatorial.....36
4.8. Ensaio de degradação em biorreator.....38
4.9. Parâmetros avaliados durante o experimento.....39
4.9.1. Avaliação do pH.....39
4.9.2. Biomassa.....39
4.9.3. Extração e análise de degradação dos constituintes do querosene.....39
4.9.4. Produção de emulsificantes.....40
4.9.5. Testes de Fitotoxicidade.....41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....42
5.1. Seleção dos micro-organismos.....42
5.2. Testes de antagonismo.....43

5.3. Condições de crescimento dos micro-organismos-teste.....43
5.4. Degradação do querosene nos ensaios de aclimatação.....47
5.4.1. Degradação do querosene na concentração de 4%.....47
5.4.2.Degradação do querosene na concentração de 10%.....48
5.5.Fitotoxicidade dos ensaios de aclimatação.....49
5.6. Cromatografia do Planejamento fatorial.....51
5.7. Teste de fitotoxicidade dos subprodutos do planejamento fatorial.....54
5.8. Biorreator.....55
5.8.1. Biomassa.....55
5.8.2. Teste de emulsificação.....57
5.8.3. Degradação de querosene por consórcio microbiano em biorreator do ensaio em biorreator.....55
5.8.4. Fitotoxicidade do ensaio em biorreator.....58
6. CONCLUSÕES.....60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....61

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma fonte de energia de origem fóssil, constituída quimicamente por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Sua destilação resulta em alguns combustíveis mais utilizados, como: a gasolina, o óleo diesel e o querosene. Este último é composto por parafinas, cicloparafinas, aromáticos e oleofinas, com cadeias de carbono que variam de C_9 a C_{20}, sendo considerado um poluente tóxico para a saúde humana e ao meio ambiente (KANIKKANNAN et al., 2000; SOUZA, 2009).

Nas atividades que envolvem a utilização do petróleo ou de seus derivados, em processos que vão desde a extração e refino até a distribuição dos mesmos, as ocorrências de derrames acidentais caracterizam fatores de relevante preocupação no que se refere ao ambiente. Com o avanço das tecnologias restauradoras de ecossistemas, técnicas corretivas e de controle de poluição têm sido aplicadas em ambientes contaminados, sendo a químicas e a físicas as mais frequentes. Entretanto, a aplicação de métodos biológicos no tratamento de locais contaminados com compostos orgânicos tóxicos e voláteis, particularmente hidrocarbonetos do petróleo, tem se mostrado economicamente e politicamente promissoras (RENE et al., 2005; GARCIA-BLANCO et al., 2007; RAGHUVANSHI;BABU, 2009).

A biorremediação é um dos métodos que vem sendo utilizados há vários anos, demonstrando uma maior eficiência na remoção dos contaminantes quando comparada às técnicas físicas e químicas, que são utilizadas no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas impactadas (BANFORTH; SINGLETON, 2005). 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 e tratamento deste em local externo ao de sua origem (MAIER, 2000).

Com a finalidade de recuperar áreas impactadas por substâncias químicas, sejam elas tóxicas ou recalcitrantes, a biorremediação baseia-se no processo de degradação do poluente pela ação de organismos, como bactérias e fungos, porque uma parte desses micro-organismos utiliza os hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono em seus processos vitais, promovendo a

degradação desses compostos recalcitrantes (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; SANTOS; LINARDI, 2004; OLIVEIRA et al, 2006).

Os micro-organismos responsáveis por essa degradação são os fungos filamentosos, leveduras e bactérias, os quais são eficientes e hábeis em degradar substâncias orgânicas tóxicas, que são normalmente encontradas em efluentes de refinarias de petróleo.

Desde a década de 50, vêm sendo isoladas bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, dentre elas: *Pseudomonas, Aeromonas, Nocardia, Paracoccus, Gordonia*, entre outras (MUTNURI et al.,2005; JACQUES et al, 2007) e vários fungos, destacando-se os gêneros *Cunnighamella, Phanerochaete, Fusarium, Candida, Penicillium, Pleorotus, Trametes, Aspergillus, Bjerkandera, Chrysosporium* (CERNIGLIA,1997; JACQUES et al., 2005).

Cada micro-organismo apresenta especificidade e susceptibilidade, que direciona para a necessidade da formação de consórcios microbianos. Para degradar fontes de carbono complexas, essas associações têm mostrado eficiência em processos de degradação quando comparada às culturas puras. Esse fato, possivelmente, ocorre devido à co-metabolização que alguns micro-organismos se encarregam de a transformar os constituintes do poluente, produzindo compostos intermediários que, posteriormente, servem de substratos para 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. Em 2005, Radwan et al. 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.

A hipótese deste estudo prende-se ao fato de que um consórcio microbiano, formado por linhagens isoladas de solo contaminado por derivados do petróleo, pode ser eficiente para a biodegradação de querosene. Caso se obtenha resultados promissores, a utilização dos micro-organismos em locais

impactados por hidrocarbonetos contribuirá para uma maior eficácia no processo de biorremediação de áreas contaminadas por querosene.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Através de um consórcio misto constituído por fungos e bactérias, determinar a potencialidade destes para degradar querosene, estabelecendo as condições adequadas em processo de biorremediação *ex situ*.

2.2. Específicos

- Selecionar fungos e bactérias que exibem potencial para degradar o querosene;
- Verificar a influência do glicerol no processo de degradação do querosene;
- Estimular a formação de um consórcio misto, a partir de micro-organismos selecionados que apresentaram maior potencial de degradação do querosene;
- Estabelecer condições para otimizar o processo de biodegradação;
- Avaliar a degradação do querosene pelo consórcio misto com o aumento de escala em biorreator, empregando as condições otimizadas.
- Determinar a eficiência do consórcio misto através de avaliação química e toxicológica do material biodegradado.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Petróleo

O petróleo é uma fonte energética de origem fóssil, que ao longo dos séculos, o petróleo passou por processos geológicos que proporcionaram alterações em suas características. Isso tem contribuído também para a evolução e adaptação de micro-organismos, fazendo com que estes se tornem hábeis na degradação de hidratos de carbono. O petróleo é conhecido desde as primeiras civilizações, mas somente a partir do século XVIII, ganhou importância comercial, sendo empregado na indústria farmacêutica e de iluminação. Com o surgimento da indústria petroquímica, os derivados do petróleo e outros produtos entraram no mercado, impulsionando a economia mundial, sendo também responsável pela ocorrência de acidentes ambientais, devido, contaminações pelo petróleo e seus derivados decorrentes do processo de carga, descarga, transporte, produção de subprodutos e combustão. Além disso, a 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; PEDROZO et al., 2002), provocando efeitos catastróficos em comunidades biológicas, como pode ser visto na tabela 1. (CRAPEZ, 2001; SOUZA, 2009)

Tabela 1. Efeitos do derrame de petróleo em comunidades biológicas (fonte: Crapez, 2001)

Comunidade		**Efeito**
Bactérias		Positivos para os grupos que degradam o óleo, com expressivo aumento das populações, e negativos para os grupos que não tem afinidade com o mesmo
Plâncton	Biomassa e produtividade do fitoplâncton	Aumento devido à diminuição da pastagem; depressão da clorofila A.
	Zooplâncton	Redução da população; contaminação
Bentos	Anfípoda, isópodas e ostracodas	Mortalidade inicial; população decresce
	Moluscos	Mortalidade inicial; contaminação; modificações histopatológicas
	Comunidades dos macrobentos	Decréscimo de diversidade
Entre marés e litoral	Crustáceos e caranguejos	Mortalidade inicial; população decresce
	Moluscos	Mortalidade inicial; contaminação, modificações histopatológicas
	Poliquetas oportunistas	População aumenta
	Maioria das comunidades	Decréscimo de diversidade
Algas		Decréscimo de biomassa; espécies são substituídas
Peixes	Ovos e larvas	Diminuição de eclosão e sobrevivência
	Adultos	Mortalidade inicial; contaminação, modificações histopatológicas
Aves		Mortalidade por esgotamento físico; intoxicação; decréscimo populacional
Mamíferos		Recobrimento e intoxicação.

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, constituído 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 metais pesados (HYNE, 1995).

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 (SOUZA, 2009). Na tabela 2 está apresentada a composição química do óleo cru, que é a fração líquida do petróleo. A tabela 3 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 (IRWIN et al., 1997; SHREVE; BRINK, 1997).

Tabela 2 - Composição química do óleo cru (Adaptado de HYNE, 1995).

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

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. E, através da destilação do petróleo podem ser obtidos vários combustíveis, como os apresentando na tabela 3.

Tabela 3- Principais frações de petróleo (BAKER;HERSON,1994)

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.

3.2 Querosene

O querosene comercial também chamado de *jet fuel* ou QAV (ANP, 2000) é o combustível de aviação mais utilizado no mundo, sendo considerado um médio destilado e constituído quimicamente por: parafinas, cicloparafinas, aromáticos e oleofinas de C_9 a C_{20}, sendo um poluente tóxico para os seres vivos (KANIKKANNAN et al., 2001; VOGEL, 1982; TAVARES, 1991). Possui diversas características específicas que conferem um excelente poder de solvência e uma taxa de evaporação lenta além de ponto de inflamação que oferece uma relativa segurança no manuseio (RAVATO, 2008). A tabela 4 contém as características físicas e químicas do querosene.

Tabela 4- Características do querosene. (Fonte: Petrobras Distribuidora, www.br.com.br)

Características do querosene	
Aspecto	Líquido, claro e puro
Odor	Característico
Ponto de ebulição inicial	>35° C
Ponto de fulgor	40°C
Inflamabilidade	Altamente inflamável
Limite inferior/superior de inflamabilidade	(HEL): 5,0% Inferior (LEL): 0,7%
Densidade de vapor	4,5
Densidade	0,804

Segundo Gomes (2004) os efeitos toxicológicos e contaminantes do querosene podem estar associados aos HPA, alquil-HPA e alquilbenzenos, seus constituintes. Embora os HPA não sejam encontrados em grandes quantidades no querosene, sua presença é causadora de grande risco potencial para o meio ambiente, contaminando lençóis freáticos, solos e sedimentos. Os HPA estão, normalmente, associados ao risco de toxicidade crônica, incluindo o acometimento de câncer. Os efeitos crônicos da exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPA nos seres humanos, incluem:

- Modificações no fígado;
- Efeitos danosos nos rins, coração, pulmões e sistema nervoso;
- Aumento no desenvolvimento de células cancerosas;
- Efeitos genotóxicos e fetotóxicos;
- Irritação nos olhos, na pele e no sistema respiratório.

A inalação por tempo prolongado provoca sintomas neurocomportamentais como: náusea, enxaqueca, fadiga e vertigem (KABBUR et al., 2001; KANIKKANNAN et al., 2001; KANIKKANNAN et al. 2002). Além disso, quando ingerido, o querosene causa diarréias, distúrbios gastro-intestinais, afeta o sistema nervoso, podendo causar dores de cabeça, perda de

reflexos, convulsões, inclusive a morte (RITCHIE et al., 2003; YANG et al., 2006).

3.3. Degradação Ambiental Causada por Derrame de Petróleo e Derivados

Segundo Lloyd (1992), as fontes de poluição que podem impactar o ambiente podem ser classificadas como: pontuais e difusas. As pontuais são aquelas onde os poluentes são introduzidos diretamente no meio ambiente, podendo ser facilmente vistos e quantificados. Ao contrário das fontes poluidoras difusas, que são provenientes da terra ou ar, e não são tão visíveis. Esses poluentes podem acarretar danos ambientais irreparáveis, em sua grande maioria, atingindo vários segmentos como: estética, economia, saúde e principalmente os ecossistemas.

Tiburtius et al., (2004) confirmam esse fato, quando afirmam que a presença dos hidrocarbonetos aromáticos, em geral, no ambiente representa um perigo para a saúde e para os ecossistemas, devido a sua toxicidade e habilidade de bioacumular ao longo da cadeia alimentar.

Biazati (2009) relata que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), presentes em derivados de petróleo, constituem uma classe de poluentes orgânicos de importância ambiental e de interesse toxicológico por apresentarem propriedades mutagênicas e carcinogênicas. A maior fonte de contaminação de HPAs (naftaleno, antraceno, fenantreno, etc.) no ambiente é devido aos afloramentos de petróleo, à combustão de automóveis e aos acidentes ambientais envolvendo petróleo e derivados.

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 significante. 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, como se pode observar na tabela 5.

Tabela 5- Acidentes ambientais ocorridos no Brasil ocasionados por atividades petrolíferas (Adaptado de ZAGATO; BERTOLETTI, 2006).

