

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS**

**BIODEGRADABILIDADE DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO
MOVIMENTADO PELO TERMINAL PORTUÁRIO DE SUAPE-PE**

Edelvio de Barros Gomes

Recife – 2004

Edelvio de Barros Gomes

**BIODEGRADABILIDADE DE QUEROSENE DE AVIAÇÃO
MOVIMENTADO PELO TERMINAL PORTUÁRIO DE SUAPE-PE**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Fátima Vieira de
Queiroz Sousa

Recife – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR EDELVIO DE BARROS GOMES AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 19 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA
EXAMINADORA:

Prof Dr Nei Pereira Júnior
Escola de Química – UFRJ

Profª Drª Alda de Andrade Chiappeta
Departamento de Antibióticos – UFPE

Prof Dr Carlos Edison Lopes
Departamento de Antibióticos – UFPE

**“... sabemos pois, não viver, mas
transcorrer a vida, sábios incautos, tendo
as crianças por nossas mestras, e os
olhos cheios de eternidade...”**

Fernando Pessoa

**A João Ricardo: meu filho e
mestre.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa, pela orientação, pelos ensinamentos, pela compreensão e pelo carinho;

A Josy, pelo amor, pela dedicação e compreensão, sobretudo nas horas mais difíceis;

Aos meus pais, pela educação, pelos cuidados e pelo amor;

Aos meus irmãos, por sempre estarem do meu lado;

À Coordenação do Pós-Biotec, especialmente à professora Dr^a Alda de Andrade Chiappeta, pela atenção e compreensão de sempre;

Ao professor Dr Carlos Edison Lopes, pelo esclarecimento de dúvidas inerentes à dissertação e pela preciosa ajuda na correção dos textos em inglês;

Ao professor José Otamar Falcão de Moraes, pelo exemplo constante de amor à ciência;

Aos meus professores do Pós-Biotec, pelos ensinamentos;

À estagiária Patrícia Barros, pela presteza, pelo empenho e dedicação;

Às bolsistas do projeto BAPPD, Rita Miranda, Cynthia Souza, Adriana Vilaça e ao monitor Danilo Mamede, pelo apoio nos isolamentos dos microrganismos, pelos ensaios bioquímicos, e pelos momentos divertidos ao longo desses dois anos;

A todos os companheiros do mestrado, em especial a Renato Oliveira, Karen Pena e Patrícia Sobral, pelos bons momentos que passamos;

A Geíza Azeredo, pela amizade;

Ao pesquisador Dr Irapuan de Oliveira Pinheiro, pela ajuda no esboço dos gráficos, pelas sugestões e pelas palavras de apoio e incentivo nas horas de dúvida e angústia;

A TRANSPETRO Suape, pela obtenção das amostras de querosene, e pelas análises físico-químicas;

À bióloga Vilalba Soares do CPRH pela atenção com as análises de ecotoxicidade, pelos cuidados e pela amizade;

À química Juliana Manso, do Departamento de Química Fundamental da UFPE, pelas análises cromatográficas, pela atenção e pelo apoio;

À CAPES, ao projeto BAPPD e a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 POLUIÇÃO POR PETRÓLEO E DERIVADOS.....	6
3.1.1 Destino do Petróleo nos ambientes Aquáticos.....	6
3.1.2 Destino do Petróleo no solo.....	8
3.2 PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO.....	9
3.2.1 Processos Abióticos.....	9
3.2.2 Processo Biótico: Biorremediação.....	9
3.3 BIODEGRADABILIDADE DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.....	11
3.3.1 Fatores que Influenciam na Biodegradação.....	11
3.3.2 Biodisponibilidade.....	13
3.3.3 Aspectos Bioquímicos da Biodegradação de Hidrocarbonetos.....	14
3.3.4 Fenômenos de Interface.....	19
3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS DO QUEROSENE.....	22
3.5 ECOTOXICIDADE.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 AMOSTRA DE QUEROSENE.....	32

4.1.1	Caracterização da Química e Físico-Química da Amostra de Querosene.....	32
4.2	MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	33
4.2.1	Manutenção das Culturas Microbianas.....	34
4.2.2	Caracterização Preliminar dos Isolados.....	35
4.3	SELEÇÃO DAS LINHAGENS E ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS.....	35
4.4	ENSAIOS DE ACLIMATAÇÃO DAS LINHAGENS E ASSOCIAÇÕES SELECIONADAS.....	37
4.5	ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	40
4.6	ENSAIO DE ECOTOXICIDADE.....	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DA AMOSTRA DE QUEROSENE.....	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DOS ISOLADOS.....	47
5.3	SELEÇÃO DOS ISOLADOS E DAS ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS.....	48
5.4	ENSAIOS DE ACLIMATAÇÃO.....	53
5.5	ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	59
5.5.1	Tensão Superficial e Crescimento Microbiano.....	59
5.5.2	pH.....	66
5.5.3	Análises Cromatográficas.....	67
5.6	ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE.....	76
6.	CONCLUSÕES.....	79
7.	SUGESTÕES.....	82
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
9.	ANEXOS.....	93
9.1	ANEXO A – GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DE ACLIMATAÇÃO COM 7 E 15% DE QAV.....	93
9.2	ANEXO B – CROMATOGRAMAS DOS HIDROCARBONETOS DE QAVCOM 35 E 60 DIAS DE PROCESSO.....	98

9.3	ANEXO C - PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	106
9.4	ANEXO D – LAUDOS DOS TESTES DE ECOTOXICIDADE.....	110

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Sequência de reações de degradação de n-alcenos (BAKER & HERSON, 1994).....	15
2 Degradação inicial do benzeno: (a) Formação do catecol e (b) formação do protocatecolato (SEEGER <i>et al</i> , 1997).....	17
3 Clivagem do anel aromático (a) Ortoclivagem (b) Metaclivagem (BAKER & HERSON, 1994).....	18
4 Esquema de uma micela(ALEXANDER, 1994).....	22
5 Tanque nº 6 do Terminal de Armazenagem conjunta de Suape-PE.....	32
6 Placas contendo o meio Tripitic-Soy-Agar para a contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro.....	40
7 Experimentos de biodegradação em frascos de Fernbach.....	41
8 Perfil cromatográfico da amostra de querosene quanto aos hidrocarbonetos totais do petróleo.....	44
9 Aspecto macroscópico dos oito isolados bacterianos obtidos de amostra de solo contaminado por petroderivados.....	48
10 Viragem do indicador DCPIP pelo isolado B6 no meio Büshnell-Haas, após 15 horas de cultivo.....	48
11 Viragem do indicador DCPIP pelos isolados B5, B6 e B7 após 15, 67 e 172 horas de cultivo, respectivamente.....	49
12 Viragem do indicador DCPIP pelas associações que contém o isolado B6 após 10 horas de cultivo.....	50
13 pH dos isolados e do controle abiótico no início e após 20 dias de experimento.....	51
14 pH dos controles (biótico e abiótico) e das associações microbianas, no início e após 20 dias de experimento.....	51
15 Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem B6 em função do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2).....	54
16 Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39 ao longo do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2).....	55
17 Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da associação B6B5 em função do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2).....	56
18 Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da associação B6B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2).....	57
19 Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano do consórcio B5B6B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2).....	57
20 Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem B6 ao	

	longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2).....	60
21	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2).....	61
22	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da associação B6B5 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2).....	61
23	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da associação B6B7 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2).....	62
24	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano do consórcio B5B6B7 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2).....	62
25	Percentuais de hidrocarbonetos de querosene após 35 dias de biodegradação com as linhagens isoladas (B6 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39) e os consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7), utilizando o bioestímulo N1.....	71
26	Percentuais de hidrocarbonetos de querosene após 35 dias de biodegradação com as linhagens isoladas (B6 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39) e os consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7), utilizando o bioestímulo N2.....	72
27	Percentuais de hidrocarbonetos de querosene após 60 dias de biodegradação com as linhagens isoladas (B6 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39) e os consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7), utilizando o bioestímulo N1.....	73
28	Percentuais de hidrocarbonetos de querosene após 60 dias de biodegradação com as linhagens isoladas (B6 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39) e os consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7), utilizando o bioestímulo N2.....	74
29	Cromatogramas do isolado B6 C:N 200:1 (a) após 60 dias; (b) após 35 dias e (c) controle abiótico.....	77
30	Cromatogramas do isolado B6 C:N 50:1 (a) após 60 dias; (b) após 35 dias e (c) controle abiótico.....	78
A.1	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano do isolado B6 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	93
A.2	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	93
A.3	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B6B5 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	94
A.4	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista	

	B6B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	94
A.5	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B5B6B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	95
A.6	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano do isolado B6 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	95
A.7	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	96
A.8	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B6B5 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	96
A.9	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B6B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	97
A.10	Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B5B6B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2).....	97
B.1	Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B5B6B7 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N1.....	98
B.2	Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B5B6B7 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N2.....	99
B.3	Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B6B5 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N1.....	100
B.4	Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B6B5 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N2.....	101
B.5	Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B6B7 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N1.....	102
B.6	Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B6B7 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N2.....	103
B.7	Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela linhagem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39 (a) com 35 e (b) com 60 dias de	

	processamento, com bioestímulo N1.....	104
B.8	Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela linhagem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DAUFPE 39 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N2.....	105

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Composição do Petróleo (BAKER & HERSON, 1994).....	6
2 Tecnologias de Tratamento de Biorremediação (BAKER & HERSON, 1994).....	9
3 Solubilidade em água de alguns hidrocarbonetos do petróleo (ALEXANDER, 1994).....	19
4 Composição do querosene JP-8 (KANIKKANNAN <i>et al</i> , 2001).....	23
5 Especificações para querosene de aviação (ANP, 2000).....	24
6 Comparação entre os critérios (padrão e sugerido) para a seleção de organismos indicadores usados em teste de ecotoxicidade (CHAPMAN, 1999).....	30
7 Meio mineral de Büshnell-Haas (ATLAS, 1995b).....	34
8 Meio Tripitic-Soy-Agar (ATLAS, 1995b).....	34
9 Meio de Büshnell-Haas modificado utilizado no bioestímulo N1 (relação C:N = 200:1), para vários percentuais de querosene (1% a 15%).....	38
10 Meio de Büshnell-Haas modificado utilizado no bioestímulo N2 (relação C:N = 50:1), para vários percentuais de querosene (1% a 15%).....	39
11 Condições operacionais do sistema GC-MS.....	42
12 Hidrocarbonetos encontrados na amostra de querosene e suas respectivas concentrações.....	44
13 Características físico-químicas da amostra de querosene.....	46
14 Características microscópicas e bioquímicas dos isolados, quanto à morfologia, provas bioquímicas de catalase, citocromo oxidadse e teste tintorial de Gram.....	47
15 Tensão superficial, inicial e após 20 dias de experimento, com os isolados B4, B5, B6 e B7.....	52
16 Tensão superficial, inicial e após 20 dias de experimento, com as associações microbianas.....	53
17 pH, inicial e final, dos ensaios de aclimatação a 1% de querosene, submetidos aos bioestímulos N1 e N2.....	59
18 Valores de tensão superficial, iniciais e após 60 dias, dos ensaios de biodegradação, submetidos aos bioestímulos N1 e N2.....	64
19 pH inicial e com 60 dias de biodegradação.....	66
20 Compostos identificados no querosene.....	68
21 Percentuais residuais dos hidrocarbonetos do QAV, após 35 dias de biodegradação, com as culturas B6, B6B5, B6B7, <i>P. aeruginosa</i> DAUFPE 39 e B5B6B7 utilizando os bioestímulos N1 e N2.....	69
22 Percentuais residuais dos hidrocarbonetos do QAV, após 60 dias de biodegradação, com as culturas B6, B6B5, B6B7, <i>P. aeruginosa</i> DAUFPE 39 e B5B6B7 utilizando os bioestímulos N1 e N2.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANP – Agência Nacional de Petróleo
- ASTM – American Society for Testing and Materials
- BH – Meio mineral de Büshnell-Haas
- CPRH – Companhia Pernambucana de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
- $C_L 50$ – Concentração letal para 50% do organismo testado
- C:N – Relação nutricional carbono-nitrogênio
- C:N:P – Relação nutricional carbono-nitrogênio-fósforo
- DANTI – Departamento de Antibióticos
- DCPIP – 2,6 Diclorofenol, indofenol
- DIN – Deutsches Institut für Normung
- DQF – Departamento de Química Fundamental
- $d_{\text{querosene}}$ = Densidade da amostra de querosene utilizada
- GC-MS – Gas Chromatograph / Mass Spectrometer
- HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
- HTP – Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
- K_{OW} – Coeficiente de partição octanol/água
- $mC_{\text{aprox.}}$ – Massa aproximada de carbono na amostra de querosene
- mC_{desejada} – Proporção de carbono desejada na relação C:N
- $mNH_4NO_3_{\text{desejada}}$ – Massa de nitrato de amônio para compor o meio de cultivo
- QAV – Querosene de Aviação
- TRANSPETRO – Petrobrás Transportes S.A.
- TSA – Tryptic Soy Agar
- TS – Tensão superficial
- UFC – Unidades Formadoras de Colônias
- UNTA-Suape – Unidade de Negócios e Transportes Aquaviários de Suape
- $V_{\text{querosene}}$ = Volume da amostra de querosene utilizado no meio de cultivo

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar a degradação do querosene de aviação (QAV) movimentado pelo terminal portuário de Suape – PE, por isolados bacterianos autóctones. Oito linhagens (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 e B8), isoladas de amostras de solo contaminado por petroderivados, provenientes da região da Lagoa da Barra, Suape - PE, e uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, proveniente de coleção, foram utilizadas. Culturas puras e mistas foram selecionadas quanto ao seu potencial degradador utilizando-se a técnica do indicador 2,6 Diclorofenol indofenol através da verificação da ocorrência de oxidação biológica, indicada pela mudança na coloração do meio de Büshnell-Haas (BH) em frascos de 250mL. As culturas selecionadas foram aclimatadas em frascos de 500mL por 12 dias em concentrações crescentes de QAV variando de 1 a 15%, e utilizando-se a relação C:N de 200:1 (bioestímulo N1) e de 50:1 (bioestímulo N2), em meio de BH modificado. Ensaio de biodegradação com 15% de querosene em frascos de 2800mL, foram realizados, submetendo-se as culturas selecionadas às mesmas condições anteriores, por 60 dias. A cultura pura B6, e as culturas mistas B6B5, B6B7, B6B4 e B4B5B6B7 foram as selecionadas na etapa inicial. O bioestímulo N2 promoveu uma maior degradação do combustível pelas culturas puras e mistas do que o bioestímulo N1. Quanto à avaliação da biodegradabilidade, a cultura pura B6 apresentou os maiores percentuais de redução dos nove constituintes analisados do querosene. A linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, apresentou grande capacidade adaptativa à fonte de carbono, podendo ser utilizada como cultura alóctone em estudos de biodegradabilidade envolvendo bioaumento.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the degradation of jet fuel from Suape Port Terminal – PE, Brazil, by autochthonous bacterial isolates. Eight isolates from contaminated soil samples by petroleum derivatives, and a known bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, were utilized. Pure and mixed cultures were selected by means of investigations on its degradative abilities, by utilizing the redox indicator 2,6 Dichlorophenol indophenol (DCPIP), and observing changes in color of the mineral Büshnell-Haas medium (BH), that indicates occurrence of biological oxidations. Selected cultures were acclimated in 500mL flasks containing BH medium containing two C: N ratio: C:N ratio 200:1 (biostimulation N1) and C:N ratio 50:1 (biostimulation N2), simultaneously, concentrations of jet fuel were augmented from 1 to 15%, and cultures were allowed to grow for 12 days in each jet fuel concentration. Biodegradation assays in flasks (2800mL) were conducted at the same biostimulation conditions described before, only in 15% jet fuel concentration in BH modified media, by 60 days. The B6 pure culture and mixed cultures B6B5, B6B7, B6B4 and B4B5B6B7, were selected on the selection procedure. The N2 biostimulation promoted higher degradation of the jet fuel by the selected pure and mixed cultures than N1 biostimulation. The highest degradation values of the nine constituents of jet fuel sample, were observed by utilizing B6 isolate in N2 biostimulation. Bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39 demonstrate high adaptation to carbon source, and hence, could be a successful autochthonous culture in biodegradation studies involving bioaugmentation.

1. INTRODUÇÃO

Nas diversas atividades humanas são consumidas e produzidas grandes quantidades de energia. Atividades agrícolas, industriais e extrativistas, responsáveis pela sustentação e sobrevivência das populações mundiais, requerem montantes extras de energia. A maior parte dessa energia é produzida por combustíveis fósseis. Dentre os combustíveis fósseis, o petróleo é o mais importante por ser o mais amplamente explorado e utilizado, sendo responsável pelo sustento tecnológico da civilização. Embora surjam tecnologias alternativas de utilização de recursos renováveis, como uma nova perspectiva para a produção de energia, o petróleo ainda é o recurso que predomina devido aos fatores econômicos e políticos, sendo considerado o “esteio da civilização contemporânea” (TIMMIS & PIEPER, 1998).

A contaminação de lençóis freáticos, solos, ambientes estuarinos e marinhos decorrente de atividades petrolíferas, devido às falhas inerentes aos processos de extração, produção, transporte e armazenamento de petróleo e de seus derivados, tem sido uma das maiores preocupações da sociedade civil e de órgãos governamentais nas últimas três décadas. Devido aos derramamentos acidentais de óleo cru e petroderivados, grande quantidade de material recalcitrante se acumula em ambientes aquáticos, em zonas costeiras e em regiões próximas a terminais de transporte e distribuição de combustíveis (OUDOT, 1994; ALEXANDER, 1994).

As diferentes frações de derivados de petróleo ocupam posições intermediárias de recalcitrância, variando desde os mais biodegradáveis até os moderadamente recalcitrantes (BARTHA, 1996). O acúmulo de petróleo e seus derivados no meio ambiente tem efeito tóxico sobre os seres vivos. Essa toxicidade pode ser avaliada pela taxa de mortalidade de organismos representativos de importância econômica ou ecológica (CHAPMAN, 2002; JUVONEM *et al*, 1999). O efeito tóxico do material no ambiente pode ser minimizado por métodos abióticos (remoção, separação, adição de surfactantes, decomposição fotoquímica), e por ação biológica (biorremediação) (ATLAS 1995a; ATLAS 1995c).

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza microrganismos ou processos microbianos para degradar contaminantes ambientais, sendo desta forma considerada uma “solução verde” (ATLAS, 1995a; ATLAS, 1998; MAIER, 1999). Embora a biorremediação seja vista como uma tecnologia emergente, há registros da utilização de microrganismos em processos de descontaminação e tratamento de dejetos industriais e municipais de pelo menos cem anos. Os processos de biorremediação modernos diferem dos anteriores basicamente no que diz respeito ao tipo de substância envolvida e à matriz onde é feita a biorremediação. Particularmente, a biorremediação de petróleo e de seus derivados, bem como de pesticidas, é uma preocupação mais recente da sociedade que reivindica por soluções rápidas e eficazes. A *priori*, o resultado da biorremediação vai depender da genética, do metabolismo e da fisiologia dos microrganismos empregados no processo (ECKENFELDER 1989).

Estatísticas mostram que, no Brasil, atividades como: carga e descarga de petróleo e derivados, operações de lavagem de tanques de navios, tratamentos de óleo entre outras, contribuem com 90% da poluição por hidrocarbonetos de petróleo. Acidentes com transporte contribuem com apenas de 5 a 10% da poluição, porém, sua ocorrência é muito mais danosa ao ambiente, caso não seja controlada rapidamente (VITAL, 1992; URURAHY, 1998; URURAHY *et al* 1998).

Nos últimos anos, a Petróleo do Brasil S.A. (PETROBRÁS), até então responsável pela produção, refino, transporte, armazenamento e distribuição do petróleo no Brasil, experimenta uma nova realidade no mercado nacional de petróleo. A quebra do monopólio estatal traz consigo perspectivas de novos empreendimentos, uma exploração de petróleo mais intensa e uma maior produção de petroderivados. Por conseqüência, novas estratégias estarão sendo definidas com o intuito de manter a competitividade, com excelência em gerenciamento ambiental e segurança operacional (MENICONI *et al*, 2002). Com a perspectiva de desenvolver novas tecnologias, quer seja para aperfeiçoar a segurança na exploração e no transporte, quer seja na mitigação dos danos ambientais causados por derrames rotineiros e acidentais, novos estudos estão sendo desenvolvidos.

O Terminal Portuário de Suape-PE abriga importantes distribuidoras de combustíveis de petróleo. O querosene de aviação, comercialmente conhecido como QAV, é hoje o terceiro produto mais movimentado do Terminal (CAVALCANTI, 2002). O armazenamento e o transporte de QAV podem trazer riscos de contaminação ambiental, quer seja no solo, no mar ou em rios.

A contaminação do solo e água por petroderivados tem se tornado uma preocupação crescente nas últimas décadas. A tecnologia de degradação desses poluentes, envolvendo o emprego de microrganismos, constitui uma alternativa ecologicamente adequada para recuperar locais impactados por atividades petrolíferas. Sendo assim, a avaliação da degradabilidade do querosene, armazenado no Terminal Portuário de Suape, por microrganismos autóctones, bem como a análise da ecotoxicidade do material biodegradado, são investigações bastante oportunas para os tempos atuais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a degradação do querosene de aviação, movimentado pelo Terminal Portuário de Suape, por isolados bacterianos autóctones.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar linhagens e associações microbianas mais promissoras;
- Efetuar ensaios de aclimatação, em várias concentrações do poluente;
- Realizar ensaios de biodegradabilidade com os isolados e consórcios selecionados, variando a relação carbono/nitrogênio;
- Avaliar a ecotoxicidade do material mais biodegradado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 POLUIÇÃO POR PETRÓLEO E DERIVADOS

A formação e origem do petróleo, remonta à era paleozóica, período permiano, a partir de organismos existentes em mares rasos extintos. Em sua grande maioria, o petróleo e seus derivados são formados por uma mistura complexa de compostos orgânicos. A maior parte desses compostos são hidrocarbonetos cuja composição abrange uma complexa variedade de líquidos, gases, n-alcenos, parafinas ramificadas, parafinas cíclicas, compostos aromáticos e outros compostos orgânicos que servem como fonte de carbono para uma grande variedade de microrganismos. A fração líquida total do petróleo é denominada de óleo cru, a qual é constituída de quatro classes principais de hidrocarbonetos: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos (FLOODGATE, 1984; WALTER *et al*, 1997; GLAZER & NIKAIDO, 1995; ATLAS, 1995a, 1995c). A tabela 1 mostra as principais frações de petróleo obtidas por destilação, e suas respectivas composições.

Embora seja de origem biogênica, as características do petróleo têm sido alteradas ao longo dos séculos por processos geológicos. Durante milhares de anos, estas alterações têm concorrido para a evolução e adaptação de microrganismos, tornando-os aptos a degradar hidrocarbonetos. Entretanto, a ação antrópica nos últimos dois séculos tem sido responsável pela aceleração da formação de novos compostos que são lançados no ambiente, e que, por sua vez, são mais recalcitrantes e tóxicos que os compostos de origem (ATLAS & BARTHA, 1972; ATLAS, 1995a; ATLAS, 1995c).

Derramamentos de óleo têm sido, freqüentemente, divulgados pela mídia e relatados através dos trabalhos na área de biorremediação (GUPTA *et al* 1995; CHO *et al*, 1997; RUBERTO *at al*, 2003). O caminho percorrido pela fonte oleosa, sua dispersão, bem como os danos causados aos ecossistemas, variam de um ambiente para outro.

Tabela 1 . Composição do 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 e 10 átomos de carbono. Ciclanos e alquilbenzenos estão presentes.
Querosene/ óleo Diesel n.º 1	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 28 átomos de carbono
Asfálticos	Compostos policíclicos pesados

3.1.1 Destino do Petróleo nos Ambientes Aquáticos

Devido ao espalhamento lateral do óleo, a dificuldade de sua contenção na superfície da água e aos danos causados a biota marinha, maior atenção tem sido dada a remediação de ambientes aquáticos. Nestes ambientes, o petróleo, provoca a morte de peixes, aves marinhas e outras formas de vida. O óleo derramado pode permanecer por mais ou menos tempo numa determinada área, dependendo da corrente marinha, da sua composição e de uma série de fatores, tais como: físicos (turbulência da água), químicos (fotodecomposição), e biológicos (biodegradação), o que determinará o seu destino no mar, o seu grau de toxicidade e o seu tempo de persistência (ATLAS, 1984).

As águas dos mares e oceanos são constituídas de uma mistura de sais cuja concentração varia de acordo com a estação do ano e a região geográfica. Esta variação associada à degradação química e física do petróleo contribui para a formação de centenas de compostos complexos, com graus específicos de toxicidade e recalcitrância (FLOODGATE, 1984).

As descargas no mar, apesar de serem quase sempre em maior quantidade do que em terra, são mais susceptíveis a biodegradação. Devido ao menor tempo de residência das águas dos mares, o óleo nessas áreas tem mais facilidade de ser biodegradado do que em áreas próximas a estuários, onde o tempo de residência das águas é bem maior, causando maiores danos à biota local. O tempo de residência da água está diretamente relacionado ao aporte de minerais e de oxigênio que são fatores de elevada importância na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (ATLAS, 1981a; ATLAS, 1984; ATLAS, 1981b; ATLAS, 1995a).

Grande parte das descargas de petróleo e de petroderivados se dá por lavagens de tanques de navios em alto mar. Após a descarga do produto, os tanques são cheios com a água do mar, para que seja mantida a estabilidade do navio. Antes de fazer uma nova carga com produto, essa água é descartada no mar, e com ela, são descartadas algumas dezenas de milhares de litros de petroderivados. Outra forma, bem mais drástica, se dá pelo vazamento de produto por naufrágios, decorrentes de rupturas na estrutura do navio. Em regiões próximas a terminais portuários, a possibilidade de ocorrer derrames devido às falhas operacionais é bastante freqüente (LEVY *et al*, 1981; WHYTMAN *et al*, 1975).

O petróleo é encontrado no ambiente marinho em quatro estados: filme, solução, emulsão e em grumos. Muitos tipos de óleos são espalhados rapidamente e reduzidos a uma camada muito fina. A espessura dessa camada numa área de águas paradas dependerá: da taxa de evaporação, da tensão superficial do óleo e da água do mar neste local e o acúmulo de hidrocarbonetos, nesta camada, afeta diretamente a vida marinha que se encontra imediatamente abaixo dela (ATLAS, 1984). Os grumos são

encontrados em tamanhos variados, sendo depositados no fundo do mar devido ao seu peso e essas partículas se acumulam e se complexam, formando uma camada de material altamente recalcitrante (MARTY & SALIOT, 1976).

Nos rios e lagos, o petróleo e seus derivados podem persistir por mais tempo, dependendo da natureza do óleo e da sua composição, além do tempo de residência da água, que nesses casos é bem maior que nos mares e oceanos. Por exemplo, os óleos leves, que são ricos em material tóxico constituído por aromáticos voláteis, permanecem menos tempo que os óleos pesados e os combustíveis marítimos. O óleo cru, por sua vez, é menos susceptível a degradação do que os seus derivados (ATLAS & BARTHA, 1972).

3.1.2 Destino do Petróleo no Solo

Sabe-se que, no solo, o óleo além de sofrer processo de fotodecomposição, percola e pode atingir o lençol freático (BARTHA 1996). Em ambientes terrestres a distribuição dos derivados líquidos de petróleo é pontual, com espalhamento lateral pouco extenso e de fácil controle. A área atingida no solo é bem pequena quando comparada à área de mesma quantidade de poluente derramado no mar ou mesmo em lagoas. Os principais problemas da contaminação em solo estão relacionados ao espalhamento vertical (percolação), devido ao constante risco de atingir o lençol freático (CORSEUIL *et al* 1997). A natureza físico-química do solo e o tamanho de suas partículas influenciam diretamente na percolação e na degradação do poluente. Frações de argila e silte-argila, por exemplo, são mais susceptíveis à formação de complexos com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que as frações de areia. Tal fenômeno se deve não somente à granulometria, mas também à presença de argilo-minerais que são capazes de formar complexos com substâncias cíclicas de baixo peso molecular e alquil-substituídas (AMELLAL *et al*, 2001; NOCENTINI *et al* 2000; IJAH, 1998; IJAH & ANTAI, 2003).

3.2 PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO

3.2.1 Processos Abióticos

Os processos abióticos de descontaminação de áreas poluídas são definidos como aqueles que envolvem métodos químicos ou físicos de remoção de poluentes. Os métodos químicos mais comuns são: a neutralização, a precipitação, oxidação, aplicação de surfactantes e a extração por solventes (KOVALICK, 1991; PIÑA *et al*, 2002; YERUSHALMI *et al*, 2003). Há de se ressaltar ainda a remoção por separadores de água e óleo, que é um método mecânico simples baseado na diferença de densidade entre a água e a fase oleosa apolar (MAIER 1999).

Alguns processos abióticos ocorrem naturalmente, não dependendo de aplicação de métodos físicos ou químicos, como é o caso da evaporação. A fotoxidação ou fotodecomposição é outra forma natural de atenuação do poluente, que é observável em locais contaminados, sendo esse processo o responsável pela transformação do petróleo em ambientes aquáticos (PATEL *et al* 1979; FERNANDES, 1994).

3.2.2 Processo Biótico: Biorremediação

Devido à complexidade dos poluentes, heterogeneidade dos ambientes e o grau de dissolução do poluente no ambiente, o sucesso da biorremediação depende de uma relação interdisciplinar com outras ciências como: geologia, ecologia, engenharia, microbiologia e química (IJAH & ANTAI, 2003).

A biorremediação pode ser definida como um processo espontâneo ou controlado, no qual a catálise biológica age sobre o poluente, e desta forma, remedia ou elimina contaminantes ambientais. Quanto ao local onde ocorre, ela pode ser classificada como:

Biorremediação *in situ* – é o tipo de biorremediação que ocorre no local onde houve o derrame e os microrganismos presentes no sítio poluído conduzem o processo de biodegradação. Pode ocorrer com a adição de nutrientes para aumentar a

velocidade de biodegradação, sendo esse procedimento chamado de bioestímulo, ou com a adição de microrganismos exógenos à microbiota nativa, o bioaumento. Exemplo: bioventing (WALTER, 1997; KOWALICK, 1991).

Biorremediação ex situ – modalidade de biorremediação que envolve a remoção do material contaminado para outra área. Exemplos: biorreatores, *landfarming*, compostagem (GLAZER & NIKAIDO, 1995; ALEXANDER, 1994).

A tabela 2 mostra as principais técnicas de biorremediação e suas características (BAKER & HERSON, 1994).

Tabela 2 . Tecnologias de Tratamento de Biorremediação (BAKER & HERSON, 1994)

Técnica	Descrição
Bioaumento	Adição de culturas bacterianas ao meio contaminado; freqüentemente usada em biorreatores e sistemas <i>ex situ</i> .
Biofiltros	Uso de colunas de suspensão microbiana para tratar emissões de gases
Bioestímulo	Estimulação da população nativa . Pode ser feita <i>in situ</i> ou <i>ex situ</i>
Biorreatores	Biodegradação em um container ou reator; pode ser usada para tratar líquidos ou lodo
Bioventing	Tratamento de solo contaminado , através da passagem de oxigênio pelo solo para estimular o crescimento e atividade microbianas.
Compostagem	Tratamento aeróbico, termofílico, no qual o material contaminado é misturado; pode ser feito usando pilhas estáticas, ou reatores de alimentação contínua

Segundo Baker & Herson (1994) as principais vantagens da biorremediação são:

- Pode ser feita no local;
- Mantém ruptura mínima do sítio contaminado;
- Eliminação de custos de transportes;
- Eliminação de poluentes de forma permanente;

- Elimina persistência prolongada de determinados poluentes.

3.3 BIODEGRADABILIDADE DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

3.3.1 Fatores que Influenciam na Biodegradação

A biodegradação de materiais orgânicos no ambiente é mediada geralmente por bactérias e fungos. As bactérias possuem características metabólicas diversas que as colocam num grupo de microrganismos de reconhecida atividade degradadora. Variabilidade genética, crescimento rápido e facilidade para se aclimatar rapidamente em diversos ambientes são as principais características. Essas características são fundamentais na seleção de microrganismos para processos de biorremediação. A otimização de parâmetros como: pH, nutrientes, oxigênio e temperatura possibilitam um melhor desempenho dos microrganismos na biodegradação. Uma máxima eficiência nesse processo de biodegradação levará a mineralização do poluente com a produção de CO₂ e água (FRANKENBERGER Jr, 1992; ATLAS & BARTHA, 1972).

