

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**ESTUDO DO IMPACTO DO ÓLEO DIESEL EM SOLO DO MANGUEZAL
DE VILA VELHA- ITAMARACÁ**

Eudinice Pereira da Silva Beltrão

Recife – 2005

Eudinice Pereira da Silva Beltrão

ESTUDO DO IMPACTO DO ÓLEO DIESEL EM SOLO DO MANGUEZAL DE VILA VELHA- ITAMARACÁ

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

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadores: Prof^o Dr. Carlos Edison Lopes
Prof^a Dr^a Maria de Los Angeles P.F.Palha

Recife - 2005

Beltrão, Eudinice Pereira da Silva

Estudo do impacto do óleo diesel em solo do manguezal de Vila Velha-Itamaracá / Eudinice Pereira da Silva Beltrão. – Recife : O Autor, 2005.

83 folhas, il.: fig., gráf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Microbiologia aplicada - Óleo diesel – Manguezal – Itamaracá-PE. 2. Bioremediação – Óleo diesel – Vila Velha – Itamaracá-PE. I. Título.

**663.1
660.6**

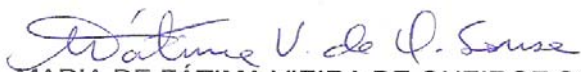
**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

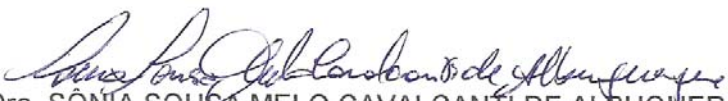
**UFPE
BC2005-448**

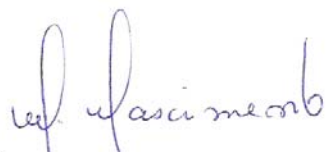
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR EUDINICE PEREIRA DA SILVA BELTRÃO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 29 DE ABRIL DE 2005 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:


Dra. MARIA DE FÁTIMA VIEIRA DE QUEIROZ SOUSA
Departamento de Antibióticos - UFPE


Dra. SÔNIA SOUSA MELO CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE
Departamento de Engenharia Química - UFPE


Dra. MÁRCIA SILVA DO NASCIMENTO
Departamento de Antibióticos - UFPE

Ao Senhor meu Deus

*Não há santo como o Senhor,
Porque outro além de ti não há e rocha não há,
nenhuma como o nosso Deus.*

*Não multipliqueis palavras de orgulho, nem
saíam cousas arrogantes de vossa boca;*

Porque o Senhor é o Deus da sabedoria...

E o meu coração se regozija no Senhor.

I SAMUEL 2: 2-3

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e amigos: Eurinice Gomes da Silva e João Pereira da Silva, pelo apoio, carinho e dedicação nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo Hildemberg e ao meu filho Emerson pelo amor, carinho e paciência nos mínimos gestos.

Aos meus irmãos Eunice, Eronildo e Edvan pelo incentivo, carinho e amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Carlos Edison Lopes, pelo incentivo, apoio na realização e correção do trabalho e ao carinho a mim dispensado participando desta forma no meu desenvolvimento humano e profissional.

A minha co-orientadora professora Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha, pela orientação, dedicação, incentivo, carinho e apoio na realização e correção deste trabalho, construindo meu conhecimento na área escolhida e meu aprimoramento profissional.

A coordenadora do curso de Pós-graduação de Biotecnologia de produtos bioativos Professora Ana Maria Souto Maior.

Ao Corpo docente do Departamento de Antibióticos da UFPE, pelas informações passadas no curso da pós-graduação e colaboração na minha vida profissional.

Aos professores que me incentivaram com carinho, em especial Prof^a. M^a Fátima Queiroz, Eulália Ximenes, Glícia Torres Callazans e Sônia Albuquerque.

Ao Setor de Combustível do DEQ/UFPE Pelo fornecimento e análise do óleo Diesel.

Aos colegas de cursos: Laurení, Manuella Mota, Joas Lucas, Gérson, Renata, Ivanildo, Claudemir, André, Rosana, Ulrich, Ricardo, Diana, Denise, Rômulo, Everaldo, Michelline, Manuella e Cláudia.

A amiga e colaboradora no desenvolvimento do trabalho Charleni Pereira.

Aos amigos Polliana, Edelvio e Rita pelo incentivo e realização da cromatografia e tensão superficial, respectivamente.

Aos amigos Irapuan Oliveira Pinheiro, Marcos, Danilo e Danielle pela amizade e incentivos.

As amigas, Olga Marques, Conceição Andrade e Márcia Marques pelo apoio e incentivo.

Aos colegas de laboratório: Andreza, Michelli, Sara, Suzana, Gloria, Elizabethe, Edvania, Marcio, Livia, Juliana e Danielle, Fabrícia pelo apoio e amizade.

Aos Funcionários do Dept^o de Antibióticos; Suely, Orlando, Janes, Josalina, Salatiel, Fátima, Lucilene, Alberto e Manuel.

Aos meus familiares e amigos que me incentivaram e apoiaram durante a jornada.

Ao apoio do CNPq

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 IMPACTOS CAUSADOS PELO DERRAMAMENTO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO	9
2.2 BIORREMEDIAÇÃO.....	11
2.3 FATORES QUE AFETAM A BIODEGRADAÇÃO	15
2.4 COMPOSIÇÃO DO PETRÓLEO.....	16
2.5 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS EM BIORREMEDIAÇÃO	17
2.6 BIORREMEDIAÇÃO EM MANGUEZAIS E ESTUÁRIOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 AMOSTRAGEM.....	24
3.1.1- Óleo Diesel	24
3.1.2 Solo.....	24
3.1.3-Água	26
3.2. ANÁLISE DO SOLO E DA ÁGUA	26
3.2.1- pH.....	27
3.2.2. QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA.....	27
A - Contagem de Microrganismos do Solo Através da Técnica de Tubos Múltiplos	27
B - Contagem dos Microrganismos da Água do Manguezal Através da Técnica de Tubos Múltiplos.....	31
3.2.3 FLUXOGRAMA DA ANÁLISE DO SOLO.....	31
3.3 IMPACTO DO ÓLEO DIESEL NO SOLO DE MANGUEZAL SEM PRÉVIA ADAPTAÇÃO	32
3.4 AVALIAÇÃO MICROBIANA DO SOLO COM PRÉVIA ADAPTAÇÃO AO ÓLEO DIESEL	33
3.5 ANÁLISE DO SOLO IMPACTADO COM ÓLEO DIESEL	35
3.6 ENRIQUECIMENTO DO SOLO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	36