Fonte (causa)	**Data**	**Local (áreas atingidas)**	**Volume vazado**
N/T Takamyia Maru (acidente de navegação)	Ago/1974	São Sebastião/SP (praias e costões)	6.000m^3
N/T Tarik Ibn Zyiad (acidente de navegação)	Mar/1975	Baía de Guanabara/RJ (praias e costões)	6.000m^3
N/T Brazilian Marina (acidente de navegação)	Jan/1978	São Sebastião/SP (praias e costões)	6.000m3
Oleoduto S.Sebastião-Cubatão (Rompimento)	Out/1983	Bertioga/SP (mangue, praias e costões)	2.500m^3
N/T Marina (acidente de navegação)	Mar/1985	São Sebastião/SP (praias e costões)	2.000m^3
N/T Theomana (não apurada)	Set/1991	Bacia de Campos/RJ (mar aberto)	2.150m^3
Oleoduto S.Sebastião-Cubatão(rompimento)	Mai/1994	São Sebastião/SP (praias e costões)	2.700m^3
Oleodulto REDUC/Ilha d´água (rompimento)	Mar/1997	Baía de Guanabara/RJ (mangue)	2.700m^3
Oleodulto REDUC/Ilha d´água (rompimento)	Jan/2000	Baía de Guanabara/RJ (praias e costões)	2.300m^3
Navio Norma – nafta (acidente de navegação)	Out/2001	Baía de Paranaguá/PR (águas da baía)	5 milhões L
Rebocador (acidente de navegação)	Fev/2002	Baía de Guanabara/RJ (águas da baía)	Cerca de 35 mil L
Oleoduto S.Sebastião-Cubatão (rompimento)	Fev/2004	São Sebastião/SP (encosta da serra, rio, praia)	Não estimada
Oleoduto S.Sebastião-Cubatão (rompimento)	Fev/2004	São Sebastião/SP (encosta da serra, rio, praia)	Não estimada
Plataforma no Campo de Frade (Vazamento na Plataforma - Chevron)	Nov/2011	Rio de Janeiro/RJ (Bacia de Campos)	Cerca de 2,4 milhões de barris

Ao longo da costa do estado do Espírito Santo e do sul da Bahia destacam-se indústrias de exploração do petróleo. Na região de Vitória, a produção de petróleo e o transporte pelo Porto de Tubarão e outros, representam riscos para as regiões próximas, como os estuários de Santa Maria, Baía de Vitória e Reserva de Comboio (MMA, 1996). Na Bahia, em Salvador, destaca-se o Pólo Petroquímico de Camaçari, mas, além disso, o estado tem consolidado o segmento de empresas que atuam na cadeia de petróleo, gás e energia. A Bahia possui, em terra e sob a concessão de produtoras independentes brasileiras, na Bacia do Recôncavo, 15 campos produtores. O estado possui 1.695 poços produtores de petróleo, onde deste total, 98,6% estão sendo explorados pela Petrobras e 1,4% por produtoras independentes (SEBRAE, 2011).

Na região metropolitana do Rio de Janeiro existem indústrias de petróleo com atividades de perfuração de poços petrolíferos iniciadas desde 1973 (DIEGUES, 1999). Nas baías de Sepetiba e Ilha Grande, estão localizados o estaleiro Velrome, a usina nuclear de Angra dos Reis e o terminal marítimo da baía de Ilha Grande, que têm ameaçado os ecossistemas (GEBIG-PETROBRÁS; MELGES-FIGUEREDO, 1999).

Em São Paulo, no estuário de Santos, localiza-se o maior porto do Brasil em termos de movimentação de cargas, onde se encontram associadas às atividades petroquímicas. Em São Sebastião - SP, no litoral norte do estado, as atividade do Porto de São Sebastião e do terminal petrolífero Duto e Terminais Centro Sul (DTCS-PETROBRAS), que movimentam 55% da carga total do país, têm sido alvo de vários acidentes que promoveram alterações ambientais e econômicas nas atividades de pesca e de turismo da região (ZANARDI-LAMARDO et al., 2000).

Na Lagoa dos Patos, no Estado do Rio Grande do Sul, localizam-se indústrias de petróleo e atividades portuárias, como o Porto do Rio Grande que abrange o terminal de petróleo, de grãos e de óleo vegetal (MMA, 1996). Em Pernambuco, também, tem atividades portuárias em sua região costeira, e destacam-se o Porto de Suape - PE e o Porto do Recife, que são vulneráveis aos riscos relacionados às atividades petrolíferas. Em ambas as localidades o transporte de petroderivados tem ocasionado contaminação de pequenas proporções.

De acordo com o CETESB (2011), ocorreram acidentes envolvendo vazamento de querosene que, em alguns casos atingiu solo, água e ar. Estes estão citados abaixo com respectivas quantidades vazadas do combustível:

- Região metropolitana de São Paulo (2005) - 400 litros;
- Interior de Taiúva (2003) - 10 metros cúbicos;
- Região metropolitana de São Paulo (1999) - 30000 litros;
- Região metropolitana de São Paulo (1991) - 2000 litros;
- Interior de Campinas (1998) -32000 litros;
- Interior de Jundiaí (1999) -27000 litros;
- Litoral de Santos (1987) - 200 litros.

Todas as atividades, seja de exploração, transporte, produção, armazenamento, ou até mesmo, derrames de petróleo e seus derivados, tornam um risco iminente ao meio ambiente. 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 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. Essa 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 (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2009). No entanto, as tecnologias de limpeza têm contribuído para essa conservação e

remediação do meio ambiente, dentre elas, tem grande destaque a biorremediação que não traz prejuízos ao meio ambiente.

3.4. Biorremediação

A biorremediação é um conjunto de tecnologias que visa à recuperação de áreas contaminadas por substâncias químicas, sejam elas tóxicas ou recalcitrantes. 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 (IJAH; ANTAI, 2003). Confirmando isso, Azambuja et al. (2000) afirmam que o problema ambiental, tratado na sua devida escala, é tipicamente multidisciplinar e exige o domínio dos processos químicos e biológicos que estão inerentemente associados.

A biorremediação baseia–se no processo de degradação do poluente por ação microbiana, sendo considerada uma estratégia ecologicamente viável, de alta eficiência e de baixo custo. Vários autores indicam como principal mecanismo para a eliminação das características tóxicas de poluentes a degradação biológica (BORÉM; SANTOS, 2004; BENTO et al., 2005).

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).

As medidas biocorretivas são aplicáveis em condições aeróbicas, onde os micro-organismos dispõem de O_2, em quantidade suficiente para o seu desenvolvimento, transformando os poluentes em CO_2 e H_2O; ou em condições anaeróbicas, onde há ausência de O_2, de forma que os micro-organismos anaeróbios facultativos e anaeróbios decompõem os compostos orgânicos para liberar a energia que necessitam, sendo um processo mais lento que o aeróbico (MELO, 2005).

As técnicas de biorremediação podem ser realizadas no local do derrame (*in situ*) ou em outro ambiente (*ex situ*), envolvendo inúmeros procedimentos,

tais como: biorremediação passiva; bioventilação; “landfarming”; compostagem; bioestimulação e bioaumentação (MOREIRA, 2002).

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. A biorremediação *ex situ* envolve a remoção do material contaminado para outro local, a fim de tratá-lo ou evitar que contamine o ecossistema (GLAZER; NIKAIDO, 1995; ALEXANDER, 1994). Tanto a biorremediação *in situ* como a *ex situ* podem ser realizadas com a adição de nutrientes para acelerar o processo de degradação, que é a técnica de **bioestímulo**; ou com a adição de micro-organismo exógenos a microbiota nativa, que é o **bioaumento** (WALTER; CRAWFORK, 1997; KOWALICK, 1991). Na tabela 6 podemos observar a descrição de tecnologias de biorremediação.

Tabela 6- Tecnologias de biorremediação (BAKER; HERSON, 1994).

Técnica	**Descrição**
Bioaumento	Adição de micro-organismo ao meio contaminado; usada em biorreatores e em sistemas *ex situ*.
Biofiltros	Uso de colunas de suspensão microbiana para tratar de emissões de gases.
Bioestímulo	Estimulação dos micro-organismos pela adição de nutrientes.
Biorreatores	Biodegradação em um reator para tratar líquidos contaminados.
Bioventilação	Tratamento de solo contaminado através do estímulo do crescimento de micro-organismos por meio de injeção de O_2.

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 hidrocarbonetos presentes no ambiente poluído (WIDDEL; RABUS, 2001).

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. Outros parâmetros, como: pH, nutrientes, O_2, 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 CO_2 e água (FRANKERBERBER JR., 1992). Portanto os fatores determinantes na biodegradação encontram-se ligados ao substrato, aos micro-organismos e ao meio ambiente, os quais contribuem para a eficácia e a velocidade da biodegradação.

O nitrogênio e o fósforo são os nutrientes mais utilizados na biorremediação de locais contaminados por petróleo e seus derivados, uma vez que estes poluentes são pobres na concentração de nitrogênio. A relação C/N e C/P têm o objetivo de estimar a concentração ótima desses nutrientes, de modo a permitir uma máxima degradação. As fontes de nitrogênio mais utilizadas nos protocolos de biorremediação são uréia, cloreto de amônia e nitrato de amônia.

Em geral, a forma preferida do nitrogênio para o crescimento microbiano é a forma reduzida da amônia (NH_4^+), pois quando as outras formas de nitrogênio estão presentes, geralmente, são convertidas em amônia antes de serem assimiladas pelos micro-organismos. (SANTOS, 2002)

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:
   - 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 O_2 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. Biossurfactantes

São compostos formados por moléculas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que através de seu acúmulo nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) reduzem as tensões superficial e interfacial aumentando a área de contato de compostos insolúveis, permitindo o aumento da mobilidade, biodisponibilidade e subsequente biodegradação. Os biossurfactantes apresentam aplicações nas indústrias de cosméticos, farmacêuticas, tintas, alimentícias, produtos de limpeza, na agricultura, e principalmente na indústria petrolífera, na recuperação terciária do petróleo e biorremediação de hidrocarbonetos, além de relatos sobre a solubilização e emulsificação de compostos químicos tóxicos (BANAT et al., 2000).

Os biossurfactantes são produzidos por meio do metabolismo aeróbio de micro-organismos em meios aquosos contendo de hidrocarbonetos, óleos, carboidratos, gordura, etc, auxiliando no transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular, quando são excretados no meio de cultivo durante o crescimento do micro-organismo. Alguns ainda mantêm os biossurfactantes associados à parede celular, facilitando a penetração dos hidrocarbonetos no espaço periplasmático, sendo promissor em processos de biodegradação. (PIRÔLLO, 2006; BOGNOLO, 1999; KOCH et. al,1991).

Os biossurfactantes apresentam muitas vantagens, quando comparado aos de origem sintéticas, tais como: (KOSARIC, 2001)

- Alta biodegradabilidade;
- Baixa toxicidade;
- Biocompatibilidade e biodigestibilidade, que permitem suas aplicações na fabricação de cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos;
- Possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais;
- Especificidade de aplicações, já que são moléculas orgânicas complexas, com grupos funcionais específicos;

- Uso em biorremediação de locais impactados por óleo e biodegradação e detoxificação de efluentes industriais;
- Eficácia em condições extremas de temperatura , pH e salinidade.

3.7. Micro-organismos Degradadores

Os principais micro-organismos responsáveis pela degradação são: os fungos filamentosos, as leveduras e as bactérias, sendo estes eficientes e hábeis em degradar resíduos orgânicos e até mesmo substâncias tóxicas presentes em efluentes contaminados por petróleo ou seus derivados.

Na literatura são encontrados relatos da capacidade de degradação desses micro-organismos, como autores que afirmam que as leveduras, pertencentes aos gêneros *Sporobolomyces* e *Rhodotorula*, são capazes de degradar uma mistura de hidrocarbonetos (DEL'ARCO, 1999).

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

Ahearn et al. (1971) isolaram espécies de *Candida, Rhodosporidium, 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 *Penicillum* e *Aspergillus* são relatados como os fungos filamentosos mais eficientes na degradação de hidrocarbonetos (JUHASZ; NAIDU, 2000).

Algumas características desses micro-organismos contribuem para a eficiência nos processos de degradação. Em geral, as bactérias e leveduras mostram uma menor capacidade de degradar cadeias longas de carbono, enquanto os fungos filamentosos não demonstram preferência quanto ao tamanho das cadeias.

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; têm capacidade de sobreviver em ambientes extremos. Além disso, há um consenso na literatura de que os fungos têm maiores possibilidades de realizarem a oxidação inicial dos HAP's (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos), devido as suas estruturas. As hifas fúngicas podem se alongar na direção destes compostos e produzir exoenzimas que são difundidas no ambiente contaminado, fazendo com que os intermediários oxidados resultantes do metabolismo fúngico dos HAPs fiquem disponíveis para as bactérias (JACQUES, 2005).

As bactérias possuem outras características, que fazem com que se destaquem na 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). Para determinação do potencial do micro-organismos em degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA's), Hanson e colaboradores (1993) descreveram a técnica consiste em verificar a ocorrência da oxidação biológica dos hidrocarbonetos, constituintes do petroderivados, no meio de cultura. O indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol-DCPIP atua como aceptor final de elétrons no processo de oxidação biológica, portanto, quando a linhagem testada é capaz de oxidar o petroderivado se observa a uma mudança de coloração do meio de cultivo de azul para incolor.

Os gêneros mais comuns de bactérias biodegradadoras, 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).

3.8. 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 micro-organismos com diferentes gêneros e espécies conseguem degradar as frações do óleo (TIBURTIUS et al., 2004).

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

Segundo Santos (2002) uma única espécie microbiana, dificilmente, será capaz de realizar a mineralização de uma variedade de compostos presentes no óleo, metabolizando, apenas, frações restritas dos substratos que compõem a mistura. Desta forma, os consórcios microbianos contribuem no sentido de ampliar sistemas enzimáticos distintos, necessários à metabolização completa do poluente.

Confirmando essa teoria, Mariano et al., (2008) afirma 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.

O emprego de consórcios de micro-organismos é viável, podendo promover uma degradação completa dos poluentes. Dessa forma, micro-organismos que não apresentam capacidade para degradar de forma completa de um composto específico, poderão transformá-lo em um composto intermediário degradável por outro microrganismo. Há uma grande diversidade de micro-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.

3.9. Toxicidade e mutagênicidade do petróleo e derivados

Além de causar danos ao meio ambiente, o petróleo e seus derivados são considerados ameaçadores aos seres vivos, pois, são altamente tóxicos e carcinogênicos. Isso ocorre, pelo fato de haver compostos presentes nesses poluentes cuja exposição prolongada aos mesmos, pode afetar órgãos, tais como rins e fígado, e o sistema circulatório (MAZZUCO, 2004), sendo também considerados perigosos pela sua potencialidade de causar leucemia para os seres humanos (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996).

Segundo Chen et al. (2008), também podem ser considerados genotóxicos para linfócitos humanos, porque induz uma variedade de danos no DNA, detectados pelo ensaio do cometa em experimentos realizados.