Os principais fatores ambientais que afetam a biodegradabilidade são:

- **Disponibilidade de Oxigênio**

Geralmente, sob condições aeróbicas, a biorremediação ocorre mais facilmente. Regiões próximas à superfície do solo têm demonstrado maior velocidade na taxa de biodegradação, enquanto que em regiões mais profundas verifica-se que estas taxas diminuem (NOCENTINI *et al*, 2000; AMELLAL, 2001).

- **Presença de Matéria Orgânica**

A presença de matéria orgânica pode indicar a presença de elementos alternativos que aumentam a taxa de biodegradação (IJAH, 1998).

- **Disponibilidade de Nitrogênio e Fósforo**

Bactérias heterotróficas e fungos, além de uma fonte de carbono, necessitam para o crescimento, de um outro grupo de nutrientes e de um aceptor de elétrons. Este

aceptor de elétrons é o O₂ para os aeróbios mas pode ser nitrato, sulfato, CO₂, ferro férrico ou compostos orgânicos para bactérias que tem habilidades para utilizar essas substâncias como acceptor de elétrons no processo de metabolização da fonte de energia. Muitas bactérias ou fungos requerem baixas concentrações de vitaminas, aminoácidos, vitaminas lipossolúveis, que são moléculas orgânicas chamadas de fator de crescimento. A ausência dessas moléculas no ambiente, pode prejudicar o crescimento microbiano (ATLAS & BARTHA 1972). Descargas de óleo por vazamentos acidentais de tanques de navios, em ambientes marinhos e estuarinos, têm suscitado muitos estudos a respeito das condições nutricionais em tais ambientes. Estas investigações mostram que a degradação do óleo em água do mar é mais rápida quando compostos à base de nitrogênio e fósforo são adicionados (FERNANDES, 1994; RAMADAN, 1990).

▪ **Temperatura**

A temperatura varia de ambiente para ambiente e de acordo com a sazonalidade. Para um determinado aumento ou decréscimo de temperatura a magnitude da resposta quanto à biodegradação varia com o ambiente e com o tipo de poluente, o que é refletido na fisiologia dos microrganismos envolvidos. Em geral, temperaturas ideais para a biodegradação, estão na faixa entre 20 e 35 °C (LEAHY & COLWELL, 1990).

▪ **pH**

Para a maioria dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação, a faixa de pH mais favorável para o seu crescimento se situa entre 6,0 e 8,0 com um valor ótimo em torno de 7,0, sendo que os fungos são mais tolerantes à condições ácidas. Em solos, os valores de pH podem ser muito variados, estendendo-se desde de 2,5 a 11,0 em solos ácidos e em desertos alcalinos, respectivamente. Esse parâmetro influencia negativamente a capacidade dos microrganismos degradarem hidrocarbonetos em solo (ATLAS, 1998; LEAHY & COLWEL, 1990).

- **Salinidade**

Alta salinidade parece afetar negativamente a atividade microbiana. É sabido que os fungos resistem menos às condições de alta salinidade do que as bactérias. Em ambientes costeiros, a biorremediação é afetada pela alta concentração salina (YANG *et al*, 1999; DEL'ARCO & FRANÇA, 1999).

- **Atividade de Água**

A atividade de água se refere à quantidade de água que efetivamente está disponível para os microrganismos no processo de biodegradação. Esta atividade está condicionada ao tipo de solo e à estrutura do poluente (DIBBLE & BARTHA, 1976).

Além dos fatores já mencionados, pode-se citar ainda um fator biótico importante, que é a predação por protozoários. Alguns protozoários são predadores naturais de bactérias e sua presença, muitas vezes, é inevitável no ambiente que precisa ser biorremediado (RAMADAM *et al* 1990).

3.3.2 Biodisponibilidade

Para que haja uma biodegradação efetiva, além das condições físicas e ambientais já mencionadas, é necessário também que os compostos com baixa toxicidade estejam sob formas disponíveis, de modo que seja possível a assimilação pelos microrganismos. A estrutura dos compostos pode influenciar a velocidade de biodegradação por estar relacionada com a disponibilidade do composto à ação microbiana. Em função da estrutura espacial do composto, pode-se prever se o mesmo será mais ou menos biodegradado em relação a um outro de estrutura diferente (efeito espacial). Compostos ramificados, por exemplo, são mais difíceis de serem degradados do que compostos de cadeia normal. Também em função da eletronegatividade dos ligantes, pode-se prever a biodisponibilidade do composto em relação a um outro (efeito eletrônico). Quanto maior for a eletronegatividade do ligante, menor será a

biodisponibilidade e conseqüentemente menor será a taxa de biodegradação (MAIER 1999).

Os compostos orgânicos que contaminam solos podem ser modificados por processos químicos de polimerização, podendo resultar na formação de uma nova substância menos susceptível a biodegradação. Estes compostos podem ainda reagir com ácido húmico ou serem “seqüestrados” por substâncias que não lhes alteram a composição, mas os tornam indisponíveis para os microrganismos (AMELLAL *et al*, 2001).

3.3.3 Aspectos Bioquímicos da Biodegradação de Hidrocarbonetos

Algumas generalizações podem ser feitas acerca do processo de biodegradação de hidrocarbonetos, como as que se seguem:

- a. Hidrocarbonetos alifáticos são geralmente mais facilmente biodegradados que os aromáticos;
- b. Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia normal são mais fáceis de serem biodegradados que os de cadeia ramificada. A introdução de uma ramificação dentro de uma molécula do hidrocarboneto diminuirá sua degradabilidade;
- c. Hidrocarbonetos saturados são mais susceptíveis à degradação que os insaturados. A presença de dupla ou tripla ligação C-C dificulta a biodegradação;
- d. Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa são mais facilmente degradados que os de cadeia curta. Hidrocarbonetos com menos de nove átomos de carbono são mais difíceis de serem degradados devido à sua toxicidade para os microrganismos. Muitos microrganismos especializados (ex: metanotróficos) podem degradar esses hidrocarbonetos e o comprimento

de cadeia ótimo para a biodegradação parece ser de dez a vinte átomos de carbono (BRITON, 1984).

Os alcanos de cadeia normal são degradados primariamente por oxidação do grupo metil terminal, seguido de uma clivagem da molécula na região entre o segundo e o terceiro carbono da cadeia (β -clivagem). Outras vias como a oxidação sub-terminal pela metanooxigenase encontrada em *Pseudomonas methanica*, também tem sido documentada (BRITON, 1984). A reação inicial na degradação do grupo metil envolve a adição direta do oxigênio ao carbono terminal do hidrocarboneto. Esta reação é mediada por uma classe de enzimas chamadas oxigenases. A adição do oxigênio ao carbono primário promove a formação de um álcool primário, que é oxidado a aldeído e finalmente transformado a ácido graxo. Um fragmento longo de dois carbonos terminais é clivado produzindo o acetil CoA, que entra na via metabólica do ciclo de Krebs. Uma repetição seqüencial destas reações resulta na completa oxidação da molécula de hidrocarboneto. Na figura 1, observa-se a seqüência de reações proposta como via de degradação de alcanos (BAKER & HERSON, 1994).

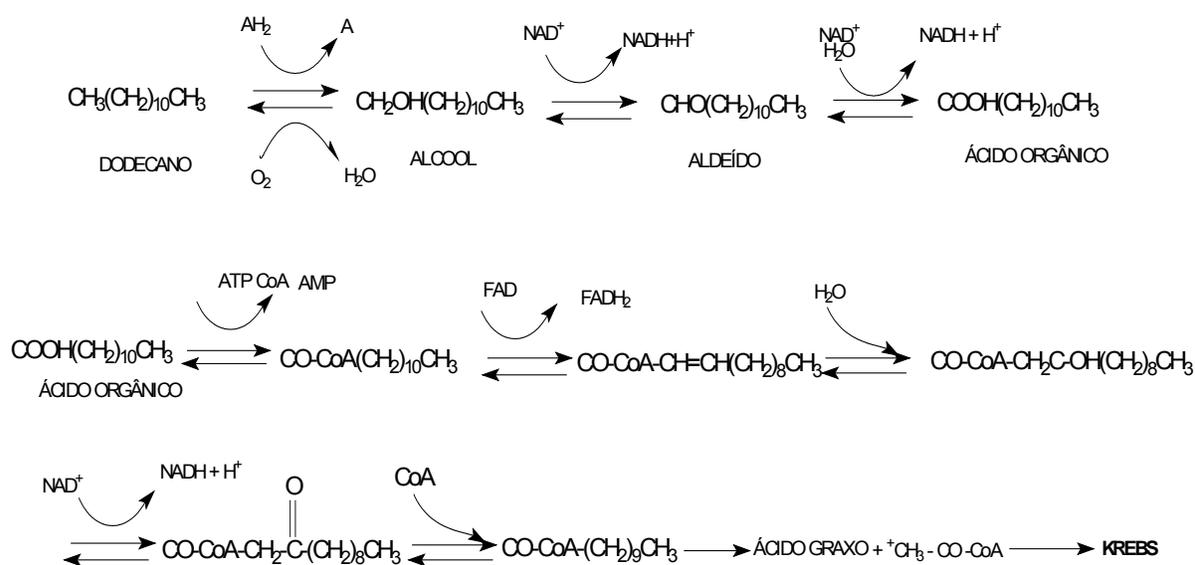


Figura 1 – Seqüência de reações de degradação de n-alcanos (BAKER & HERSON, 1994).

A presença de ramificações na molécula de alcano dificulta a β -clivagem e torna a molécula refratária a biodegradação. O pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) por exemplo, é extremamente resistente à biodegradação devido às suas ramificações (RONTANI & GIUSTI, 1986).

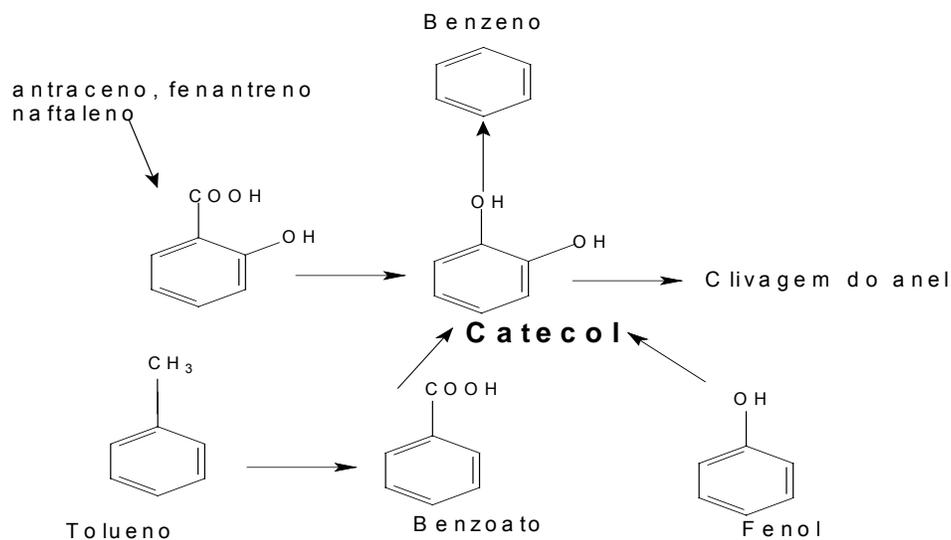
A oxidação dos hidrocarbonetos alifáticos insaturados não ocorre da mesma forma que a dos alcanos. Muitos estudos de degradação de alcenos têm focalizado moléculas que contém dupla ligação no carbono terminal. Esta posição permite vários mecanismos de ataque e diversas maneiras de degradação de alcenos têm sido observadas (SEEGER *et al*, 1997).

Hidrocarbonetos aromáticos como, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno são encontrados, predominantemente, nas frações leves de petróleo, como a gasolina, muito embora possam também estar presentes em quantidades sob a forma de traços, em diversas frações pesadas. A degradação aeróbica de aromáticos por bactérias foi demonstrada pela primeira vez em meados de 1900 (ALEXANDER, 1994). Há um número elevado de vias metabólicas envolvidas na degradação de aromáticos.

O benzeno é degradado primeiro pela conversão em catecol ou em protocatecolato. O núcleo aromático nesses compostos é subsequente aberto por uma dessas duas vias: a ortoclivagem (via do 3-oxodipato) ou pela metaclivagem. A ortoclivagem envolve a clivagem de catecol ou protocatecolato entre os dois grupos hidroxil. Este processo leva à formação dos respectivos compostos: muconato e mucolactona, os quais são também metabolizados a 4-oxadipato enol-lactona e depois ao 3-oxiadipato (beta-ceto adipato). O metabolismo procede à formação do acetil-CoA e succinato. Na metaclivagem, por outro lado, a clivagem inicial do anel, ocorre adjacente ao grupo hidroxil, formando o semi-aldeído 2-hidroxil-mucônico, como produto inicial da clivagem do anel. Subseqüentemente a orto e metaclivagem do anel aromático procede à formação de piruvato, formiato, e acetaldeído, que vão alimentar o ciclo de Krebs. A figura 2, mostra a seqüência de reações para a formação do catecol e protocatecolato, proveniente da degradação de

benzeno e de poli-aromáticos (antraceno, fenantreno e naftaleno), e na figura 3 estão apresentados os esquemas das reações de orto e metaclivagem do anel aromático (SEEGER *et al* 1997; BAKER & HERSON, 1994).

(a)



(b)

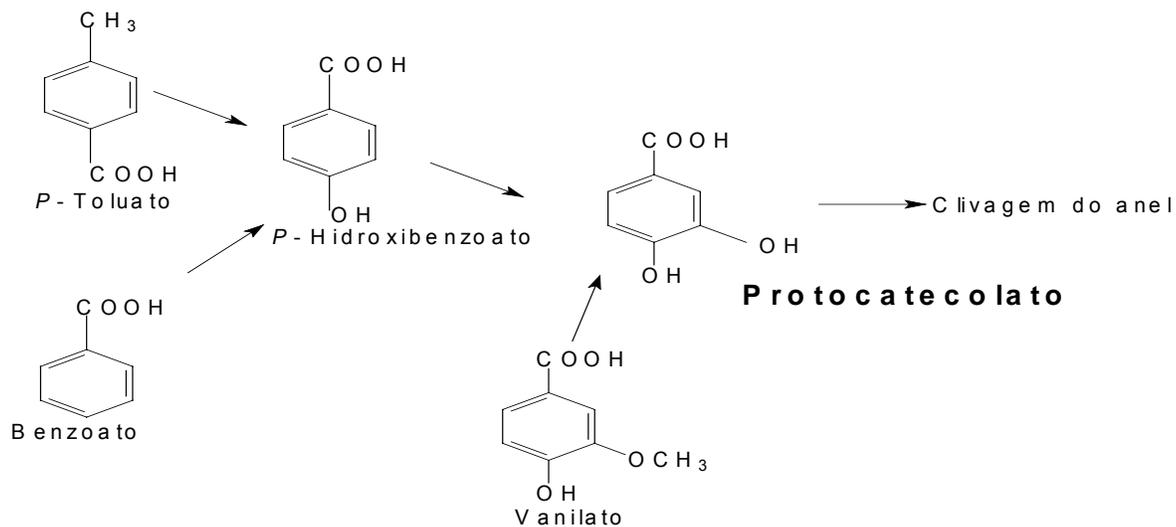


Figura 2 – Degradação inicial do benzeno: (a) Formação do catecol e (b) Formação do protocatecolato (SEEGER *et al* 1997).

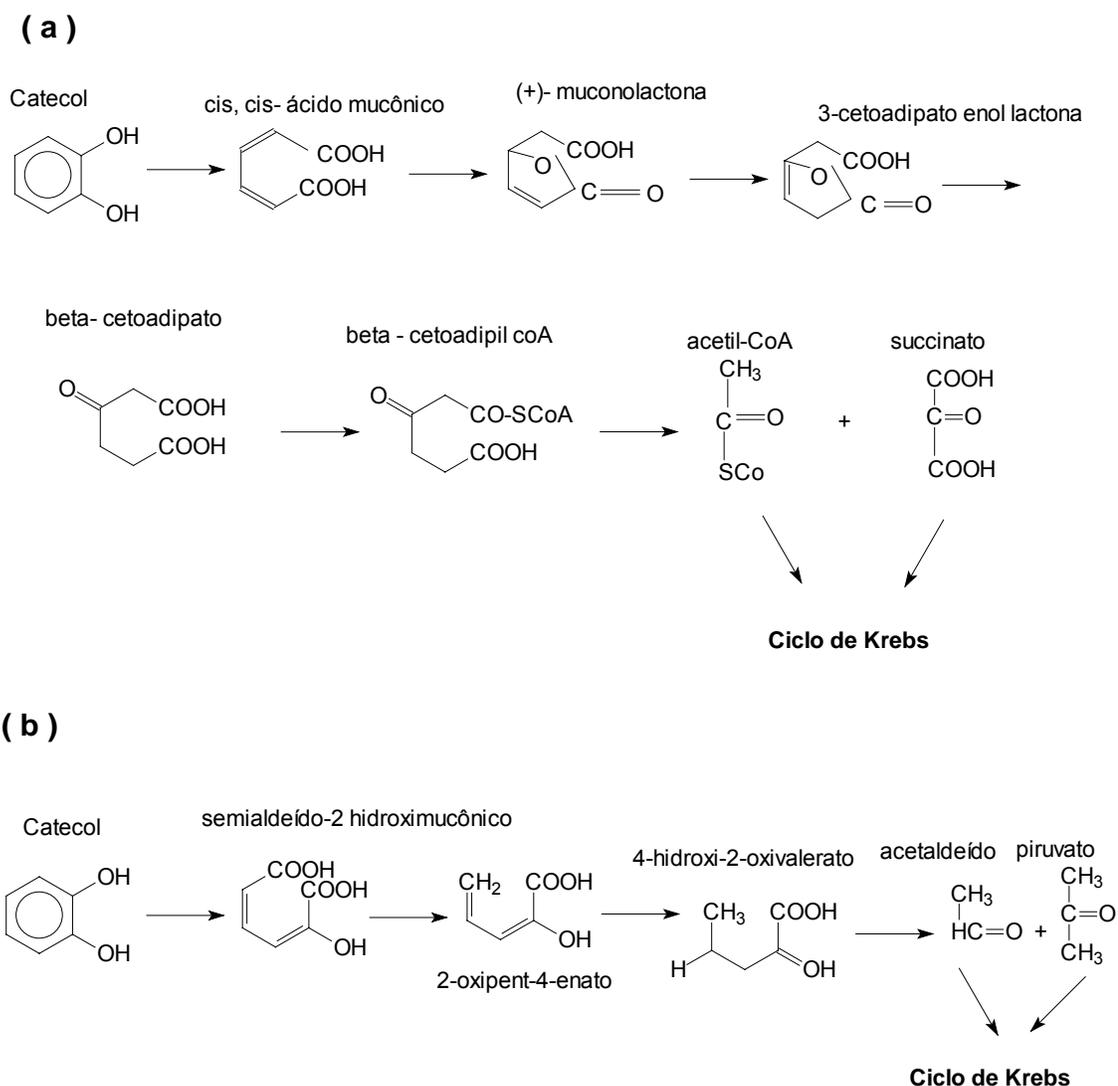


Figura 3 – Clivagem do anel aromático: (a) Ortoclivagem (b) Metaclivagem (BAKER & HERSON, 1994).

Os benzenos alquil substituídos (tolueno, etilbenzeno) são inicialmente oxidados utilizando uma das vias existentes. Se o ataque inicial for no anel aromático, alquilcatecol é formado, o qual pode ser clivado utilizando a meta ou a ortoclivagem. Se o grupo alquil for oxidado inicialmente, quase sempre, ácidos carboxílicos aromáticos são formados. Por exemplo, a oxidação inicial da alquil-substituição do *p*-xileno leva à formação do ácido tolúico. Esse ácido carboxílico aromático pode ser convertido em homoagentisato ou gentisato. A clivagem do anel aromático ocorre, subsequente,

com a formação de intermediários como fumarato e acetoacetato, que alimentam o ciclo de Krebs (ALEXANDER, 1994).

3.3.4 Fenômenos de Interface

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo ocorre em um sistema multifásico composto por matéria orgânica insolúvel, água, sais e microrganismos. Neste sistema, a interface água-óleo é bastante distinta, por causa da imiscibilidade das fases aquosa e oleosa. A compreensão dos fenômenos ocorridos nesta interface permite fazer o controle dos processos de assimilação de compostos orgânicos, e a otimização de parâmetros nutricionais e respiratórios (URURAHY, 1998).

Segundo Rosemberg (1991), a assimilação de hidrocarbonetos exige hidrofobicidade da superfície celular, embora nem todos os microrganismos que possuem esta hidrofobicidade são degradadores de hidrocarbonetos e nem todos os degradadores de hidrocarbonetos são capazes de sobreviver em superfície oleosa (RON & ROSEMBERG, 2001; 2002).

O grau de solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo é um fator importante para avaliar o mecanismo utilizado pelos microrganismos na degradação. Na tabela 3, estão apresentadas as solubilidades de alguns hidrocarbonetos encontrados no petróleo e seus derivados (ALEXANDER, 1994).

Tabela 3 – Solubilidade em água de alguns hidrocarbonetos do petróleo (ALEXANDER, 1994)

Grupo	Composto	mg/litro
Hidrocarbonetos alifáticos	Heptano	$2,9 \times 10^0$
	Octano	$6,6 \times 10^{-1}$
	Nonano	$2,2 \times 10^{-1}$
	Decano	$5,2 \times 10^{-2}$
	Hexadecano	$2,0 \times 10^{-5}$
	Eicosano	$1,1 \times 10^{-6}$
Hidrocarbonetos aromáticos	Naftaleno	$3,1 \times 10^1$
	Bifenil	$7,2 \times 10^0$

Tabela 3 (continuação) – Solubilidade em água de alguns hidrocarbonetos do petróleo (ALEXANDER, 1994)

Grupo	Composto	mg/litro
Hidrocarbonetos aromáticos	Acenafteno	$4,3 \times 10^0$
	Antraceno	$5,0 \times 10^{-2}$
	Fenantreno	$1,1 \times 10^0$
	Pireno	$1,3 \times 10^{-1}$
	Criseno	$2,0 \times 10^{-3}$
	1,2 – Benzopireno	$5,3 \times 10^{-3}$

Existem três mecanismos através dos quais se explica a assimilação de hidrocarbonetos por via microbiana. Estes mecanismos focalizam a forma como o hidrocarboneto é transferido do ambiente à superfície da célula, e depois é transportada através da membrana para regiões intracelulares por ação enzimática (ALEXANDER, 1994; URURAHY, 1998). Tais mecanismos são:

a) Utilização do composto orgânico apenas na fase aquosa

O microrganismo é capaz de utilizar apenas as moléculas que estão dissolvidas na fase aquosa. Estes microrganismos são comumente encontrados em substratos de baixa solubilidade. A presença de substância ou mistura de substâncias de baixa solubilidade na fase aquosa pode ser medida pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), que é a razão entre a quantidade da substância que está efetivamente dissolvida em octanol e a quantidade que está dissolvida em água, num sistema com quantidades iguais de água e octanol. Desta forma, a utilização de substrato disponível apenas na fase aquosa é comum em substâncias com baixos valores de K_{ow} . O crescimento microbiano (decorrente da degradação do poluente) está condicionado à disponibilidade do composto orgânico a estes microrganismos, presumivelmente não produtores de biosurfactantes. Para que haja uma degradação efetiva, é necessário que a taxa de dissolução espontânea seja maior que a taxa de biodegradação. Quando ocorre um aumento significativo de biomassa, a demanda biológica de carbono excede a taxa de

dissolução espontânea da substância e a atividade microbiana ficará limitada a esta taxa de dissolução.

b) Contato direto dos microrganismos com a fase não-aquosa

Os microrganismos aderem diretamente à superfície da fase oleosa e metabolizam os seus constituintes. Bactérias que crescem em hidrocarbonetos alifáticos em solução aquosa, freqüentemente se fixam ao substrato orgânico e, se este se encontra sob a forma de gotículas, as células retidas por estas gotículas também podem formar aglomerados. Para muitos microrganismos, a aderência da célula é um pré-requisito para a degradação.

c) Excreção de produtos que induzem a formação de gotículas de substrato menores que 1µm

Em muitos casos é evidenciada a produção de substâncias que são capazes de aumentar a taxa de consumo de substrato oleoso. Nestes casos, a taxa de biodegradação aumenta concomitantemente com a biomassa e não há dependência direta da taxa de dissolução espontânea da fase não-aquosa. Estas substâncias são chamadas de biossurfactantes, ou bioemulsificantes, e sua produção aumenta o coeficiente de partição da substância para a fase aquosa, potencializando a taxa de biodegradação. Os surfactantes são moléculas anfifílicas, que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Em baixas concentrações, os surfactantes são solúveis em água e a proporção em que se aumenta a concentração, os surfactantes se agregam em micelas. A menor concentração em que se observa a produção de micelas é chamada de concentração micelar crítica – CMC. As micelas são formadas por uma região interna hidrofóbica e uma região externa hidrofílica. A porção terminal hidrofílica fica voltada para o meio aquoso (Figura 4). O substrato hidrofóbico não-solúvel fica, presumivelmente incorporado no interior da micela aparentando estar dissolvido na fase aquosa. Este fenômeno é conhecido como “pseudossolubilização”, uma vez que, a gotícula oleosa está retida na região interna da micela, e não está dissolvida na fase aquosa. Muitos microrganismos degradadores de alcanos ou de óleo cru, excretam agentes emulsificantes que induzem a formação de gotículas de substrato, de tamanhos que variam entre 0,1 e 1,0µm.

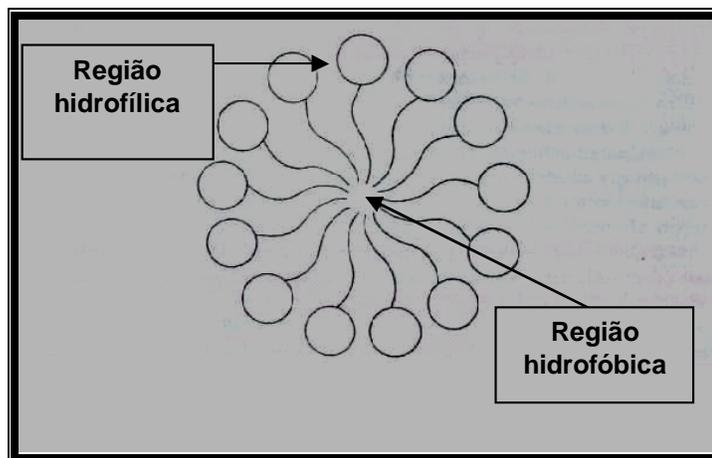


Figura 4 – Esquema de uma micela (ALEXANDER, 1994)

Segundo a classificação de Zajic & Mahomedy (1984), os biossurfactantes estão divididos em cinco grupos: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídios e ácidos graxos.

Há, pelo menos duas maneiras pelas quais os biossurfactantes estão envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos: através do aumento da superfície de contato do material oleoso e do aumento da biodisponibilidade do hidrocarboneto. Neste último caso, o biossurfactante atua na desorção das moléculas do hidrocarboneto de baixa solubilidade (RON & ROSEMBERG, 2002).

3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS DO QUEROSENE

O querosene de aviação, também chamado de *jet fuel* ou QAV (ANP, 2000) é o combustível de aviação mais utilizado no mundo. Por estar mais disponível que a gasolina, foi o combustível mais utilizado nos aviões de combate durante a Segunda Guerra Mundial, passando por um longo processo de aperfeiçoamento nos Estados Unidos, o que propiciou a produção de diferentes classes de querosene de aviação, a partir de misturas com outras substâncias, como por exemplo, o benzeno. Por conseqüência, o desenvolvimento de aeronaves comerciais, após a Segunda Guerra Mundial, centrou-se na utilização dos diferentes tipos de querosene (IRWIN *et al*, 1999).

Quanto às características de refino, o querosene de aviação é considerado um médio destilado. Os médios destilados incluem, além do querosene comercial (querosene iluminante - QI), o óleo Diesel e o óleo combustível, os quais contêm parafinas, cicloparafinas, aromáticos e oleofinas de aproximadamente C₉ a C₂₀. As parafinas de cadeia normal são os constituintes em maior proporção no querosene, variando entre C₁₁ e C₁₂ (ATLAS, 1984). Os aromáticos incluem alquilbenzenos, toluenos, naftalenos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPA. As proporções dos componentes podem variar de um tipo de querosene para outro, ou ainda, de um poço de petróleo para outro. Kanikkannan *et al* (2001), estudando os efeitos da absorção cutânea de um tipo de querosene de aviação, o JP-8, obtiveram as frações de hidrocarbonetos por cromatografia gasosa as quais estão descritas na tabela 4.

O ponto de ebulição do querosene se situa, normalmente, bem acima do ponto de ebulição do benzeno. É comum encontrar tipos de querosene com ponto de ebulição um pouco mais próximo ao do benzeno devido às misturas feitas com esta substância (IRWIN *et al*, 1999).

Tabela 4 - Composição do querosene JP-8 (KANIKKANNAN *et al.*, 2001)

Componentes	Percentual (m/m)
Alifáticos	
Undecano	6,00
Dodecano	4,50
Decano	3,80
Tridecano	2,70
Tetradecano	1,80
Nonano	1,10
Penatadecano	1,00
Dietilaenoglicol-monometil-eter	0,08
Aromáticos	
Trimetil-benzeno	1,00
Metil-naftalenos	1,20
Dimetil-naftalenos	0,78
Dimetil-benzeno	0,59
Naftaleno	0,26
Etil-benzeno	0,15
Tolueno	0,06
Total	25,06

Bernabei *et al* (2003), realizando estudos detalhados da composição do QAV por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, identificaram mais de 20 diferentes HPA (entre eles, alquilnaftalenos, acenaftenos, fenantreno, antraceno) e mais de 60 hidrocarbonetos aromáticos em nível de traços.

Da mesma forma que os demais derivados líquidos de petróleo, o querosene é armazenado em tanques nos terminais de combustíveis. Como são recebidos carregamentos de diversos portos e refinarias, é comum que o material esteja misturado. Desta forma, como as propriedades físico-químicas variam de uma fonte de extração para outra, devem ser considerados valores compreendidos numa faixa com máximo e mínimo, especificados para transporte, armazenamento e distribuição. Esses valores, máximos e/ou mínimos, garantem intervalos ou limites nos quais o produto mantém suas características de combustão, segurança no armazenamento, escoamento e corrosividade, entre outras.

A tabela 5 mostra as principais características físico-químicas do querosene de aviação, considerando as faixas de valores que obedecem às especificações da Agência Nacional do Petróleo, definidas nas normas da ABNT, ASTM e IP, para transporte, armazenamento e comercialização do produto (ANP, 2000).

Tabela 5 - Especificações para querosene de aviação (ANP, 2000).

CARACTERÍSTICAS	UNIDADE S	LIMITES	MÉTODOS		
			ABNT	IP	ASTM
APARÊNCIA Aspecto (visual)		claro, límpido e visivelmente isento de água não dissolvida e material sólido à temperatura ambiente normal.			
COMPOSIÇÃO					
Acidez total, máx	mg KOH/g	0,015	-	354	D 3242
Aromáticos , máx	% volume	25,0	MB 424	156	D 1319

Tabela 5 (continuação) - Especificações para querosene de aviação (ANP, 2000).