3.7. EFEITO DA AERAÇÃO NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS DO ÓLEO DIESEL EM TRATAMENTO UTILIZANDO CULTURA MISTA DO SOLO	36
3.9 CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO OLEOSA	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1 ANÁLISE DO SOLO E DA ÁGUA	40
4.1.1 DETERMINAÇÃO DO pH NO SOLO E NA ÁGUA	40
4.1.2 QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA DO SOLO E NA ÁGUA PELA TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL	41
A- Solo.....	41
B- Água do Manguezal.....	42
C- Análise Comparativa da Contagem Microbiana Entre o Solo e a Água	44
4.2 IMPACTO DO ÓLEO DIESEL EM SOLO DE MANGUEZAL SEM PRÉVIA ADAPTAÇÃO	45
4.3 AVALIAÇÃO MICROBIANA DO SOLO EM SUCESSIVOS CONTATOS COM ÓLEO DIESEL.....	48
4.3.1 AÇÃO DO GÊNERO <i>PSEUDOMONAS</i> SOB O ÓLEO DIESEL	52
4.4 ANÁLISE DO SOLO IMPACTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO DIESEL	56
4.5 EFEITO DA AERAÇÃO NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS DO ÓLEO DIESEL EM TRATAMENTO UTILIZANDO CULTURA MISTA DO SOLO	61
5. CONCLUSÕES	69
6. SUGESTÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8.0 ANEXOS	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Vista aérea da zona portuária do Distrito industrial de Suape. e manguezal próximo. Site: meio ambiente www.suape.pe.gov.br/meio ambiente	5
Figura 1.2	Imagem da entrada do Canal de Santa Cruz em Vila Velha – Itamaracá	6
Figura 2.1	Contaminação ocasionada por vazamento ocorrido na refinaria Getúlio Vargas-Paraná. Site: www.ambicenter.com.br/ petrobras	11
Figura 2.2	Estrutura da atrazina	13
Figura 3.1	Mapa da Ilha de Itamaracá, local da coleta Fonte: PORTO NETO (1998)	25
Figura 3.2	Procedimento para análise de Coliformes Totais.....	28
Figura 3.3	Teste confirmativo para presença de <i>Pseudomonas</i>	30
Figura 3.4	Coloração do meio Agar cetrimide na presença de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Figura 3.5	Procedimento para análise do solo, quanto à quantificação, impacto e biodegradabilidade do óleo Diesel	32
Figura 3.6	Transferência do inóculo a cada 24 h em processo adaptativo a concentrações e variações do óleo Diesel	35
Figura 4.1	Contagem de Coliformes totais (C), Coliformes Termotolerantes (T) e <i>Pseudomonas</i> (P) no solo de Manguezal	41
Figura 4.2	Contagem microbiana de Coliformes totais(C), Termotolerantes (T), <i>Pseudomonas</i> (P) em água do Manguezal.....	43
Figura 4.3	Comparação da contagem microbiana do solo e da água do manguezal Termotolerantes do solo T(s), Termotolerantes da água T(a), Coliformes Totais do solo C(s) Coliformes Totais da água C(a), <i>Pseudomonas</i> do solo P(S) e <i>Pseudomonas</i> do solo P(a)	44
Figura 4.4	Impacto no crescimento bacteriano oriundo do solo de manguezal inoculadas em meios: Agar Nutritivo(ANS), Czapeck (CZ), Czapeck-óleo (CZ-óleo) todos contendo Fluconazol	46

Figura 4.5	Crescimento microbiano para verificação do impacto de fungos em meio CZ com Tetraciclina; fungos em CZ-óleo com Tetraciclina; bactérias em CZ-óleo com Tetraciclina	47
Figura 4.6	Mudança da coloração após vinte dias de incubação. A- no momento da inoculação; B- após vinte dias de crescimento.....	49
Figura 4.7	Ensaio bioquímico confirmativo a presença de <i>Pseudomonas</i> (A) em meio de acetamida (B) meio de Agar cetrimide	50
Figura 4.8	Análise gráfica do Percentual de degradação dos cinco compostos no óleo Diesel	52
Figura 4.9	Crescimento do gênero <i>Pseudomonas</i> em diferentes concentrações do óleo Diesel 3%, 5% e 10% (m/v) após 30 dias de contato.....	53
Figura 4.10	Cromatografia em meio fermentado contendo óleo Diesel a 3% (m/v) após 30 dias de fermentação em presença da cultura pura do Gênero <i>Pseudomonas</i> isolado do solo de manguezal. (eixo y: intensidade KW; eixo X: tempo de retenção mim).....	54
Figura 4.11	Cromatografia em meio fermentado contendo óleo Diesel a 5%(m/v) após 30 dias de fermentação em presença de cultura pura do Gênero <i>Pseudomonas</i> isolado do solo de manguezal. (eixo y: intensidade KW; eixo X: tempo de retenção mim).....	55
Figura 4.12	Cromatografia em meio fermentado contendo óleo Diesel a 10%(m/v) após 30 dias de fermentação em presença de cultura pura do Gênero <i>Pseudomonas</i> isolado do solo de manguezal. (eixo y: intensidade KW; eixo X: tempo de retenção mim)	56
Figura 4.13	Crescimento bacteriano de solo impactado em diferentes concentrações de óleo Diesel em meio AN (barras com erro de 5%).....	58
Figura 4.14	Crescimento bacteriano de solo impactado em diferentes concentrações de óleo Diesel em meio ANS. (barras com erro de 5%).....	58
Figura 4.15	Contagem bacteriana de solo impactado por diferentes concentrações de óleo Diesel em meio de ANS	59
Figura 4.16	Contagem de fungos do solo impactado com óleo Diesel por 30 dias.....	60
Figura 4.17	Crescimento microbiano em experimento de frascos agitados no período de vinte dias.....	62