Segundo Maila e Cloete (2005), é importante uma avaliação da eficiência dos processos tecnológicos aplicados na melhoria das condições ambientais. Pedrozo et al. (2002) afirma que a biotransformacão de alguns compostos podem resultar em produtos menos tóxicos do que o inicial ou em produtos com um efeito tóxico ainda maior. Rosato (1997) afirma que os subprodutos formados durante o processo de degradação podem tornar-se mais tóxicos ou mutagênicos que o produto original, portanto, é necessário o monitoramento e avaliação do processo de biodegradação.

Plaza et al. (2005) concordam com essas afirmativas quando diz 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.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fonte de Carbono

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

4.2. Micro-organismos Utilizados

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de fungos *Aspergillus tamarii* UFPEDA 870 e *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 e uma bactéria, *Bacillus cereus* UFPEDA 838.Os micro-organismos foram isolados da Lagoa da Barra, área impactada por petroderivado, localizada no Complexo Industrial e Portuário de Suape – PE e pertencem à Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3. Manutenção dos micro-organismos

A manutenção das culturas foi realizada por meio de repiques mensais, em placas de Petri, contendo o meio Agar Sabouraud – SAB (10g de peptona, 40g de glicose e 15g de agar para 1L de água) para os fungos e para a bactérias foi utilizado o meio Triptic Soy Agar – TSA (15g de tripticase, 5g de peptona, 5g de cloreto de sódio e 15g de agar para 1L de água). As culturas purificadas foram mantidas no mesmo meio em tubos de ensaios inclinados, sob refrigeração (8º C), para a realização de ensaios posteriores.

4.4. Seleção das linhagens isoladas

O teste qualitativo foi realizado com base na metodologia preconizada por Hanson et al. (1993) e adaptado por Gomes (2004), técnica que investiga a potencialidade de degradação do petróleo ou derivados. Foram empregados frascos de Erlenmeyer, contendo o meio Bushnell-Haas (49,5 ml), a fonte oleosa (0,5 ml) e o inóculo (2 blocos de gelose do micro-organismo testado), totalizando um volume de 50 ml. Decorrido o tempo de 12 horas, foram adicionados 0,02 ml da solução do indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol-DCPIP (0,8 mg/ml) e aguardou-se a descoloração do meio de cultivo. Para cada cultura foram utilizados: o frasco teste, em duplicata, o frasco controle negativo (abiótico) e o

frasco controle positivo (biótico) no qual se utilizou a glicose como única fonte de carbono.

4.5. Teste de antagonismo

O teste de antagonismo foi realizado como o ensaio de atividade antimicrobiana descrita por Bauer et al. (1966). Após o crescimento em forma de tapete, blocos de gelose (Ø8mm) de um microrganismo foi colocado frente a outro. A leitura foi realizada após 24 horas para a bactéria e 72 horas para os fungos. Sendo considerada inibição, halos superiores a 8mm.

4.6. Ensaios de Aclimatação

A aclimatação dos micro-organismos selecionados, foi realizada de forma isolada e em consórcio em frascos de Erlenmeyer (500mL), contendo o meio mineral de Bushnell Haas-BH, 2 blocos de gelose (Ø8mm) de cada micro-organismo e concentrações crescentes (1%, 4%, 7% e 10%) de querosene (fonte de carbono).

Para o aumento das concentrações de querosene foi realizado um pré-inóculo das culturas crescidas em placas de Petri, e, após o período de 48horas, 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 querosene. Os frascos foram incubados a temperatura de 30±1ºC, em condições estáticas por 48 horas. Em seguida, foram repicados para placas de Petri com meios de cultura específicos com concentração de querosene de 4%. Este procedimento foi repetido para todas as concentrações de querosene.

Em paralelo, foram realizados ensaios nas mesmas condições citadas acima com a adição de 1 ml de glicerol, que foi utilizado como fonte adicional de carbono, para verificar se havia a ocorrência do cometabolismo. A influência do glicerol no processo de degradação foi verificada através da taxa de degradação do querosene ao longo do experimento. A cada 48 horas após a transferência para concentrações maiores de querosene foram avaliados parâmetros como: biomassa (g/L) e pH. No final dos ensaios de aclimatação foi analisada a

toxicidade do material residual biodegradado, segundo a metodologia de Tiquia et al. (1996) e a quantificação da degradação por meio da cromatografia gasosa.

4.7. Planejamento Fatorial

O planejamento de experimentos representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, no qual são aplicadas alterações nas variáveis consideradas importantes para o processo, denominadas de variáveis independentes, tendo como objetivo principal identificar o efeito destas alterações por meio das variáveis de resposta ou dependentes (MONTGOMERY, 2000).

Com base nos dados que foram obtidos durante o processo de aclimatação, foi realizado um planejamento fatorial completo, envolvendo 2 níveis e 3 variáveis mais 3 pontos centrais, conforme a tabela 7. As variáveis utilizadas foram: a concentração da fonte de nitrogênio (NH_4NO_3), a concentração de glicerol e a dosagem do inóculo, cujos valores estão apresentados na tabela 8. A variação simultânea desses fatores permitiu verificar o desempenho do consórcio na degradação do querosene, quando submetido a estímulos nutricionais diferentes e a variável resposta considerada foi o resíduo de querosene biodegradado obtido por análise cromatográfica. Os experimentos foram realizados a temperatura de 30 ±1°C, durante 9 dias de forma estática. Ensaios abióticos com o mesmo petroderivado foram realizados a fim de estimar a volatilidade do mesmo durante o experimento.

Após os nove dias de cada experimento foram avaliados os percentuais de degradação dos ensaios do planejamento experimental e analisados pelo programa Statistic 6.0.

Tabela 7- Matriz do Planejamento Fatorial

Ensaios	Inóculo (blocos de gelose)	Glicerol (mL)	Fonte de Nitrogênio (C:N)
1	(-) 1	(-) 0,5	(-) 150:1
2	(+) 3	(-) 0,5	(-) 150:1
3	(-) 1	(+) 1,5	(-)150:1
4	(+) 3	(+) 1,5	(-) 150:1
5	(-) 1	(-) 0,5	(+) 50:1
6	(+) 3	(-) 0,5	(+) 50:1
7	(-) 1	(+) 1,5	(+) 50:1
8	(+) 3	(+) 1,5	(+) 50:1
9 (C)	(0) 2	(0) 1	(0) 100:1
10 (C)	(0) 2	(0) 1	(0) 100:1
11 (C)	(0) 2	(0) 1	(0) 100:1

Nesses experimentos foram empregadas três composições modificadas do meio de Bushenll-Haas, onde as relações de C:N foram de 50:1, 100:1 e 150:1.

Para efeito de cálculo da relação de C:N, considerou-se a massa do querosene como sendo a massa total de carbono presente na amostra, pois, segundo Gomes (2004), este petroderivado é constituído basicamente por hidrocarbonetos. Portanto, a massa de carbono é igual a densidade do querosene (0,7975g/cm^3), multiplicada pelo volume do querosene, (por exemplo: para 10% v/v de querosene o volume de querosene é 100 mL utilizado para compor 1000mL de meio de cultivo. Nesse exemplo, a massa encontrada será portanto, de 79,75 g de carbono por litro de meio.

Aplicando-se a proporção C:N de 50:1, considerando que C=79,75 g, temos que:C/N=50/1.: N=1,595 g. Logo, considerando que o peso molecular do NH_4NO_3 é de 80,05g corresponde a 28g de nitrogênio, então para se obter 1,595 g de nitrogênio será necessário 4,56g de NH_4NO_3 por litro. Assim, seguindo a regra para as demais relações será necessário 2,28g de NH_4NO_3 para a relação de C:N de100:1 e 1,515g de NH_4NO_3 para a relação de C:N de 150:1.

Tabela 8- Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial $2^{3.}$

Fator	Nível		
	-	0	+
Inóculo (blocos- Ø 8mm)	1	2	3
Concentração de glicerol	0,5 ml	1ml	1,5 ml
Fonte de nitrogênio (NH_4NO_3),	1,51g/l (150:1)	2,28 g/l (100:1)	4,56g/l (50:1)

4.8. Ensaio de Degradação em Biorreator

Para este ensaio foi utilizado um biorreator de bancada, modelo BioFlo 110, da New Brunswick, dotado dos controles de aeração, agitação, nível de espuma, temperatura e pH, através dos quais foi possível manter algumas condições de processo, conforme o interesse do presente estudo. Pela possibilidade de controle de algumas condições consideradas importantes no processo de biodegradação, o ensaio em biorreator foi realizado com o objetivo de elevar a taxa de degradação do querosene pela ação dos micro-organismos consorciados utilizando melhor condição obtida no planejamento experimental em frascos.

O ensaio foi realizado durante 9 dias, sendo usadas as seguintes condições: temperatura de 30 ±1°C, pH igual a 6,0; sem agitação, vazão de ar de 3.000 cm^3/min. A concentração de glicerol, do inóculo e da fonte de Nitrogênio (NH_4NO_3) foi estabelecida de acordo com o resultado do planejamento fatorial, obtidos durante o ensaio anterior. Essas condições foram mantidas durante todo o experimento com a finalidade de otimizar o processo. O monitoramento do tratamento biológico do querosene pelo consórcio em biorreator foi realizado através: da determinação a cada 48 horas da concentração microbiana pela técnica do peso seco; verificação da degradação do poluente por análise de cromatografia gasosa; teste de produção de emulsificante e avaliação da fitoxicidade ao longo do tratamento.

Figura 1. Biorreator de bancada

4.9. Parâmetros avaliados durante o experimento

4.9.1. Medição do pH

Para avaliação do pH durante os ensaios foram realizadas medições do potencial de hidrogênio do caldo nutritivo após cada etapa, utilizando o potenciômetro digital DIGIMED® modelo DM-21.

4.9.2. Biomassa

A biomassa foi avaliada através da medida do peso seco, utilizando alíquotas de 50 ml do meio biodegradado. O material foi centrifugado e lavado com detergente até a retirada da fonte oleosa, para em seguida ser filtrado. A massa de células foi pesada em membrana filtrante de porosidade Ø 0,45µm para avaliação do crescimento microbiano por gravimetria (g/L).

4.9.3. Extração e Análise de degradação dos constituintes do querosene

A biodegradação do petroderivado foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM, SHIMADZU@), através do decréscimo dos picos de concentração dos constituintes do querosene em função do tempo de retenção. Após os ensaios descritos nos itens 4.6; 4.7 e 4.8 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 fase gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG-EM).

Nesse ensaio o cromatógrafo foi ajustado para a temperatura de injeção e de interface de 290°C, utilizando uma coluna cromatográfica OV-5 (5% difenil e

95% dimetilpolisiloxano) de dimensões 30 µm x 0,25µm. O volume injetado foi de 1µL com split de 1:98 e fluxo de gás hélio de 1 mL mim^{-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 290ºC e varredura de 35 a 500 m/z. A identificação dos hidrocarbonetos alifáticos foi realizada por comparação dos espectros de massa dos constituintes do querosene com os da Biblioteca de Compostos Wiley ^{tm}.

Figura 2. Cromatográfico Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massa utilizado no ensaio de degradação

4.9.4. Produção de emulsificantes

Neste experimento avaliou-se a estabilidade de formação emulsões contra diferentes fontes hidrofóbicas e foi realizado a temperatura ambiente. Os óleos utilizados neste teste foram: querosene, óleo diesel, soja, lubrificante automotivo queimado, lubrificante automotivo.

O índice de emulsificação foi determinado através da adição de uma fonte oleosa ao sobrenadante livre de células (2ml de cada) em tubos de ensaio, os quais foram mantidos sob agitação em vortex durante 2 minutos. Em seguida deixados em repouso por 24 horas, para que o índice de emulsificação fosse calculado através da fórmula: E_{24}= (altura de camada de emulsão/altura total) x100, segundo Paraszkiewicz et al.(2002),

4.9.5. Teste de Fitotoxicidade

O efeito da toxicidade do material residual, proveniente da biodegradação do querosene pelo consórcio microbiano misto, 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, 10 feijões foram colocados em cada placa de modo equidistante, previamente desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% e água destilada esterilizada. Paralelamente, foram feitas placas controle negativo empregando 5 mL da fonte oleosa e placas controle positivo com 5 mL de água destilada esterilizada. Todos os testes foram realizados em triplicata, sob a temperatura de 30±2°C, durante sete dias. Após esse tempo, foram quantificados: percentual de germinação e o percentual de crescimento da raiz, para obtenção do valor do índice de germinação, considerado o parâmetro-resposta, de acordo com as definições abaixo:

- $\%\ \text{germinação} = \dfrac{\text{Média de sementes testes germinadas x 100}}{\text{Média de sementes germinadas no controle}}$

- $\%\ \text{crescimento da raiz} = \dfrac{\text{Média do crescimento das raízes (teste) x 100}}{\text{Média do crescimento das raízes (controle)}}$

- $\text{Índice de germinação} = \dfrac{(\%\text{Germinação}) \times (\%\text{Crescimento da raiz})}{100\%}$

5. RESULTADOS

5.1. Seleção dos micro-organismos

Os fungos *Aspergillus tamarii*-UFPEDA 870 e *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA-845 e a bactéria *Bacillus cereus*- UFPEDA 838 promoveram a oxidação biológica do indicador 2,6 diclorofenol –indofenol (DCPIP), após 12 horas, 24 horas e 48 horas respectivamente, indicando potencialidade em degradar os constituintes do querosene. Gomes (2004) verificou em ensaios de seleção aplicando-se a mesma técnica que as linhagens bacterianas B6, B7, B5 e B4 descoloriram o meio de cultivo, após 15, 67, 172 e 240 horas, respectivamente, selecionando as linhagens com os menores tempos de viragem do meio para a formação de consórcios. Pirôllo (2006) utilizando o DCPIP em meio de cultivo Bushnell-Haas - BH verificou a descoloração do meio após 68 horas por *Pseudomonas aeruginosa* LBI, utilizando o querosene como fonte de carbono.