CARACTERÍSTICAS	UNIDADE	LIMITES	MÉTODOS		
			ABNT	IP	ASTM
Enxofre total, máx	% massa	0,30	NBR 6563	107, 243, 336, 373	D 1266, D 1552, D 2622, D 4294, D5453
Enxofre mercaptídico, máx.	% massa	0,0030	NBR 6298	342	D 3227
ou Ensaio Doctor	-	negativo	MB 339	30	D 4952
Componentes na refinaria produtora					
- Fração hidrotratada	% volume	anotar	-		
VOLATILIDADE					
Destilação					
- P.I.E. (ponto inicial de ebulição)	°C	Anotar			
- 10% vol. Recuperado, máx.	°C	205			
- 50% vol. Recuperado	°C	Anotar			
- 90% vol. Recuperado	°C	Anotar			
- P.F.E. (ponto final de ebulição), máx.	°C	300			
- Resíduo, máx.	% volume	1,5			
- Perda, máx.	% volume	1,5			
Ponto de fulgor, mín.	°C	40 ou 38	NBR 7974		D 56
				170 ou 303	D 3828
Massa específica a 20°C	kg/m ³	771 - 837	NBR 7148	160 ou 365	D 1298 ou D 4052
FLUIDEZ					
Ponto de congelamento, máx.	°C	-47	NBR 7975	16	D 2386, D 5901, D4305 (4) ou D 5972
Viscosidade a -20°C, máx.	(mm ² /s) cSt	8,0	NBR 10441	71	D 445
COMBUSTÃO					
Poder calorífico inferior, mín.	MJ/kg	42,8	-	12, 355, 381	D 4529, D 3338, D4809

Tabela 5 (continuação) - Especificações para querosene de aviação (ANP, 2000).

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITES	MÉTODOS		
			ABNT	IP	ASTM
- Ponto de fuligem, mín. OU	mm	25	NBR 11909	57	D 1322
- Ponto de fuligem, mín. e	mm	19	NBR 11909	57	D 1322
- Naftalenos, máx.	% volume	3,0	-		D 1840
CORROSÃO					
Corrosividade à prata, máx.		1		227	
Corrosividade ao cobre(2h a 100°C), máx		1	MB 287	154	D 130
ESTABILIDADE					
Estabilidade térmica a 260°C				323	D 3241
- queda de pressão no filtro, máx.	mm Hg	25,0			
- depósito no tubo (visual) -		<3 (não poderá ter depósito de cor anormal ou pavão)			
CONTAMINANTES					
Goma atual, máx.	mg/100 mL	7	MB 289	131	D 381
Tolerância à água			NBR 6577	289	D 1094
- condições interfaciais, máx.		1b			
Índice de separação de água, MSEP	-				D 3948
- Com dissipador de cargas estáticas, mín.	-	70			
- Sem dissipador de cargas estáticas, mín.	-	85			
CONDUTIVIDADE					
- Condutividade elétrica	pS/m	50 – 450		274	D 2624

Tabela 5 (continuação) - Especificações para querosene de aviação (ANP, 2000).

LUBRICIDADE , máx.	mm	0.85	D 5001
ADITIVOS			
. Antioxidante	mg/L		
- Combustível não-hidrotratado:			
Opcional, máx		24,0	
- Combustível hidrotratado:			
Mandatário		17,0 - 24,0	
Desativador de metal	mg/L		
- Opcional, máx.		5,7	
Dissipador de cargas estáticas:	mg/L		
- Opcional			
Primeira Aditivação, máx.		3,0	
Segunda Aditivação - concentração acumulada , máx.		5,0	
Inibidor de corrosão / melhorador de lubricidade			
Inibidor de formação de gelo			

O querosene de aviação possui volatilidade e solubilidade moderadas, podendo causar toxicidade à biota, em graus variáveis, de moderada a aguda, dependendo da concentração das substâncias aromáticas específicas presentes em sua composição. Sua presença na coluna de água pode afetar populações de *Daphnia* sp. (copepoda), por muitas semanas. Entre os efeitos de longo prazo dos componentes mais voláteis e mais solúveis em água, incluem-se a contaminação de solos, de lençóis freáticos e de sedimentos. Tais efeitos podem estar associados aos HPA, alquil-HPA e alquilbenzenos, constituintes do querosene de aviação. Embora os HPA não sejam encontrados em grandes quantidades no QAV, sua presença é causadora de grande risco potencial para o meio ambiente. De modo geral, a toxicidade aguda não é evidenciada em seres humanos, peixes ou em vida selvagem, como resultado de exposição a baixos níveis de concentração de um HPA isoladamente. Normalmente, os HPA estão associados ao risco de toxicidade crônica. Esse risco inclui o acometimento de câncer, sendo, freqüentemente resultado da exposição a misturas complexas de

aromáticos de risco crônico (alquil-HPA, HPA, benzenos e alquilbenzenos) e não a compostos simples. Muitos HPA, apresentam considerável biodisponibilidade e, conseqüentemente, grande mobilidade em organismos vivos, sobretudo em plantas, causando quase sempre efeitos danosos. A CL₅₀ para ratos (via oral) é estimada em 25g/kg e para coelhos (via cutânea) em 8g/kg. Os efeitos notórios em coelhos são irritação na pele e alterações hepáticas (IRWIN *et al*, 1997).

Nos seres humanos, os efeitos crônicos da exposição aos HPA incluem: modificações no fígado, efeitos danosos nos rins, coração, pulmões e sistema nervoso. Aumento no desenvolvimento de células cancerosas, efeitos genotóxicos, fetotóxicos também estão associados à diversos componentes do QAV. A exposição no ambiente de trabalho pode ocorrer por contato com vapor, líquido ou aerossol. A inalação e a exposição dérmica são as rotas mais comuns de exposição. As formas líquida e aerossol podem provocar efeitos sistêmicos, sendo irritante para os olhos, pele e sistema respiratório. Os distúrbios ocupacionais na pele são a segunda causa de doenças ocupacionais mais relatadas. As substâncias tóxicas presentes no QAV podem causar irritação devido a mudanças estruturais nos lipídeos da pele ou por causar citotoxicidade (KABBUR *et al.*, 2001). 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).

Compostos como benzeno, tolueno e xileno tendem a evaporar rapidamente para a atmosfera ou migrar para o lençol freático. Estas substâncias ocupam uma faixa intermediária de coeficiente de partição octanol / água. Quando expostos ao oxigênio e à luz solar, sofrem quebra, rapidamente. Quase sempre, muitos desses compostos tendem a ser mais recalcitrantes no lençol freático que em águas superficiais. Os compostos que tendem a ser mais recalcitrantes e passíveis de se ligarem a partículas sólidas são, em geral, HPA, alquil-HPA e alquil-benzenos. Metabólitos provenientes da transformação de alguns componentes do QAV podem causar impactos biológicos e perturbações em sistemas biológicos, após a degradação dos hidrocarbonetos originais. Esses efeitos podem ter como causa: descargas de baixo nível de toxicidade crônica

proveniente de metabólitos tóxicos, substâncias tóxicas bioacumuladas de organismos mortos e material celular decorrente de lise (IRWIN *et al*, 1997).

3.5 ECOTOXICIDADE

Os primeiros estudos no campo da ecotoxicologia surgiram junto com a necessidade de se estabelecer critérios para estudar os efeitos tóxicos de determinadas substâncias poluentes sobre a biota, a fim de se ter um controle da emissão de poluentes no ambiente, ou de se estabelecer parâmetros para saber quais os níveis toleráveis de poluição. Frequentemente, as maiores dificuldades encontradas, tem sido as de se determinar a abrangência de tais efeitos nos organismos, e a representatividade que esses efeitos, observados para um grupo de organismos, possa ter para uma comunidade. Os efeitos tóxicos das substâncias nos organismos vivos, podem se manifestar em diferentes níveis: sub-celular ou celular, nos tecidos, nos órgãos ou nos organismos inteiro. Embora o conhecimento do mecanismo de ação seja muito importante, para fins de estudos meramente toxicológicos, por si só não é o bastante para prever danos à biota susceptível à exposição ao poluente (ABEL, 1991).

Os estudos de ecotoxicologia compreendem a integração entre os domínios da toxicologia e da ecologia e tem por objetivo, entender e prever os efeitos das substâncias tóxicas nas comunidades naturais sob condições realísticas de exposição (CHAPMAN, 2002). As substâncias tóxicas podem atuar de forma aguda ou crônica em organismos no ambiente.

A ecotoxicologia estuda a existência dessas formas de toxicidade nos organismos e a relação de tais organismos no ambiente, através de testes específicos com organismos padrão, selecionados de acordo com determinados critérios. Microrganismos são utilizados com frequência em testes de ecotoxicidade por serem de fácil manipulação, por terem versatilidade bioquímica e pela rapidez com que se obtém os resultados (TORSLOV, 1992). Ambientes poluídos por substâncias recalcitrantes e submetidos à algum tipo de tratamento remediante devem ser avaliados quanto à ecotoxicidade.

Para escolher o organismo padrão, são necessários alguns critérios. Um dos critérios mais comuns é a disponibilidade do organismo no ambiente. Este critério leva em conta a existência em grande quantidade do organismo e a sua relação direta com o equilíbrio do ambiente, porém pode apresentar falhas com relação à exatidão dos resultados e a aproximação das condições realísticas (CHAPMAN, 1999; 2002).

A substância tóxica pode atuar direta ou indiretamente no organismo teste. De forma direta, causa mortalidade em curto prazo e, indiretamente, causa toxicidade aguda em produtores ou consumidores primários ou crônica em níveis tróficos subsequentes. Para uma resposta mais abrangente, é importante o estudo da toxicidade da substância nos quatro níveis tróficos: produtor, consumidor primário, consumidor secundário e decompositor (CALOW, 1996).

A tabela 6 mostra os principais critérios considerados padrões de seleção de organismos, comparados com alguns sugeridos por Chapman (1999).

Tabela 6 - Comparação entre os critérios (padrão e sugerido) para a seleção de organismos indicadores usados em teste de ecotoxicidade (CHAPMAN, 1999).

Padrão	Sugerido
Um importante grupo ecológico (baseado na taxonomia, nível trófico ou nicho).	Espécies chaves ou dominantes identificadas por estudos de comunidades de base
Amplamente disponível (menos esforço).	Razoavelmente disponível (maior esforço).
Facilmente cultivado e geneticamente estável	Pode ser razoavelmente coletado no campo e cultivado em laboratório
Não especificado	Pode ser testado com outros taxa
	Pontos finais ecologicamente e toxicologicamente relevantes.
Respostas consistentes e mensuráveis aos tóxicos	Pode ser testado no laboratório ou campo.

O estudo de testes de toxicidade envolvendo bactérias tem aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas devido à sua fácil manipulação (BITTON

& DUTKA, 1986). Muitas das vias metabólicas das bactérias estão presentes nos organismos superiores e, freqüentemente, respondem às substâncias químicas de maneira similar (QURESHI, 1984).

Bactérias são utilizadas em testes de toxicidade para determinar o efeito ou o “não-efeito” de substâncias químicas em comunidades bacterianas do ambiente ou em locais submetidos à tratamento de biorremediação. A avaliação da toxicidade do material biodegradado é de grande relevância ambiental, tendo sido desenvolvidos vários trabalhos com este enfoque (JUVONEN *et al* 1999, URURAHY *et al*, 1998).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA DE QUEROSENE

A amostra de querosene utilizada em todos os ensaios foi coletada do tanque número 06 do Terminal de Armazenagem Conjunta de Suape - PE e cedida pela Unidade de Negócios e Transportes Aquaviários de Suape (UNTA/NE – Suape) da Petrobrás Transportes S.A. - TRANSPETRO. A figura 5 mostra uma vista do referido tanque.



Figura 5 – Tanque n.º 6 do Terminal de Armazenagem Conjunta de Suape-PE

4.1.1 Caracterização Química e Físico-Química da Amostra de Querosene

A análise química da amostra de querosene referente à determinação dos hidrocarbonetos totais de petróleo – HTP, foi realizada pela Empresa Analytical

Solutions, cujos resultados foram obtidos de acordo com o procedimento laboratorial padrão e protocolos da USEPA SW-846.

A caracterização físico-química da amostra de querosene foi realizada no laboratório da TRANSPETRO, em Suape - PE, e constou das seguintes análises: destilação, massa específica a 20/4°C e ponto de fulgor, de acordo com a portaria 137 da Agência Nacional de Petróleo - ANP, de 1º de outubro de 2000 (ANP, 2000). Esta portaria está baseada nas normas de referência da ASTM e ABNT correspondentes às referidas análises.

4.2 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Foram utilizados oito isolados bacterianos obtidos de amostras de solo, contaminado por petroderivados, coletadas na região da Lagoa da Barra, localizada no Complexo Industrial e Portuário de Suape – PE. Além das oito linhagens isoladas de ambiente contaminado, foi testada também a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, pertencente à Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, como referência de espécie, não sendo isolada de local contaminado por petroderivado. Tal inclusão se deve ao fato de que o gênero *Pseudomonas* é bastante citado na literatura, como um dos gêneros que tem potencialidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo.

Inicialmente, adotou-se a nomenclatura: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 e B8 para designar os oito isolados, os quais receberam, posteriormente, os seguintes números de identificação na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE: DAUFPE 832, DAUFPE 833, DAUFPE 834, DAUFPE 835, DAUFPE 836, DAUFPE 837, DAUFPE 838 e DAUFPE 839, respectivamente. Neste trabalho será empregada a nomenclatura inicial.

O isolamento foi realizado aplicando-se a técnica do enriquecimento seletivo em meio mineral sólido de Büshnell-Haas - BH, contendo o querosene como única fonte de carbono e energia (Tabela 7).

Tabela 7 – Meio mineral de Büshnell-Haas (ATLAS, 1995b)

Componente	
KH ₂ PO ₄	1,00g
K ₂ HPO ₄	1,00g
NH ₄ NO ₃	1,00g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20g
FeCl ₃	0,05g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
Água destilada	1L
Quando sólido	
Agar	15,0g
pH 7,0±0,2	

4.2.1 Manutenção das Culturas Microbianas

Para manutenção dos isolados foram efetuados repiques, a cada duas semanas, em tubos de ensaio contendo o meio Tryptic-Soy-Agar - TSA[®] (Tabela 8), os quais foram mantidos sob refrigeração (4 a 8° C) para a realização posterior dos ensaios.

Tabela 8 - Meio Tryptic-Soy-Agar (ATLAS, 1995b)

Componente	
Trypticase	15,0g
Peptona de soja	5,0g
Agar	15,0g
NaCl	5,0g
Água destilada	1L
pH 7,3±0,2	

4.2.2 Caracterização Preliminar dos Isolados

A caracterização morfológica foi realizada através da microscopia óptica. Com relação ao tipo de parede celular dos oito isolados bacterianos, foi realizada a coloração diferencial pelo método de Gram, separando-os em dois grandes grupos (Gram positivos e Gram negativos). Além disso, foram realizados os testes bioquímicos de catalase e citocromo oxidase. Todas as metodologias foram seguidas por Cappuccino & Sherman (1996).

4.3 SELEÇÃO DAS LINHAGENS E ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS

Para a seleção dos isolados bacterianos mais promissores, utilizou-se a técnica do indicador redox 2,4 diclorofenol-indofenol - DCPIP (HANSON *et al*, 1993) adaptada para frascos Erlenmeyer (GOMES *et al*, 2004). O princípio da técnica com este indicador consiste em se verificar a ocorrência de oxidação biológica dos hidrocarbonetos, constituintes do querosene, no meio de cultura e o DCPIP atua como o acceptor de elétrons nesse processo de oxidação, ocorrendo, conseqüentemente, a mudança de coloração do meio de cultivo de azul para incolor, ou seja, viragem do indicador da forma reduzida para a forma oxidada.

Inicialmente, as culturas foram crescidas por 12 horas sob agitação de 200 rpm a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ em frascos Erlenmeyer de 250mL, contendo 1% de querosene, 25% de inóculo e 74% do meio mineral de Büshnell-Haas (Tabela 7), totalizando um volume de 75mL. O inóculo foi preparado com 5mL de água esterilizada, tendo como referência o tubo nº 2 da escala de Mac Farland, o que corresponde a uma concentração celular da ordem de $3,0 \times 10^8$ células por mL. Decorrido o tempo de 12 horas, foram adicionados 0,02mL da solução do indicador DCPIP (0,8 mg/mL) e se aguardou a descoloração do meio de cultivo.

Os tempos de viragem do indicador DCPIP no meio foram anotados e as quatro primeiras culturas que descoloriram o meio de cultivo, foram selecionadas e agrupadas para a realização dos ensaios em consórcios.

De posse dos quatro isolados mais promissores, foram realizados ensaios em consórcios aplicando-se a técnica do indicador DCPIP, com o intuito de encontrar a associação bacteriana mais promissora. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo comparados com os dois controles: um biótico, contendo o meio mineral BH, inóculo e o indicador DCPIP, que é um composto aromático; e um abiótico, com o meio BH, querosene e o indicador DCPIP.

As associações microbianas foram crescidas nas mesmas condições dos experimentos da etapa de seleção dos isolados. A composição do inóculo foi realizada, primeiramente, utilizando-se 5mL de água esterilizada e uma concentração celular de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL (escala Mac Farland nº 2) de cada cultura, e em seguida, foram misturados os inóculos em volumes iguais para compor os controles.

Para avaliar, de maneira indireta, a potencialidade degradadora dos microrganismos, através da produção de substâncias tensoativas que favorecem a biodegradação, foram tomadas medidas de tensão superficial do meio líquido isento de células, no início dos experimentos e após 20 dias (RON & ROSEMBERG, 2001; 2002; LANG, 2002; BOGNOLO, 1998). As medidas de tensão superficial foram realizadas em tensiômetro manual Dü Nouy, pelo método da leitura através do anel de platina (ASTM D -971, 1999).

Para averiguar a extensão da biodegradação a partir da produção de ácidos orgânicos, resultantes da degradação parcial dos hidrocarbonetos do QAV, foram tomadas medidas de pH no início e após 20 dias de experimento (FRANKEMBERGER JR, 1992). As medições de pH foram realizadas em potenciômetro digital DIGIMED® modelo DM-21.

4.4 ENSAIOS DE ACLIMATAÇÃO DAS LINHAGENS E ASSOCIAÇÕES SELECIONADAS

As linhagens isoladas (B6 e a *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39) e as associações selecionadas foram aclimatadas durante 12 dias em meios de Büshnell-Haas modificados, contendo, em cada estágio de aclimação, concentrações crescentes de querosene (1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13% e 15%).

Nestes experimentos, foram empregadas duas composições modificadas do meio de Büshnell-Haas: uma obedecendo à relação aproximada C:N de 200:1, denominada de bioestímulo N1 e a outra em que a relação aproximada C:N é de 50:1, chamada de bioestímulo N2, a fim de verificar o desempenho na biodegradação dos isolados e das associações microbianas, submetidas a estímulos nutricionais diferentes.

Para efeito de cálculo da relação aproximada C:N, considerou-se a massa da amostra de querosene como sendo a massa total de carbono presente nesta amostra, uma vez que este petroderivado é constituído basicamente por hidrocarbonetos. Portanto, a massa aproximada de carbono, é igual à densidade da amostra de querosene ($0,7975\text{g/cm}^3$) multiplicada pelo volume de querosene utilizado no meio de cultivo. Esta relação é ilustrada pela fórmula:

$$mC_{\text{aprox}} = d_{\text{querosene}} \times v_{\text{querosene}}$$

Onde:

mC_{aprox} = massa aproximada de carbono na amostra de querosene;

$d_{\text{querosene}}$ = densidade da amostra de querosene utilizada;

$v_{\text{querosene}}$ = volume da amostra de querosene utilizada no meio de cultivo.

Por exemplo, para a concentração de 15%v/v de querosene, o volume de querosene utilizado para compor 1000 mL de meio de cultivo é 150mL. Neste exemplo,

a massa aproximada de carbono encontrada para 150mL de querosene será, portanto, de 119,6 g de carbono por litro de meio de cultivo.

Para calcular a massa de NH_4NO_3 a ser utilizada na composição do meio de cultivo, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$mNH_4NO_3 = \frac{\left(\frac{mC_{aprox}}{mC_{desejada}} \right) \times 80,05}{28}$$

Onde:

mNH_4NO_3 = massa de nitrato de amônio para compor o meio de cultivo;

mC_{aprox} = massa aproximada de carbono na amostra de querosene;

$mC_{desejada}$ = proporção de carbono desejada na relação C:N.

Desta forma, a massa de NH_4NO_3 para compor 1000 mL de meio de cultivo com a relação C:N de 200:1 será 1,71 gramas (Tabela 9).

Tabela 9 – Meio de Büshnell-Haas modificado utilizado no bioestímulo N1 (relação C:N = 200:1), para vários percentuais de querosene (1% a 15%)

Componentes	
KH_2PO_4	1,00g
K_2HPO_4	1,00g
NH_4NO_3	variável: (0,11g a 1,71g)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20g
$FeCl_3$	0,05g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02g
Água destilada	1L
pH 7,0±0,2	

Da mesma forma, aplicando-se as fórmulas anteriores para a relação C:N de 50:1, obtém-se 6,99g de NH_4NO_3 , que será a massa utilizada na composição do meio modificado de Büshnell-Haas. Assim, a relação 50:1, contém quatro vezes mais nitrogênio que a relação 200:1 (Tabela 10).

Tanto na relação C:N de 200:1 quanto na de 50:1, a massa de NH_4NO_3 utilizada variou de acordo com a variação do percentual de querosene (de 1 a 15%) nos experimentos de aclimação, como estão mostradas nas tabelas 9 e 10. Tais variações foram de 0,11 a 1,71g de NH_4NO_3 para a relação de 200:1, e de 0,45 a 6,99g de NH_4NO_3 para a relação de 50:1.

Tabela 10 – Meio de Büshnell-Haas modificado utilizado no bioestímulo N2 (relação C:N = 50:1), para vários percentuais de querosene (1% a 15%)

Componentes	
KH_2PO_4	1,00
K_2HPO_4	1,00
NH_4NO_3	variável: (0,45g a 6,99g)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20
FeCl_3	0,05
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02
Água destilada	1L
pH 7,0±0,2	

Os experimentos de aclimação foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 25% de inóculo, 74% de cada meio Büshnell-Haas modificado e 1% de querosene, inicialmente. Após 12 dias de cultivo, foram retirados 25% do material bioprocessado para compor o inóculo do experimento seguinte no mesmo meio de BH, contendo uma concentração crescente de querosene, numa escala aritmética de razão 2. Foram feitas re-inoculações sucessivas até a concentração de 15% de querosene, mantendo sempre 12 dias de aclimação em cada concentração. No total, foram

realizados oito estágios de aclimação com percentuais crescentes de querosene (1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13% e 15%). Nos estágios 1%, 7% e 15% foram realizadas determinações de: pH, tensão superficial e crescimento microbiano, com intervalos de quatro dias. As medições de pH e tensão superficial foram realizadas da mesma maneira que nos ensaios de seleção.

A quantificação microbiana foi realizada em triplicata através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), utilizando a técnica *spread plate*, em placas contendo o meio Tryptic-Soy-Agar (TSA) para o desenvolvimento de colônias (Figura 6).

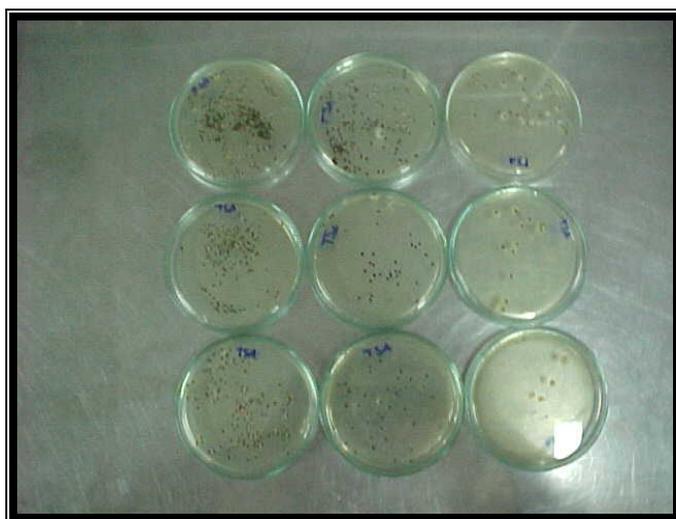


Figura 6 – Placas contendo o meio Tryptic-Soy-Agar para a contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro

4.5 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

Os ensaios de biodegradação foram conduzidos em frascos Fernbach com capacidade para 2800mL, contendo 20% de inóculo, 65% de cada meio mineral BH modificado e 15% de querosene, totalizando 560mL, o que corresponde a uma relação de aeração, volume do meio para volume do frasco de 1:5. Estes frascos foram submetidos à agitação de 200 rpm e à temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 60 dias (Figura 7).

Transferiu-se, após 12 dias de aclimação, 112 mL da suspensão microbiana aclimatada a 15%, para os frascos Fernbach contendo o meio de Büshnell-Haas modificado e 15% de querosene.

Durante todo o ensaio, foram realizadas medições de: pH, tensão superficial e crescimento microbiano, com intervalos de cinco dias.



Figura 7 – Experimentos de biodegradação em frascos Fernbach

A biodegradação dos hidrocarbonetos do querosene foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) a fim de verificar a ocorrência da biodegradação, através do decaimento dos picos de concentração dos constituintes do querosene em função do tempo de retenção. Após 35 e 60 dias de processamento, alíquotas de 50 mL, foram centrifugadas a 10.000 rpm à temperatura de 5° C. Nos sobrenadantes foram realizadas as determinações de pH e tensão superficial. Alíquotas de 10 mL do sobrenadante foram submetidas à extração da fase apolar com heptano e nos extratos foram efetuadas as análises cromatográficas.

As condições operacionais utilizadas nas análises cromatográficas estão descritas na tabela 11, e estas análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Tabela 11 – Condições operacionais do sistema GC-MS

Parâmetros do GC-MS	Valores
Temperatura inicial de injeção	250,0°C
Temperatura da interface	280,0°C
Modo de controle	Split
Pressão de entrada	56,7 Kpa
Fluxo da coluna	1,0mL/min
Velocidade linear	36,5cm/seg
Taxa de fracionamento	1/50
Fluxo total	52,5mL/min
Parâmetros da coluna	Descrição/valores
Nome	DB-5 ms
Numero de série	US 1372916
Espessura	0,25µm
Comprimento	30,0m
Diâmetro interno	0,25mm

4.6 ENSAIO DE ECOTOXICIDADE

O teste de ecotoxicidade foi efetuado apenas no ensaio que apresentou o maior percentual de biodegradação. Este teste foi realizado na Companhia Pernambucana de Meio Ambiente e Recursos Hídricos – CPRH, utilizando-se a fotobactéria *Vibrio fischeri*, a fim de se determinar a concentração letal da amostra para cinquenta por cento da população deste microrganismo (CL₅₀), de acordo com a metodologia descrita na norma alemã DIN 38/412-34 (DIN, 1997).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DA AMOSTRA DE QUEROSENE

A análise química da amostra de querosene, referente à determinação dos hidrocarbonetos totais do petróleo – HTP, está apresentada na figura 8 e na tabela 12.

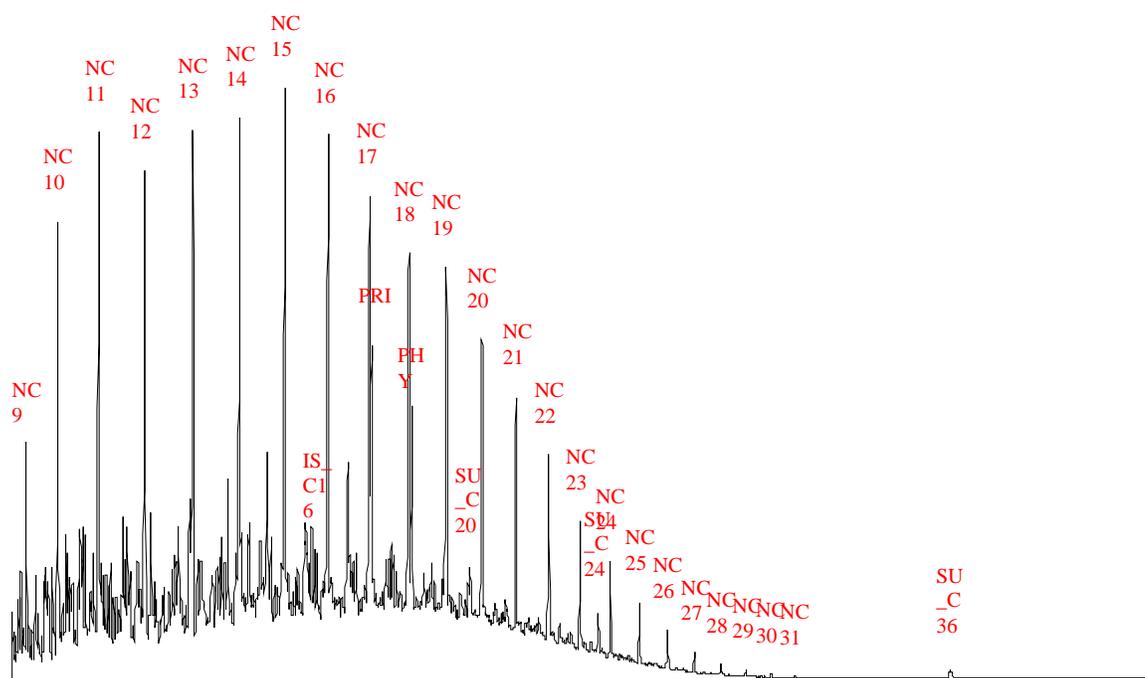


Figura 8 – Perfil cromatográfico da amostra de querosene quanto aos hidrocarbonetos totais do petróleo

Tabela 12 – Hidrocarbonetos encontrados na amostra de querosene e suas respectivas concentrações

Fração de alcano	Concentração (µg/L)
nC11	11187827,0
nC12	10498752,0
nC14	16308723,0

Tabela 12 (continuação) – Hidrocarbonetos encontrados na amostra de querosene e suas respectivas concentrações

Fração de alcano	Concentração (µg/L)
nC13	11526770,0
nC15	14499274,0
nC16	13907540,0
nC17	12166636,0
Pri	6051782,0
nC18	9802196,0
Phy	5003180,0
nC19	4783560,6
nC20	7753550,5
nC21	6007040,5
nC22	4356778,0
nC23	3444458,0
nC24	2912936,8
nC25	1144700,8
nC26	1724891,9
nC27	722265,1
nC28	406982,8
nC29	244642,5
nC30	138607,4
nC31	83970,8
nC32	41287,1
nC33	24259,2
nC34	18500,9
nC35	N.D.*
nC36	N.D.*
Limite Detecção:	200,0
TOTAL	149687248,1

N.D.* – não detectado

O perfil cromatográfico de amostras de querosene, apresentado na figura 8, evidencia que este petroderivado abrange a faixa de hidrocarbonetos que se estende de C₉ a C₃₁. Observa-se na tabela 12 que os maiores constituintes na amostra do querosene são os alcanos, abrangendo a faixa de C₁₁ a C₁₇. Os alcanos ramificados pristano e fitano, que são citados na literatura como recalcitrantes (PRITCHARD *et al*, 1996; URURAHY, 1998), estão presentes na referida amostra em menor concentração.

A tabela 13 mostra os resultados das análises físico-químicas da amostra de querosene. Estas análises fazem parte do conjunto de análises, realizadas pelo laboratório de controle de qualidade da TRANSPETRO-SUAPE, para liberação de cargas e descargas de navios transportadores de derivados claros de petróleo.

Tabela 13- Características físico-químicas da amostra de querosene.

Característica	Valores	Norma de referência
Aspecto	Claro, límpido, isento de água e material sólido em suspensão a temperatura ambiente normal.	Não aplicável (comparação visual)
Massa específica a 20/4°C (Kg/m ³)	797,6	ASTM 1298 / NBR 7148
Ponto de fulgor (°C)	43,0	ASTM D 56 / NBR MB 42
Destilação:		ASTM D 86 / NBR MB 9619
20% recuperado (°C).	168,0	
Ponto final de ebulição (°C)	271,0	
Resíduo (% volume)	1,2	
Perda (% volume)	0,3	

A amostra de querosene apresenta valores típicos de: ponto de fulgor, destilação e massa específica para querosene de aviação (Tabela 13) e os seus valores encontram-se dentro das especificações da Agência Nacional de Petróleo – ANP (ANP, 2000).