Figura 4.18	Variação do pH durante os vinte dias em frascos agitados.....	63
Figura 4.19	Decréscimo da Tensão superficial nos 20 dias de aeração em frasco agitado.....	64
Figura 4.20	Halo de inibição entre colônias em isolados do solo de manguezal.....	64
Figura 4.21	Cromatografia em meio fermentado com cultura mista do solo de manguezal durante vinte dias sobre frasco agitados em condições de aeração 1:10, (eixo y: intensidade kW; eixo X: tempo de retenção mim).....	66
Figura 4.22	Redução dos componentes do óleo Diesel por cultura mista, com e sem aeração e gênero <i>Pseudomonas</i> , submetidos à análise cromatográfica.....	67

LISTA DE TABELAS

Tab. 1	Características físico-químicas do óleo Diesel.....	24
Tab. 2.	Composição da água salina peptonada.....	28
Tab. 3	Composição do meio Lauril.....	29
Tab. 4	Composição do meio Escherichia coli (E.C).....	29
Tab. 5	Composição do meio presuntivo de Asparagina.....	31
Tab. 6	Composição dos meios AN, CZ, CZ-óleo.....	33
Tab. 7	Variações da fonte de carbono no meio original de Czapeck em g/l.....	34
Tab. 8	Composição do meio Sabouraud (SB) para 1litro.....	36
Tab. 9	Meio mineral de Bushnell-Haas.....	37
Tab.10	Valores dos diâmetros dos halos de inibição em mm da Tetraciclina frente às colônias isoladas de meio Cz.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Meio de cultivo Agar nutritivo
AN Sal ou ANS	Meio de cultivo Agar nutritivo contendo sal
BH OU B&H	Meio mineral de Bushnell-Haas
SB	Meio de cultivo Agar Sabouraud
CZ	Meio de cultivo Czapeck
CZ-ÓLEO	Meio de cultivo Czapeck modificado contendo óleo
INPE	Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais
EPA	Enviromental Protection Agency
HPA	Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares
CPRH	Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
CPRM	Companhia de Pesquisas e Recursos Minerais
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
UFC	Unidade Formadora de Colônias.
NMP	Números mais prováveis
MTBE	Éter tert butílico e metílico
EC	Escherichia coli

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar o impacto do óleo Diesel na microbiota nativa do solo de manguezal de Vila Velha- Itamaracá, analisando a capacidade biodegradadora natural dos microrganismos nativos presente nesta área. Os resultados mostraram que microrganismos solo de manguezal (fungos e bactérias) quando submetidos a impactos da substituição total de sua fonte de carbono sem um prévio contato com o poluente reduziram no número de colônias. Porém quando o solo foi submetido ao impacto com o poluente, durante trinta dias a reação microbiana foi de um aumento populacional, sendo observado a diminuição na diversidade das formas de colônias e surgimento de outras. Nos estudos realizados com a substituição total da fonte de carbono em meio aquoso sem estímulo a aeração confirmou-se através dos ensaios bioquímicos a presença do gênero *Pseudomonas* e sua participação no processo de biodegradação, através da redução de componentes do óleo Diesel analisado por cromatografia GCMS. Nos ensaios submetidos à agitação obteve-se um aumento populacional superior ao do impacto no solo, apresentando uma diminuição na tensão superficial em 40% no período de vinte dias, neste a redução do poluente em ensaios cromatográficos apresentou-se maior chegando a 99% no composto decano.

ABSTRACT

The aim of this work is to study the impact of Diesel oil contamination on the mangrove located in the Itamaracá Island near Vila Velha in the State of Pernambuco, Brazil. The capacity of the mangrove native microbial population of degrading Diesel oil was analyzed. The results showed that when this native population was subjected to complete substitution of the carbon source without previous contact with the contaminant Diesel the population colony count decreased. Nevertheless, when the contact occurred slowly during 30 days an increase in the population occurred. A reduction in the diversity of colonies and appearance of news colonies not present in the previous experiment were observed. In the studies with complete substitution of the carbon source without aeration the presence of *Pseudomonas* genus by biochemistry methods. The reduction of the contaminant Diesel oil was measured by GCMS. In the assays subjected to aeration in aqueous medium the population increase was bigger than in the impacted soil. A reduction in the surface tension of the fermenting broth was also observed. The chromatographic assays showed a 99% reduction of the decane.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos através de microrganismos tem sido considerada como uma forma eficiente, versátil e econômica de tratamento de ambientes impactados. Para isso é possível fazer uso de tratamentos *in situ* e *ex-situ* (MARGESIN & SCHINNER, 2001).

O petróleo contém inúmeros compostos que são agrupados em frações de acordo com sua solubilidade em solventes orgânicos, são eles: hidrocarbonetos parafínicos, naftálicos, aromáticos, resinas e asfaltenos. Quanto à composição depende da sua formação e estudos sobre a mesma, vêm facilitar a aplicação da biorremediação, indicando a susceptibilidade dos petroderivados ao ataque dos microrganismos (CAPELLI *et al.*, 2001).

Os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (HPA) são constituintes importantes do petróleo, tem um alto peso molecular sendo alguns poluentes recalcitrantes, porém quanto menor for o número de anéis, maior a facilidade de serem biodegradados. Recentemente, alguns estudos têm mostrado que o gênero *Mycobacterium* isolado de solo contaminado com petróleo apresenta capacidade de degradar moléculas como o pireno e benzopireno (CHEUNG & KINKLE, 2001, GROSSER *et al.*, 1991, SCHNEIDER *et al.*, 1996, ROSATO, 1997; CORGIE *et al.*, 2004).

Além dos HPA_s serem tóxicos, a presença dessas substâncias em ambientes marinhos pode destruir o macro e o microambiente. Sabe-se, porém, que certos microrganismos são hábeis em degradar hidrocarbonetos de petróleo usando-os como fonte de carbono e energia para seu crescimento por diferentes vias metabólicas (GRAWFORD & GRAWFORD, 1996).

A degradação de compostos orgânicos é complexa e nem sempre o resultado é a completa mineralização em CO₂ e H₂O. O produto da atividade microbiana pode ser um composto transformado por uma degradação incompleta, tornando-o ainda mais nocivo. Além disso, a biorremediação pode ser limitada, no meio natural, por fatores que possam vir a interferir no crescimento bacteriano como a competição entre

microrganismos, quantidade de água, temperatura, pH, presença de resíduos tóxicos, tipo de poluente, aceptores de elétrons e nutrientes (BAKER & HERSON, 1994; SÁ, 2002).