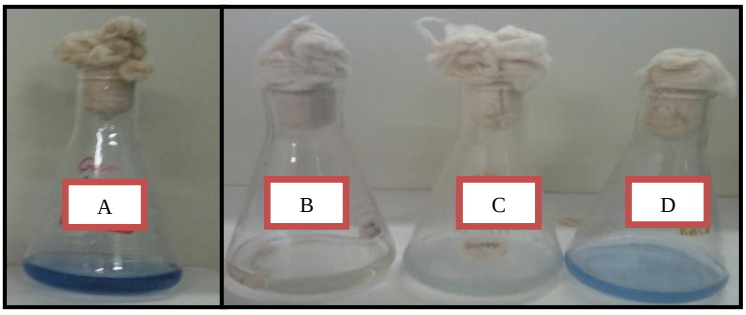

Figura 3. Teste de descoloração do indicador DCPIP em frascos utilizando querosene como fonte de carbono. A) Controle Abiótico; B) *Aspergillus tamarii* UFPEDA 870; C) *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845; D) *Bacillus cereus* UFPEDA 838.

Em 2010, Maciel e colaboradores verificaram que os fungos *Aspergillus tamarii* (UFPEDA 870), *Penicillium griseofulvum* (UFPEDA 880), e *Cunninghamella elegans* (TC 542), e *C. elegans* (TC 596) promoveram oxidação biológica, e havendo destaque para *A. tamarii* (UFPEDA 870) isolado e em consórcio com outros fungos, porque otimizou o processo de degradação. Isso justifica e impulsiona estudos envolvendo consórcios microbianos.

5.2. Testes de Antagonismo

Os testes indicaram que não houve formação de halos de inibição nas placas (figura 4), sugerindo que os micro-organismos selecionados não inibem o crescimento um do outro, podendo assim, atuar em consórcio. Regis (2000) diz que a biodegradação geralmente ocorre por um consórcio de diferentes espécies de micro-organismos capazes de metabolizar os produtos e subprodutos da biodegradação, em diferentes etapas.

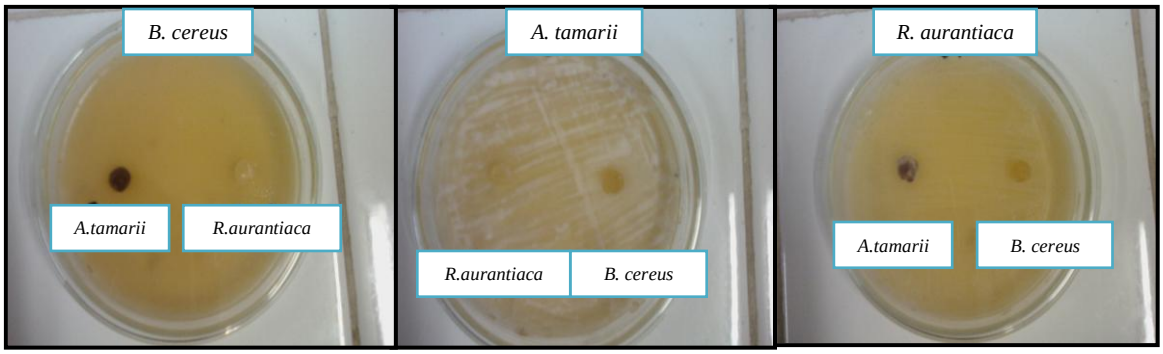

Figura 4. Placas de Petri contendo os micro-organismos do teste de antagonismo: (a) Placa da bactéria *Bacillus cereus versus Aspergillus tamarii* e *Rhodotorula aurantiaca* (b) Placa do fungo filamentoso *Aspergillus tamarii versus Bacillus cereus* e *Rhodotorula aurantiaca* e (c) Placa da levedura *Rhodotorula aurantiaca versus Aspergillus tamarii* e *Bacillus cereus.*

5.3. Condições de crescimento dos micro-organismos-teste

Nas figuras de 5 a 8 são apresentados os gráficos de pH e biomassa comparativa de *R. aurantiaca, A. tamarii* e *B. cereus* de forma isolada e do consórcio formado pelos mesmos, em ensaios contendo apenas o querosene como fonte de carbono e um outro ensaio contendo o querosene e glicerol.

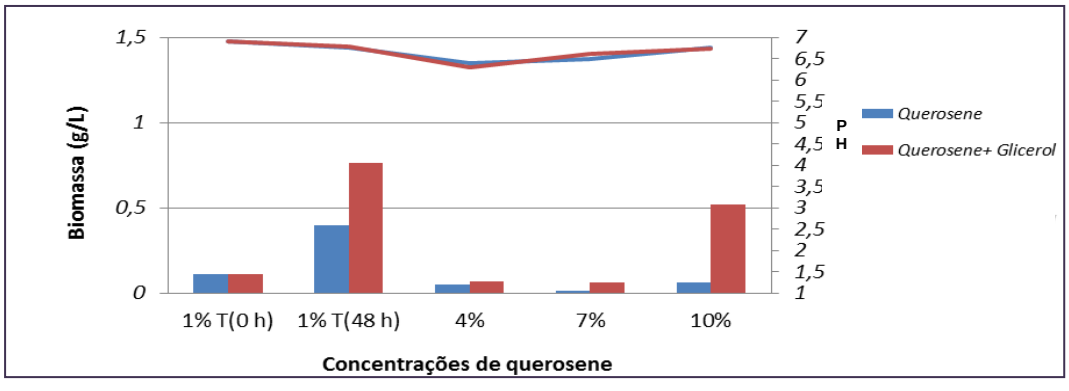

Figura 5. Valores de pH e biomassa da levedura *Rhodotorula aurantiaca* crescida em meio contendo querosene e outro com querosene mais glicerol.

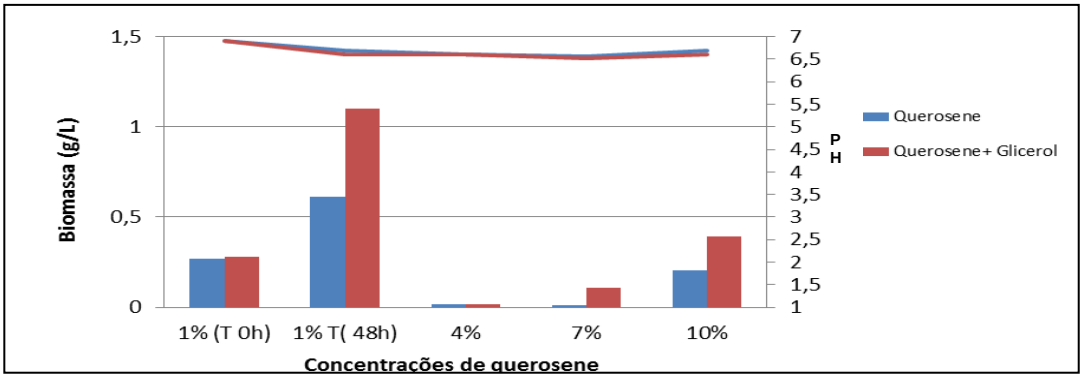

Figura 6. Valores de pH e biomassa do *Aspergillus tamarii* crescido em meio contendo querosene e outro com querosene mais glicerol.

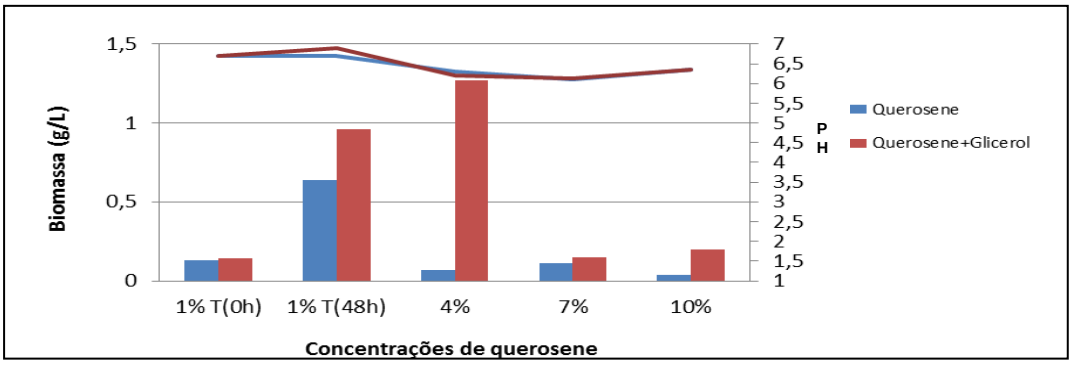

Figura 7. Valores de pH e biomassa do *Bacillus cereus* crescido em meio contendo querosene e outro com querosene mais glicerol.

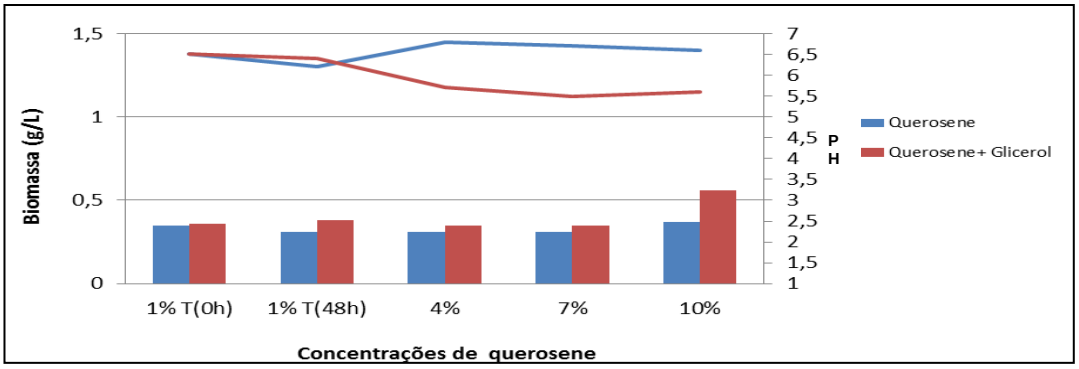

Figura 8. Valores de pH e biomassa do consórcio *Rhodotorula aurantiaca, Aspergillus tamarii e Bacillus cereus* em meio contendo querosene e outro com querosene mais glicerol.

As figuras 5, 6, 7 e 8 revelaram que houve produção de biomassa, indicando que os micro-organismos em questão foram capazes de utilizar o querosene como única fonte de carbono, porém, em todos os ensaios realizados com os micro-organismos

tanto isolados quanto em consórcio houve um aumento de biomassa quando foi acrescentado glicerol, como fonte de carbono adicional, para estimular o cometabolismo. 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, e também a presença de uma fonte adicional de carbono facilmente assimilável, garante produção inicial de biomassa para a biodegradação.

Pode-se observar no presente estudo que os micro-organismos isolados apresentaram crescimento nas primeiras 48 horas de aclimatação. Com o aumento das concentrações de querosene nos dois ensaios, ocorreu uma redução de crescimento, exceto para o *B. cereus* no ensaio que continha querosene mais glicerol, pois, este continuou crescendo até a concentração de 4% de querosene, e a partir daí começou a declinar. Goldstein et al. (1985) atribuem o declínio de biomassa à formação de metabólitos tóxicos, esgotamento de nutrientes ou a oxigenação superficial em frascos agitados deixou de ser eficaz.

No ensaio em consórcio (figura 8) o crescimento dos micro-organismos foi semelhante em todas as concentrações utilizadas, entretanto em algumas concentrações foi inferior aos valores desses micro-organismos isoladamente. Estes resultados são corroborados com os encontrado por Gomes (2004) utilizando um consórcio para degradar o querosene, verificou um decréscimo inicial da população microbiana, supondo que devido à interação entre as linhagens seria necessário um tempo maior de aclimatação para que ao se iniciar o experimento de biodegradação, ocorresse uma diminuição da fase de adaptação à nova carga de poluente.

De acordo com Kataoka (2001), a biodegradação de compostos orgânicos ocorre de forma mais eficaz quando os micro-organismos inoculados são pré-selecionados, portanto mais adaptados aos poluentes alvos.

A biodegradação ocorre com mais facilidade para os hidrocarbonetos lineares, de cadeia intermediária e de menor grau de saturação do que os de maior grau de saturação e de peso molecular mais elevados, os quais podem

conduzir a uma maior concentração de compostos mais recalcitrantes que causam um efeito inibitório à ação microbiana (BAKER & HERSON, 1994b).

Com relação ao pH não houve grande variação, tanto para os micro-organismos isolados quanto para o consórcio nos ensaios comparativos entre os meios que continham apenas o querosene como fonte de carbono e os que continham querosene adicionado de glicerol. Pode-se observar que mesmo com o aumento das concentrações de querosene os micro-organismos isolados e em consórcio mantiveram-se seus valores de pH numa faixa próximo a neutralidade, variando entre 6,1 a 6,9. Com exceção do consórcio, no ensaio que continha querosene mais a adição do glicerol, o qual apresentou uma acidificação do meio, atingindo o valor de pH mínimo de 5,5 e máximo de 6,5.

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.

Skalandany & Metting (1993) relatam que os fungos que degradam compostos complexos, tem o pH ótimo igual ou menor que 5. Alexander (1980a) afirma que muitas espécies de fungos se desenvolvem numa ampla faixa de pH, desde de 3 até 9. De acordo com Del' Arco (1999) a maioria dos fungos se desenvolve em pH ácido e são mais eficientes sob condições adversas, tais como: valores extremos de pH, limitação de nutriente e baixo teor de umidade.

Alguns autores afirmam que o acúmulo de ácidos orgânicos, produtos intermediários, formados durante o processo de degradação, pode conduzir a uma queda do pH, o que denota uma maior atividade microbiana (AISLABIE et al., 2006; GADD, 2001;LEAHY ;COLWELL,1990)

5.4. Degradação do querosene nos Ensaios de Aclimatação

5.4.1. Degradação do querosene na concentração de 4%.

A figura 9 mostra os percentuais de degradação de hidrocarbonetos saturados, na concentração de querosene de 4%.