5.2 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DOS ISOLADOS

Na tabela 14 estão apresentadas as características microscópicas e bioquímicas dos isolados. Observa-se que todos os isolados exibem a morfologia celular de bastonetes, com exceção do isolado B1 que tem a forma de cocos. Quanto à diferenciação tintorial de Gram, todas as linhagens são Gram negativas, exceto a B2 e a B6 que são Gram positivas. Com relação à existência de enzima catalase, apenas três isolados (B3, B6 e B7) apresentam prova positiva. Quanto ao teste de citocromo oxidase, somente três linhagens (B6, B7 e B8) exibiram resultado positivo. O aspecto macroscópico dos referidos isolados está mostrado na figura 9.

Tabela 14 – Características microscópicas e bioquímicas dos isolados, quanto à morfologia, provas bioquímicas de catalase, citocromo oxidase e teste tintorial de Gram

Isolado	Morfologia	Coloração de Gram	Catalase	Oxidase
B1	Cocos	-	-	-
B2	Bastonetes	+	-	-
B3	Bastonetes	-	+	-
B4	Bastonetes	-	-	-
B5	Bastonetes	-	-	-
B6	Bastonetes	+	+	+
B7	Bastonetes	-	+	+
B8	Bastonetes	-	-	+

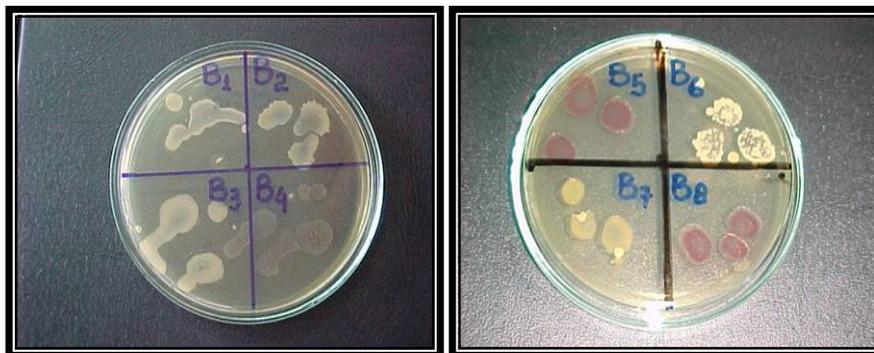


Figura 9 – Aspecto macroscópico dos oito isolados bacterianos obtidos de amostra de solo contaminado por petroderivados.

5.3 SELEÇÃO DOS ISOLADOS E DAS ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS

Os ensaios de seleção foram realizados com todos os isolados, aplicando-se a técnica do indicador redox 2,6 diclorofenol indofenol – DCPIP. Verificou-se que as linhagens B6, B7, B5 e B4 descoloriram o meio de cultivo, após 15, 67, 172 e 240 horas, respectivamente (Figuras 10 e 11). Como estes isolados foram os primeiros que descoloriram o meio, portanto foram os selecionados para a realização dos ensaios em consórcios.

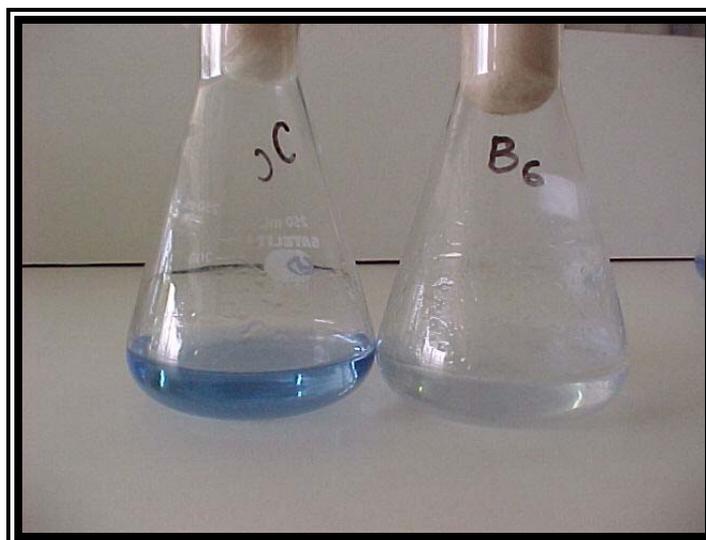


Figura 10 – Viragem do indicador DCPIP pelo isolado B6 no meio Büshnell-Haas, após 15 horas de cultivo.



Figura 11 – Viragem do indicador DCPIP pelos isolados B5, B6 e B7 após 15, 67 e 172 horas de cultivo, respectivamente.

Os isolados B1, B2, B3 e B8 descoloriram o meio com um tempo superior a 240 horas, não sendo utilizados nos ensaios subseqüentes, todavia, deve-se levar em consideração que os mesmos têm potencial degradador, uma vez que foram isolados de um meio contendo o querosene como única fonte de carbono, embora tenham se mostrado menos velozes quanto ao início da oxidação biológica, quando comparados às quatro linhagens selecionadas (HANSON *et al* 1993; BRADDOCK & CATTERALL 1999; BROWN & BRADDOCK, 1990).

Hanson *et al* (1993), utilizando placas multi-poços para testar o potencial degradador de cinco isolados bacterianos com relação ao óleo cru, verificaram, que os isolados selecionados ocasionaram mudança na coloração do meio contendo o indicador DCPIP, após 12 horas de incubação, enquanto que, os isolados que responderam com menor rapidez ao processo de oxidação biológica apresentaram a viragem do indicador DCPIP após 24 horas de incubação.

Outro critério, utilizado para determinar o número mais provável de microrganismos com potencialidade para degradar óleo cru, é apresentado por Brown & Braddock (1990) que consiste na verificação da ruptura da superfície oleosa do meio de

cultura em placas multi-poços. Os referidos autores atribuem a ruptura da superfície oleosa à produção de biossurfactante no início do processo de biodegradação.

Para compor as associações, foram utilizados os quatros isolados mais promissores, formando-se os pares: B4B5; B4B6; B4B7; B5B6; B5B7, B6B7 e o consórcio, constituído pela mistura dos quatro isolados selecionados (B4B5B6B7). Todos os ensaios foram submetidos às mesmas condições dos experimentos efetuados com as linhagens isoladas, aplicando a mesma técnica do indicador DCPIP a fim de selecionar a associação mais promissora.

Verificou-se que nas associações microbianas em que o isolado B6 estava presente (B6B5, B6B7, B6B4 e B4B5B6B7), ocorreu a descoloração do meio de cultivo com apenas 10 horas (Figura 12), o que evidencia uma redução de 5 horas no tempo de viragem do indicador DCPIP, quando comparado ao experimento com a linhagem isolada B6 (Figura 10). Esta redução de tempo na oxidação biológica sugere que o isolado B6 exerce um certo efeito sinérgico para com as demais linhagens, indicando que as associações tem maior potencialidade para degradar o querosene que a linhagem B6 isoladamente. As demais associações microbianas apresentaram a viragem do indicador após 160 horas de incubação.

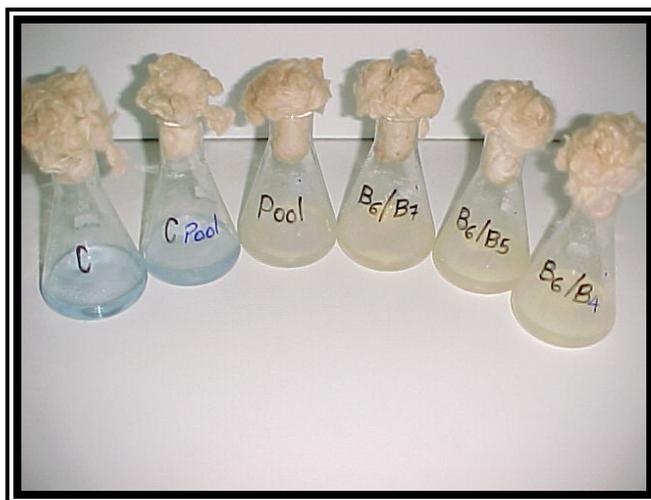


Figura 12 – Viragem do indicador DCPIP pelas associações que contém o isolado B6 após 10 horas de cultivo.

As figuras 13 e 14 mostram os valores de pH, iniciais e após 20 dias de experimento, para os isolados e as associações microbianas, respectivamente.

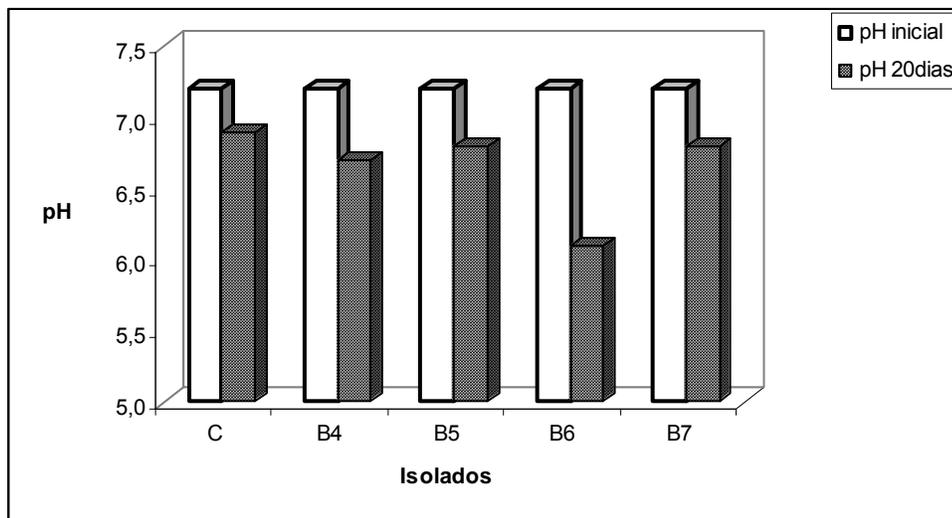


Figura 13 – pH dos isolados e do controle abiótico no início e após 20 dias de experimento

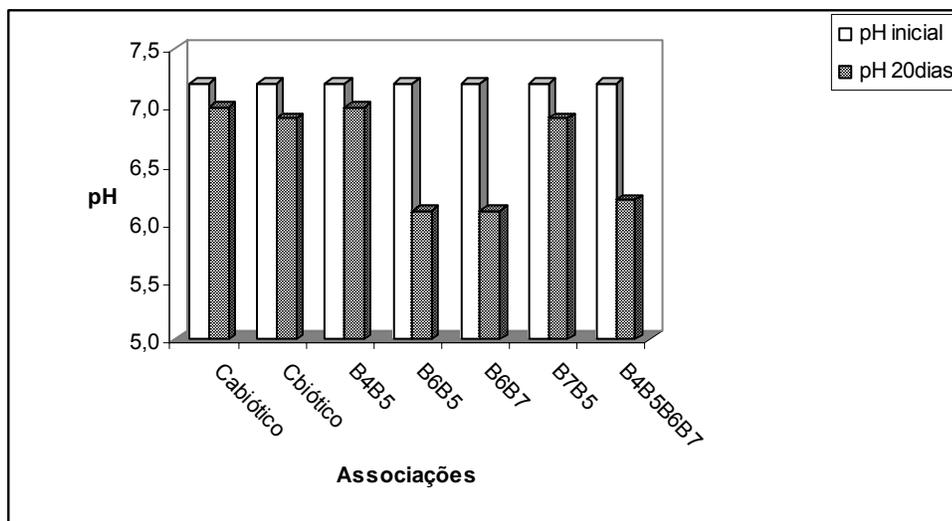


Figura 14 - pH dos controles (biótico e abiótico) e das associações microbianas, no início e após 20 dias de experimento.

Nota-se, na figura 16, que ocorreu uma maior queda no valor do pH (15%) para o ensaio com o isolado B6 do que para o demais isolados, o que nos leva a inferir que houve uma maior produção de ácidos orgânicos por este isolado. Verifica-se ainda que

os valores de pH para os isolados B7, B5 e B4, ao final de 20 dias, foram próximos entre si, indicando que o teor de ácidos orgânicos produzido foi semelhante.

Quanto às associações, a figura 14 mostra que os maiores decréscimos dos valores de pH ocorreram para as duplas associações B6B5 e B6B7, decréscimos estes que são da ordem de 15%, tal qual observado para a linhagem B6 isolada (Figura 13), evidenciando a presença marcante da referida linhagem no que tange à produção de ácidos orgânicos provenientes do processo de biodegradação de hidrocarbonetos (FRANKENBERGER JR., 1992). O consórcio B4B5B6B7 apresentou uma redução de pH semelhante às duplas associações que contém o isolado B6 (cerca de 13%), o que reforça o efeito predominante do isolado B6 com relação às demais linhagens.

Nas tabelas 15 e 16, estão apresentados os valores de tensão superficial iniciais e após 20 dias de experimento, com os isolados e consórcios, respectivamente.

Tabela 15 - Tensão superficial, inicial e após 20 dias de experimento, com os isolados B4, B5, B6 e B7.

Isolado	Tensão superficial inicial	Tensão superficial final	Redução (%)
Controle abiótico	60,9	59,8	1,8
B4	60,9	40,5	33,5
B5	60,9	46,0	24,5
B6	60,9	36,7	39,7
B7	60,9	33,9	44,3

A tabela 15 mostra que os isolados B7 e B6 exibiram as maiores reduções nos valores de tensão superficial (44,3% e 39,7%, respectivamente). Embora o isolado B7 não tenha sido o primeiro isolado selecionado, por não ter realizado a viragem do indicador DCPIP no meio em menor tempo, foi o que produziu maior quantidade de compostos ativos de superfície, indicando ser uma linhagem promissora no que se refere à produção de biossurfactante (RON & ROSEMBERG, 2002).

Tabela 16 – Tensão superficial, inicial e após 20 dias de experimento, com as associações microbianas.

Associação	Tensão superficial inicial	Tensão superficial final	Redução (%)
B5B4	60,9	58,6	3,7
B6B4	60,9	34,2	43,8
B6B5	60,9	32,0	47,5
B6B7	60,9	33,6	44,8
B7B5	60,9	57,6	5,4
B7B4	60,9	58,6	3,7
Consórcio			
B4B5B6B7	60,9	42,7	29,9
Controle abiótico	60,9	59,8	1,8
Controle biótico	60,9	60,9	0,0

Na tabela 16, observa-se que as maiores reduções nos valores de tensão superficial ocorreram com as duplas associações B6B5, B6B7 e B6B4 (47,5% e 44,8% e 43,8%, respectivamente) em que o isolado B6 fez parte. Reduções estas que foram superiores às obtida pela linhagem B6, isoladamente (39,7%), o que nos leva a crer que o referido isolado potencializou a produção de substâncias tensoativas favorecendo a disponibilidade da fonte oleosa à ação microbiana. O consórcio (B6B5B4B7) apresentou, em seguida, a maior taxa de redução da tensão superficial (29,9%), indicando a potencialidade deste consórcio no tocante à produção de biossurfactante.

5.4 ENSAIOS DE ACLIMATAÇÃO

Os ensaios de aclimação foram realizados durante 12 dias, com as linhagens (B6 e *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39), e as associações B6B5, B6B7, B5B6B7, as quais foram submetidas a teores crescentes de querosene (1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13% e 15%) e a estímulos diferentes da fonte de nitrogênio em relação à fonte de carbono (C:N de 200:1 e de 50:1). Apenas nos ensaios com 1%, 7% e 15% de querosene foram determinados os parâmetros de: tensão superficial, pH e crescimento microbiano. Os resultados referentes aos ensaios contendo 1% de querosene tanto na aplicação da relação C:N de 200:1 (bioestímulo N1) como na relação C:N de 50:1 (bioestímulo N2), estão apresentados nas figuras 15 a 19, e estes foram escolhidos

para serem discutidos. Os demais ensaios (7% e 15%), por apresentarem comportamento semelhante aos de 1%, estão apresentados no anexo A.

As figuras 15 e 16 mostram os perfis de tensão superficial e crescimento microbiano das linhagens, B6 e *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, durante os ensaios de aclimação a 1% de querosene submetidos aos bioestímulos N1 e N2.

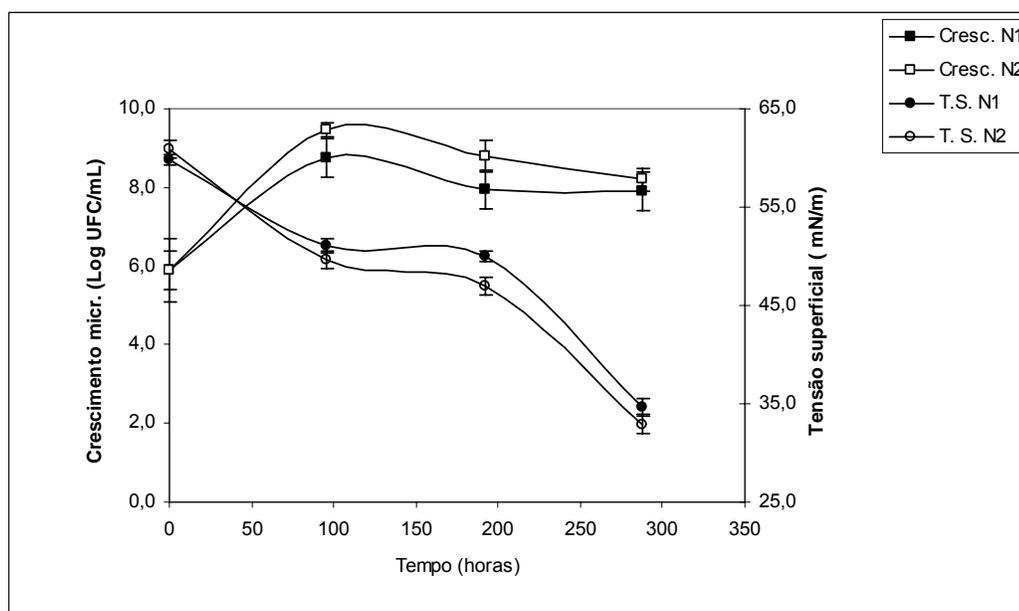


Figura 15 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem B6 em função do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2)

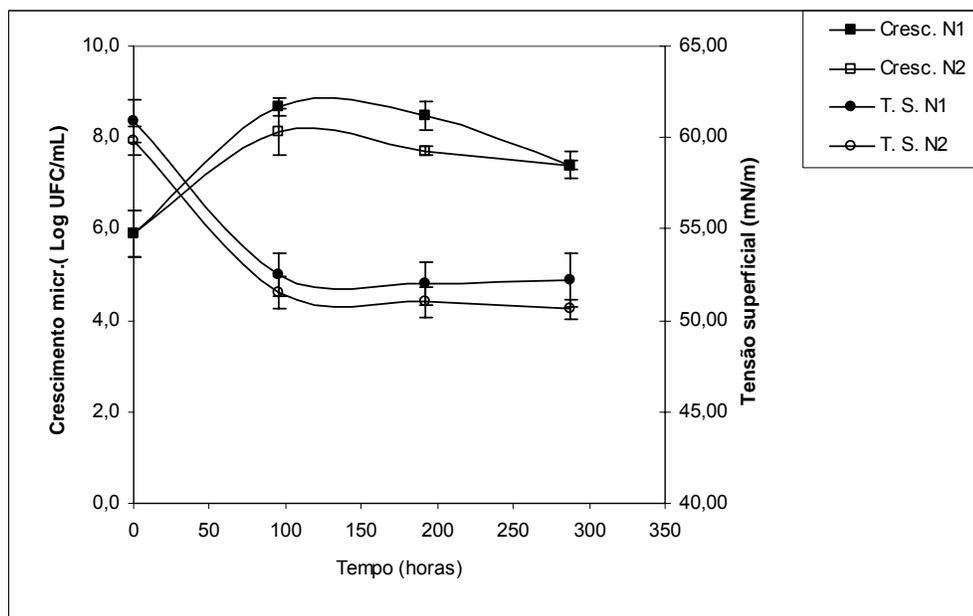


Figura 16 - Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39 ao longo do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2)

Comparando as figuras 15 e 16, vê-se que os valores de tensão superficial, ao final da aclimação, para o isolado B6 foram bastante inferiores (30,0mN/m) aos observados para a cultura de *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, a qual apresentou os maiores valores finais de tensão superficial, estabilizando a partir de 96 horas num valor em torno de 50 mN/m. Isto, provavelmente se deve ao fato de que a cultura de coleção não foi isolada de ambiente contaminado com petróleo, embora o gênero *Pseudomonas*, seja citado na literatura como um gênero de grande potencialidade para biodegradar hidrocarbonetos de petróleo. Vários autores enfatizam que a adaptação da cultura microbiana ao poluente é um fator preponderante no processo de biodegradação. Microrganismos isolados de ambientes com histórico de poluição por hidrocarbonetos de petróleo, tem maior habilidade para degradar tais poluentes (ENGLERT & KENZIE, 1993; KILBANE II *et al*, 2000).

Nota-se, nas figuras 15 e 16, que o crescimento microbiano, tanto do isolado B6 como de *P. aeruginosa*, atinge, com 96 horas, uma densidade da ordem de 10^9 UFC/mL.

Nas figuras 17, 18 e 19, estão apresentados os perfis de tensão superficial e crescimento microbiano dos consórcios B6B5, B6B7 e B6B5B7, nos ensaios de aclimação a 1% de querosene, submetidos ao bioestímulos N1 e N2.

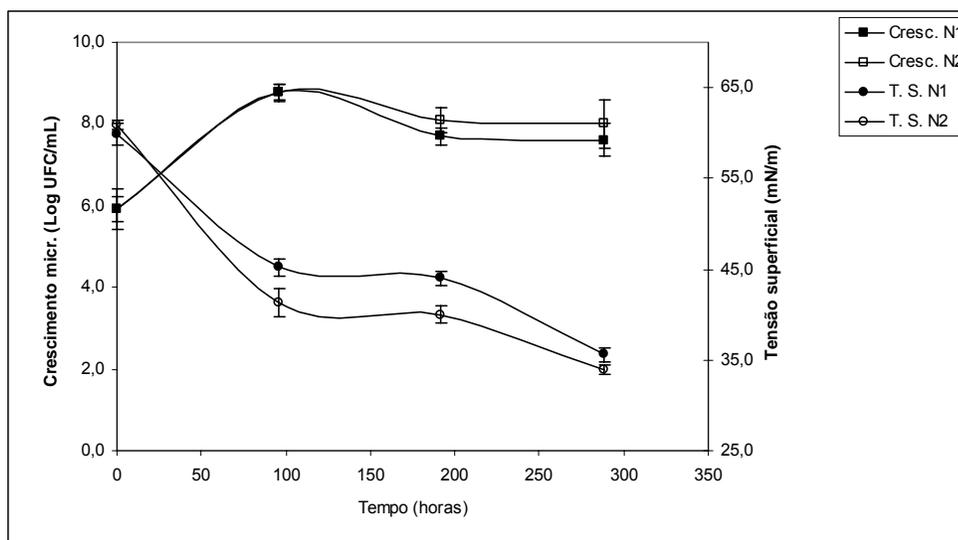


Figura 17 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da associação B6B5 em função do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2).

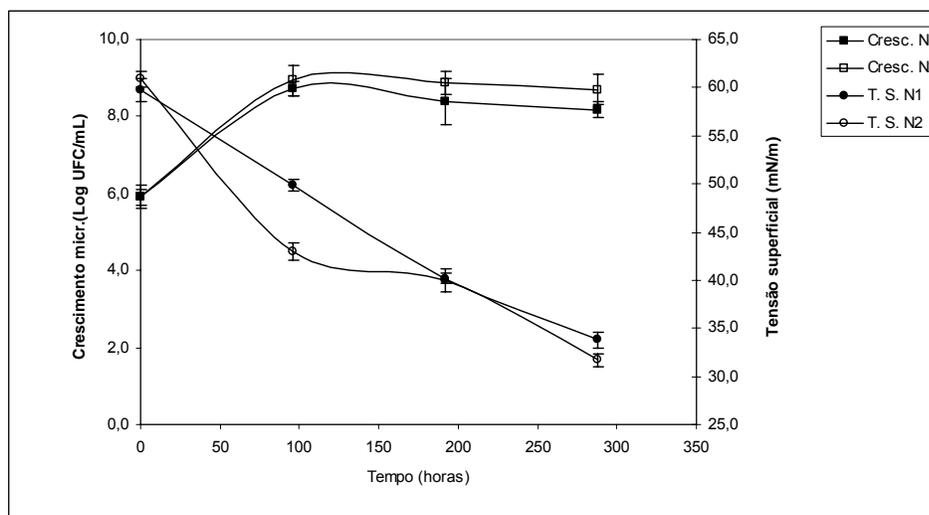


Figura 18 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da associação B6B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2)

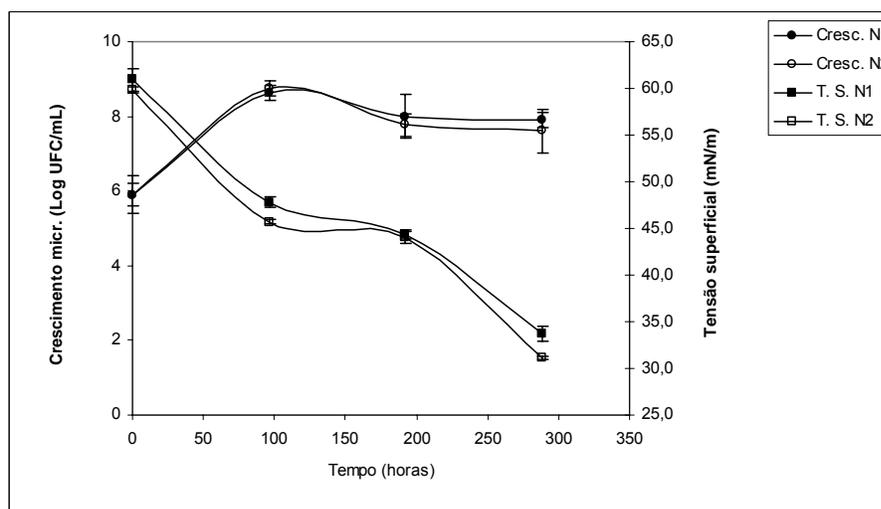


Figura 19 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano do consórcio B5B6B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 1% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e de 50:1 (N2)

Observa-se, nas figuras 17, 18 e 19, que as associações B6B5, B6B7 e B5B6B7 apresentaram um comportamento semelhante quanto ao crescimento microbiano, alcançando quantificações máximas da ordem de 10^9 UFC/mL, com 96 horas de aclimação, para em seguida declinar, provavelmente, devido às condições de cultivo

serem bastante seletivas. Verifica-se ainda, que, no período compreendido entre 192 e 280 horas de aclimatação, ocorre uma estabilização na concentração celular (10^8 UFC/mL), o que é típico de fase estacionária. Ao mesmo tempo, verifica-se que, nesse citado período, ocorre uma maior queda nos valores de tensão superficial (de 40 para em torno de 30 mN/m), o que indica a ocorrência de substâncias tensoativas. RON & ROSEMBERG (2001;2002), destacam que, compostos ativos de superfície, produzidos freqüentemente por microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo, tem a sua maior produção na fase estacionária do crescimento microbiano.

De uma maneira geral, durante a etapa de aclimatação com 1% de querosene, os valores de tensão superficial e de crescimento microbiano obtidos com todas as culturas, foram próximos para os bioestímulos N1 (C:N de 200:1) e N2 (C:N de 50:1), verificando-se que os valores de tensão superficial foram um pouco inferiores no bioestímulo N2 do que no N1 (variações de 2,9% a 10%), decorrente da maior produção de substâncias tensoativas. Quanto à quantificação de microrganismos, observa-se que o bioestímulo N2 foi ligeiramente superior ao bioestímulo N1 (entre 8% e 47,5%), denotando que a relação C:N de 50:1 promoveu uma melhor condição nutricional para as culturas, puras e mista.

A atribuição de valores ótimos da relação C:N, tem sido discutida amplamente por diversos autores. Alexander (1994) reporta valores que variam de 50:1 a 400:1, enquanto Baker & Herson (1994) propuseram relações de C:N na faixa de 10:1 a 200:1. Walworth *et al* (1997) sugerem um estudo acurado dos níveis críticos de nitrogênio para encontrar os mais adequados a fim de suprir as necessidades nutricionais do microrganismo com respeito à este elemento, sem que ocorra a inibição do crescimento microbiano.

Na tabela 17 estão discriminados os valores de pH, iniciais e finais, bem como os percentuais de redução desses valores, após 12 dias de aclimatação com 1% de querosene, utilizando os bioestímulos N1 e N2.

Tabela 17 – pH, inicial e final, dos ensaios de aclimação a 1% de querosene, submetidos aos bioestímulos N1 e N2

Associação/Isolado	pH inicial		pH final		Redução (%)	
	N1	N2	N1	N2	N1	N2
B6	7,2	7,2	5,6	5,2	22,2	27,7
B6B5	7,2	7,2	5,4	5,3	25,0	26,3
B6B7	7,2	7,2	5,6	5,4	22,2	25,0
DAUFPE 39	7,2	7,2	6,5	6,2	9,7	13,8
B5B6B7	7,2	7,2	5,5	5,3	23,6	26,3
Controle abiótico	7,2	7,2	7,1	7,1	1,3	1,3

Observa-se na tabela 17 que as maiores reduções de pH ocorreram com todas as culturas, isoladas ou em consórcios, quando se empregou o bioestímulo N2. Tal fato era de se esperar, uma vez que, aumentos na concentração de nitrogênio, favorecem a biodegradação, e conseqüentemente, maior produção de ácidos intermediários (ATLAS, 1984).

5.5 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados, durante 60 dias, com as mesmas culturas, isoladas e em consórcios, que foram aclimatadas, porém empregando apenas o percentual de 15% de querosene. Nestes ensaios foram avaliados: o pH, a tensão superficial e o crescimento microbiano, a intervalos de 5 dias, e o percentual dos hidrocarbonetos residuais no material biodegradado, com 35 e 60 dias de bioprocessamento.

5.5.1 Tensão Superficial e Crescimento Microbiano

As figuras 20 a 24 mostram os perfis de tensão superficial e a quantificação microbiana das linhagens, B6 e *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, e dos consórcios B6B5, B6B7 e B5B6B7.

Verifica-se em todas as figuras (20 a 24), tanto no bioestímulo N1 como no N2, uma queda da tensão superficial ao longo do processo, provocada, provavelmente pela produção de substâncias tensoativas que promovem um aumento na superfície de contato água-óleo, contribuindo para que ocorra uma maior disponibilidade da fonte oleosa à ação microbiana. Segundo RON & ROSEMBERG (2001; 2002) a medida da tensão superficial dos meios bioprocessados com derivados de petróleo é uma avaliação indireta da ocorrência de biodegradação.

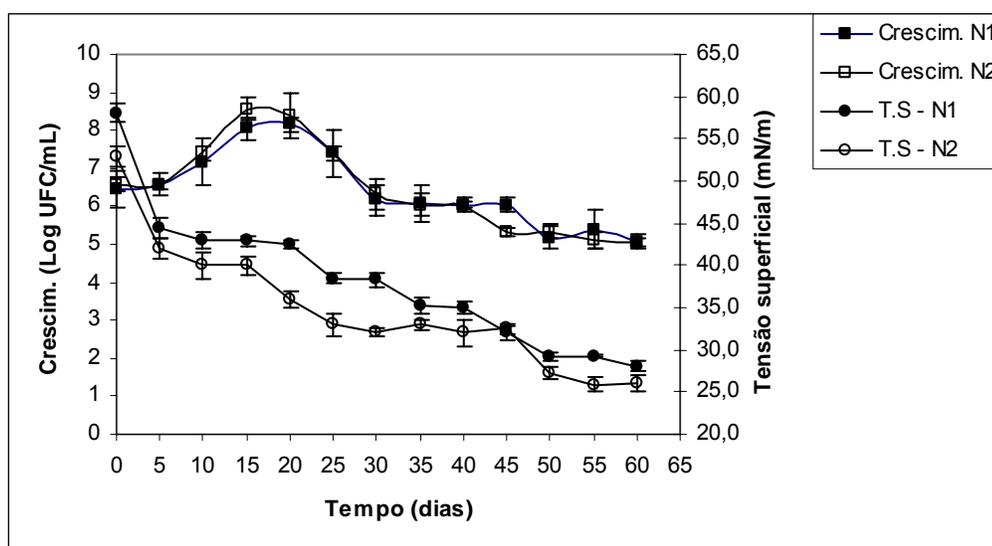


Figura 20 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem B6 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2).