Essas degradações envolvem reações de oxidação que em sua maioria são realizadas por microrganismos aeróbios, porém alguns estudos têm demonstrado a degradação de hidrocarbonetos em anaerobiose no meio ambiente, sendo estas realizadas por desnitrificação, redução de sulfato ou em condições metanogênica, produção de metano (BAKER & HERSON, 1994; ROSATO, 1997).

Bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Micobacterium* são citadas em vários trabalhos como degradadoras de hidrocarbonetos contaminantes do solo (GRAWFORD & GRAWFORD, 1996).

Várias pesquisas têm demonstrado que alguns gêneros de fungos são capazes de degradar compostos orgânicos, como a espécie *Phanerochaete chrysosporium*, que mineraliza o bifenil a CO₂ (SIETMANN *et al.*, 2001, SCHULTZ *et al.*, 2001). Zheng & Obbard (2003) constataram que isolados de cultura de fungos foram capazes de oxidar mais de 50% de fenantreno e, especialmente, algumas linhagens do gênero *Penicillium* foram capazes de oxidar 89% deste composto presente no meio de cultura utilizado.

Sullivan *et al.* (2001) em pesquisa realizada em um estuário, em Nova Jersey, descreveram um consórcio microbiano, que sob ambiente sulfidogênico, foi capaz de mineralizar o composto 2-metil-naftaleno. Esses autores relatam outros consórcios, obtidos no mesmo local, capazes de mineralizar o naftaleno e o fenantreno.

Santo (2002) coletou amostras de areia na praia de Suape e enriqueceu com óleo Diesel com a finalidade de promover o crescimento de consórcios naturais capazes de consumir hidrocarbonetos. A partir disso, isolou microrganismos como bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas sp* e *Bacillus sp* além de duas espécies de leveduras, *Candida tropicalis* e *C. lodderae*.

Apesar da contaminação por petróleo ser de caráter ocasional, dependendo da ocorrência de acidentes com navios, embarcações ou de vazamento em terminais petrolíferos, os estuários e mangues estão sujeitos a poluição, estando estes sobre constantes riscos devidos a essas atividades (LIRA *et al.*, 1992; CURY, 2002).

Em um acidente de grande percussão, uma tonelada de óleo pode se espalhar por 112 km²; dependendo das condições hidrológicas, da característica do óleo e do ecossistema atingido pode persistir por muito tempo. Acarretando interferências diretas ou indiretas na pesca, mariscocultura e turismo (POFFO *et al.*, 2001).

Em Suape está localizado um dos mais importantes estuários de Pernambuco, onde dentre as intervenções antrópicas sofridas, destaca-se como principal modificador do relevo, a construção e instalação de um complexo industrial e portuário (Figura 1.1). O Porto de Suape localiza-se em uma região de interação entre as correntes de deriva litorânea e a dinâmica estuarina. Estudos têm demonstrado que a oscilação da maré resulta na penetração das águas do mar no estuário sendo então distribuídos pelos canais e margens, portanto qualquer acidente poderá atingir esta zona, o que destaca sua fragilidade (CPRM, Set 2003). Com essas intervenções, coberturas vegetais foram destruídas, áreas foram aterradas e outras alagadas, tendo conseqüências desastrosas e irreversíveis para o ecossistema, levando em consideração os importantes papéis desempenhados pelo estuário.

Uma das formas de degradação dos estuários é através da poluição hídrica, se considerarmos o destino dos poluentes que são os manguezais, regiões ribeirinhas e litorâneas. Entre as várias formas de poluentes orgânicos estão os esgotos, os lixos e os derivados de petróleo (LIRA *et al.*, 1992). Os manguezais próximos ao Porto de Suape como também os de Vila Velha, encontram-se sob risco eminente de contaminação visível ou não, por derivados de petróleo, Suape por conta da intensa atividade industrial e comercial, em quanto a Vila Velha é devido principalmente, ao turismo e ao crescimento desordenado próximo a esses ecossistemas.



Figura 1.1: Vista aérea da zona portuária do Distrito industrial de Suape e manguezal próximo. Site: meio ambiente [www.suape.pe.gov.br/meio ambiente](http://www.suape.pe.gov.br/meio_ambiente)

Os manguezais constituem um importante ecossistema no equilíbrio ecológico e na cadeia alimentar, de solo lamoso, apresenta variações na salinidade dependente da influência que recebe, apresentando uma diversidade de espécies funcionando como fonte de alimentação com grande potencial econômico (PORTO NETO, 1998). Ao serem atingidos com petróleo ou seus derivados apresenta dificuldades para remoção do mesmo devido às características deste ecossistema, com vegetação de raízes aéreas e solo encharcado (CURY, 2002).

As áreas de manguezais no Brasil cobrem 25.000 km², porém no Estado de Pernambuco ocupa 270 km² de área, destacando-se dentre os seus sistemas estuarinos o da região de Itamaracá, onde se localiza o Canal de Santa Cruz (Figura 1.2) apresentando-se de forma expressiva na produção de espécies comercializáveis. Este complexo estuarino recebe influência do mar e de rios como Botafogo, Paripe e Igarassu, apresentando uma vasta área de manguezais a qual tem sido objeto de estudo nos últimos trinta anos devido a sua importância cultural, econômica e científica. A degradação deste local vem ocorrendo devido a impactos sofridos através de aterros,

pesca estuariana e além de despejo de esgotos sanitários (SOARES *et al.*, 2001; PORTO NETO, 1998; CPRH, 2005).



Figura 1.2: Imagem da entrada do Canal de Santa Cruz em Vila Velha – Itamaracá.

O estudo do impacto por hidrocarbonetos do petróleo no solo de manguezal vem a ser de grande importância para que se possa observar o comportamento da microbiota nativa do solo deste ambiente e sua adaptação ou habilidade para degradar este tipo de poluente, seja em grandes ou pequenas concentrações. Visto que para aplicar a técnica de biorremediação se faz necessário um conhecimento do local e do processo mais viável com eficiência na remoção do poluente. Esse estudo é motivado por riscos eventuais à poluição visível ou não que possam chegar aos manguezais, pois, não se descartam os riscos de acidentes com pequenas embarcações de pescas locais e contaminações oriunda do mar, que possam danificar e alterar a microflora desse ecossistema. O qual já vem sofrendo agressões e degradações que são perigos eminentes aos manguezais do Estado, estes já alcançados com impactos variáveis de ações antrópicas.