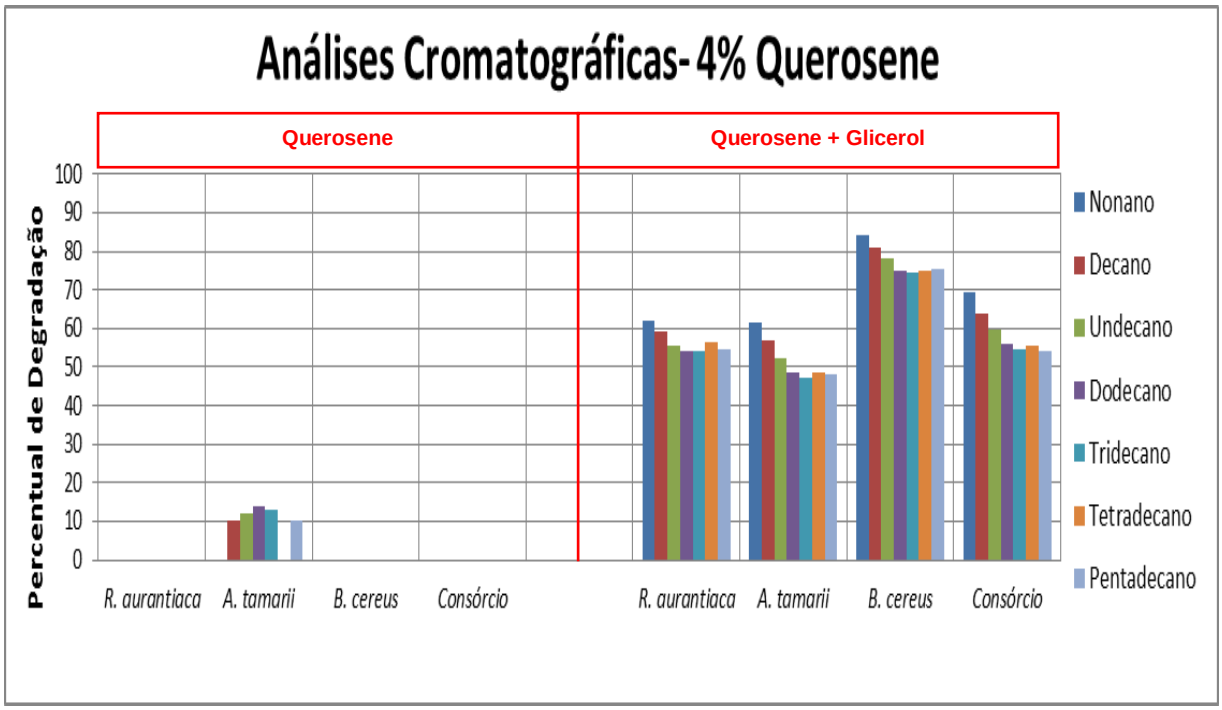

Figura 9. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos do querosene na concentração de 4%.

Tanto os micro-organismos isoladamente quanto em consórcio apresentaram percentuais de degradação do querosene inferiores a 5%, entretanto com a adição de glicerol ao querosene houve um aumento para valores acima de 40%, confirmando que algumas substâncias atuam como co-metabólica (ALEXANDER,1999b).

Passos et. al. (2009) afirmam que embora, a repressão catabólica seja frequentemente mencionada, fontes de carbono convencionais, como glicose, glutamato e extrato de levedura, geralmente aumentam a biodegradação de compostos aromáticos, diminuindo a toxicidade e o efeito inibitório sobre o crescimento celular.

Shabir et al. (2008) em testes de biodegradação de querosene em solo, utilizando um consórcio de bactérias e adição de nutrientes, verificaram uma

resposta eficaz. Na concentração do querosene (4%), o valor foi reduzido de 4 ± 0,2% para 2,9 ± 0,1% e 4 ± 0,1% para 1,4 ± 0,1% em 6 semanas de incubação em diferentes tratamentos T1 e T2, respectivamente.

5.4.2. Degradação de querosene na concentração de 10%.

A figura 10 mostra os percentuais de degradação de alguns hidrocarbonetos saturados, na concentração de 10% de querosene.

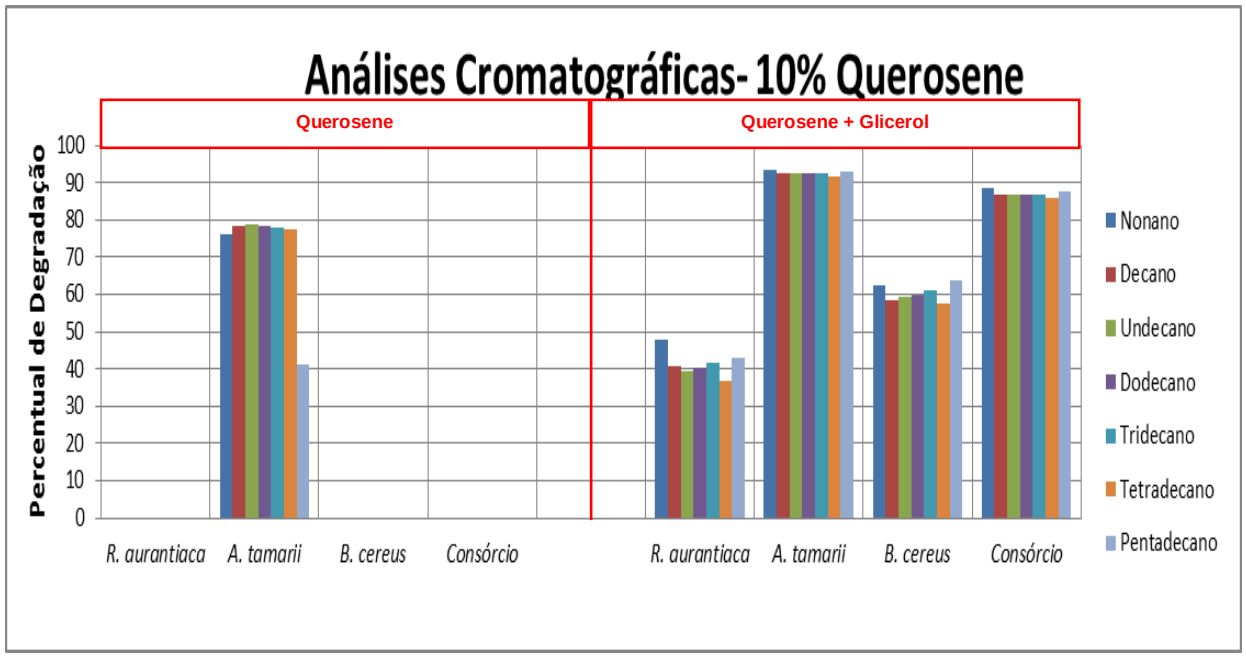

Figura 10. Percentuais de degradação dos hidrocarbonetos do querosene na concentração de 10%.

Observa-se que na concentração de 10% de querosene, o *Aspergillus tamarii* quando utilizado isoladamente degradou de 40 a 60%, enquanto que os outros micro-organismos isoladamente e em consórcios não degradaram. Entretanto, com a adição de glicerol todos os micro-organismos degradaram o querosene (isoladamente e em consórcio) confirmando a atuação do glicerol como co-metabólico. Araújo e Lemos (2002) verificaram em experimentos de biodegradação, que a ação microbiana foi estimulada nos ensaios com a adição de outras fontes de carbono, no caso a glicose e extrato de levedura, acelerando a degradação do combustível analisado. O

Aspergillus tamarii e o consórcio destacaram-se, alcançando percentuais de degradação na faixa de aproximadamente 90% e 80%, respectivamente.

Maciel et al., (2008), investigando a degradação de querosene por fungos, verificou que o *Penicillium griseofulvum* foi eficiente no processo de biodegradação, pois além de degradar todos os constituintes do mesmo, os subprodutos gerados não ofereceram toxicidade frente às sementes testadas. Em determinado meio BH 3 (modificado), houve degradação de aproximadamente de 100%, 30% e 60% para o nonano, decano e undecano, respectivamente.

5.5. Fitotoxicidade dos Ensaios de Aclimatação

Os vegetais são ótimos indicadores de toxicidade que podem ser utilizados no monitoramento ambiental, porque apresentam respostas diante de alterações ambientais, devido à exposição dos organismos às condições ambientais desfavoráveis (BEZRUKOV;LAZARENKO, 2002; MAZZEO, 2009).

Os testes de fitotoxicidade (figura 11) revelaram melhores resultados para os ensaios no qual foi utilizado o consórcio de micro-organismos, com e sem a adição de glicerol. Todas as sementes apresentaram 100% germinação, de crescimento da raiz e de índice de germinação para o líquido metabólico dos micro-organismos crescidos isoladamente em caldo nutritivo contendo querosene. Enquanto que, quando adicionado o glicerol, os valores foram: 88,9%, 100% e 88,9 respectivamente, indicando que o consórcio foi eficiente na degradação do combustível, entretanto o índice de germinação foi menor. Possivelmente, o querosene não foi biodegradado quando não houve glicerol, logo ele não ficou tão disponível (tóxico) na coluna de água (meio de cultura). Após a biodegradação pela adição do glicerol, os resíduos da degradação se dissolveram na coluna e ofereceram uma redução no índice de germinação. Rivera-Cruz; Trujillo-Narcía (2004) também afirmam que a inibição da germinação e a diminuição do crescimento vegetal são indicadores da toxicidade dos poluentes.

Os resíduos biodegradados pela *Rhodotorula aurantiaca* também apresentou resultados para esses parâmetros semelhantes aos valores do

consórcio, porém com relação ao percentual de degradação não apresentou grande eficiência.

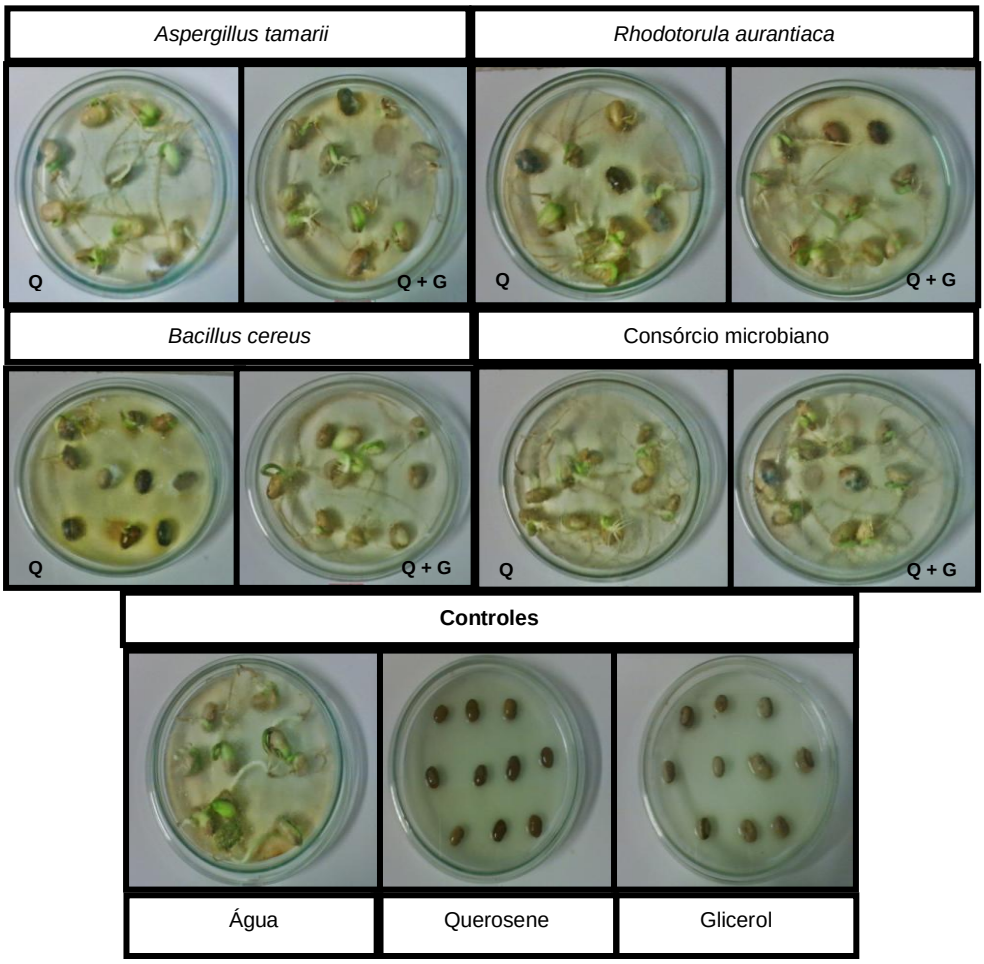

Figura 11. Placas do teste de fitotoxicidade com material biodegradado e placas controles, Q (Querosene); G (Glicerol).

Os resultados dos parâmetros de fitotoxicidade podem ser visualizados na tabela 10.

Tabela 10- Teste de Fitotoxicidade da aclimatação dos micro-organismos na concentração de 10% de querosene

Micro-organismos	Fontes de carbono	%G	% CR	IG
Aspergillus tamarii	**Querosene**	**94,4%**	**79,5%**	**75,04**
Aspergillus tamarii	**Querosene + Glicerol**	**77,8%**	**61,2%**	**47,6**
Rhodotorula aurantiaca	**Querosene**	**72,2%**	**100%**	**72,2**
Rhodotorula aurantiaca	**Querosene + Glicerol**	**88,9%**	**100%**	**88,9**
Bacillus cereus	**Querosene**	**66,7%**	**35,3%**	**23,5**
Bacillus cereus	**Querosene + Glicerol**	**83,3%**	**100%**	**83,3**
Consórcio	**Querosene**	**100%**	**100%**	**100**
Consórcio	**Querosene + Glicerol**	**88,9%**	**100%**	**88,9**

%G (Percentual de germinação); %CR (Percentual de crescimento de raiz); IG (Índice de germinação).

Maciel (2009), avaliando a fitotoxicidade de um consórcio microbiano misto encontrou valores para %G, %CR e IG, respectivamente de 92%, 45% e 41,76.