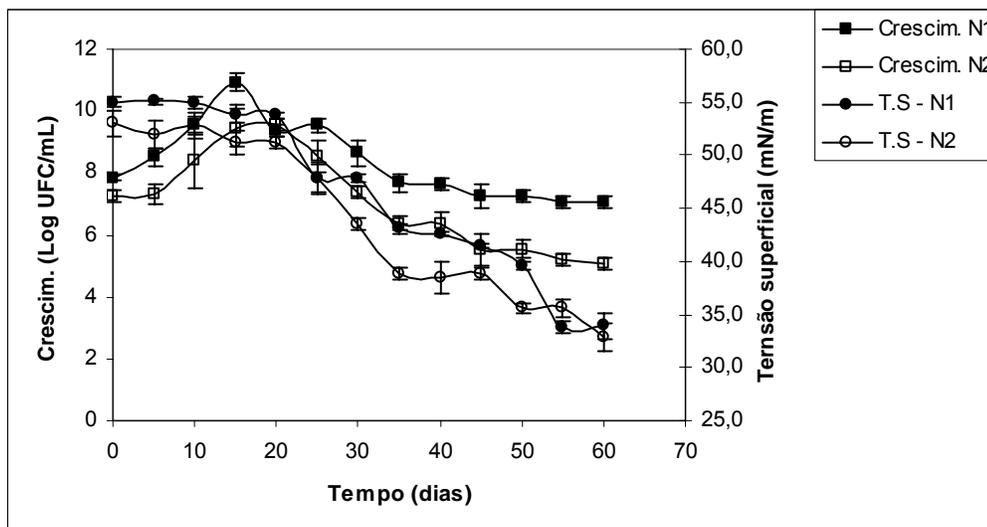


Figura 21 - Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2)

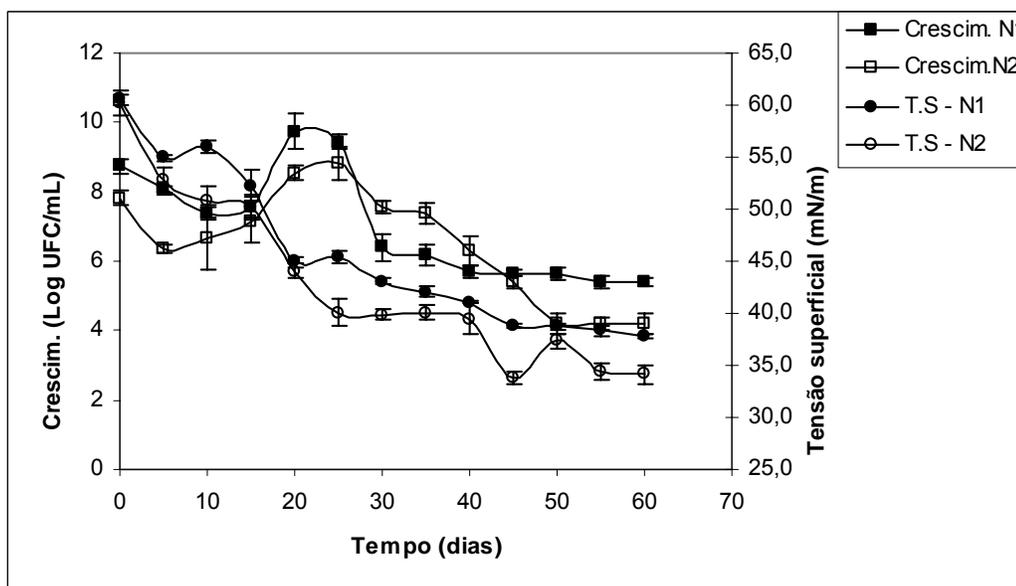


Figura 22 - Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da associação B6B5 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2)

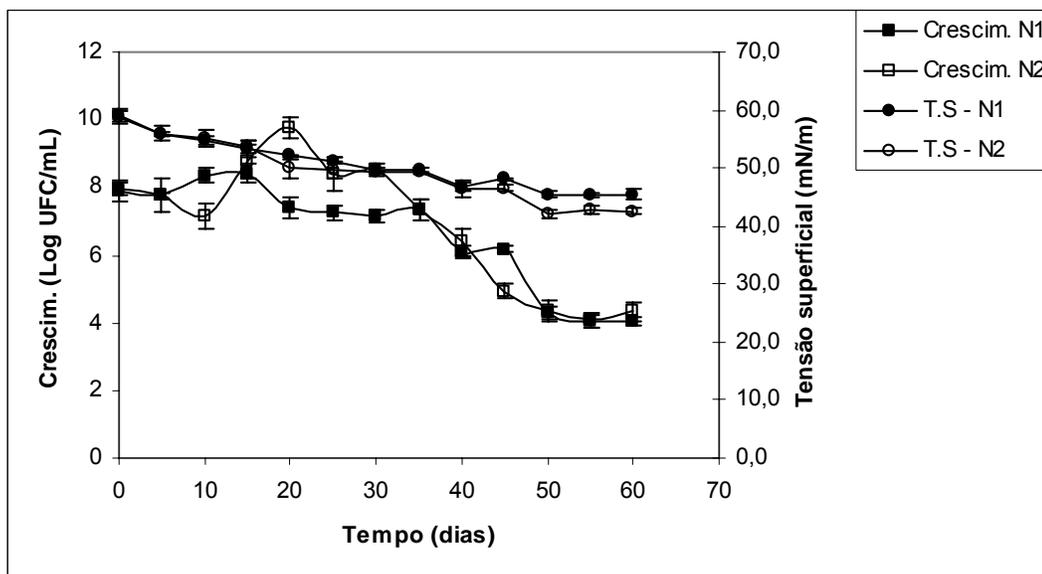


Figura 23 - Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da associação B6B7 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2)

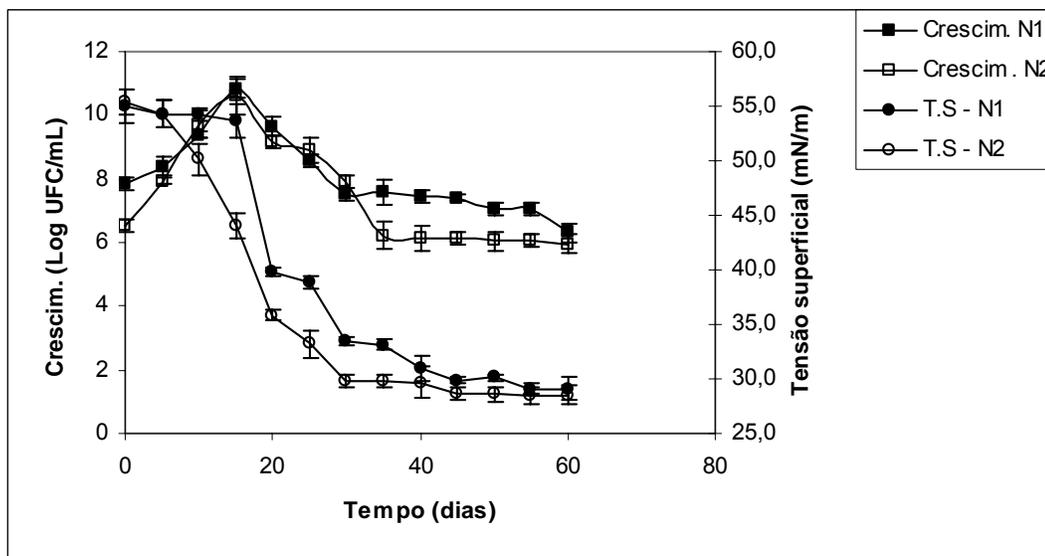


Figura 24 - Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano do consórcio B5B6B7 ao longo dos 60 dias, em meio contendo 15% de querosene e C:N de 200:1(N1) e 50:1 (N2)

Observa-se, nas figuras 20 a 24 com os bioestímulos N1 e N2, que ocorre, geralmente, no período final do processo (50 a 60 dias), uma estabilização da tensão

superficial em torno de um valor, o qual é variável de acordo com a cultura ensaiada, ou seja, para as linhagens, B6 e *P. aeruginosa* DAUFPE 39, os valores foram cerca de 27 e 33mN/m, e para as associações B6B5, B6B7 e B5B6B7 de 36, 44 e 29 mN/m, respectivamente. Segundo Neufeld *et al*, 1980, o tempo de duração do bioprocessamento, é primordial para a observação da estabilização da tensão superficial em torno de um valor.

Valores semelhantes foram encontrados por Lang (2002), utilizando biossurfactante produzido por *Norcadia* sp. cultivada em meio contendo n-hexadecano como fonte de carbono e energia, obteve uma redução da tensão superficial da ordem de 28mN/m.

Neufeld *et al* (1980), partindo de um meio aquoso com tensão superficial de aproximadamente, 70,0mN/m, obtiveram resultados da ordem de 26,5 mN/m com *Acinetobacter calcoaceticus* cultivada em meio mineral contendo 2% de n-hexadecano como fonte de carbono, em fermentação contínua por 30 horas.

Bognolo (1998), em sua revisão, mostra valores de tensão superficial de alguns biossurfactantes. Entre eles, estão os raminolipídios 1, 2 e 3, com valores entre 28,0 e 31,0 mN/m.

Para uma melhor avaliação dos valores de tensão superficial, iniciais e finais, de todas as culturas, foi elaborada a Tabela 18, levando-se em conta os bioestímulos N1 e N2. Pode-se observar que as maiores reduções de tensão superficial ocorreram, em ordem decrescente, para o isolado B6 (51%), o consórcio, B5B6B7 (48%), a associação B6B5 (43%), a linhagem de *P. aeruginosa* (40%) e o consórcio B6B7 (27%).

Tabela 18 – Valores de tensão superficial, iniciais e após 60 dias, dos ensaios de biodegradação, submetidos aos bioestímulos N1 e N2

Associação/Isolado	Tensão inicial		Tensão final		Redução (%)	
	N1	N2	N1	N2	N1	N2
B6	58,0	53,0	28,0	26,1	51,7	50,75
B6B5	60,6	60,3	37,9	34,1	37,4	43,4
B6B7	59,0	58,9	45,5	42,5	22,8	27,8
DAUFPE 39	55,0	53,0	33,0	32,9	40,0	37,9
B5B6B7	55,0	55,4	29,1	28,5	47,0	48,5
Controle abiótico	60,9	60,9	59,1	59,1	2,9	2,9

De uma maneira geral, as reduções percentuais de tensão superficial foram maiores nos ensaios submetidos ao bioestímulo N2 do que no N1 para as culturas em consórcios, enquanto que para as culturas puras, B6 e *P. aeruginosa* DAUFPE 39, as reduções bioestímulo N1 foram maiores do que no bioestímulo N2.

Vale destacar que, a linhagem de *P. aeruginosa* DAUFPE 39 apresentou reduções de tensão superficial maiores que o consórcio B6B7, o que é surpreendedor, uma vez que a mesma apresentou maiores valores finais de tensão superficial nos ensaios de aclimatação.

Rosemberg (1991), ressalta que a *Pseudomonas aeruginosa*, é uma espécie degradadora de hidrocarbonetos, com reduzida capacidade de se estabelecer em superfícies oleosas, embora seja responsável por altas taxas de biodegradação, quando aclimatada e submetida a bioestímulo.

Nota-se, em todas as figuras (20 a 24), que as quantificações microbianas máximas ocorreram no período entre 15 e 25 dias de biodegradação com valores compreendidos entre 10^8 a 10^{11} UFC/mL. Logo em seguida, verifica-se uma queda nas quantificações de bactérias metabolicamente ativas, por se tratar de uma condição de cultivo altamente seletiva, vindo, posteriormente, a se estabilizar, abrangendo valores

na faixa de 10^4 a 10^7 UFC/mL. Tal fato foi evidenciado por Espírito-Santo, (2002), que, trabalhando com óleo Diesel em frascos, aplicou inóculos da ordem de 10^7 UFC/mL e observou, após 8 dias, um crescimento máximo, tanto de leveduras quanto de bactérias (10^8 a 10^9 UFC/mL), porém, após 20 dias, essas quantificações decresceram para a faixa de 10^5 a 10^6 UFC/mL.

Nos ensaios com as linhagens B6 e *P aeruginosa*, (Figuras 20 e 21), verifica-se curvas ascendentes de crescimento microbiano com pequena fase *lag* de cinco dias, enquanto que para o consórcio B5B6B7 (Figura 24), o crescimento é imediato, não existindo fase *lag* de adaptação à nova carga de poluente, o que é decorrente da etapa de aclimação com igual teor do contaminante orgânico. Segundo Alexander (1994), após a aclimação, a taxa de metabolização do poluente pode ser maior ou menor, porém se uma nova adição do poluente for feita, a degradação desse incremento ocorrerá com um período de aclimação pequeno ou praticamente inexistente.

As associações B6B5 e B6B7 (Figuras 22 e 23), apresentaram, tanto no bioestímulo N1 como no N2, um decréscimo inicial da população microbiana, o que é de se estranhar, uma vez que todos os isolados e consórcios foram aclimatados por 12 dias com 15% de querosene. Pode-se supor que, partindo-se de um consórcio com menor potencial degradador, devido a interações entre eles, seja necessário um tempo maior de aclimação para que, ao se iniciar o experimento de biodegradação, ocorra uma diminuição da fase de adaptação à nova carga de poluente.

A linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, apresentou quantificação microbiana máxima (bioestímulo N1) da ordem de 10^{11} UFC/mL em 15 dias de processo (Figura 21). Apesar de não ter sido isolada de ambiente poluído, a versatilidade do seu potencial genético lhe permitiu crescer expressivamente devido à fácil adaptação aos hidrocarbonetos do querosene.

5.5.2 pH

Na tabela 19, estão discriminados os valores de pH, iniciais e finais, como também o percentual de redução desses valores, nos ensaios de biodegradação com as culturas, puras e mistas, submetidas aos bioestímulos N1 e N2.

Tabela 19 - pH inicial e com 60 dias de biodegradação

Associação/Isolado	pH inicial		pH final		Redução (%)	
	N1	N2	N1	N2	N1	N2
B6	7,0	6,9	4,8	4,8	31,4	30,4
B6B5	7,0	7,1	5,7	5,2	18,5	26,7
B6B7	7,2	6,8	5,6	5,5	22,2	19,1
DAUFPE 39	6,9	6,1	5,1	4,8	26,8	21,3
B5B6B7	6,9	6,8	5,2	4,8	24,6	29,4
Controle abiótico	7,2	7,2	7,1	7,1	1,3	1,3

Quanto à produção de metabólitos ácidos, observa-se, na tabela 19, que as reduções de pH ocorreram, em ordem decrescente para: o isolado B6 (31,4% bioestímulo N1), o consórcio B5B6B7 (29,4% bioestímulo N2), a linhagem de *P. aeruginosa* e a associação B6B5 (26,8% bioestímulo N1 - e 26,7% bioestímulo N2 respectivamente) e a associação B6B7 (22,2% bioestímulo N1).

O pH inicial difere do pH do meio de cultura (7,2) nos ensaios de biodegradação porque o inóculo foi preparado com o meio, contendo células e produto metabólico, proveniente dos ensaios de aclimatação a 15% de querosene (Tabela 19). Desta forma, os isolados ou consórcios que apresentaram maior produção de metabólitos ácidos na etapa de aclimatação, produziram inóculos mais ácidos, diminuindo conseqüentemente o pH no início dos ensaios de biodegradação.

Leahy & Colwell (1990) sugerem que valores de pH entre 6,0 e 8,0 são os mais favoráveis à ação de microrganismos degradadores de petróleo, embora seja bastante difundido que os fungos são mais tolerantes às condições ácidas (ATLAS, 1981a).

Álvarez (2002), investigando a produção de compostos alquilados pela beta-oxidação de hidrocarbonetos, detectou vários intermediários ácidos, entre eles, os ácidos: hexadecanóico, fenildecanoico e pristanóico, derivados de n-alcanos, monoaromáticos, poliaromáticos e de misturas, como o óleo Diesel, o querosene e o óleo cru. Estes metabólitos ácidos são seguramente responsáveis pela redução do pH na fase aquosa.

5.5.3 Análises Cromatográficas

A avaliação da biodegradabilidade de cada composto que constitui o querosene foi realizada por comparação entre os compostos encontrados no controle com os dos ensaios propriamente ditos. Desta forma, considerou-se o controle como sendo a concentração máxima de cada composto (100%).

Os resultados, das análises cromatográficas do controle, indicaram 89 picos, dos quais apenas 13 puderam ser identificados com maior precisão (Tabela 20). Destes treze picos, apenas os nove primeiros (n-decano, 4-metildecano, 3-eti-2,7-dimetiloctano, n-undecano, dodecano, 6-metil-dodecano, 2,6,10,14- tetrametiloctano, n-tridecano, 2,6,11-trimetildodecano) puderam ser visualizados em quase todos os ensaios e portanto foram utilizados para fins de um estudo comparativo.

As figuras 25 a 28 mostram teores percentuais dos hidrocarbonetos residuais existentes nos materiais biodegradados pelas linhagens, B6 e *Pseudomonas aeruginosa*, e pelos consórcios B6B5, B6B7 e B5B6B7, submetidos aos bioestímulos N1 e N2 após 35 e 60 dias de processamento respectivamente. Para uma melhor avaliação, nas tabelas 21 e 22, estão discriminados os percentuais residuais do material biodegradado por todas culturas ensaiadas, em ambos os bioestímulos.

Tanto com 35 dias como com 60 dias de bioprocessamento, observou-se, maior degradação dos hidrocarbonetos do querosene nos ensaios submetidos ao bioestímulo N2 do que no N1, em todas as culturas ensaiadas (Tabela 21 e 22).

Tabela 20 – Compostos identificados no querosene

Número do pico	Tempo de retenção(min.)	Área do pico	Percentual	Nome do composto
01	4,997	173085635	5,7	n-decano
02	5,319	77732178	2,6	4-metildecano
03	5,558	80003898	2,7	3-etil, 2,7-dimetiloctano
04	6,462	233943103	7,8	n-undecano
05	7,960	472807610	15,7	Dodecano
06	8,163	284654620	9,4	6-metil-dodecano
07	9,032	442587630	14,7	2,6,10,14-tetrametilheptano
08	9,433	303908974	10,1	n-tridecano
09	10,520	213506627	7,1	2,6,11-trimetildodecano
10	10,843	365532468	12,1	n-tetradecano
11	11,317	59276335	2,0	n-hexano
12	11,688	132298249	4,4	n-eicosano
13	12,183	179190610	5,9	Policíclicos aromáticos*

*A biblioteca do espectrômetro de massa - MS apresentou com pouca precisão, muitos poli-aromáticos prováveis neste tempo de retenção.

Tabela 21 – Percentuais residuais dos hidrocarbonetos do QAV, após 35 dias de biodegradação, com as culturas B6, B6B5, B6B7, *P. aeruginosa* DAUFPE 39 e B5B6B7 utilizando os bioestímulos N1 e N2.

Bioestímulo	Hidrocarboneto	Percentual residual por Isolado / Associação					
		C	B6	B6B5	B6B7	DAUFPE 39	B5B6B7
N1							
	n-decano	100	38,30	20,10	42,40	79,00	4,60
	4-metildecano	100	99,50	14,00	59,50	16,20	25,60
	3-etil-2,7-dimetiloctano	100	15,10	16,70	52,20	100,00	16,60
	n-undecano	100	92,40	36,00	65,70	89,20	32,40
	Dodecano	100	11,90	22,60	33,00	93,60	15,00
	6-metil-dodecano	100	12,70	19,10	43,80	97,60	12,40
	2,6,10,14-tetrametilheptadecano	100	22,80	12,00	42,00	85,20	13,50
	n-tridecano	100	98,90	22,80	70,00	45,30	24,30
	2,6,11-trimetildodecano	100	28,50	99,90	50,80	99,80	23,00
N2							
	n-decano	100	0,20	5,10	25,00	77,00	4,00
	4-metildecano	100	0,50	14,00	28,30	15,00	18,90
	3-etil-2,7-dimetiloctano	100	0,10	14,10	21,10	98,70	15,00
	n-undecano	100	1,80	28,80	44,80	51,30	30,00
	dodecano	100	0,10	15,50	30,40	84,80	6,60
	6-metil-dodecano	100	0,50	13,40	33,40	71,30	12,00
	2,6,10,14-tetrametilheptadecano	100	0,30	9,60	27,50	77,40	7,70
	n-tridecano	100	0,60	2,40	49,40	40,00	24,30
	2,6,11-trimetildodecano	100	0,30	99,80	32,90	70,90	13,60

Tabela 22 – Percentuais residuais dos hidrocarbonetos do QAV, após 60 dias de biodegradação, com as culturas B6, B6B5, B6B7, *P. aeruginosa* DAUFPE 39 e B5B6B7 utilizando os bioestímulos N1 e N2.

Bioestímulo	Hidrocarboneto	% residual por Isolado / Associação					
		C	B6	B6B5	B6B7	DAUFPE 39	B5B6B7
N1	n-decano	100	6,20	21,00	27,30	1,40	1,90
	4-metildecano	100	8,00	15,90	20,70	1,60	2,30
	3-etil-2,7-dimetiloctano	100	11,10	19,20	24,40	0,90	3,80
	n-undecano	100	0,50	39,60	38,60	3,20	5,30
	dodecano	100	3,00	36,40	33,10	11,40	5,10
	6-metil-dodecano	100	3,70	25,80	22,50	7,60	4,2
	2,6,10,14-tetrametilheptadecano	100	15,40	91,00	96,80	3,00	0,01
	n-tridecano	100	5,70	32,50	32,50	12,80	9,10
	2,6,11-trimetildodecano	100	19,20	15,70	94,50	11,40	9,20
	N2		C	B6	B6B5	B6B7	DAUFPE 39
n-decano		100	N/D	10,60	25,00	1,00	N/D
4-metildecano		100	N/D	0,90	17,90	1,10	N/D
3-etil-2,7-dimetiloctano		100	N/D	15,00	15,20	0,01	N/D
n-undecano		100	0,40	20,30	36,10	0,90	0,20
dodecano		100	0,20	15,10	28,90	2,80	0,50
6-metil-dodecano		100	0,01	10,60	19,60	0,60	0,40
2,6,10,14-tetrametilheptadecano		100	0,10	54,30	89,40	1,80	0,50
n-tridecano		100	0,20	17,30	27,80	3,70	1,20
2,6,11-trimetildodecano		100	0,20	12,00	94,00	2,10	0,7

*N/D = não detectado

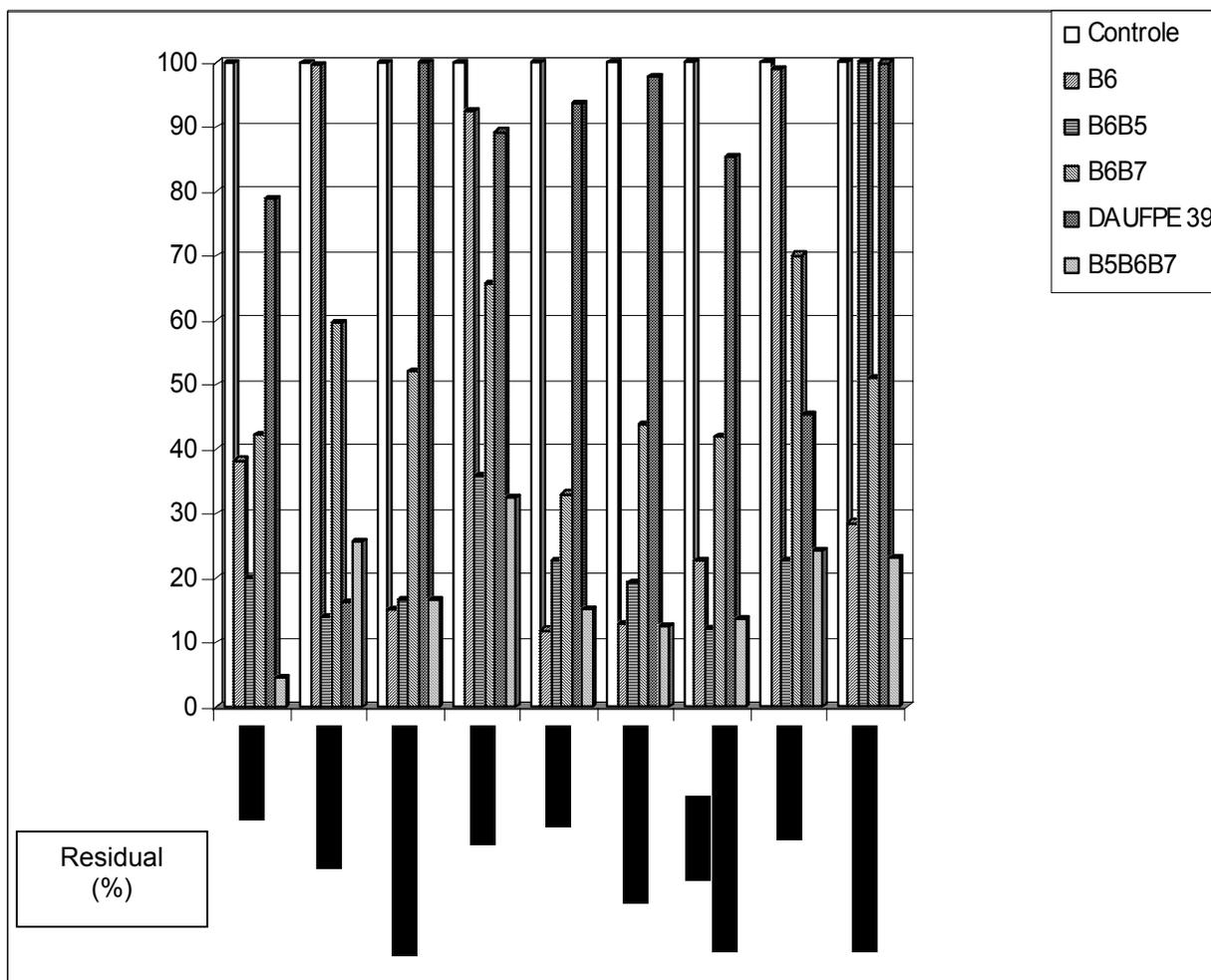


Figura 25 – Percentuais de hidrocarbonetos de querosene após 35 dias de biodegradação com as linhagens isoladas (B6 e *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE – 39) e os consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7), utilizando o bioestímulo N1.

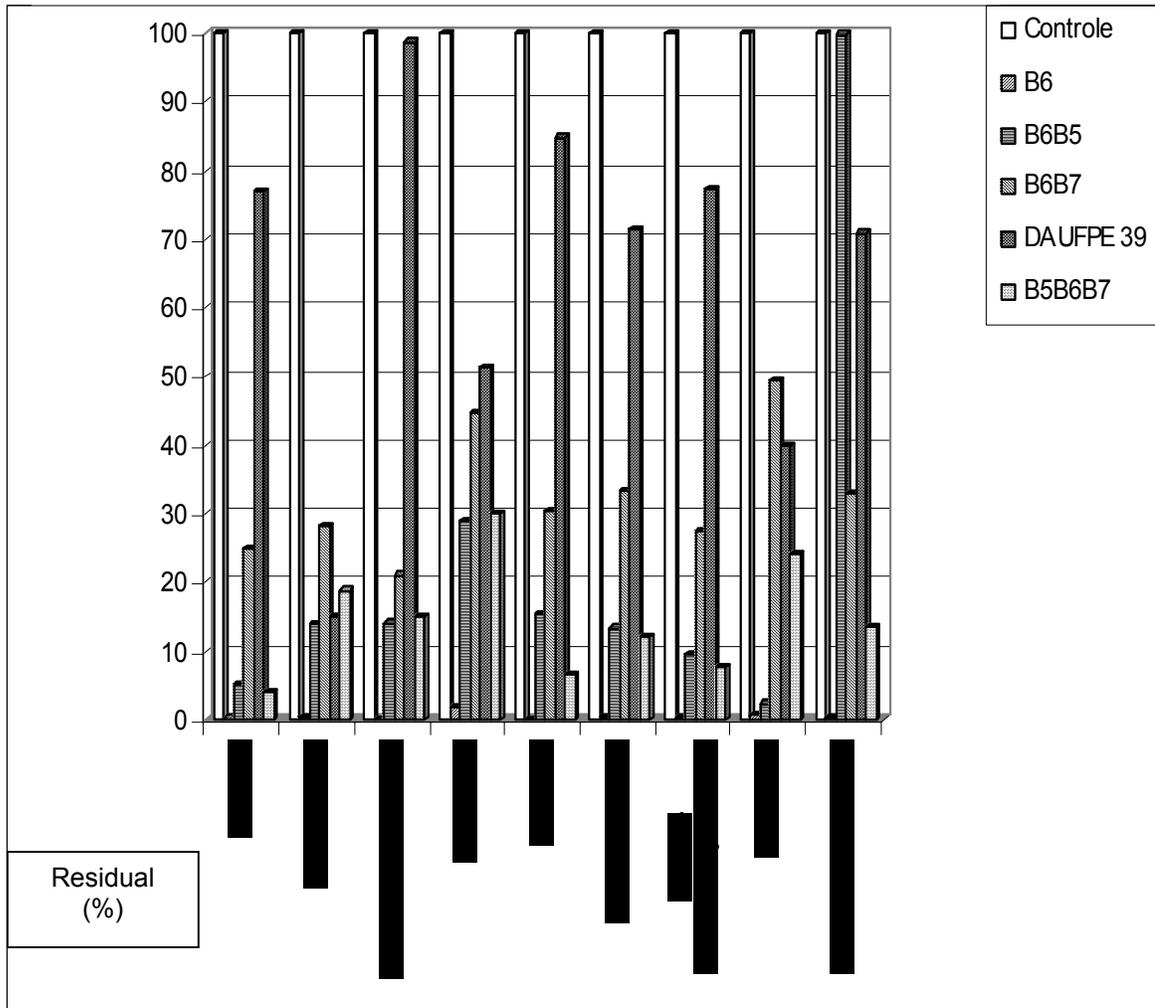


Figura 26 – Percentuais de hidrocarbonetos de querosene após 35 dias de biodegradação com as linhagens isoladas (B6 e *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE – 39) e os consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7), utilizando o bioestímulo N2.

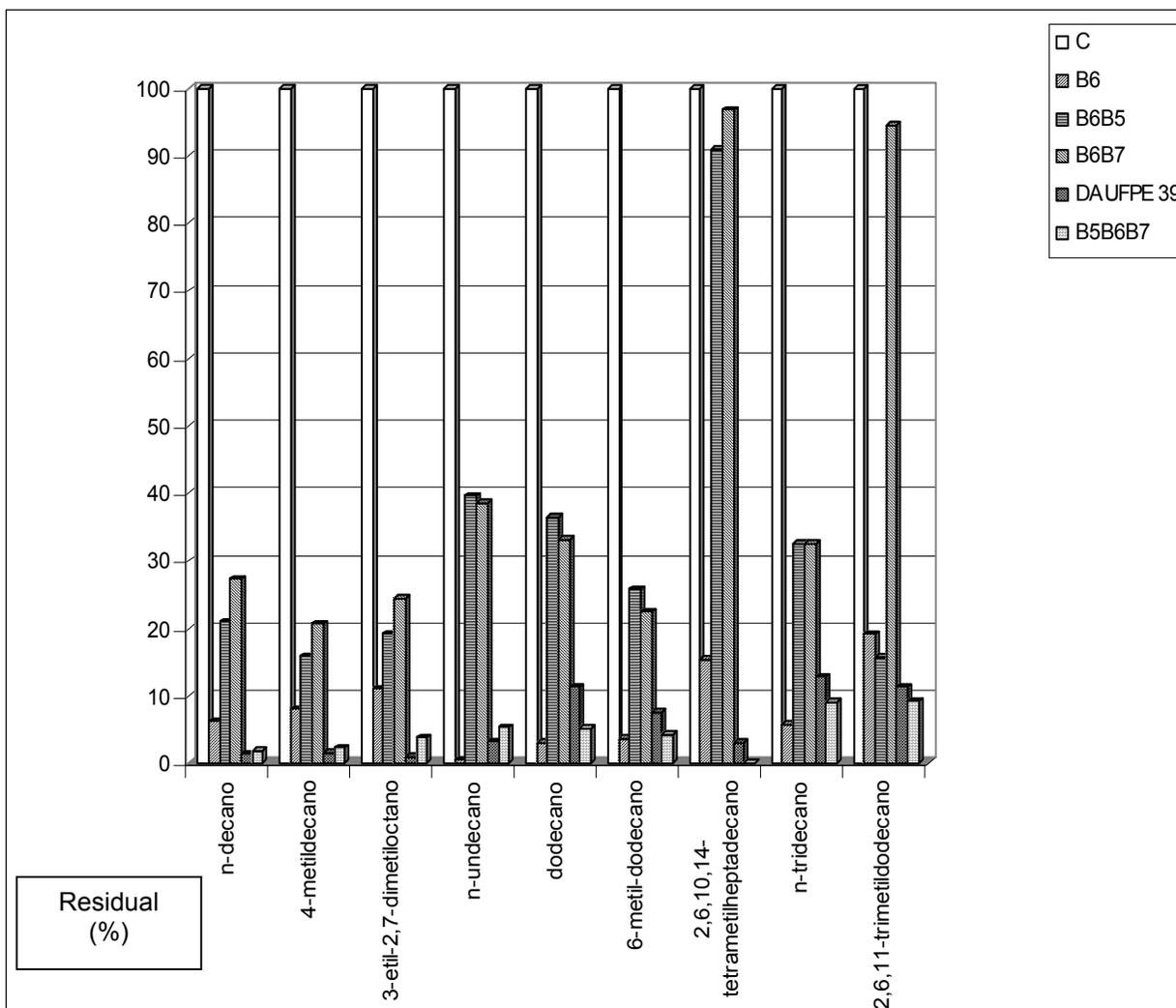


Figura 27 – Percentuais de hidrocarbonetos de querosene após 60 dias de biodegradação com as linhagens isoladas (B6 e *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE – 39) e os consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7), utilizando o bioestímulo N1.