Dentro deste contexto avaliativo temos como principais objetivos:

Objetivos Gerais:

- Estudar o impacto do óleo Diesel na microbiota nativa do solo do manguezal de Vila Velha em Itamaracá Quantificando a população microbiana antes e após o contato com o poluente observando o impacto nesta população.

Objetivos específicos;

- Isolar microrganismos sobreviventes à presença do poluente.
- Verificar a ocorrência de biodegradabilidade pelos microrganismos nativos
- Verificar a capacidade biodegradadora do isolado em diferentes concentrações do óleo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPACTOS CAUSADOS PELO DERRAMAMENTO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO

Os derramamentos acidentais, os manuseios impróprios durante o processo de transporte e armazenagem de derivados do petróleo, têm resultado em inúmeras contaminações, levando a problemas ecológicos com sérios danos econômicos. Por conta disso, a biorremediação tem sido uma das propostas para descontaminar estes locais (VILA *et al.*, 2001).

Após a detecção de um acidente ou mesmo de pequenos vazamentos, medidas emergenciais são tomadas durante o derramamento de óleo com intuito de minimizar o efeito do desastre, estas dependem do local e do tipo do poluente. Como estratégia de limpeza tem-se a escolha da técnica adequada, que podem variar, entre elas as aplicações de adsorventes, que são produtos oleofílicos (sintético ou mineral), remoção manual usando, baldes e/ou pás, caminhões e outros, cortes de vegetação impregnada, bombeamento a vácuo para tambores e “bags”, equipamento de contenção (rede e barreiras), dispersantes químicos. Além da ação intencional há também a ação de agentes naturais como: ondas, chuvas, ventos, biodegradação, volatilização que vão depender da característica do poluente para atuarem na remoção (CESTEB, 2005)

Alguns acidentes além de causar impactos ecológicos, tornaram-se marcos mundiais devido as suas proporções e danos causados ao meio ambiente. O derramamento de óleo do petroleiro Exxon Valdez em março de 1989 é um exemplo de biorremediação *in situ*, onde onze milhões de galões de óleo bruto contaminaram 350 milhas no Alasca. A adição de nutrientes inorgânicos para o bioestímulo aumentou significativamente a taxa de biorremediação neste acidente (MADIGAN *et al.*, 1997; GLAZER & NIKAIKO, 1998, KOREM *et al.*, 2003).

Em 1992, aproximadamente 100 toneladas de óleo bruto foram acidentalmente, derramados em Israel. A técnica escolhida para recuperação foi a de biorremediação por bioaumento e bioestímulo onde foram utilizadas bactérias selecionadas e adicionados compostos de nitrogênio e fósforo (GRAWFORD & GRAWFORD, 1996).

Nas últimas décadas ocorreram graves acidentes com petroleiros, entre eles destaca-se o que correu no fim de 2002 quando o navio Prestige afundou na costa da Galícia, Espanha, com 20,5 milhões de galões de hidrocarbonetos causando um grande impacto ambiental e transtornos econômicos irreparáveis; a maré negra formada atingiu aves, peixes, além de praticamente toda a costa noroeste e norte do país (DRAGO, 2003).

Outros problemas são os causados pelos aditivos usados em combustível como o éter tert-butilico e metílico (MTBE) que é altamente solúvel, juntamente com outros produtos químicos tóxicos, têm sido usados na gasolina desde 1970. A divulgação de seu uso foi revelada após um espalhamento acidental em solo e água, na Califórnia, o que chamou a atenção para definir o limite de concentração do MTBE e até mesmo a substituição deste produto por outro “mais” biodegradável. A biorremediação de MTBE tem sido foco de estudo para a descontaminação do aquífero do Porto Naval da Califórnia. Vários autores relataram que mais de dez mil locais estão contaminados com este produto e segundo a agência de proteção ao meio ambiente americana (Environmental Protection Agency – EPA, 2003), é listado como possível cancerígeno humano (KANE *et al.*, 2001; HATZINGER *et al.*, 2001; FIORENZA & RIFAI, 2003).

Dentre os principais acidentes ocorridos no Brasil pode-se citar alguns: o primeiro, no Brasil e no litoral sul, foi em 1974 com o navio Takimya Maru, o segundo foi no Rio de Janeiro em 1975 com o navio Tarik Lbn Ziyad. Vários outros têm ocorrido no país, desde embarcações a acidentes em plataformas e oleodutos (POFFO, 2001). Segundo a CESTEB, de 1978 a 2001 ocorreram 4.499 acidentes no País. O segundo maior acidente em derramamento de óleo no País ocorreu, no ano de 2000, na refinaria Getúlio Vargas em Araucária, no Paraná (Figura 2.1), provocando um grave impacto ao ambiente, contaminando quatro rios, acarretando a morte de peixes e várias espécies de animais (SANTO, 2002). Em 2003, mais um registro de acidente por derramamento

de óleo ocorreu em Ubatuba com o Nordic Marita e o mais recente, ocorreu em novembro de 2004 com navio de bandeira Chilena que derramou óleo e metanol no Paraná atingindo manguezais e praias, resultando na proibição da pesca à população que sobrevive economicamente desta área (CESTEB, 2005).



Figura 2.1 Contaminação ocasionada por vazamento ocorrido na refinaria Getúlio Vargas-Paraná. Site: www.ambicenter.com.br / petrobras

2.2 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma técnica direcionada a estimular microrganismos para assimilarem contaminantes como fontes de energia e crescimento. Para seu sucesso faz-se necessário combinar as exigências dos microrganismos quanto à quantidade de oxigênio e nutrientes, quanto à temperatura e pH, ideais para o seu desenvolvimento. Somente os microrganismos adaptados para a degradação de contaminantes específicos são capazes de crescer (EPA, 2003; BAKER & HERSON, 1994; ROSATO, 1997). As técnicas de biorremediação podem ocorrer *in situ* ou *ex-situ* envolvendo processos de bioaumento que visam o aumento do número de microrganismos degradadores de compostos orgânicos e/ou bioestimulo, que visam melhorar as

condições de crescimento do microrganismo, através do fornecimento de nutrientes, correções do pH e a bioaeração, que mantém a oxigenação. (EPA, 2003; GLAZER & NIKAIIDO, 1998; BAKER & HERSON, 1994; ALEXANDRE, 1994 ;).