5.6. Cromatografia do Planejamento Fatorial

A figura 12 mostra os percentuais de degradação dos hidrocarbonetos saturados nos 11 ensaios do planejamento fatorial.

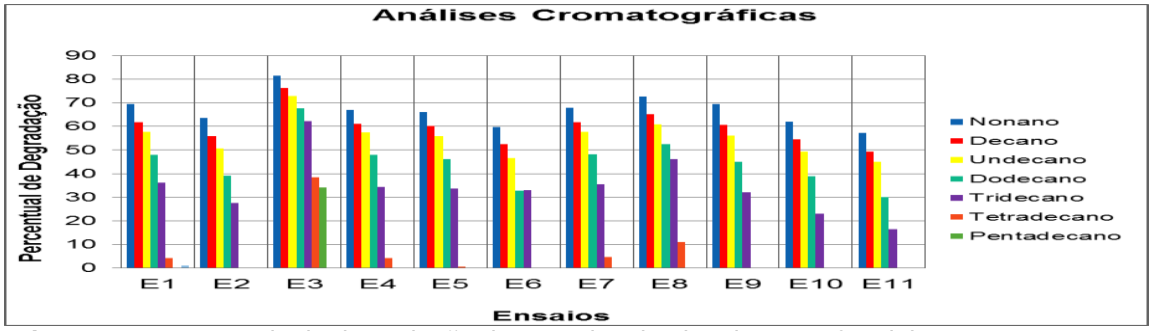

Figura 12. Percentuais de degradação dos ensaios do planejamento fatorial

Pode-se observar que houve degradação de alguns hidrocarbonetos saturados do querosene em todos os ensaios, principalmente os n-alcanos: nonano, decano, undecano e dodecano, sendo que a melhor condição que foi encontrada para a obtenção de uma maior degradação foi a do ensaio 3. Nessa condição foi escolhido o menor inóculo (1 bloco de gelose), a maior concentração de glicerol (1,5mL) e a maior relação de C:N(50:1).

No diagrama de Pareto pode-se observar que nenhuma das variáveis foi significativa para o processo em nível de significância a 10% (p=0,1). No entanto, dois efeitos positivos foram encontrados: a concentração de glicerol e a interação entre o inóculo e a relação de C:N. Azevedo (2010) verificou que a concentração de NH_4NO_3 e a interação desta com a concentração celular influenciaram de forma negativa no processo, e esta última variável isoladamente não foi significativa. Segundo Barros-Neto et al. (1995) nem sempre todas as variáveis analisadas apresentam influência que sejam significativas com relação as variáveis de resposta, desta forma é necessário fazer uma triagem e descarte das variáveis não significativas visando a racionalização do experimento.

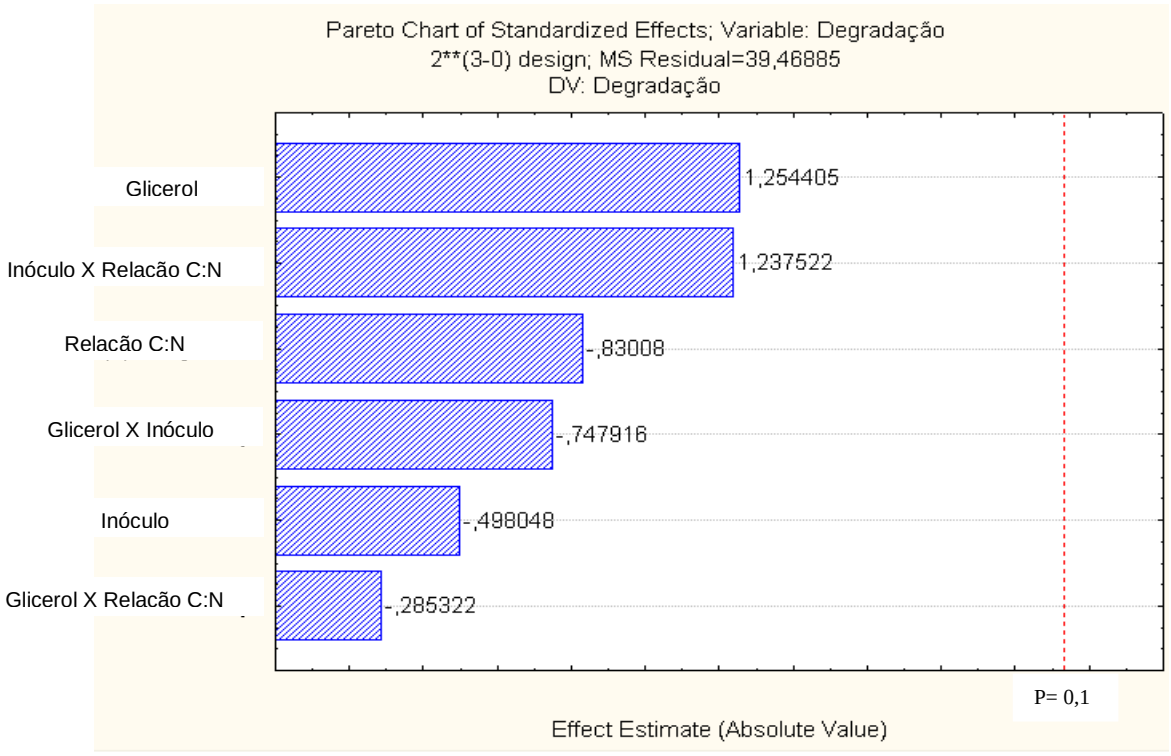

Figura 13. Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial 2^3, cuja variável resposta é a degradação dos hidrocarbonetos do querosene.

Todos os gráficos (14a,14b e 14c) confirmam e mostram a tendência dos resultados obtidos durante o planejamento experimental, que a degradação do querosene é maior quando aumenta a concentração do glicerol e diminui o inóculo e a concentração do NH_4NO_3.

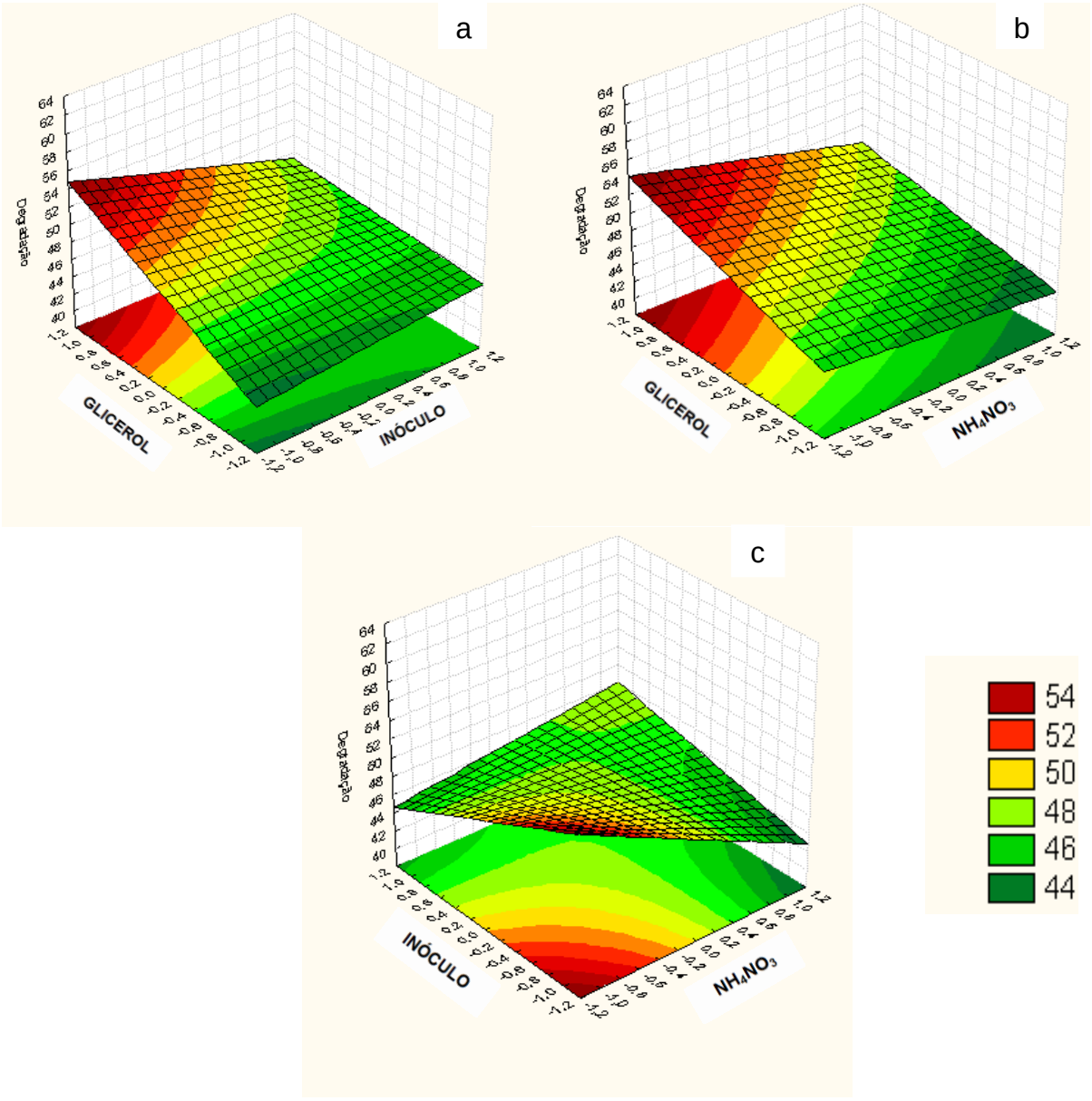

Figura 14. Gráficos de superfície de resposta: (a)Interação entre glicerol e inóculo; (b) Interação entre glicerol e NH_4NO_3; (c) Interação entre Inóculo e NH_4NO_3.

.

5.7. Teste de Fitotoxicidade dos subprodutos do Planejamento fatorial

Os resultados dos parâmetros de fitotoxicidade dos ensaios pertencentes ao planejamento fatorial mostram que os ensaios 2, 3, 4, 5 e 6 ao final dos experimentos, apresentaram as menores concentrações de metabólitos tóxicos formados durante o processo, porém, a condição do ensaio 3 além de não ser tóxica, promoveu uma maior degradação do querosene atingindo percentuais de até 80%. Tiquia et al. (1996) afirma que quando o índice de germinação é maior que 80, é um indício que desapareceu a toxicidade do composto.

Tabela 11- Resultados do Teste de Fitotoxicidade do Planejamento Fatorial

Ensaio	%G	% CR	IG
1	60%	100%	60
2	100%	83,2%	83,2
3	100%	91%	91
4	83,2%	100%	83,2
5	100%	80%	80
6	100%	97,2%	97,2
7	100%	61%	61
8	80%	61,2%	49
9(C)	100%	70%	70
10(C)	100%	69%	69
11(C)	100%	69%	69

5.8. Ensaio em Biorreator

5.8.1. Biomassa

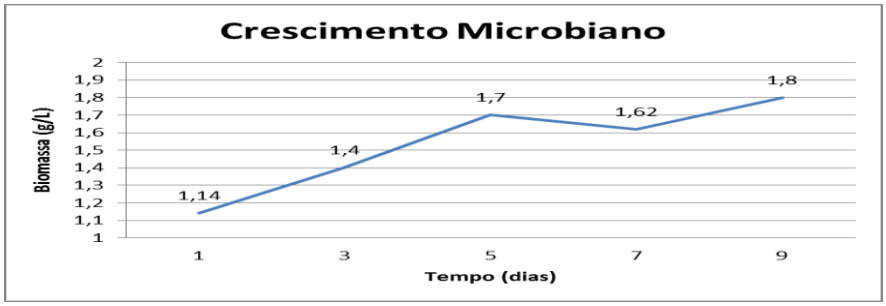

Figura 15. Perfil de crescimento da massa seca obtida pelo consórcio

O perfil de biomassa do consórcio no ensaio em biorreator, inicialmente foi ascendente até o 5º dia, sofreu um pequeno declínio até o 7º dia. Goldstein et al. (1985) atribuem o declínio de biomassa à formação de metabólitos tóxicos, esgotamento de nutrientes ou a oxigenação superficial em frascos agitados deixou de ser eficaz.

Mas, apresentou um novo crescimento, denotando uma adaptação ao poluente, e alcançando uma concentração de biomassa com valor de 1,8 g/L no final do ensaio.

6.1.2. Teste de emulsificação

Os resultados do teste de emulsificante revelaram que dos óleos testados, apenas quando foram utilizados o óleo lubrificante automotivo queimado e não queimado (figuras 16a e 16b) houve a produção de 100% de emulsão.

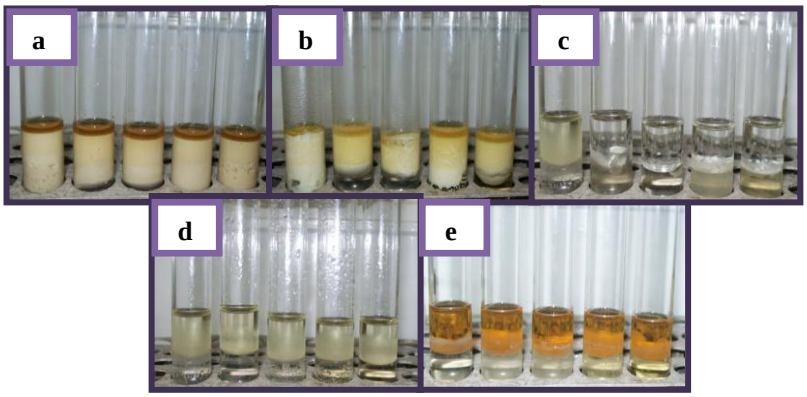

Figura 16. Teste de emulsificante utilizando: (a) óleo automotivo queimado, (b) óleo lubrificante automotivo, (c) querosene, (d) óleo de soja e (e) óleo Diesel, nos 1º, 3º, 5º, 7º e 9º dias de ensaios.