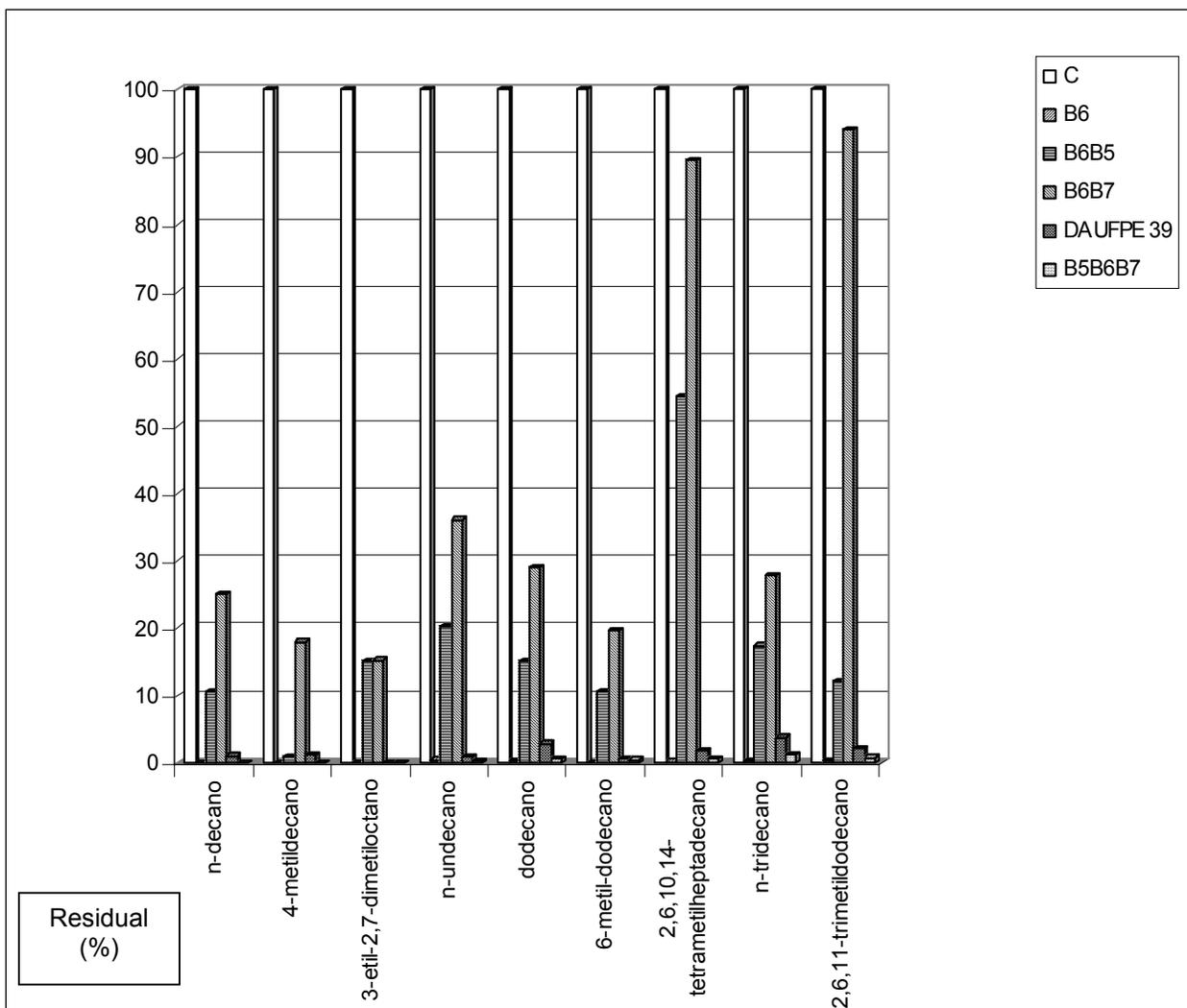


Figura 28 – Percentuais de hidrocarbonetos de querosene após 60 dias de biodegradação com as linhagens isoladas (B6 e *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE – 39) e os consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7), utilizando o bioestímulo N2.

Nota-se, nas tabelas 21 e 22, que o isolado B6 apresentou as maiores degradações em todos os constituintes analisados tanto nas diferentes condições nutricionais como nos tempos de bioprocessamento. Os cromatogramas relativos às concentrações dos hidrocarbonetos degradados pelo isolado B6 nos bioestímulos N1 e N2 com 35 e 60 dias de processamento estão mostrados nas figuras 29 e 30. Os cromatogramas das demais culturas encontram-se no anexo B.

Os compostos ramificados 2,6,10,14-tetrametilheptadecano e 2,6,11-trimetil dodecano, foram os que apresentaram maior persistência com 60 dias de bioprocessamento empregando os consórcios B6B5 e B6B7. A baixa biodegradabilidade destes compostos, comparada aos demais, provavelmente, está relacionada à sua baixa biodisponibilidade para os microrganismos. De acordo com Maier (1999), hidrocarbonetos ramificados têm menor biodisponibilidade quando comparados aos de cadeia normal.

Os compostos n-decano, 4-metil-decano e 3-etil, 2,7-dimetiloctano, não foram detectados após 60 dias de processamento com o isolado B6 e o B5B6B7, submetidos ao bioestímulo N2. É provável que esses compostos, tenham sido completamente eliminados, ou biotransformados, podendo, os seus produtos, serem detectados em outro tempo de retenção que não foi abrangido.

Atlas (1981b) trabalhando com óleo cru verificou uma redução, da ordem de 50%, para n-alcanos a partir de 14 dias de processo de biodegradação. O desaparecimento completo de n-alcanos com menos de 26 átomos de carbono ocorreu com 28 dias. Alcanos com mais de 28 átomos de carbono persistiram por mais de 42 dias.

Cunha & Leite (2000), realizando ensaios de biodegradação de gasolina em meio mineral, verificaram melhores taxas de degradação para n-undecano e n-tridecano após 72 horas de processamento. Um consórcio de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas alcaligenes*) reduziu n-alcanos com C₉ em 19,9%; C₁₁ em 26,4%; C₁₂ em 21,5% e C₁₃ em 25,3%. Maiores taxas foram observadas com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio (NH₄NO₃) no meio de cultura.

Ruberto *et al*, (2003), após 50 dias de processamento, obtiveram reduções na concentração média dos hidrocarbonetos de óleo Diesel em torno de 35% e 65% com relação à concentração inicial, trabalhando com a relação nutricional C:N:P de 100:12:3.

Ururahy (1998), trabalhando com 10% de borra oleosa (em frascos agitados), obteve melhores resultados de biodegradação com a relação C:N 100:1, quando comparada à relação C:N de 50:1. Seus melhores resultados com este percentual de borra foram 20,7% de eficiência de biodegradação com a relação C:N de 100:1 e 20,0% com a relação C:N de 50:1 após 42 dias de processamento.

5.6 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

O isolado B6 foi o que apresentou os melhores resultados nos ensaios de biodegradação e o material resultante dos ensaios (no bioestímulo N2) com 35 e 60 dias de processamento, foi escolhido para realização dos ensaios de ecotoxicidade.

A amostra biodegradada com 35 dias necessitou, para ser determinada a CL_{50} , de uma diluição 256 vezes a amostra original (FDB = 256), enquanto que para a amostra biodegradada com 60 dias foi necessário um fator de diluição de 128 (FDB = 128). As concentrações estimadas para a CL_{50} , são respectivamente, 390,6ppm e 781,2ppm.

Tais resultados indicam que, de acordo com os padrões de ecotoxicidade para efluentes líquidos, ambas as amostras encontram-se com níveis não toleráveis de toxicidade. Para os objetivos do presente estudo, entretanto, tais resultados são satisfatórios porque a redução da toxicidade de um processamento para o outro foi da ordem de 50%.

Santa Anna *et al* (2002), investigando a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*, testaram o material resultante dos ensaios quanto à sua ecotoxicidade utilizando a fotobactéria *Vibrio fisheri* e encontraram valores em torno de 13,0 ppm para a CL_{50} do material isento de células.

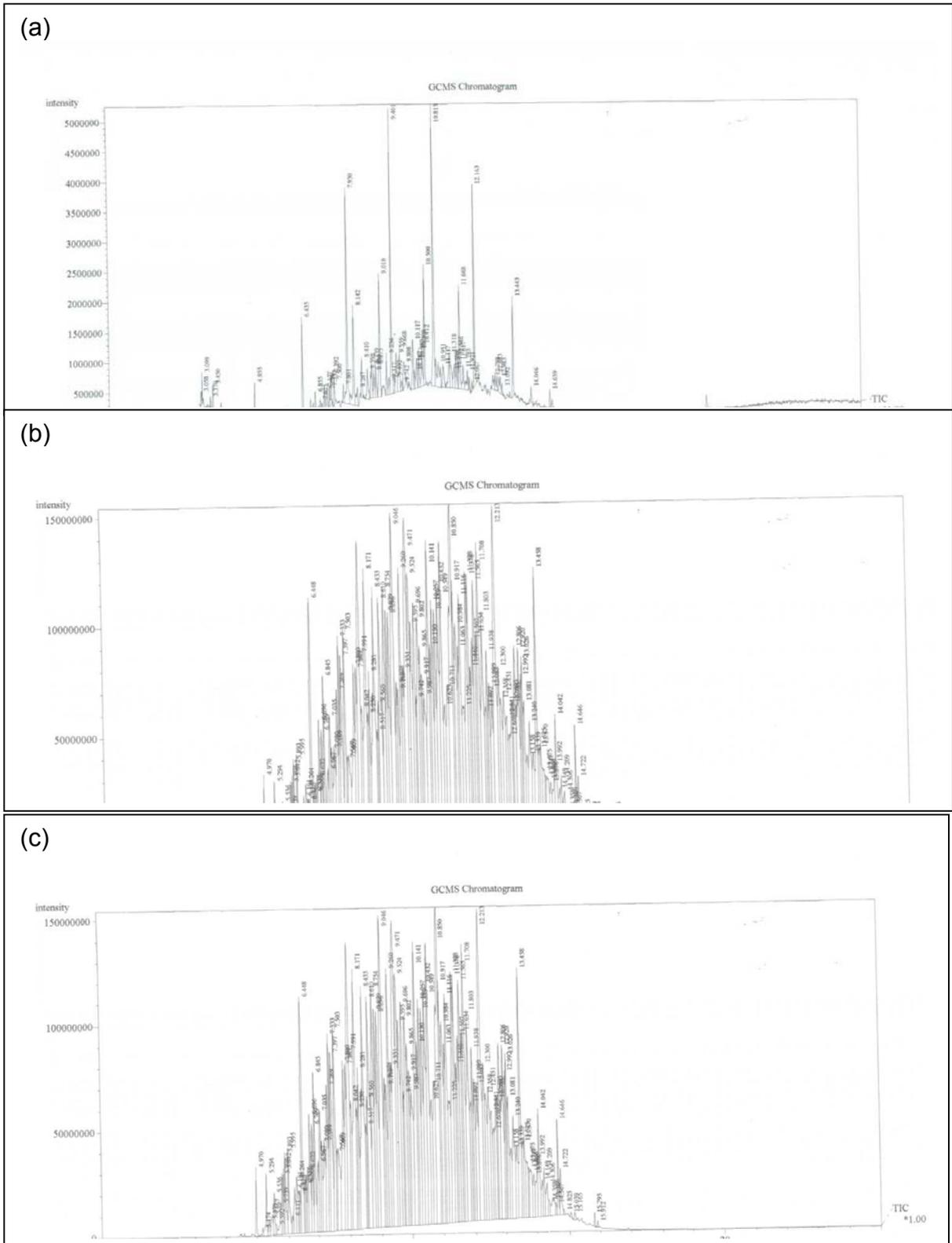
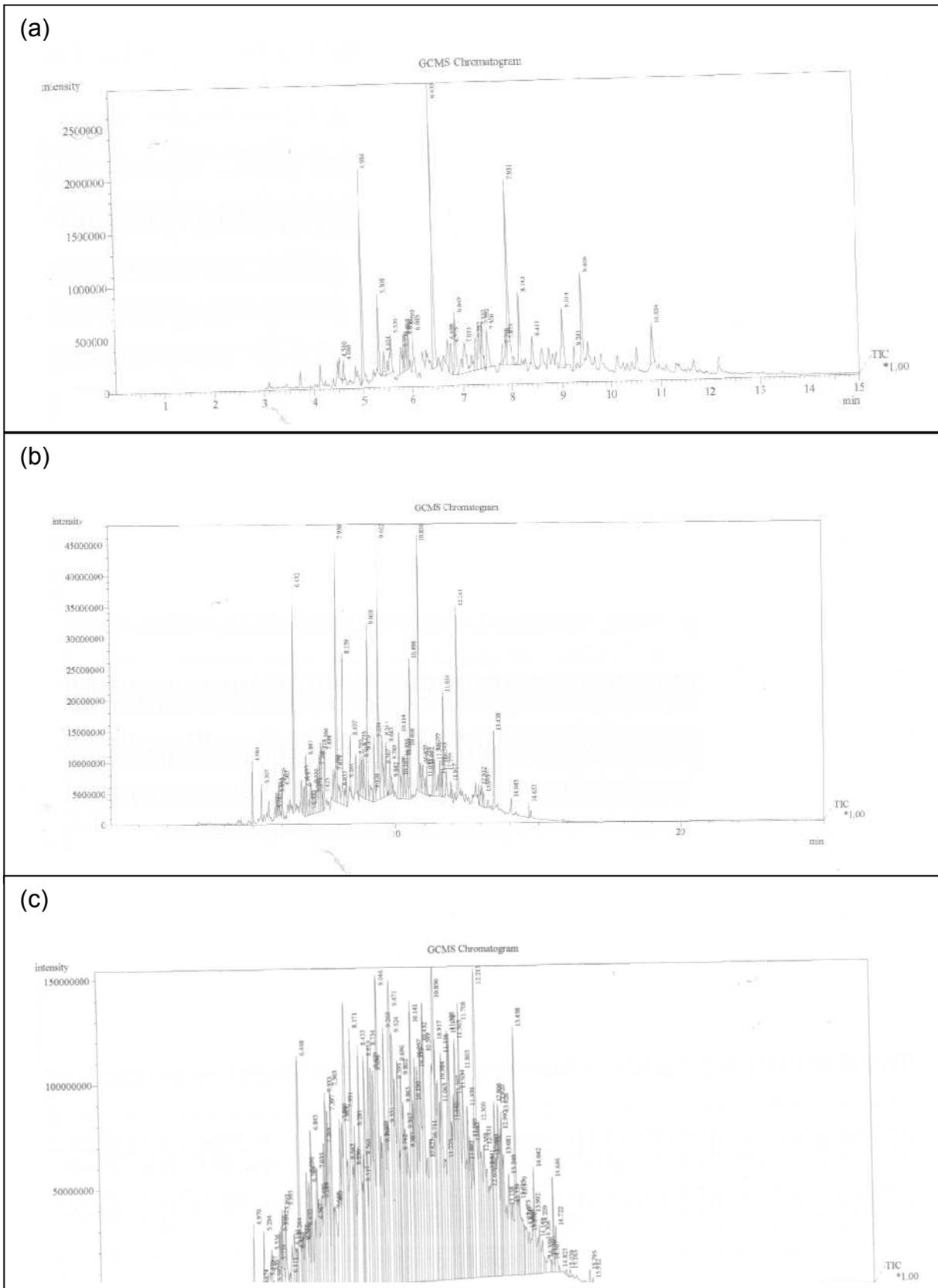


Figura 29 – Cromatogramas do isolado B6 C:N 200:1– (a) após 60 dias; (b) após 35 dias e (c) controle abiótico.



6. CONCLUSÕES

- a. A adaptação da técnica, aplicada a placas multi-poços por Hanson *et al* (1993), para frascos agitados, utilizando o indicador 2,6 diclorofenol indofenol no meio de cultivo, serviu para selecionar microrganismos, isolados ou em consórcios, com potencialidade para degradar hidrocarbonetos;
- b. Na etapa de seleção, a linhagem B6 e as associações B6B5, B6B7, B6B4 e B4B5B6B7 foram as selecionadas, dentre oito isolados bacterianos e seus consórcios, por apresentarem maior potencialidade para degradar o querosene;
- c. O isolado B7 e os consórcios B6B4, B6B5 e B6B7 exibiram, nos ensaios de seleção, reduções nos valores de tensão superficial ($\geq 44,3\%$) superiores ao isolado B6 (39,7%), indicando ser culturas promissoras no que se refere à produção de substâncias tensoativas.
- d. Durante a etapa de aclimação a 1% de querosene, os valores de: tensão superficial, pH e crescimento microbiano, no bioestímulo N1, foram próximos ao bioestímulo N2, sendo que esta última condição promoveu uma maior produção de substâncias tensoativas, ácidos orgânicos e conferiu uma melhor condição nutricional para as culturas B6, B6B5 e B6B7, dando quantificações ligeiramente superiores;
- e. Nos ensaios de aclimação a 1% de querosene, verificou-se que o crescimento microbiano, em todas as culturas selecionadas, alcançou uma quantificação máxima (cerca de 10^9 UFC/mL) com 96 horas de processo, declinando, em seguida para estabilizar, no período de 192 a 280 horas (em torno de 10^8 UFC/mL), período este em que houve maior redução na tensão superficial, indicando maior produção de substâncias tensoativas;

- f. Nos ensaios de biodegradação, as maiores concentrações microbianas ocorreram no período entre 15 e 25 dias de biodegradação (10^8 a 10^{11} UCF/mL), havendo, em seguida, uma queda nessas quantificações (10^4 a 10^7 UFC/mL) por se tratar de uma condição de cultivo bastante seletiva;
- g. Observou-se, nos experimentos de biodegradação, que as produções de metabólitos ácidos ocorreram, em ordem decrescente, para: B6 (31,0%), B5B6B7 (29,4% - bioestímulo N2), *P. aeruginosa* (26,8% - bioestímulo N1), B6B5 (26,7% - bioestímulo N2) e B6B7 (21,0%);
- h. Nos ensaios de biodegradação, as reduções de tensão superficial foram, em média, de: 51% (B6), 47% (B5B6B7), 40% (B6B5), 36% (*P. aeruginosa* DAUFPE 39) e 25% (B6B7), e estas reduções foram maiores nos ensaios de submetidos ao bioestímulo N2 do que ao N1, para os consórcios, enquanto que ocorreu o inverso para as culturas puras;
- i. O bioestímulo N2 (relação C:N de 50:1), promoveu uma maior degradação do querosene pelos isolados (B6 e *P. aeruginosa*) e consórcios (B6B5, B6B7 e B5B6B7) do que o bioestímulo N1 (relação C:N de 200:1);
- j. O isolado B6, submetido ao bioestímulo N2, apresentou as maiores degradações em todos os nove constituintes analisados do querosene seguido do consórcio B5B6B7;
- k. A linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, apesar de ter exibido os maiores valores finais de tensão superficial (~ 50 mN/m) na etapa de aclimação, apresentou, nos ensaios de biodegradação com 15% de querosene, quantificações microbianas da ordem de 10^{11} UFC/mL, em 15 dias de processo, demonstrando uma grande capacidade de se adaptar às condições de altas concentrações de hidrocarbonetos de petróleo;

- l. Os compostos com maiores ramificações, como o 2,6,10,14-tetrametilheptadecano e 2,6,11 trimetildodecano, mostraram-se mais persistentes à degradação para os consórcios B6B5 e B6B7, após 60 dias de bioprocessamento;

- m. Os ensaios de ecotoxicidade mostraram uma redução de 50% na toxicidade do material degradado pelo isolado B6, quando decorreu o tempo de 35 para 60 dias de experimento, evidenciando a degradação de substâncias tóxicas.

7. SUGESTÕES

- ❖ Avaliar a potencialidade dos isolados frente a hidrocarbonetos puros, a fim de compor um consórcio de microrganismos que atuem em cometabolismo;
- ❖ Realizar ensaios de biodegradação em biorreator com isolados e consórcios promissores;
- ❖ Verificar o crescimento de bactérias na interface, paralelamente ao crescimento na fase aquosa, a fim de estimar com maior precisão a população microbiana total;
- ❖ Acompanhar a variação da tensão interfacial, concomitantemente com a tensão superficial, a fim de se verificar os isolados que possuem maior atividade na interface água-óleo;
- ❖ Realizar ensaios de ecotoxicidade com organismos representativos da biota marinha local;
- ❖ Avaliar a produção de biossurfactantes;
- ❖ Realizar ensaios de biodegradação simulando uma contaminação de querosene em solo, testando diferentes relações de C:N:P, (bioestímulo), e diferentes inóculos com microrganismos alóctones (bioaumento), comparando com o desempenho da população nativa;
- ❖ Acompanhar o crescimento de bactérias hidrocarbonoclásticas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P. D. Approaches to measuring the toxicity of pollutants to marine organisms. In: *Ecotoxicology and Marine Environment*. New York. Ellis Horwood Limited. 1991.

ALEXANDER, M.: *Biodegradation and Bioremediation*. academic Press, 2ed. 1994.

ÁLVAREZ, H. M.: Relationship Between β -Oxidation Pathway and The Hydrocarbon Degrading Profile in Actinomycetes Bacteria. **International Biodeterioration. & Biodegradation**. v. 52, p. 35-42. 2002.

AMELLAL, N.; PORTAL, J., M.; BERTHELIN, J.: Effect of Soil Structure on the Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons within Aggregates of a Contaminated Soil". **Applied Geochemistry**. v. 16, p. 1611-1619. 2001.

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

ASTM D – 971. 99th, Standard tests Method for Interfacial Tension of Oil against Water by the Ring *in*: Method – **America Society for testing and Materials**, 1999.

ATLAS, R. M.: Microbial degradation of Petroleum Hydrocarbons.: An environmental Perspective. **Microbial Reviews**. v. 45, n. 1, p. 180-209. 1981a.

ATLAS, R. M.: Fate of Oil from Two Major Oil Spills: Role of microbial Degradation in Removing Oil from The AMOCO Cadiz and IXTOC I Spills. **Environmental International**. v. 5, p. 33-38. 1981b.

ATLAS, R. M. **Petroleum Microbiology**. New York. Macmillan Publishing Company 1984.

ATLAS, R. M.: Bioremediation of Petroleum Pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**. p. 317- 327. 1995a.

ATLAS, R. M.: **Handbook of Media for Environmental Microbiology**. London. CRC Press, 1995b.

ATLAS, R. M.: Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**. p.178 - 182. 1995c.

ATLAS, R. M.: Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Spill. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 52, p. 149-156. 1998.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R.: **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. Menlo Park, California. Benjamin/Cumins Publishing Company. 1972.

BAKER, K. H.; S. HERSON. **Bioremediation**. New York. McGraw-Hill, inc. 375p. 1994.

BARTHA, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. **Microbial Ecology**. v.12: p. 155-172. 1996.

BERNABEI, M.; REDA, R.; GALIERO, R.; BOCCHINFUSO, G.: Determination of total and Polycyclic aromatic hydrocarbons in aviation jet fuels. **Journal of Chromatography A**. v. 985, p.197-203. 2003.

BITTON, G.; DUTKA, B. J.: Introduction and review of microbial and Biochemical Toxicity Procedures, *in*: **Toxicity testing Using Microorganisms**. Florida. G. Bitton and J. Dutka eds. p. 1-8, CRC Press. 1986.

BOGNOLO, G.: Biosurfactant as Emulsifying Agents for Hydrocarbons. **Colloid and surfaces** . A: Physicochemical and Engineering Aspects. n. 152, p. 41-52. 1998.

BRADDOCK, J.F.; CATTERALL, P.H.: A simple method for enumerating gasoline and Diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**. v. 3, p. 81-84. 1999.

BRITTON, L. N.: Microbial Degradation of Aliphatic Hydrocarbons *in: **Microbial degradation of Organic Compounds*** New York. D. T. Gibson ed. Marcel Dekker, Inc. p. 89-129. 1984.

BROWN, J. E.; BRADDOCK, J.F: Sheen Screen, a Miniaturized Most-Probable-Number Method for Enumeration of Oil-Degrading Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56. n.12. p. 3895-3896. 1990.

CALOW, P. Ecology in ecotoxicology: some possible 'rules of thumb'. In: **Ecotoxicology: ecological Dimensions**. London. Baird, D. J., Maltby, L., Greig-Smith, P. W., Douben, P.E.T. eds. p. 5-12. 1996.

CAPPUCCINO, G. J.; SHERMAN, N.: **Microbiology: A Laboratory Manual**. California. Publishing Company, 4 ed. Benjamin/Cummings. Inc. 477 p. 1996.

CAVALCANTI, R.: Informação pessoal. 2002.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and Ecology: Putting the "eco" into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**. p. 44: -15. 2002.

CHAPMAN, P. M.: Selenium – A potential time bomb or just another contaminant? **Human Ecology Risk Assess**. v.5, p. 1122-1137. 1999.

CHO, B. ; CHINO, H.; TSUJI, H. ; KUNITO, T.; NAGAOTA, K.; OTSUKA, S.; KAZUHIRO, Y.; MATSUMOTO, S.; OYAZU, H.: Laboratory Scale Bioremediation of Oil Contaminated Soil of Kwait Soil Amendment Materials. **Chemosphere**. v. 35 p. 1599-1611. 1997.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, R. S.; SANTOS, R. C. F.: The Influence of the Gasoline Oxygenate Ethanol on Aerobic and Anaerobic BTEX Biodegradation. **Water Research**. v. 32. p. 2065 – 2072. 1997.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F.: Gasoline Biodegradation in Different Soil Microcosm. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.31, p. 41-49. 2000.

DEL'ARCO, J. P.; FRANÇA, F. P.: Biodegradation of Crude Oil in Sandy Sediment. **International Biodeterioration & Biodegradation** . v. 44. p. 87-92.1999.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R.: Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**. v.37, p. 729-739. 1976.

DIN 38412-34: Part 1: Determination of the Inhibitory Effect of Waste Water on the Light Emission of *Photobacterium phosphoreum*. Berlin. **Deutsches Institut für Normung**. 1997.

ECKENFELDER, W. W. **Industrial Water Pollution Control**. New York. McGraw-Hill Publishing Company. 1989.

ENGLERT, C. J.; KENZIE, E. J.: Bioremediation of Petroleum Products in Soil. API, v. 40, p. 111-129. 1993.

ESPÍRITO-SANTO, L. S. Biodegradabilidade de óleo Diesel por microrganismos nativos da areia da praia de Suape – PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente. **Dissertação de mestrado. UFPE**. Recife. 2002.

FERNANDES, M.: Efeito da 9, 10 – Fenatrenoquinona na Fotodegradação do Petróleo. **Dissertação de mestrado – Instituto de Química UFRJ**. 1994.

FLOODGATE, G. D.: The Fate of Petroleum in Marine Ecosystem *in*: **Petroleum Microbiology**. New York. Macmillan publishing company. 1984.

FRANKENBERGER Jr., W.T.: The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. *In*: **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater** Boca Raton. E.J. Calabrese and P.T. Kosteki eds. p. 237-293. 1992.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H.: **Microbial Biotechnology - Fundamentals of Applied Microbiology**. New York. W. H. Freeman and Company Editors. 1995.

GOMES, E. B.; MACÊDO, P. B.; SOUSA, M. F. V. Q.: Adaptation of Rapid Screening Technique for Petroleum Degrading Bacteria. Em elaboração. 2004.

GUPTA, R. S.; FONDEKAR, M. S.; SHAILAJA, M.; SAKANARAYNAN, S.: Maersk Navigator Oil Spill in the Great Channel (Andaman Sea) in January 1993 and its environmental Impacts. **Spill Science and Technology**. Bulletin v.2/3 p. 113-119. 1995.

HANSON, K. G.; DESAI, D.; DESAI, A. J.: A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v 7, n. 10. p. 745-748. 1993.

IJAH, U. J. J.; Studies on Capabilities of Bacterial and yeast Isolates from Tropical Soil in degrading Crude Oil. **Waste Management**. (18), 293-299. 1998.

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

IRWIN, R. J., VANMOUWERICK; 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.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEM, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEM, J.; LEHTOKARIS, M.: A Battery of Toxicity Tests as Indicators of Decontamination in Composting oils Waste. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 47, p. 156-166. 1999.

KABBUR, M. B., ROGERAS, J. V., GUNASEKAR, P. G., GARRET, C. M., GEISS, K. T., BRINKLEY, W. W., MCDUGAL, V.: 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. 2001.

KANIKKANNAN, N.; LOCKE, B. R.; SINGH, M.: Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). **Toxicology**. v.161, p.1-11. 2001.

KANIKKANNAN, N.; LOCKE, B. R.; SINGH, M.: Effect of Jet Fuels on the skin morphology and irritation in hairless rats. **Toxicology**. v.175, p. 37-47.2002.

KILBANE II, J. J.; RANGANATHAN, R.; CLEVELAND, L.; KAYSER, J. K.; RIBEIRO, C.; LINHARES, M.: Selective Removal of Nitrogen From Quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGTN9m. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66 n.2. 2000.

KOWALICK, W. W., JR.: Removing Impediments to the use of Bioremediation and Other Innovative Technologies *in*: **Environmental Biotechnology for waste Treatment**. New York. G. S. Sayler, R. Fox, and J. W. Blackburns editors. Plenum Press, p. 53-60. 1991.

LANG, S.: Biological Amphiphiles (Microbial Biosurfactants). **Current Opinion in Colloid and Interface Science**. v.7, p.12-20. 2002.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R.: Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment. **Microbiol. Ver**. v.54, p. 305-315. 1990.

LEVY, E. M.; EHRHARDT, M.; KOHNKE, D., SOBTCHENKO, E.; SUZUOKI, T.; TIRO, A.: **Global Oil Pollution: Results of MAPMOPP, the IGOSS pilot project on Marine Pollution (Petroleum) Monitoring.** Paris France. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO. 1981.

MARTY, J. C., SALIOT, A. Hydrocarbons (n-Alkanes) in the Surface Microlayer of Seawater. **Deep Sea Resources.** v. 23, p. 863-874. 1976.

MAIER, R.: **Environmental Microbiology.** Hardcover, 1999.

MENICONI, M.F.G.; GABARDO, I.T.; CARNEIRO, M. E.R.; BARBANTI, S. M.; SILVA, G.C.; MASSONE, C.G.: Brazilian Oil Spill Chemical Characterization – Case Studies. **Environmental Forensics.** v. 3, p. 303-321. 2002.