Os derrames de petróleo ou de seus derivados ocorrem principalmente no mar devido ao tráfego de grandes cargueiros, além do transporte em pequenas embarcações. No ambiente marinho as alterações da composição e da quantidade dos hidrocarbonetos podem ocorrer pela variedade de processos físicos, químicos e biológicos, como a volatilização, a solubilização, as reações de oxidações, o aumento da viscosidade e a ação de biosurfactantes (ROSATO, 1997).

A estimativa de impacto anual de 10^7 toneladas de óleo bruto em ambientes marinho e estuarino despertou a necessidade de utilizar processos biológicos para a remediação de poluentes, contaminantes do solo e da água, como uma alternativa natural e viável em relação a alguns processos físicos, como incineração, escavação de solos (GREER *et al.*, 2003).

Algumas pesquisas relatam a importância da densidade microbiana degradadora como fator de redução de poluentes. Para isso, faz-se uso de técnicas como bioaumento, estimulando o desenvolvimento do número de microrganismos endógenos e desta forma, reduzindo o período de adaptação ao poluente ou ainda, utilizando-se a técnica de bioenriquecimento que introduz no ambiente microrganismo exógeno, porém esta prática pode apresentar limitações, pois, os microrganismos selecionados devem ser capazes de degradar uma grande parte do poluente, ter estabilidade genética, não devem gerar produto tóxicos e dentre outras ter alta atividade enzimática. Quanto à técnica de bioestimulo é utilizada para otimizar o crescimento microbiano através de fornecimento de nutrientes como nitrogênio, fósforo e melhoramento das condições de aeração através da adição de oxidantes, revolvimento do solo e introdução de tubos de aeração no solo (SÁ, 2002).

Segundo Bennet *et al.* (2002) a biorremediação pode utilizar três estratégias: a) o uso do componente como fonte de carbono; b) o uso como estimulador de ataques enzimáticos, no caso de cometabolismo e c) o bioacumulo onde o composto não é metabolizado, mas é incorporado ao organismo. Definindo a biodegradação como a

quebra de compostos químicos, que quando é completa chama-se de mineralização, resultando como produtos CO_2 e água. A biotransformação ou bioconversão é a transformação de um composto em outro pelas vias bioquímicas.

O processo apropriado utilizado na recuperação de solo, através da aplicação da técnica de biorremediação, deve seguir um estudo prévio. Yerushalmi *et al.* (2003) estudaram o solo contaminado com hidrocarboneto, no Canadá, e verificaram que a técnica de bioaumento com a cultura enriquecida foi mais eficiente que a de bioestímulo, aumentando a remoção de hidrocarbonetos de 20% para 49%.

No uso da biotecnologia para a recuperação de solos é necessário se conhecer o poluente, a microbiota degradadora do mesmo e a caracterização do solo. Garcia-Gonzalez *et al.* (2003) verificaram que, dependendo da fonte de nitrogênio encontrada no solo, havia interferência no processo de biodegradação da atrazina (Figura 2.2) por espécies de *Pseudomonas sp.*, e observaram ainda, que a recuperação de solos contaminados por este poluente tem sua mineralização reduzida pela presença de nitrato no ambiente.

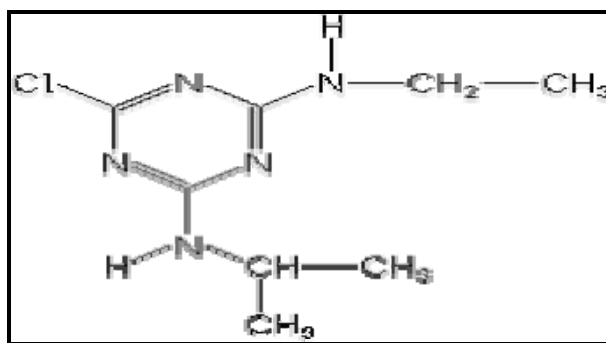


Figura 2.2 Estrutura da atrazina

No processo de biorremediação para a degradação ou transformação de compostos, uma outra estratégia comumente aplicada é o cometabolismo, que consiste no uso de um outro composto que funciona como um co-substrato para acelerar o processo de transformação e utilização do poluente que pode ser de difícil metabolização pelo microrganismo (SÁ, 2002; BAKER & HERSON, 1994).

A espécie *Pseudomonas mendocina* utilizou o cometabolismo no processo de transformação de alcanos gasosos e do éter metil terci butil (MTBE), apresentando melhores resultados na presença de alcanos, o propano e o n-butano, com maior crescimento celular (SMITH *et al.*, 2003).

Outro fator importante é a utilização de microrganismos produtores de biosurfactantes. Esses surfactantes presentes na fase aquosa podem emulsificar o composto, estimulando o crescimento microbiano, o que pode aumentar a taxa de biodegradação e a redução da tensão superficial. O potencial do surfactante pode ser positivo com o aumento da degradação ou negativo, com apenas formação de espumas (CASSIDY *et al.*, 2000). A produção de biosurfactante é citada como uma estratégia bacteriana que atua em forma de dispersante ou na dissolução do poluente, facilitando o ataque dos microrganismos na interface do óleo-água (PRINCE *et al.*, 2003). Embora haja trabalhos contraditórios em que o gênero *Pseudomonas*, produtor de biosurfactantes, aumente o ataque ao substrato, sugerindo a atuação na dissolução. Outros relatos mostram que esse gênero não apresenta efeito na dissolução, desvinculando a degradação da produção de surfactantes, todavia estudos recentes indiquem que a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por *Pseudomonas* reduza a tensão superficial em meio aquoso (JOHNSEN *et al.*, 2005).

Microrganismos produtores de biosurfactantes têm influenciado o uso da técnica de biorremediação, desenvolvendo o seu potencial em utilizar o poluente, mostrando eficiência na recuperação de solos e água contaminados por compostos orgânicos. Dentre os microrganismos produtores e os biosurfactantes produzidos por eles estão a *Pseudomonas aeruginosa*, raminolipídios; *Bacillus subtilis*, sufactrina; *Streptomyces tendae*, streptofactina (MULLIGAN *et al.*, 2005).