Essa emulsão produzida neste experimento permaneceu estável por 20 dias.

Pirôllo (2006) realizando um estudo de emulsificação utilizando o sobrenadante livre de células do cultivo adicionados aos hidrocarbonetos (óleo diesel, querosene, benzeno e petróleo), no intuito de avaliar o poder de emulsificação sobre estes compostos, verificou que todos os hidrocarbonetos avaliados foram emulsificados.

Segundo Ururahy et al. (1998a), é possível que tenha ocorrido inibição pelo substrato e/ou efeito tóxico dos produtos resultantes do metabolismo microbiano. Ururahy (1998 b) afirma que as enzimas envolvidas na produção de biossurfactante encontram-se reprimidas nas células que estão em crescimento. A exaustão, limitação ou carência relativa às fontes de carbono, nitrogênio e fósforo leva a repressão das enzimas do metabolismo secundário, constituindo, assim, numa resposta a situação de stress nutricional, ou seja, os micro-organismos produzem agentes emulsificantes em situações nas quais, apenas, os mecanismos de adesão não garantem o seu crescimento.

As figuras (17a, 17b e 17c) abaixo mostram os índices de emulsificação total, percentual de óleo emulsificado e o percentual de óleo não emulsificado restante na amostra.

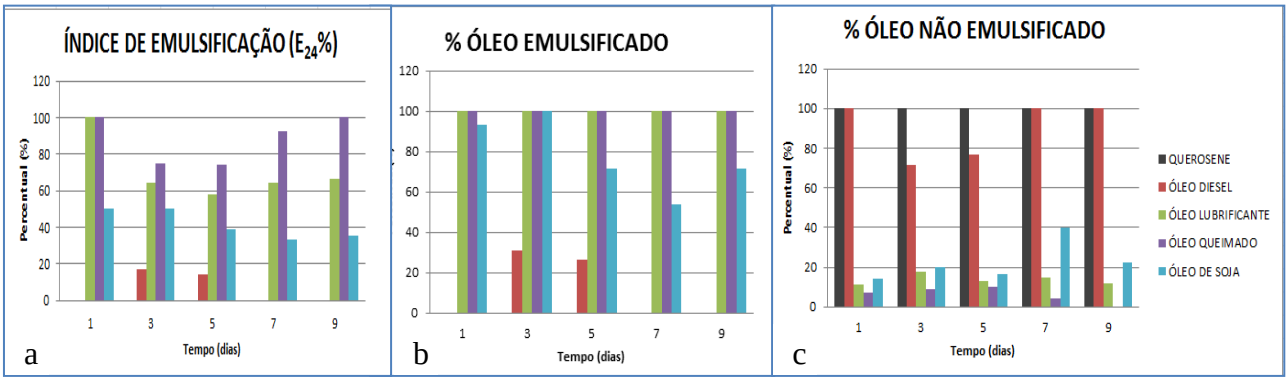

Figura 17. a) Índices de emulsificação obtidos com a suspensão microbiana do consórcio e os diversos óleos testados. b) Percentual de óleo emulsificado e c) Percentual de óleo não emulsificado.

5.8.3. Degradação do querosene por consórcio microbiano em biorreator

A figura 18 mostra o perfil de degradação dos n-alcanos (C_9 a C_{15}) que constituem o querosene pelo consócio através da análise em Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectro de massa.

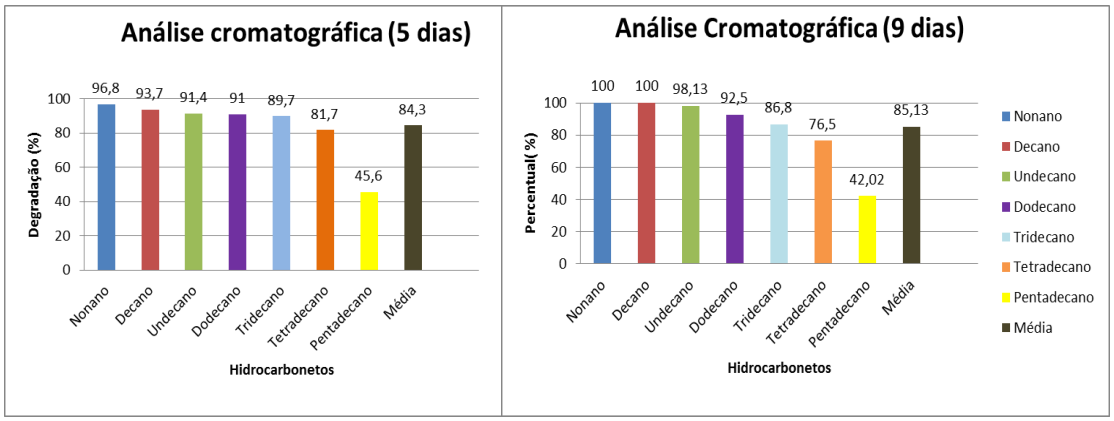

Figura 18. Perfil de degradação dos hidrocarbonetos saturados do querosene nos 5º e 9º dias de ensaios.

Os resultados revelaram que houve degradação dos hidrocarbonetos desde o 5º dia até o 9° dia de cultivo. O nonano e o decano foram degradados totalmente, enquanto os demais foram mineralizados num percentual de 42 a 98% no 9º dia de ensaio.

Os percentuais médios de degradação dos n-alcanos analisados para o 5º e 9º dia do experimento foram, respectivamente, de 84,3% e 85,13 %. Os resultados, como já eram esperados, foram melhores que os dos ensaios realizados em frascos, durante a aclimatação e no planejamento fatorial, pois, em biorreator o processo foi otimizado sendo aplicadas as melhores condições e controladas para aumentar a degradação.

Melo (2011), em estudos de degradação de petróleo utilizando culturas de *A. oryzae*, uma bactéria não identificada e um consórcio microbiano, obteve percentuais médios de degradação em torno de 66,05%, 32,43% e 87,52%, respectivamente. Concluindo que houve maior degradação dos hidrocarbonetos alifáticos quando foi utilizado no processo, o consórcio microbiano.

Uytebroek et al.(2007) confirmam esse fato, quando citam que a ação conjunta de micro-organismos pode degradar em maior grau do que um micro-organismo isolado, por participarem do processo diferentes enzimas.

Arruda (2011) em estudos de degradação do óleo Diesel, utilizando *Penicillium commune, Aspergillus terreus* e *Cunninghamella echinulata* mostraram interação no teste de antagonismo, mas quando utilizado em consórcio diante da fonte oleosa e em outras condições de cultivo suas interações não foram tão eficientes no processo de degradação.

5.8.4. Fitotoxicidade do ensaio em Biorreator

A figura 19 mostra os resultados do teste de toxicidade, avaliando parâmetros como, percentual de germinação e de crescimento, além do índice de germinação, ao longo do ensaio em biorreator.

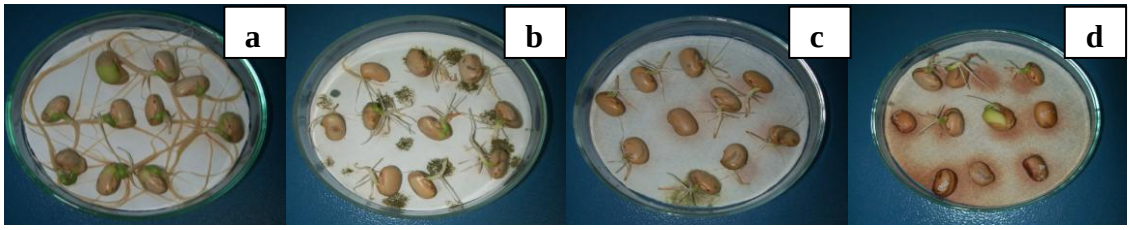

Figura 19. Placas do teste de fitotoxicidade do experimento em biorreator: (a) Placa controle com água destilada esterilizada; (b) Placa teste com 1 dia de ensaio; (c) Placa teste com 5 dias de ensaio; (d) Placa teste com 9 dias de ensaio.

Os resultados do teste de fitotoxicidade indicam um aumento da toxicidade dos subprodutos durante o processo de degradação em biorreator que é evidenciado pela diminuição do crescimento da raiz e da germinação das sementes (tabela 13).

Tabela 12 - Parâmetros de fitotoxicidade avaliado ao longo do ensaio em biorreator.

Parâmetros	Tempo (dias)		
	1	5	9
Percentual de germinação	100	49	49
Percentual de crescimento	55,5	43,2	43,2
Índice de germinação	55,5	34	18,9

Corroborando com os resultados apresentados acima, 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, observado pelos testes de germinação de sementes e de toxicidade com minhoca, concluindo que metabólitos tóxicos intermediários poderiam ter sido formados durante o processo.

Arruda (2011) realizando teste de toxicidade do material residual proveniente da degradação de óleo Diesel por consórcio fúngico verificou que o resíduo mostrou-se tóxico, apresentando taxas inferiores a 25 no índice de germinação.

6. CONCLUSÕES

- A biodegradação do querosene é favorecida quando se acrescenta uma fonte de carbono alternativa, como o glicerol;
- O *Aspergillus tamarii* é eficiente na degradação dos constituintes do querosene com ou sem adição do glicerol;
- A toxicidade é menor quando é utilizado na degradação do querosene, o consórcio microbiano nos ensaios em frascos;
- A melhor condição, obtida pelo planejamento fatorial, para que ocorra maior degradação é a menor concentração de inóculo e de nitratato de amônia e maior quantidade de glicerol;
- A degradação do querosene é maior quando as condições foram otimizadas e o ensaio realizado em biorreator, onde as condições que favoreciam o processo foram controladas;
- A toxicidade dos subprodutos formados durante o processo de degradação em biorreator foi aumentando progressivamente ao longo do experimento;
- O consórcio formado por *Rhodotorula aurantiaca, Aspergillus tamarii* e *Bacillus cereus* promove a degradação completa de alguns hidrocarbonetos, sendo promissor para processos de biorremediação, no entanto o tempo do processo deve ser reduzido para que a toxicidade seja minimizada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahearn, D. G.; Meyers, S. P.; Standard, P. G. 1971.The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. Developments in Industrial Microbiology, v. 12, p. 126-134.

- Aislabie, J.; Saul, D. J.;Foght, J. M. 2006. Biorremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. Extremophiles 10, 171-179.

- Alexander, M. Introducciõn a La microbiologia del suelo. 2. Ed. Planta Alta, México: libros y editoriales, 1980.

- Alexander, M. 1994. Environmental effects. In: Biodegradation and Bioremediation. 2 ed. New York: Academic Press. Cap.14, p.265-300.

- Alexander, M. 1999. Effect of Chemical Strectures on Biodegradation. In: Biodegradation na Biorremediation. 2 ed. New York: Academic Press; cap. 11, p.177-194.

- Alexander, M. 1999b. Biodegradation and Bioremediation. San Diego: Academic Press, 452p.

- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Portaria Nº 137, de 1º de Agosto de 2000.

- Araujo, F. S.M.; Lemos, J. L. S. 2002. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. In: X Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral-CETEM/MCT.

- Arruda, F.V.F. 2011. Degradação de óleo Diesel por Aspergillus terreus, Cunnighamella echinulata e Penicillium commune. Dissertação (mestrado) Pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco.

- Atlas, R. M.; Bartha, R. 1972. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Menio Park, California. Benjamin Cumins Publishing Company.

- 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.

- Azevedo, L.M.L. 2010. Potencial de Degradação do Petróleo por Fungos Isolados de Manguezal Impactado. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pe.

- Baker,K.H..; Herson, D.S. 1994. Biorremediation. New York. McGraw-Hill, inc. 375p.

- 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.

- Bamforth, S.; Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Sussex, v.80, n.7, p.723-736.

- Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S.2000. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Applied Microbiology and Biotechnnology, Berlin, v.53, p. 495-508.

- Barros-Neto, B. de, Scarminio, I.S., Bruns, R. E. 1995. Planejamento e otimização de experimentos. 2 ª ed. Editora da UNICAMP.

- Baur, A. M.; Kirby, M. N.; Sherris, J.C.;Turck, M.B. 1966. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, Philadelphia, v.45, p.493-496.

- Bento, F. M. et al. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaumentation. Bioresource Technology, v. 96, p. 1049-1055.

- 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.

- Biazati, L. B. 2009. Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos a partir da reação de Fenton utilizando magnetitas dopadas com cobalto. Dissertação (Mestrado em Química e Recursos Naturais) – Universidade Federal do Espírito Santo.

- Bognolo, G.1999. Biosurfactant as emulsifying agentes for hydrocarbons. Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects, Amsterdam, v.152, p. 411-52.

- Borém, A.; Santos, F. R. Biorremediação. In: Borém, A.; Santos, F. R. 2004. (Eds.) Biotecnologia Simplificada. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 179-187.

- Campana, M.A.; Panzeri, A.M.; Moreno, V.J.; Dulout, F.N. 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish Cheirodon interruptus interruptus. Mutation Research, 438. p.155-161.

- Cerniglia, C.E. 1997. 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.

- CETESB: Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/ acessado em 31 de dezembro de 2011.

- Chen, H.; Rupa, D.S.; Tomar, R.; Eastmond, D.A. 2008. Chromosomal loss and breakage in mouse bone marrow and spleen cells exposed to benzene in vivo. Cancer Research, Baltimore, v.54. p.3533–3539.

- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Disponível em:<www.conama.com.br>. Acesso em: 15 ago. 2009.

- 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. 2007. Obtenção de consórcio de micro-organismos a partir de amostra de petróleo. Revista Ciências & Tecnologia. Ano 1, n.1.

- Corseuil, H.X.; Alvarez, P.J.J. 1996. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. Water Science & Technology, Oxford, v. 34, p.311-318.

- Crapez, M.A.C. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na biota marinha. In: Moraes, R. et. al.(org.) 2001. Efeitos de poluentes em organismos marinhos, Rio de Janeiro, p. 255-269, Arte e Ciência Villipress.