NEUFELD, R. J.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F: Cell surface Measurements in Hydrocarbon and Carbohydrate Fermentations. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 39. p. 511-517. 1980.

NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F.: Bioremediation of Soil Contaminated by Hydrocarbon Mixtures: The Residual concentration Problem. **Chemosphere.** v.41, p.1115-1123. 2000.

OUDOT, J.: Soil pollution by petroleum products and treatments. **Analysis Magazine.** v. 22, n. 2, p.16 – 18. 1994.

PATEL K. M.; DESAI, J. D. E DESAI, A. J.: “Amino Acid Production by Submerged Cultivation of *Pseudomonas fluorescens* on Gasoline”. **Folia Microbiol.** v.30, p. 420-426. 1979.

PIÑA, J.; MERINO, J.; ERRAZU, A. F.; BUCAL, V.: Thermal Treatment of soils Contaminated with Gas Oil: Influence of Soil Composition and Treatment Temperature. **Journal of Hazardous Materials**. v. 94, p. 273-290, 2002.

PRITCHARD, P. H.; LIN, J. E.; MUELLER, J.G.; SHIELDS, M.S.: Bioremediation research in EPA: an Overview of Needs, Directions and Potentials. **International Symposium of Biotechnology Industrial Waste Treatment and Bioremediation, 1992**. Boca Raton. Published by Rickey R. F. & Smith, G.1996.

QURESHI, A. A.: Evaluation and Realignment of the Microtox Test for use in toxicity screening. In: **Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems**. New York. D. Lyu and B. J. Dutka eds. p. 1-22. 1984.

RAMADAN, M. A.; EL-TAYER, O. M. E ALEXANDER, M.: Inoculum Size as a Factor Limiting Success of Inoculation for Biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, p. 1392-1396. 1990.

RONTANI, J. F.; GIUSTI, G.: Study of the Biodegradation of Polybranched Alkanes by Marine Bacterial Community. **Marine Chemistry**. v.20. pp.197-205. 1986.

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

RON, E. Z.; ROSENBERG, E.: biosurfactants and Oil Bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13: p.249-252. 2002.

ROSEMBERG, M.: Basic and Applied Aspects of Microbial Adhesion at the Hydrocarbon: Water Interface. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 18, n.2, p. 159-173. 1991.

RUBERTO, L.; VASQUEZ, S., C.; CORMACK, W. P. M.: Effectiveness of the Natural Bacterial flora, Bioestimulation and Bioaugmentation on the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Antarctic Soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.52, p. 115 – 125. 2003.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA Jr, N.; FREIRE, D.M.G.: Production of Biosurfactant From *Pseudomonas aeruginosa* PA1 Isolated in Oil Environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.19, n. 2, p.159-166. June, 2002.

SEEGER, M.; TIMMIS, K., N.; HOFER, B.: Bacterial Pathways for the Degradation of Polychlorinated Biphenyls. **Marine chemistry**. v. 58, p. 327-33, 1997.

TIMMIS, K. N.; PIEPER, D. H. Bacteria designed for Bioremediation. **Trends in Biotechnology**. vol. 17, may, 1998.

TORSLOV, JENS. Comparison of Bacterial Toxicity Tests Based on Growth, dehydrogenase Activity, and Esterase activity of *Pseudomonas fluorescens* . **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.25, p. 33-40. 1992.

URURAHY, A. F. P.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R. L.; GABARDO, I. T.; PEREIRA Jr., N.: Effect of Aeration Biodegradation of Petroleum Waste. **Rev. Microbiol**. V.29 n.4. p. São Paulo, 1998.

URURAHY, A. F. P. Biorremediação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria. **Tese de Doutorado em Ciências. Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro**. 1998.

VITAL, N.: Formação de emulsificantes por *Candida guilliermondii* T9 a partir de querosene. **Dissertação de mestrado – Escola de Química – UFRJ**. 1992.

WALTER, M. V. Bioaugmentation. In: **Manual of Environmental Microbiology**. Washington. American Society for Microbiology - ASM. p.753-57. 1997.

WALWORTH, J.L.; WOOLARD, C.R.; BRADDOCK, J.F.; REYNOLDS, C.M.: The Role of Soil Nitrogen Concentration in Bioremediation. Fourth International *in situ* and On-site Bioremediation Symposium, New Orleans, April 28 May 1, Battelle. **Bioremediation** v. 9, n. 4, p. 283-288. 1997.

WHYTMAN, B. T.; DUCKYWORTH, D. F., HARDING, A. A. B., JEFFREY, P. G.; PERRY, S. C. Marine Pollution by Oil: Characterization of Pollutants, Sampling, Analysis and Interpretation. *In: Applied Science*. London 1975.

YANG, L.; LAI, C. T.; SHIEH. "Biodegradation of Dispersed Diesel Fuel under High Salinity Conditions". **Wat. Res.** v. 34, n. 13 p. 3303 –3314. 1999.

YERUSHALMI, L.; ROCHELEAU, S.; CIMPOIA, R.; SARRAZIN, M.; SUNAHARA, G.; PEISAJOVICH, A.; LECLAIR, G.; GUIOT, S. R.: Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil. **Bioremediation Journal**. v.7.n.1, p. 37 - 51. 2003.

ZAJIC, J. E., MAHOMEDY, A. Y. in: **Petroleum Microbiology**. New York. Macmillan Publishing Company. 1984.

9 . ANEXOS

9.1 ANEXO A – GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DE ACLIMATAÇÃO COM 7 E 15% DE QAV

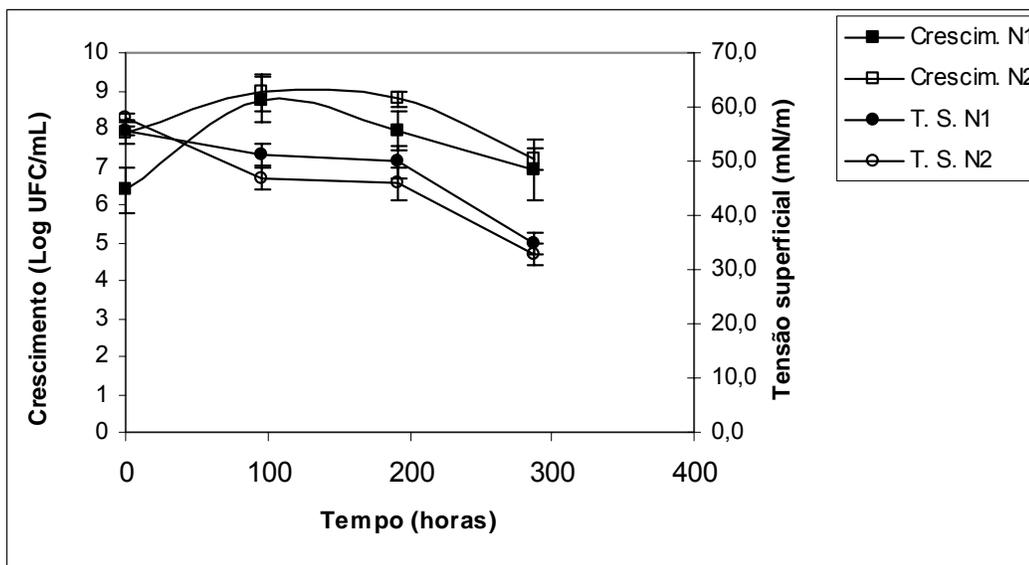


Figura A.1 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem B6 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

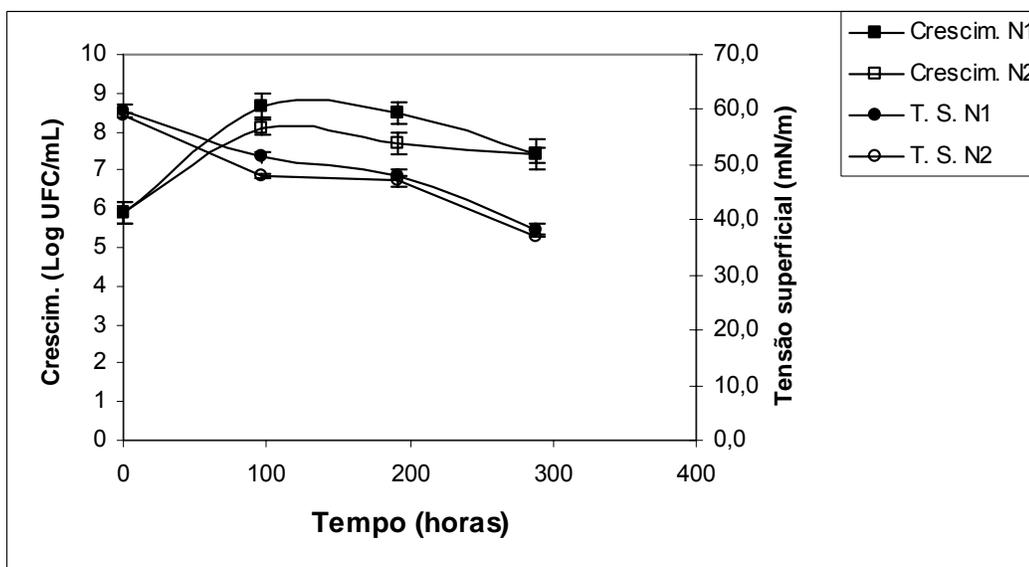


Figura A.2 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem *P. aeruginosa* DAUFPE 39 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

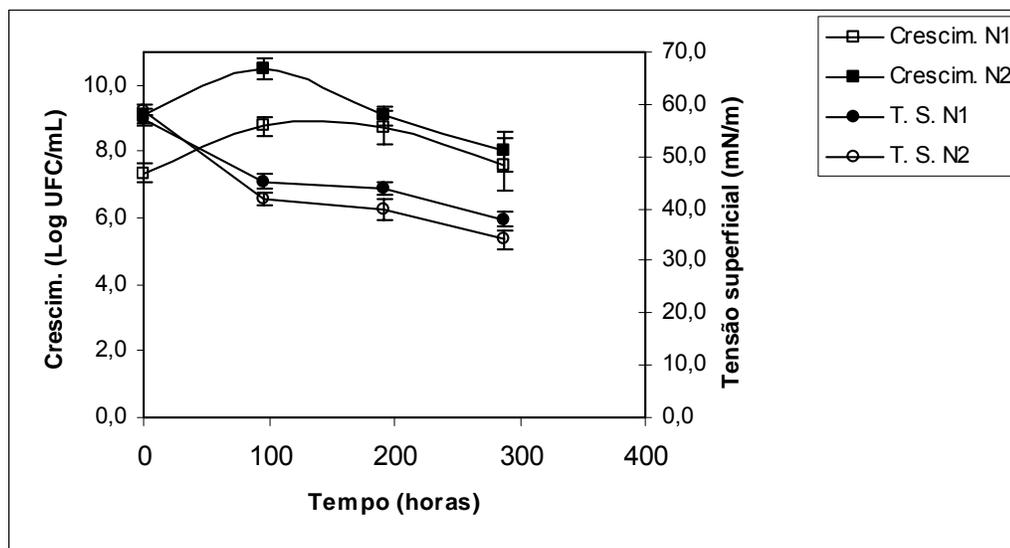


Figura A.3 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B6/B5 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

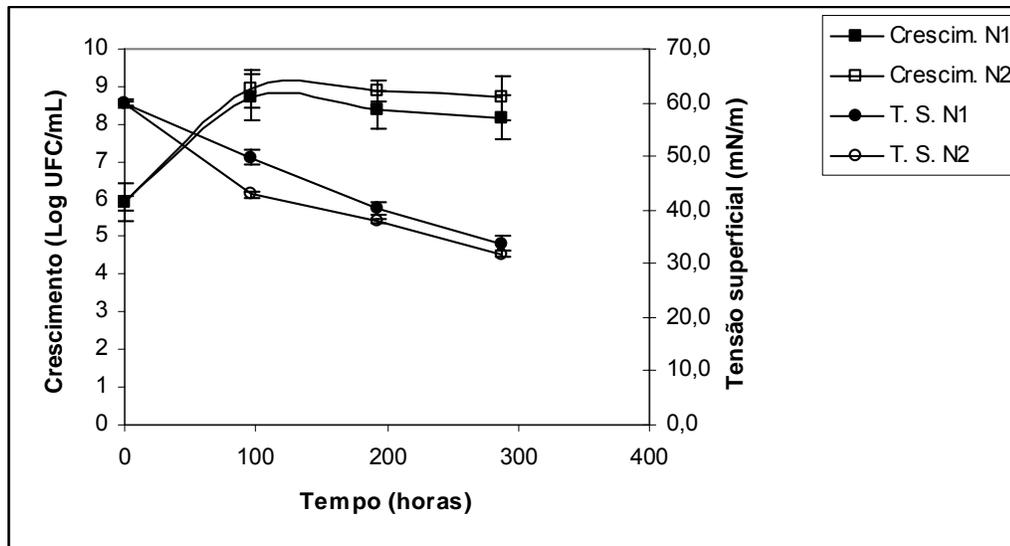


Figura A.4 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B6/B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

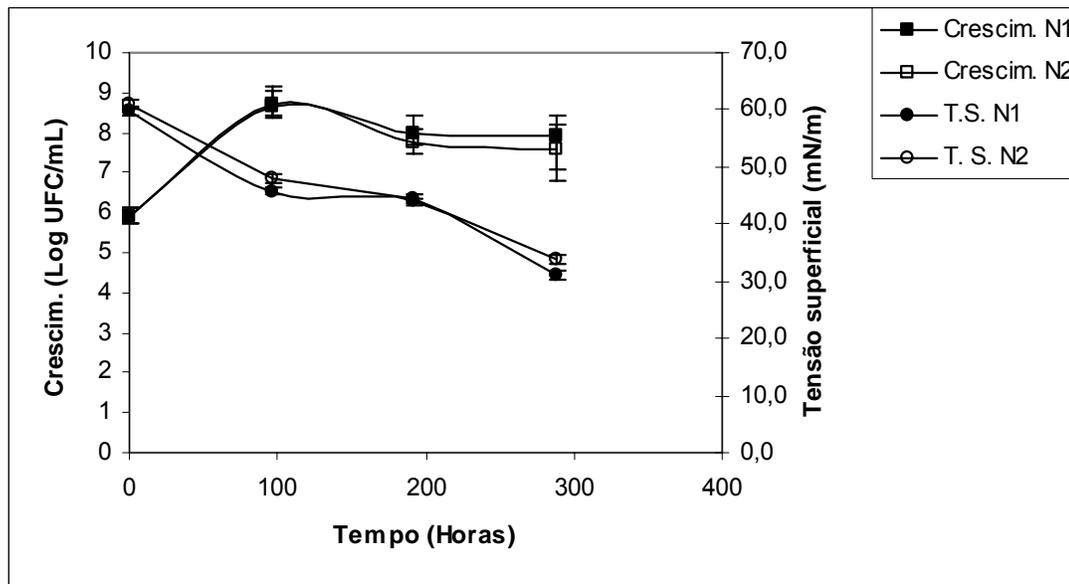


Figura A.5 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B5/B6/B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 7% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

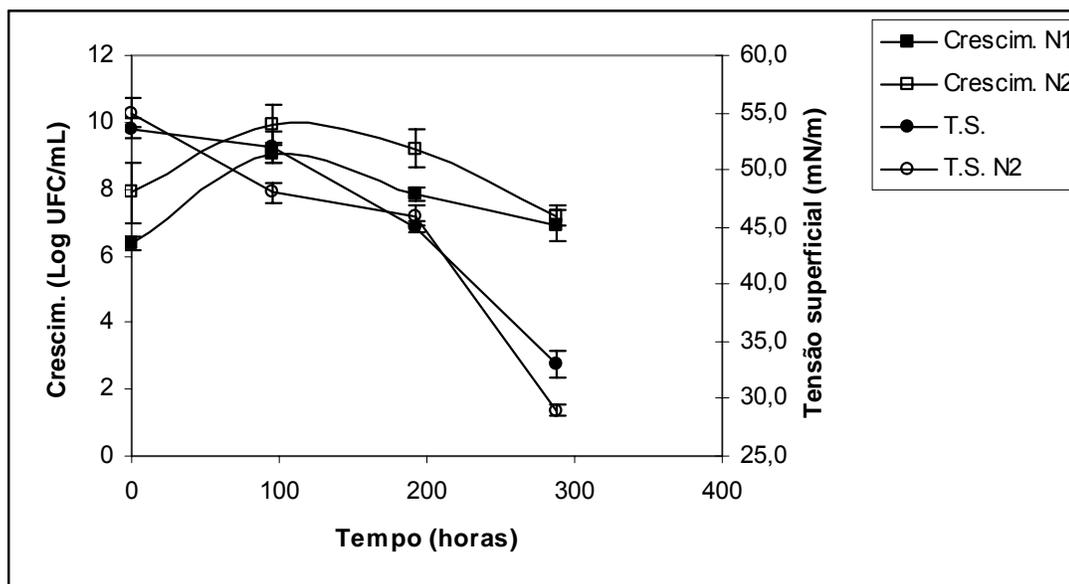


Figura A.6 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem B6 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

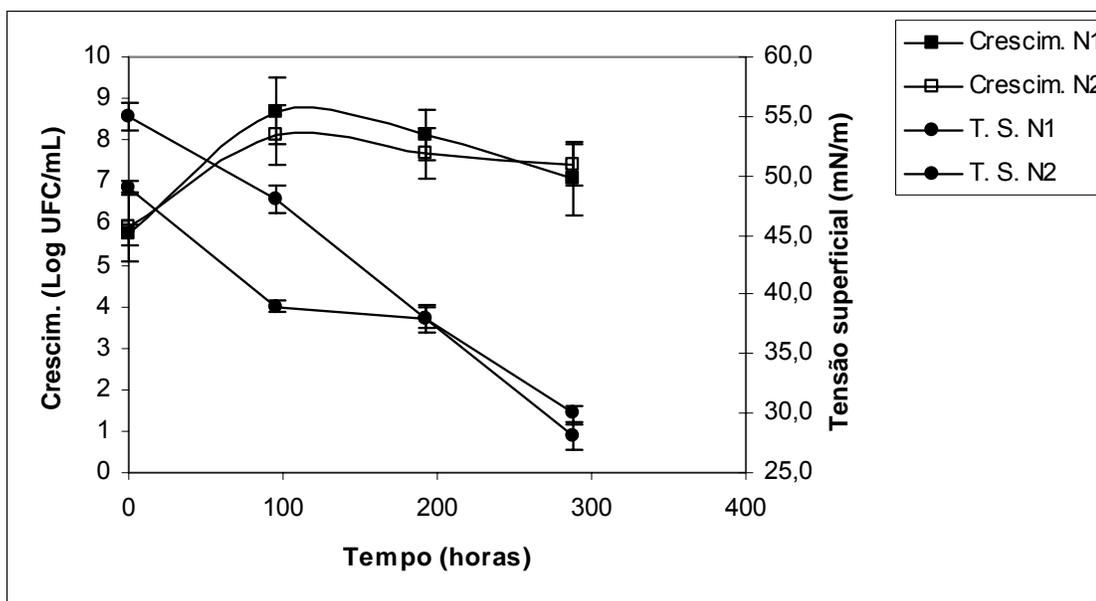


Figura A.7 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da linhagem *P. aeruginosa* DAUFPE 39 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

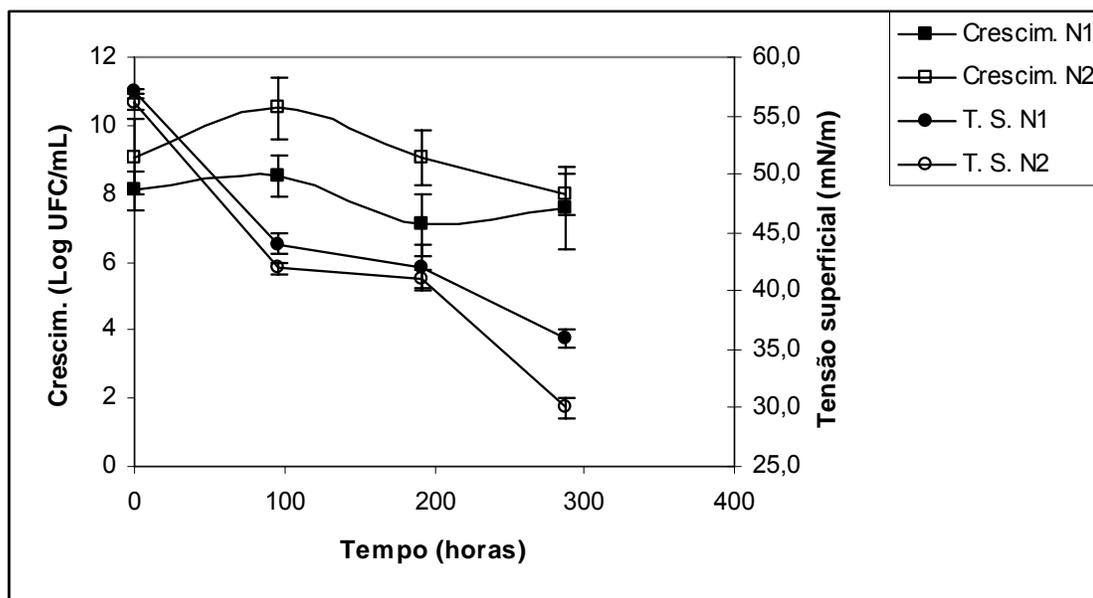


Figura A.8 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B6/B5 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

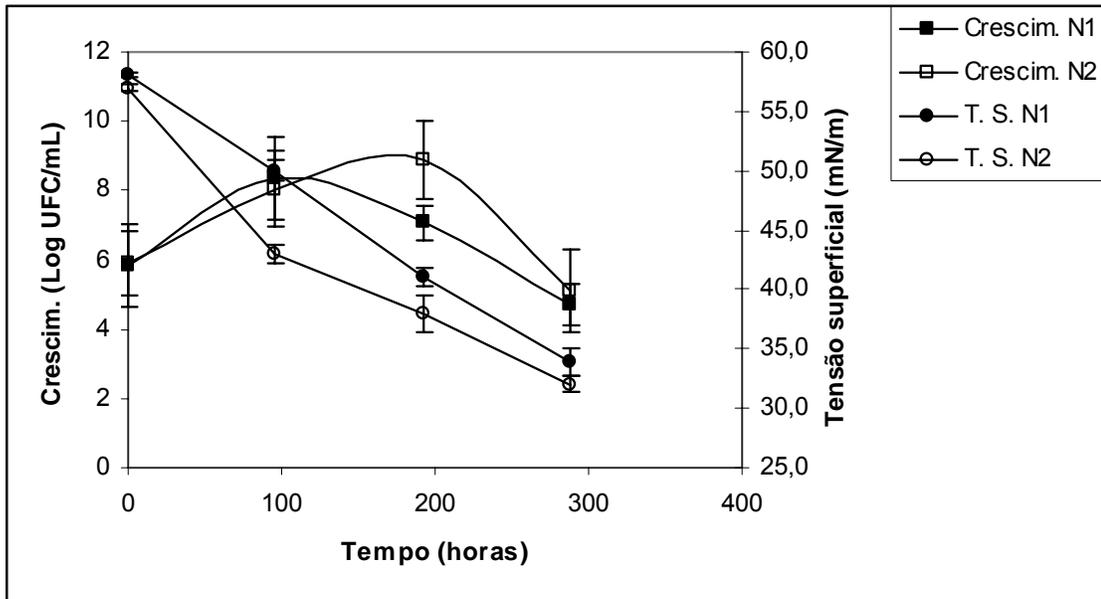


Figura A.9 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B6/B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

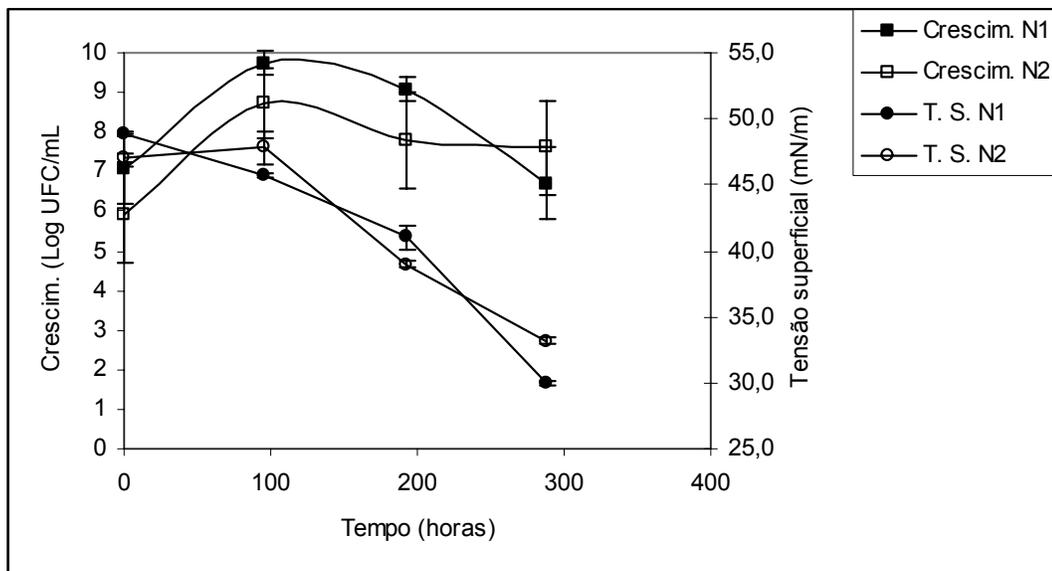
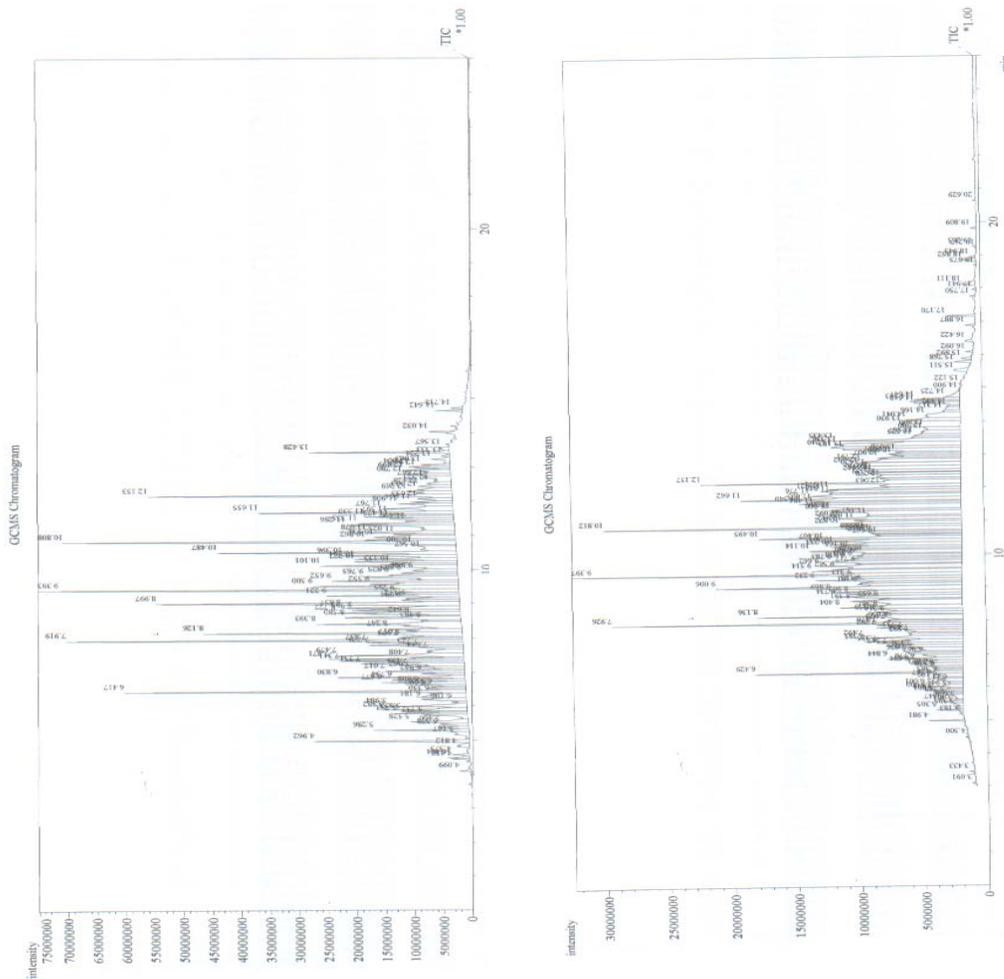
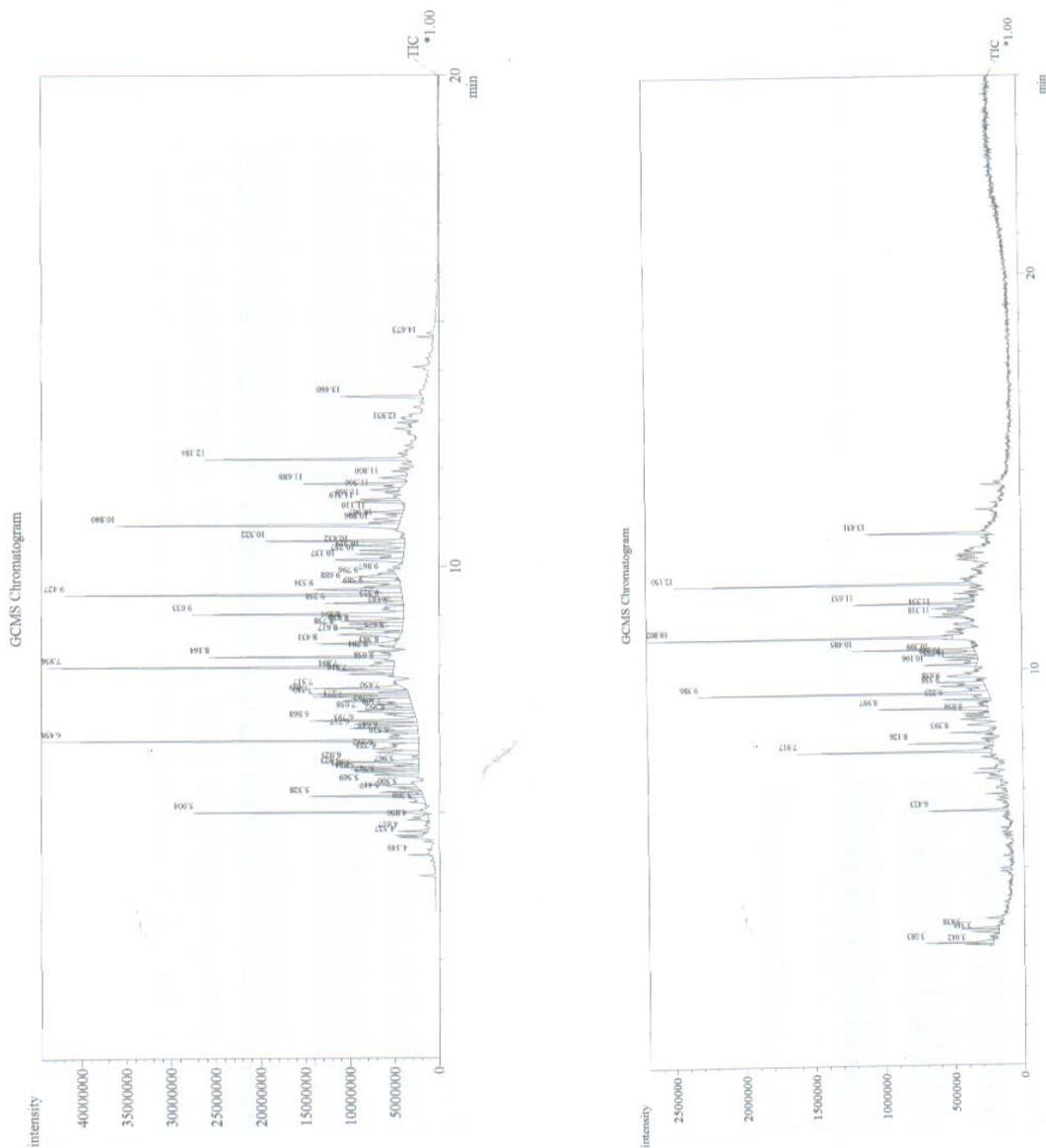