2.3 FATORES QUE AFETAM A BIODEGRADAÇÃO

Os fatores que podem limitar a população bacteriana na biorremediação são o teor de água, a temperatura, o pH, a presença de produtos tóxicos tais como metais, aceptores de elétrons e os nutrientes orgânicos e inorgânicos. A dificuldade em estabilizar a biodegradabilidade de contaminantes depende do composto químico específico, considerando suas propriedades físicas e químicas (BAKER & HERSON, 1994). Além dos citados, afetam a viabilidade do tratamento, a natureza do composto a ser biodegradado, sua heterogeneidade, concentração e a toxicidade, a característica do local, bem como a porosidade e a composição do solo que indicará a microflora nativa do ambiente, a presença e o nível da população microbiana (EPA, 2003; BALBA *et al.*, 1998).

A estrutura do solo depende da associação entre os minerais, das partículas do solo e da matéria orgânica formada por microagregados, que envolvem a interação das partículas de diferentes tamanhos com os microrganismos, sendo caracterizados pela diferença de substratos, nutrientes, concentração de oxigênio e quantidade de água. Alguns estudos têm demonstrado que a microbiota do solo apresenta uma alta diversidade fenotípica e genotípica (SESSITSCH *et al.*, 2001).

Em ambientes marinhos a biodegradabilidade é afetada pela baixa concentração de oxigênio, fósforo e nitrogênio. No manguezal é limitada por se tratar de um ambiente que apresenta pouco oxigênio no solo (CURY, 2002). O petróleo pode servir como fonte de carbono, porém os microrganismos necessitam de nutrientes para seu desenvolvimento, como as disponibilidades destes nutrientes variam de local para local, a correção no solo, para esta carência se dá por utilização de fertilizantes, porém no mar deve ser efetuado de forma que não se dissipe na interface óleo-água (ROSATO, 1997).

O pH e a população microbiana degradadora de hidrocarbonetos, são citados como fatores importantes no processo de biorremediação. Sua importância é relatada no trabalho de Singh *et al.* (2003) em que um consórcio bacteriano reduziu o tempo de

biodegradação de um nematicida, quando submetido a pH alcalino, comparado com sua atuação em pH ácido.

Os mecanismos de degradação e/ou destruição dos contaminantes através de processos físicos e químicos como: dispersão, diluição, volatilização, absorção e transformação são importantes e são influenciados pela temperatura e água, que pode variar a viscosidade, a evaporação e a solubilidade (MARGENSIN & SCHINNER, 2001; ROSATO, 1997). A biodegradação de compostos químicos também depende de sua solubilidade, que nos hidrocarbonetos alifáticos diminui nos compostos de cadeias maiores (ALEXANDRE, 1994). Segundo Baker & Herson (1994), os compostos se tornam mais degradáveis em comparação a outros, dependendo da: classificação, disposição, saturação e tamanho da cadeia carbônica.

2.4 COMPOSIÇÃO DO PETRÓLEO

O petróleo originado de resíduos de fitoplânctos se acumulam em depressões no oceano, consistem em um complexo de gases, líquidos e sólidos compostos de n-alcano, parafinas, ciclo-parafinas, compostos aromáticos, compostos sulfurados, além de outros compostos orgânicos. Os maiores constituintes do petróleo são parafinas (30 a 50%), ciclo parafina (20 a 65%) e aromáticos (6 a 14%), dependendo da origem do óleo (GLAZER & NIKAIDO, 1998; PRINCE *et al.*, 2003).

O petróleo e seus derivados são misturas complexas de compostos orgânicos com alto valor de energia. A gasolina, por exemplo, contém mais de cem substâncias diferentes e em sua maioria, os compostos encontrados são hidrocarbonetos (BAKER & HERSON, 1994; ROSATO, 1997). Os produtos do petróleo como a gasolina, o querosene e o óleo Diesel são poluentes comuns ao meio ambiente. A biodegradabilidade da gasolina tem sido observada no solo e na água apesar de em sua composição ter recalcitrantes (SOLANO-SERENA *et al.*, 2000).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA_s) são importantes constituintes do petróleo sendo poluentes recalcitrantes, produzidos durante a queima de combustível, incineração, processos industriais e nas refinarias de petróleo (CHEUNG & KINKLE, 2001). Segundo Gentry & Wolf (2003), a análise do efeito do HPA_s em comunidade microbiana extraída do solo pode aumentar o processo de remediação do mesmo quando contaminado com HPA_s permitindo uma maior adaptação dos microrganismos.

Em depósitos de petróleo, freqüentemente são encontrados altos níveis de hidrocarbonetos sulfurosos. O óleo cru contém HPA que acima de 5% apresenta-se ligado organicamente ao enxofre, esses níveis podem ser aumentados durante o processo de produção de combustíveis. Como a emissão de dióxido de enxofre pode causar chuvas ácidas, as refinarias têm desenvolvido estratégias para diminuir as concentrações de enxofre em seus produtos (DUARTE *et al.*, 2001).

O óleo Diesel é um derivado do petróleo que apresenta em sua composição principalmente átomos de carbono e hidrogênio e, em baixa concentração o enxofre, oxigênio e nitrogênio. Esse é um produto volátil, límpido que apresenta toxidade e cheiro forte característico, sendo um artigo de aplicações diversas. O óleo Diesel comum caracteriza-se por ser simples, não possuir aditivos e ter cor amarelo ou alaranjada. O óleo Diesel aditivado possui as mesmas características diferindo do comum pela presença de aditivos como antiespumante, dispersantes, anticorrosivo e desmulsificante (PETROBRAS, 2005).

2.5 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS EM BIORREMEDIAÇÃO

A decomposição microbiana do petróleo e de seus derivados é importante para a recuperação do meio ambiente, além de ser uma técnica viável. Por ser o petróleo rico em matéria orgânica é atacado por vários microrganismos de grupos especializados, como as bactérias metanofílicas que conseguem degradar o metano; alguns microrganismos como fungos e bactérias são hábeis em metabolizar pesticidas, outros

conseguem oxidar minerais e remover metais pesados da água. Sendo o gênero *Pseudomonas* relatado em vários trabalhos como participante de degradações de hidrocarbonetos (MADIGAM *et al.*, 1996).

Os hidrocarbonetos contendo enxofre na estrutura são seletivos para os microrganismos. Segundo Duarte *et al.* (2001), a espécie *Rhodococcus erythropolis* é utilizada em estudos de desulfurização devido a sua habilidade em remover o átomo de enxofre. Yang *et al.* (2004) observaram a capacidade biodegradadora do gênero *Rhodococcus sp.* em sete bifenois policíclicos e seus intermediários. Poucos trabalhos têm explorado a resposta bacteriana da população do solo imposta ao “stress” de tais compostos e sua capacidade degradadora.