- Cruz, G.G. 2009. Degradação de gasolina, óleo Diesel e querosene por Rhodotorula aurantiaca UFPEDA 845. Monografia da graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

- Del'Arco, J. P. 1999. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimentos arenoso.171p. tese (doutorado em Ciências) – Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- Esposito, E.; Azevedo, J. L. 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs; p. 510.

- Frankenberger Jr., W. T. 1992. The Need for a Laboratory Feasibility Study in Bioremediation of Petroleaum Hidrocarbons. In: Hydrocarbons Contamiacted Soils and Groundwater. Boca Raaton. E. J.; Calabrese and P. T. Kostecki Eds. P. 237-293.

- Fenech, M.; Cheng, W.P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E. 2003. Humn project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutation Research. 534. 65-75.

- Gaad, G.M. 2000. Bioremedial Potencial of Microbial Mechanism of Metal Mobilization an Immmbilization. Current opinion in Biotecnology 11:271-279.

- Garcia-Blanco, S.; Venosa, A.D.; Suidan, M.T.; Lee, K.; Cobanli, S.; Haines, J.R. 2007. Biostimulation for the treatment of an oil-contaminated coastal SALT march. Biodegradation. 18:1–15.

- Glazer, A.N.; Nikaido, H. 1995. Microbial Biotecnology: Fundamentals Applied Microbiology. New York: W. H Freeman and Company.

- Goldstein, R.M.; Mallory, L.M.; Alexander, M. 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. Applied and Environmental Microbiology, v.50, n.4, p.977-983.

- Gomes, E. B. 2004. Biodegradabilidade de Querosene de Aviação Movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-Pe. Dissertação da Pós-Graduação em Biotecnologia De Produtos Bioativos Biodegradabilidade, Universidade Federal de Pernambuco.

- Grisolia, C.K. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mutation Research. 518: 145-150.

- 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.

- Hyne, N. J. The nature of oil an gas. 1995. IN: Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling an production. Oklahona: Pennwell Publishing Company; p.11-23, 1995.

- Irwin, R. J.; Mouwerik, M. V.; Stevens, L.; Seese, M. D.; Basham, W. Jet Fuel " A Entry"; In: Environmental Contaminants Encyclopedia. Colorado.National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, 1999.

- Ijah, U. J. J.; Antai, S. P. 2003. "Removal of Nigerian light Crude Oil in Soil Over a 12-month Period". International Biodeterioration and Biodegradation. v. 51, 93-99.

- Jacques, R. J. S. 2005. Biorremediação de Antraceno, Fenantreno e Pireno em um Argissolo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (Rs) Brasil.

- Jacques, J. S.; Bento, F. M.; Antoniolli, Z. I.; Camargo, F. A. O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n.4, p.1192-1201, julho-agosto.

- Juhasz, A.L.; Naidu, R. 2000. Bioremediation of molecular polycycle weigth aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] peryne. International Biodeterioration & Biodegradation, v.42, p.57-88.

- Kabbur, M. B., Rogeras, J. V., Gunasekar, P. G., Garret, C. M., Geiss, K. T., Brinkley, W. W., Mcdougal, V. 2001. Effect of JP-8 jet fuel on molecular and histological parameters related to acute skin irritation. Toxicology and applied pharmacology. v.175, p. 83-88.

- Kanikkannan, N.; Locke, B. R.; Singh, M. 2001. Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). Toxicology; 161, 1-11.

- Kanikkannan, N.; Locke, B. R.; Singh, M. 2002. Effect of Jet Fuels on the skin morphology and irritation in hairless rats. Toxicology. v.175, p. 37-47.

- Kataoka, A. P. A. G. 2001. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por micro-organismos isolados de “landfarming”. Tese (Doutorado)– Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro.

- Kowalick, W. W. Removing Impediments to the Use of Bioremediation and Other Inmovative Techonogies. In: Environmental Biotechnology for waste

Treatment. New York. G.S. SAYLER, R. FOX and J.W. Black Burns Editors. Plenum Press; p.53-60, 1991.

- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technology and Biotechnology, Zagreb, v.39, n. 4, p. 295-304.

- Koch, A. K.; Kappeli, O.;Fiechter, A.; Reiser, J. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in Pseudomonas aeruginosa mutants. Journal of Bacteriology, Washington v. 173, p. 4212-4219.

- Larini, L. Toxicidade dos praguicidas. In: Toxicologia dos praguicidas. São Paulo:Manole, p.918, 1999.

- Leahy, J. G.; Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews, v. 54, p. 305-315.

- Li, X.; Li, P.; Lin, X.; Zhang, C.; Li, Q.; Gong, Z. 2008. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. Journal of Hazardous Materials. 150 (1): 21–26.

- Lima, M.; Primaz, A.l.; Costa, J.A.V.; Colla, L.M. 2006. 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.]:

-

- Lloyd, R. 1992. Pollution And Freshwater Fish. U.S.A: Fishing News Books; p.176. In: Zagato, P. A; Bertoletti, E. 2006. Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações. São Carlos, SP. RIMA; p. 96.

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

- 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).

- Maciel, C.C.S.; Sousa, C.S.; Silva, R˙; Villela, A.L.S.; Souza, M.F.V.Q.; Gusmão, N.B. 2008. Degradação de Querosene de Aviação Por Penicillium spp. Revista Diálogos & Ciência, ano 8, nº 23.

- Maciel, J. M. 2009. Biodegradação de querosene por culturas isoladas e em consórcio, aplicando a técnica de bioestimulação. Monografia da graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

- Maier, R. M. Microorganisms and organics Poluants. In: Maier, R.M.; Peppre, I.L. E Gerba, C.P. 2000. Environmental Microbiology. New York: Academic Press; cap.16, p.363-402.

- 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.

- 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.

- Mazzuco, L. M. 2004. Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo Diesel. 86f. 2004. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- Melgues-Figueredo, L. H. 1999. Investigação das Contribuições Antrópicas e Naturais em Sedimentos Costeiros Utilizando-se Hidrocarbonetos Marcadores. Tese de Doutorado, Departamento de Química, Pontifícia universidade Católica, Rio de Janeiro, p.151.

- Melo, E. J. V. 2005. Biodegrabilidade de Naftaleno por Linhagens de Bactérias Isoladas do Terminal Portuário de Suape-PE. Universida Federal de Pernambuco. p.16-25.

- Melo, E. J. V. 2011. Degradação de petróleo por cultura mista de fungos e bactérias. Dissertação (mestrado)-Pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco.

- MMA-MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, RECURSO HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL. 1996. Perfil dos Estados Litorâneos do Brasil: Subsídios e Implantação do Programa Nacional de Gerenciamento Costeiro- p. 301.

- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. 2002. Microbiologia e bioquímica do solo. Editado pela UFLA, p. 277-283.

- Montgomery, D.C. 2000. Design and analysis of experiments. 5th John Wiley and sons, Inc. Arizona. USA.

- Muller-Hurting, R.; Wagner, F.; Roman, B.; Kosaric, N.1993. Biosurfactants: Production-Properties-Applications. New York: Marcel Derkker, INC.Cap. 17, p.447-469.

- Mulligan, C.N. 2005. Environmental Applications for Biosurfactants. Envi ronmental Pollution; v.133, p.183-198.

- Mutnuri, S.; Vasudevan, N; Kaestner, M. 2005. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. Applied Microbiology and Biotechnology, New York. 67(4): 569-576.

- Neilson, A. H.; Allard, A. S.; Reimberger, M. 1985. Biodegradation and Transformation Of Recalcitrant Compounds. In: The Handboo of Environmental Chemistry-Reactions and Processes.Vol 2, Part C. Edº H.

- Oliveira, E.C. et al. Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2006. p. 133-148.
- Paraszkiewicz, K; Kanwal, A.; Dlugonki, J. 2002. Emulsifier production by steroid transforming, filamentous fungus Curvularia lunata. Growth and product characterization, Journal of Biotechnology. 92:287-294.

- PaschoaL, C. M. R. B. 1996. Avaliação da Qualidade Ambiental de Cubatão. Dissertação de Mestrado. Universidade São Paulo, p. 114.

- 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.

- 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.

- Pedrozo, M.F.M.; Barbosa, E.M.; Corseuil, H.X.; Schneider, M.R.; Linhares, M.M. 2002. Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. Salvador: NEAMA, 246p.

- PETROBRAS. Centro de Estudos de Petróleo (CEPETRO). Disponível em www.cepetro.unicamp.br/petroleo acessado em: 18/11/2003. Apud: MELO, E. J. V. 2005. Biodegradabilidade de Naftaleno por Linhagens de bactérias Isoladas do Terminal Portuário de Suape-PE, Universidade Federal de Pernambuco.

- PETROBRAS-BR. Disponível em :www.br.com.br. Acesso em: 04 de abril de 2011.

- Pirôllo, M. P. S. 2006. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Ri Claro, SP.

- 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.

- Radwan, S.S.; Al-Hasan, R.H.; Ali, N.; Salamah, S.; Khanafer, M. 2005. Oil consuming microbial consortia floating in the Arabian Gulf. International Biodeterioration and Biodegradation. 56: 28–33.

- RAVATO. Disponível em www.ravato.com.br Acessado em 06 de fevereiro de 2009.

- Rene, E.R.; Murthy, D.V.S.; Swaminathan, T. 2005. Performance evaluation of a compost biofilter treating toluene vapours. Process Biochem. 40: 2771–2779.

- Regis, G. 2000. Tratamento eletrolitico das aguas residuarias de uma industria produtora de antioxidante de borracha visando sua biodegradacao. 117f. Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, SP.

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

- Rodriguez Jr., M.; Klasson, T.; Davison, B. H. 2000. Enhancement of the Biochemistry and Biothechnology; v. 91-93, p. 195-203.

- Rosato, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: Melo I. S; Azevedo, J. L. 1997. Microbiologia Ambiental. Jaguariúna. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, São Paulo; Cap.14, p.307-334.

- Santos, V. L.; Linard, V. R. 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potential. Process Biochemistry, v. 39, p. 1001-1006.

- Santos, L. S. E. 2002. Dissertação: Biodegradabilidade de óleo Diesel por micro-organismos nativos da areia da praia de Suape-Pe e predição de um

modelo relacionado ao derramamento do poluente. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

- Shabir, G.; Afzal,M.; Anwar, F.; Tahseen, R.; Khalid, Z. 2008. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. International Biodeterioration & Biodegradation 61 (2008) 161–166

- SEBRAE: Disponível em http://www.sebrae.com.br/setor/petroleo-e-gas acessado em 31 de dezembro de 2011.

- Semple, R. T.; Reid, B. J.; Fermor, T. R. 2001. Review: Impact of Contamination Strategies on the Treatment ol Soils Contaminated with Organic Polluants. Environmental Pollution; v.112, p.263-283.

- Shreve, R. N.; Brink Jr., J. A. Produtos Carboquímicos e Refinação de Petróleo. In: Indústrias de Processos Químicos. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.58-71 e 580-617, 1977. Appud MOREIRA, V. S. F. D. Biodegradação de Naftaleno, 1999.

- Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P. (org.). 2003. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, p. 7084.

- Singh, N.P.; Mccoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 175:184-191.

- Skladany, G.J., Metting Jr., F.B. Bioremediation of contaminated soil. p. 483 –513. In: Metting Jr, F.B. (ed.) Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker, Inc. New York. 1993. 646 p.

- Souza, F. A. S.D. 2009. Biodegradação de óleo Diesel por Candida lipolytica em água do mar. Dissertação (mestrado)- Universidade Católica de Pernambuco, Recife.158 f.

- Tavares, D.C. Estudos da possivel acao genotoxica do alcaloide boldina em sistemas de celulas de mamifero "in vitro" e "in vivo".1991. 205f. Tese (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Universidade do Estado de Sao Paulo, Ribeirao Preto, 1991.

- Tiburtius, E. R. L.; Peralta-Zamora, P.; Leal, E. S. 2004. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. Química Nova. v. 27, n. 3, p. 441-446.

- Tiquia, S. M.; N. F.; Hodgkiss, I. J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. Environonmental Polluition; 93 (3): 249-256.

- Uyttebroek, M.; Spoden, A.; Ortega-Calvo, J.; Wouters, K; Wattiau, P.; Bastiaens, L.; Springael, D. 2007, Differential responses of eubacterial, Mycobacteirum, and Sphingomonas communities in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil to artificially induced changes in PAH profile. Journal of environmental quality. 2007;36(5):1403-11.

- Ururahy, A.F.; Marins, M.D.M.; Vital, R.L.; Gabardo, I.T.; Pereira Jr., N. 1998a. “Efect of aeration on biodegradation of petroleum waste”. Rev. Microbiol. v.29 n. 4, p. 1-10

- Ururahy, A.F.P. 1998b. Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refenaria. 344. Tese (Doutorado em ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- Walter, M. V.; Crawford, R. L. 1997. Overview: Biotransformation and Biodegradation. In: HURST, C.J. et al. Manual of Environmental Microbiology. American Society for Microbiology; cap.76, p.707-708.

- Widdel, F.; Rabus, R. 2001. Anaerobic Biodegradation of Saturated and Aromatic Hidrocarbons.Biotechonology; 12, 259-276.

- Vogel, E.W. 1982. Assessment of chemically-induced genotoxic events. Prospectives and Limitations. Leiden, The Netherlands: Universitaire Pers Leiden, vol.2, 24p.

- Zanardi-Lamardo, E.; Bícego, M. C.; Prósperi, V. A.; Castro, B. M.; Miranda, L. B. The Southerm Brazil Sea. IN:Seas at Mileannium: An e Environmental Evolution, Volume I-Regional Chapters: Urope, The Americas and West Africa. C. Sheppard (ed). Elsevier Sciense Ltds., Chapter 47, p.731-747, 2000. In: Zagato, P. A; Bertoletti, E. 2006. Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações. São Carlos, SP. RIMA, pp 96.

- Zagato, P. A; Bertoletti, E. 2006. Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações. São Carlos, SP. RIMA, pp 96.