Figura A.10 – Perfil da tensão superficial e crescimento microbiano da cultura mista B5/B6/B7 em função do tempo de aclimação em meio contendo 15% de querosene e relação C:N de 200:1 (N1) e 50:1 (N2)

9.2 ANEXO B – CROMATOGRAMAS DOS HIDROCARBONETOS DO QAV COM 35 E 60 DIAS DE PROCESSO





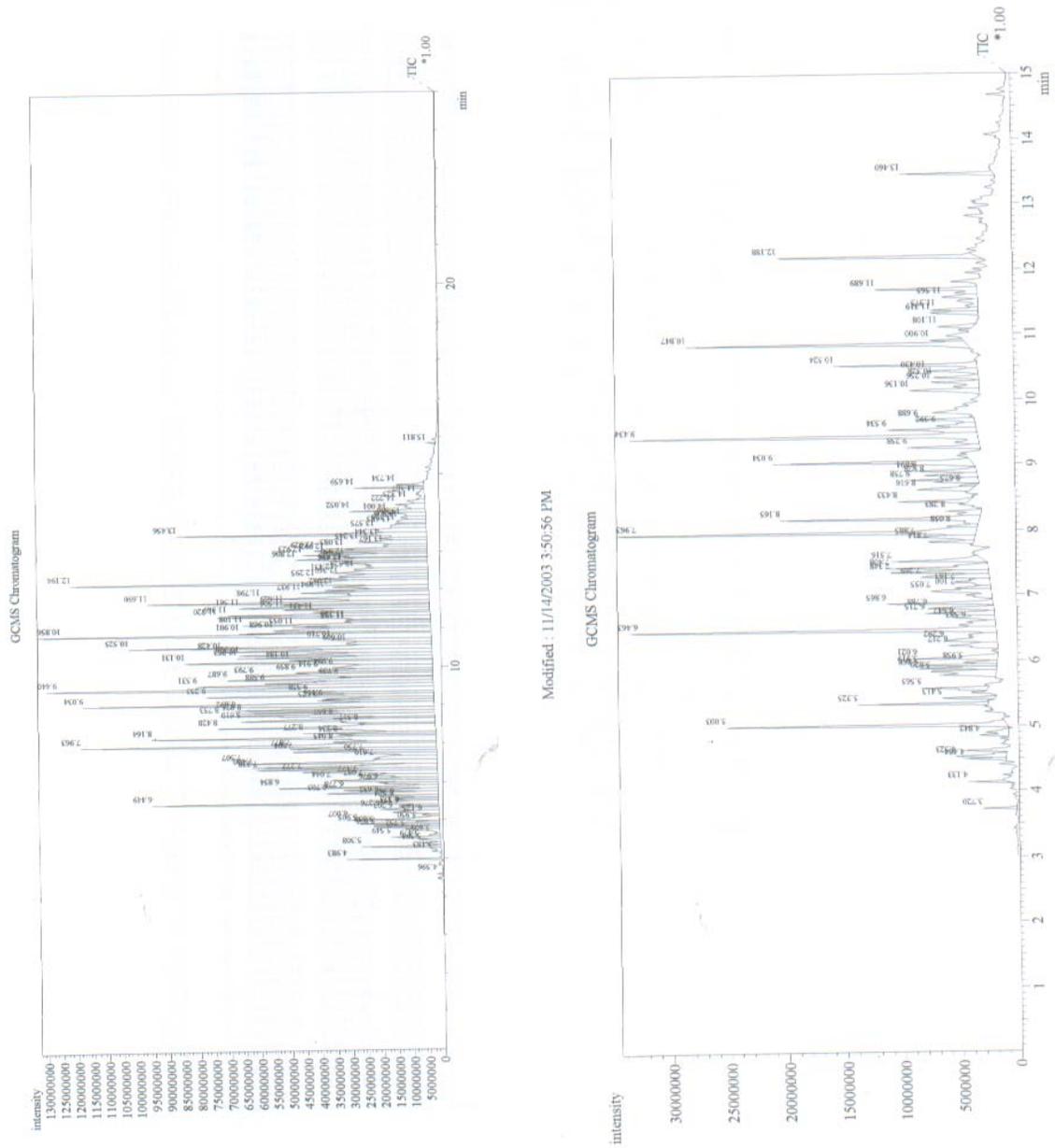
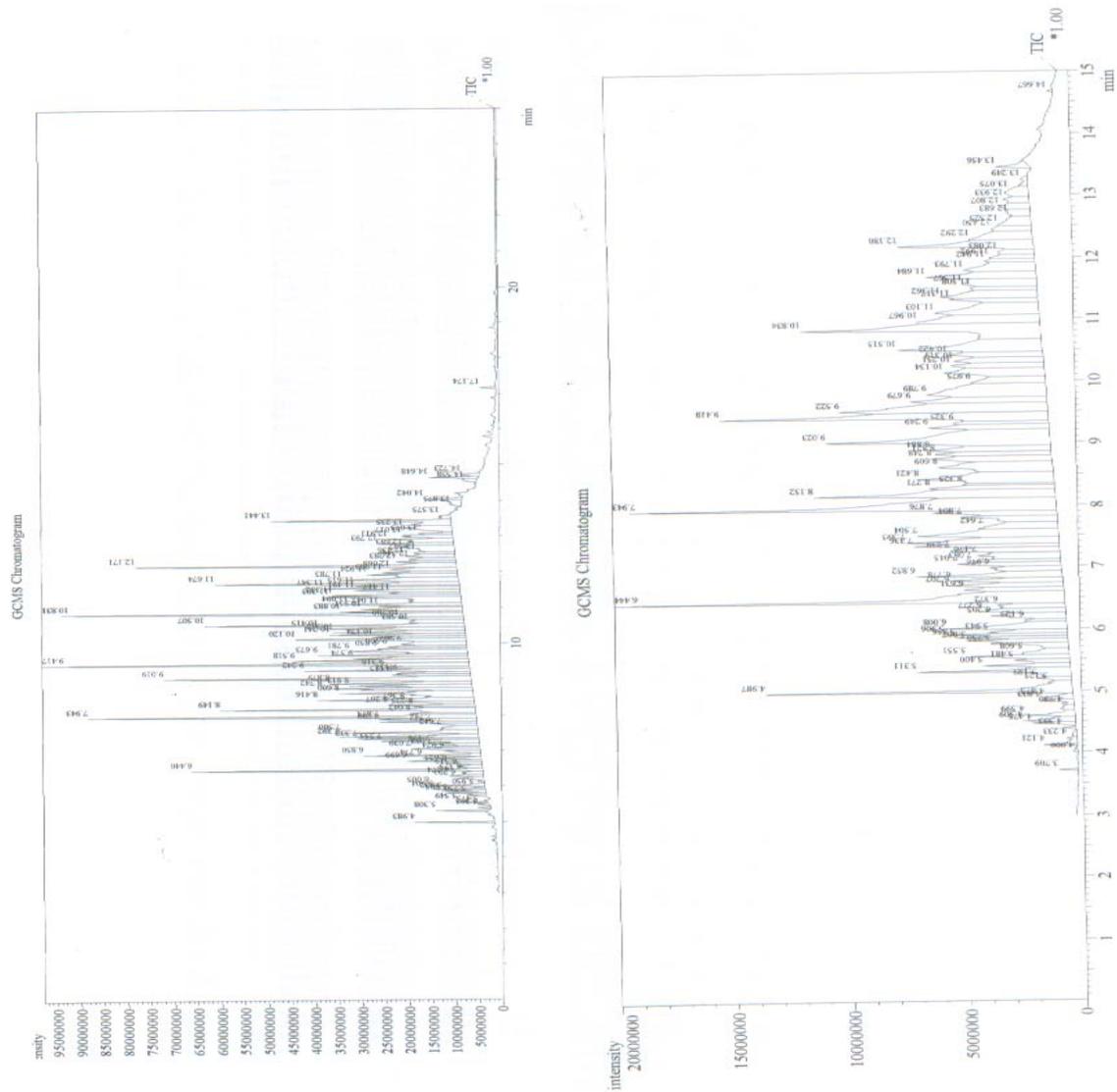


Figura B.3 – Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B6B5 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N1.



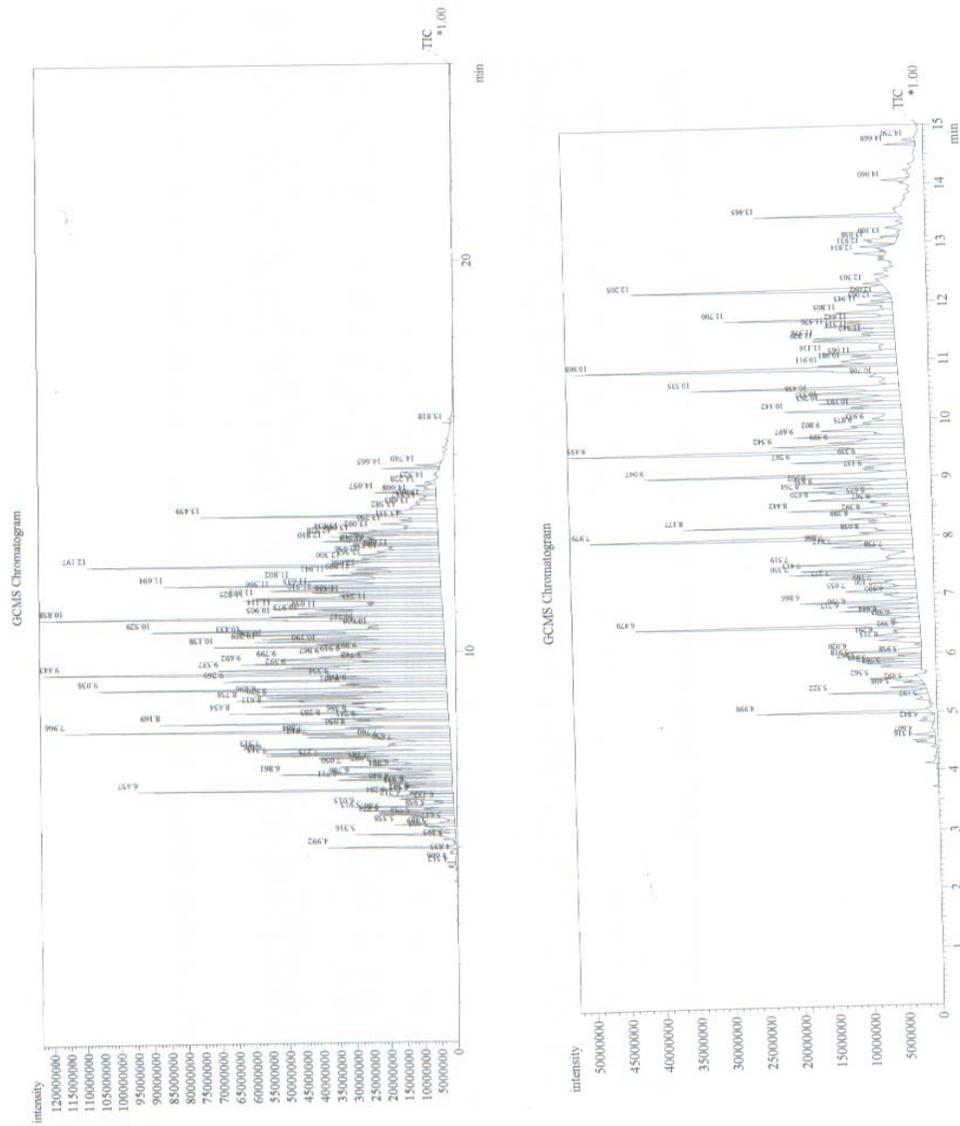


Figura B.5 – Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B6B7 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N1.

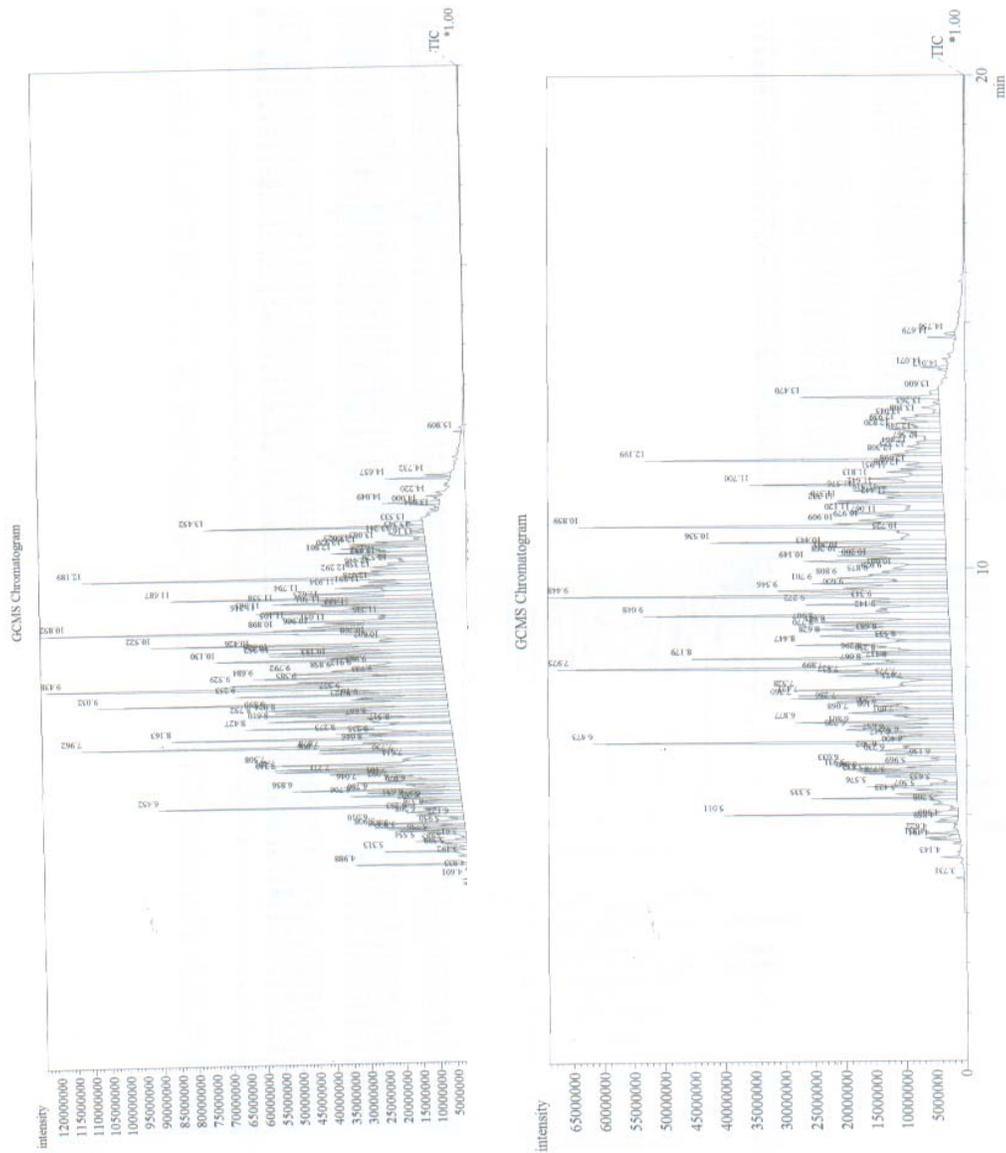


Figura B.6 – Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela cultura mista B6B7 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N2.

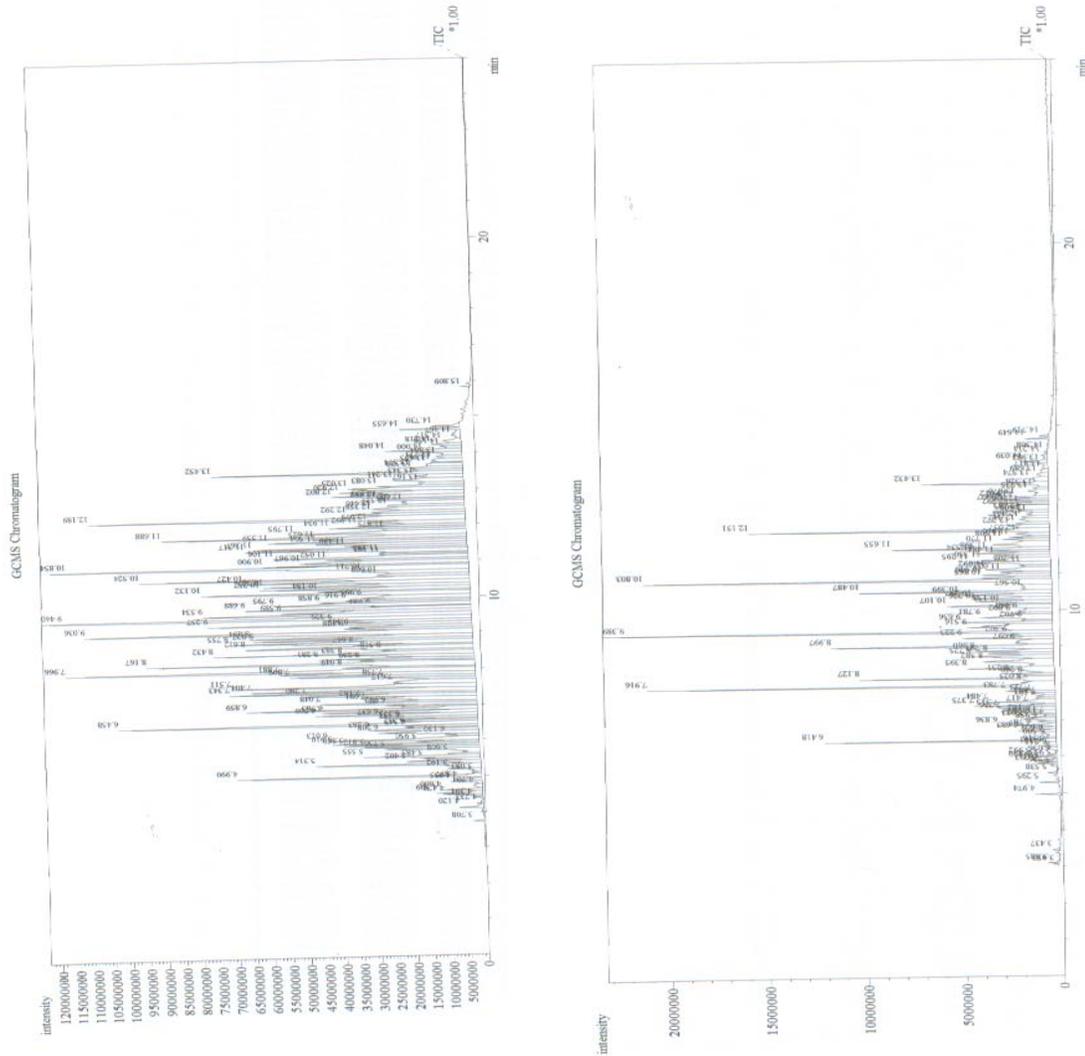


Figura B.7 – Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela linhagem *P. aeruginosa* DAUFPE 39 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N1.

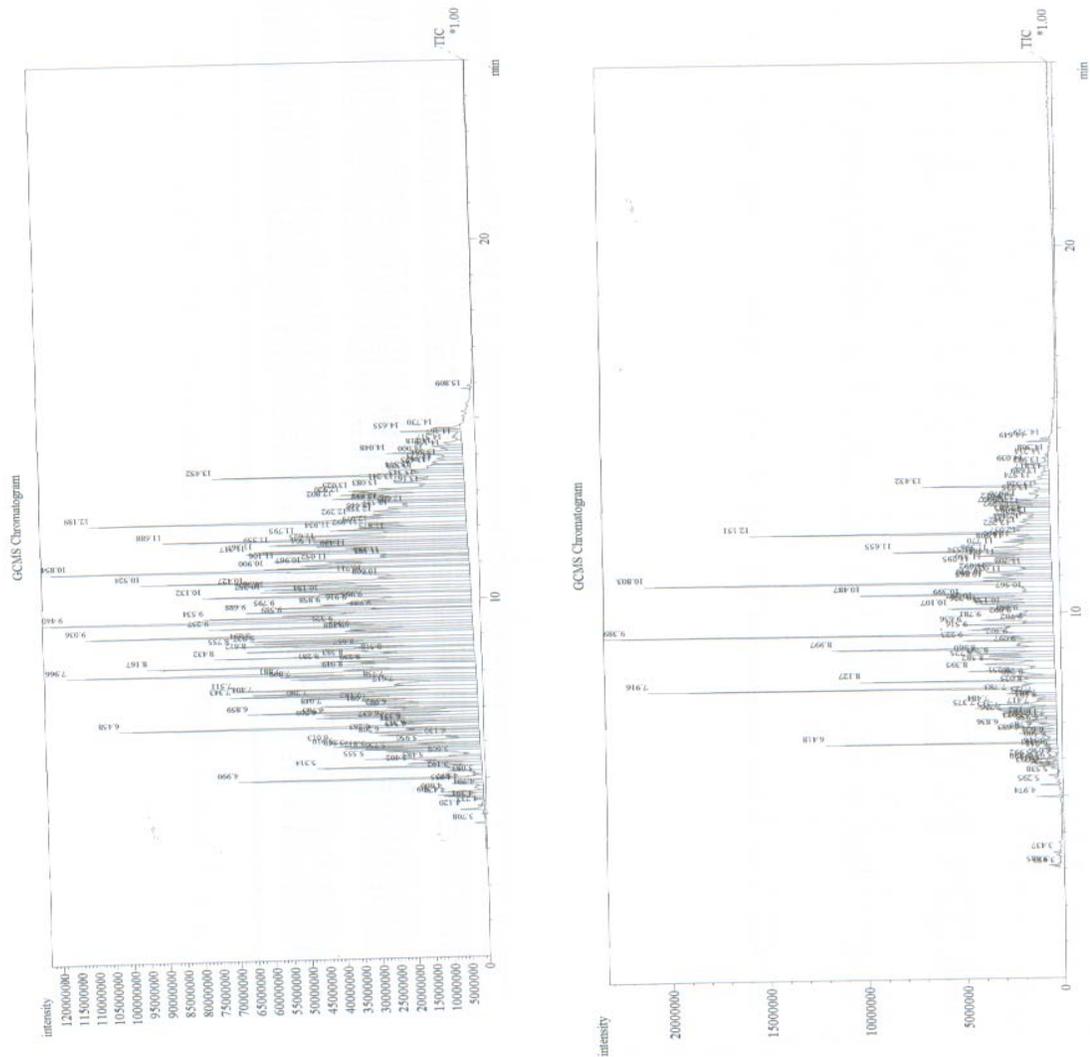


Figura B.8 – Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos degradados pela linhagem *P. aeruginosa* DAUFPE 39 (a) com 35 e (b) com 60 dias de processamento, com bioestímulo N2.

9.3 ANEXO C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ADAPTATION OF A RAPID SCREENING TECHNIQUE FOR PETROLEUM DEGRADING BACTERIA

Edelvio de Barros Gomes¹; Patrícia Barros de Macêdo²; Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa¹

¹*Departamento de Antibióticos UFPE, Recife, PE, Brazil*

²*Departamento de Biologia UFRPE, Recife, PE, Brazil*

ABSTRACT

An adaptation of a rapid and simple technique for screening of potential petroleum hydrocarbons degrading bacteria, using the redox, was developed. Eight isolates and six bacterial consortia were investigated on its degradative capabilities by utilizing Jet fuel as the sole carbon source. Cultures were grown at $30\pm 1^\circ\text{C}$, and 200-rpm shaker using Büshnell-Haas medium in 250mL Erlenmeyer's flasks. Tests were performed by adding 0,02mL of a 2,6 dichlorophenol indophenol (DCPIP) solution to the flasks after 12h incubation and by observing the time required to change the color of medium containing indicator DCPIP, from blue to colourless. The isolate B6 changed the color of medium after 15h, while all the others, after 67h. Microbial associations changed the color of medium after 10h when B6 isolate was present. Lower pH and surface tension values were observed in these combinations.

Key words: Bioremediation; jet fuel; screening technique

INTRODUCTION

Studies showed that bioremediation could be a cost-effective clean-up technology to treat soils, seawater and sediments containing petroleum hydrocarbons. Spilled oils removed by mechanical means usually allows the continuous presence and accumulation of residual oils in the spilled area. Bioremediation is defined as an

acceleration of the natural fate of oil pollutants and hence a natural solution that causes minimal damages to the environment.

Hydrocarbons degrading microorganisms are commonly isolated in contaminated soils and marine environment following oil spills. The screening of potential petroleum degrading microorganisms is an important step toward development of a bioremediation protocol. Techniques for screening of hydrocarbons degrading bacteria have been developed.

Hanson *et al* (1993) developed a rapid and simple technique based on microbial oxidation by observing the color change in the medium containing redox indicator DCPIP used as the electron acceptor in cellular oxidation reactions. This technique was conducted in microtitres. Usually, degradation of hydrocarbons is accompanied by emulsification, resulting in a greater oil-water interface due to the presence of natural emulsifiers (RON & ROSEMBERG, 2001). The production of biosurfactants (natural emulsifiers) allows the uptake and utilization of hydrocarbons, hence, leads to the growth of microbial cells and decreases in surface tension and pH in aqueous media.

The aims of this study is to select bacterial isolates and bacterial consortia on its capabilities to degrade hydrocarbons presents in jet fuel by utilizing a redox modified technique, and to compare this results to surface tension and pH data (FRANKEMBERGER Jr., 2000).

MATERIAL AND METHODS

Isolates and culture conditions

Eight bacterial isolates (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 and B8) were obtained by selective enrichment technique on cultures from petroleum derivatives contaminated soil

samples (WALTER, 1995). This technique provided jet fuel as the sole carbon and energy source, by increasing the concentration of the cited fuel. With the purpose of adaptation, isolates were grown in rotatory shaker, at 200 rpm and 30 ± 1 °C, in 250mL Erlenmeyer's flasks containing 75mL of Büshnell-Haas media from 12 hours.

Selection

After adaptation, selection was accomplished by adding 0,02mL of DCPIP in flasks, allowing the growth at the same conditions described before. Flasks were observed at 4 hours intervals to verify the changes in color of indicator. The time required to change the color of DCPIP from blue colorless were reported, and isolates with high abilities to degrade jet fuel were grouped in double associations and submitted to the same conditions.

Surface tension and pH measurements

Surface tension and pH were measured in aqueous phase before inoculation, and after 20 days experiments. Measurements of surface tension were accomplished as recommended by Dü-Noy (ASTM D 71, 1999), in manual tensiometer at 30 ± 1 °C. Measurements of pH in aqueous phase were conducted utilizing pH measurements devices.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolate B6, changed the color of medium after 15 hours; B7 after 67 hours; B5 after 172 hours and B4 after 240 hours. All the others isolates changed the color of medium after 240hours. All the associations containing isolate B6, changed the color after 10 hours from incubation time, while others, required more than 150hours. Lower pH and surface tension values were observed to isolates B6 (pH 6.1; surface tension 36.7mN/m)

and B7 (pH 6.1 and surface tension 33.9mN/m). On associations, lower values were observed to B6B5 (pH 6.1, surface tension 32.0mN/m), B6B7; (pH 6.1, surface tension 33.6mN/m), and B4B5B6B7 (pH 6.2, surface tension 47.2mN/m).

Results showed that, although B6 changed the color of medium more rapidly than B7, surface tension values in B7 suggest that this isolated is the most indicated to studies in biosurfactant production (RON & ROSEMBERG, 2001).

Isolate B6 may cause a synergic effect, when associated with other isolates. Other association caused an inhibitory effect on abilities to oxidize hydrocarbons, instead.

CONCLUSIONS

The adaptation of method to flasks is more appreciable to determine degrading potential in few isolates, because it require high quantities of flasks and space, and than, is not viable. On the other hand, adaptation showed that it is very useful to determine the potentiality of consortia to degrade hydrocarbons.

REFERENCES

FRANKENBERGER Jr., W.T.: The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. *In: Hydrocarbon contaminated soils and groundwater* Boca Raton. E.J. Calabrese and P.T. Kostecki eds. p. 237-293. 1992.

HANSON, K. G.; DESAI, D.; DESAI, A. J.: A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v 7, n. 10. p. 745-748. 1993.

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

WALTER, M. V. Bioaugmentation. *In: Manual of Environmental Microbiology*. Washington. American Society for Microbiology - ASM. p.753-57. 1997.

9.4 ANEXO D – LAUDOS DOS TESTES DE ECOTOXICIDADE

Laboratório Prof. Aducto da Silva Teixeira

Certificado de Ensaios de Toxicidade

Data: 06/01/2004 Certificado Nº 006195 Atendimento Nº 01.024298 Página: 1/1

Dados do Cliente

Nome
FADE/UFPE - FUNDAÇÃO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO DA UFPE

Endereço
RUA ACADÊMICO HÉLIO RAMOS, 336
CIDADE UNIVERSITÁRIA, RECIFE, PE

Telefone
(81) 34534646

Solicitante
MARIA DE FÁTIMA VIEIRA DE QUEIROZ SOUSA

Local de coleta
Laboratório de Processos Fermentativos
Departamento de Antibióticos - UFPE
Cidade Universitária, Recife, PE

Ponto de coleta
Diretamente do frasco - Ref. B6N2 35 dias

Data da coleta	Hora da coleta	Data de entrada	Material	Responsável coleta
01/12/2003	-	01/12/2003	Efluente Industrial	CLIENTE

Observação

Resultados

Fator de Diluição para Fotobactéria 256

Comentários do Laboratório:

Método de ensaio: Draft International Standard ISO/DIS 11348-1

Legenda e Interpretação

FDf : Fator de diluição para bactéria luminescente (Vibrio fischeri)
FD : Fator de diluição
FD = 1 Amostra não apresenta toxicidade aguda.
FD > 1 Amostra apresenta toxicidade aguda.
O resultado do FD está baseado na primeira de uma série de diluições efetuadas na amostra que não causa efeito tóxico agudo ao organismo teste.
Os resultados se referem apenas aos itens de ensaio. Este certificado só pode ser reproduzido completo.

Maria do Carmo Ferreira
Mária do Carmo Ferreira
Unidade de Hidrobiologia

Vilalba Soares
Vilalba Soares de Mendonça
Gerência do Laboratório
CRB 05.535-5

Santana, nº 367 – Casa Forte – CEP 52060-460 - Recife-PE – Fone: (pabx) 3267.1800 – Fax: (081) 3441.6088 – CGC 11.268.802/0001-01

Laboratório Prof. Aduacto da Silva Teixeira

**Certificado de Ensaios de Toxicidade**SECRETARIA DE CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE

Data: 06/01/2004 Certificado Nº 006194

Atendimento Nº 01.024297 Página: 1/1

Dados do Cliente**Nome**

FADE/UFPE - FUNDAÇÃO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO DA UFPE

EndereçoRUA ACADÊMICO HÉLIO RAMOS, 336
CIDADE UNIVERSITÁRIA, RECIFE, PE**Telefone**

(81) 34534646

Solicitante

MARIA DE FÁTIMA VIEIRA DE QUEIROZ SOUSA

Local de coletaLaboratório de Processos Fermentativos
Departamento de Antibióticos - UFPE
Cidade Universitária, Recife, PE**Ponto de coleta**

Diretamente do frasco - Ref. B6N2 60 dias

Data da coleta	Hora da coleta	Data de entrada	Material	Responsável coleta
01/12/2003	-	01/12/2003	Efluente Industrial	CLIENTE

Observação**Resultados**

Fator de Diluição para Fotobactéria 128

Comentários do Laboratório:

Método de ensaio: Draft International Standard ISO/DIS 11348-1

Legenda e InterpretaçãoFDf : Fator de diluição para bactéria luminescente (*Vibrio fischeri*)

FD : Fator de diluição

FD = 1 Amostra não apresenta toxicidade aguda.

FD > 1 Amostra apresenta toxicidade aguda.

O resultado do FD está baseado na primeira de uma série de diluições efetuadas na amostra que não causa efeito tóxico agudo ao organismo teste.

Os resultados se referem apenas aos itens de ensaio. Este certificado só pode ser reproduzido completo.

Maria do Carmo Ferreira
Unidade de Hidrobiologia

Vialba Soares de Mendonça
Gerência do Laboratório
CRB 05.535-5