Vários autores têm relatado sobre inúmeros microrganismos que são capazes de degradar compostos orgânicos, poluentes e xenobióticos, sendo estes nativos ou engenheirados. De acordo com Ramsay *et al.* (2000), bactérias capazes de degradar o óleo Diesel podem ser enumeradas baseada na sua habilidade de crescer em hidrocarbonetos aromáticos ou alcanos usando-os como fonte de carbono.

Os estudo para a utilização de microrganismos engenheirados na biorremediação do meio ambiente vem crescendo. Muitos compostos recalcitrantes são tóxicos para microrganismos nativos, por isto, os geneticamente modificados têm sido avaliados quanto à modificação das vias de degradação ou a produção de enzimas envolvidas em processos de degradação. Suas habilidades e função no meio natural são analisadas quanto às vantagens e desvantagens de seu uso (GLAZER & NIKAIDO, 1998).

Algumas bactérias têm se mostrado como biodegradadores de poluentes, principalmente hidrocarbonetos, utilizando os mesmos para obtenção de energia em condições de aerobiose e anaerobiose. Esses microrganismos, alguns modificados geneticamente, associados ou não em consórcios, vêm sendo estudados para facilitar sua rápida adaptação aos poluentes e melhorar os ciclos biogeoquímicos envolvidos (DIAZ, 2004).

Estudos têm focado a utilização de microrganismos capazes de degradar compostos orgânicos que apresentam resistência a metais pesados, considerando as

diversidades de compostos orgânicos e que a presença de metais tóxicos é um fator inibitório ao desenvolvimento do microcosmo, seres com essas características facilitarão a degradação de compostos recalcitrantes (ROANE *et al.*, 2001).

Teste de tolerância à presença do metal Zn em comunidade microbiana de solo para desenvolvimento da adaptação ao mesmo, sugerem a ocorrência de três mecanismos durante o impacto para o aumento da tolerância ao metal: inicialmente, há uma seleção pela toxidez, permanecendo apenas os resistentes; a seguir, há o desenvolvimento da habilidade competitiva e por ultimo, a adaptação fisiológica e genética (DIAZ-RAVINA & BAATH, 1996).

Cheung & Kinkle (2001) relatam o crescimento do interesse pelo o gênero *Mycobacterium* e sua diversidade genética uma vez que apresentam potencial de degradar o HPA, em a busca de soluções para recuperar ambientes poluídos com compostos cíclicos e aromáticos.

A degradação de m-xileno e o-xileno por bactérias redutora de sulfato necessitaram da adição de fumarato como co-substratos (MORASCH *et al.*, 2004). Essa habilidade é relatada em outro trabalho onde a bactérias *Desulfobacterium cetonicum* oxida completamente o p-cresol utilizando o sulfato como aceptor de elétrons quando adicionado a fumarato (MULLER *et al.*, 2001).

A degradação de compostos nitrogenados com liberação da amônia consiste em obter a fonte de nitrogênio como suporte para o crescimento microbiano através de rotas naturais de predileção das vias por adaptação (HOU *et al.*, 2004).

A maior parte das fontes de nitrogênio são solúveis em água, sendo a presença deste importante no processo de biodegradação do petróleo. Usualmente, utilizam-se polímeros insolúveis para promover o processo, porém, experimentalmente, obteve-se um aumento na população microbiana quando se utilizou óleo e ácido úrico, que é pouco solúvel, como fonte de nitrogênio para culturas mistas e de espécie *Acinetobacter* (KOREN *et al.*, 2003).

A grande maioria dos policíclicos aromáticos esta presente em óleos, querosene e gases com riscos significativos para contaminação do ambiente. O estudo de microrganismos e suas vias metabólicas são importantes para o sucesso da técnica de

biorremediação, como no caso da oxidação do benzo-pireno por *Mycobacterium* (MOODY *et al.*, 2004) e a degradação do ciclopropanocarboxilato pelo *Rhodococcus rhodochrous* (TORAYA *et al.*, 2004).

Estudos com o *Methylobacterium* demonstraram sua capacidade de degradar explosivos tóxicos, estes microrganismos existem na natureza principalmente associados a plantas e em locais contaminados por explosivos (AKEN *et al.*, 2004). A biorremediação e a fitotoxidade em vegetais tem sido estudada devido à presença de poluentes no solo. Pesquisas realizadas com grãos de milho e feijão indicam que a fitotoxidade aumenta em solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos, e que a presença da bactéria *Norcadia sp.* reduziu esse efeito, principalmente nas sementes de milho (BAEK *et al.*, 2004).

A população microbiana de uma rizosfera apresenta uma atividade específica, devido ao exudato produzido pelas raízes que funcionam como fonte de carbono. Em ensaios realizados para verificar a biodegradabilidade do fenantreno, comparou-se uma população próxima às raízes das plantas e distante das mesmas, observou-se uma maior redução do poluente próximo à população da rizosfera (CORGIÉ *et al.*, 2004).

Em solo contaminado com herbicida, foram isolados microrganismos que apresentaram a capacidade de mineralizar atrazina através da quebra do anel sendo concluído que os mesmos realizavam a decloração e desalcalinação para quebra do anel (RADOSEVICH *et al.*, 1995).

A recuperação de áreas contaminada com hidrocarbonos além de envolver bactérias e plantas, vários trabalhos citam a utilização de algumas espécies de fungos. Muitos desses, apresentam capacidade em degradar xenobióticos e absorver metais (BENNET *et al.*, 2002).

Os denominados fungos lignolíticos e não lignolíticos são capazes de oxidar hidrocarbonetos aromáticos devido à semelhança entre as estruturas formada nas plantas e estes poluentes, através da enzima ligno-peroxidase (JOHNSEN *et al.*, 2005).

A utilização de treze variedades de fungos Basidomicetos, em ensaios acondicionados em meio contendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos,

demonstraram diferenças nas atividades lignolíticas e degradadora do poluente quando houve variação na concentração dos poluentes (CLEMENTE. *et al.*, 2001).

2.6 BIORREMEDIAÇÃO EM MANGUEZAIS E ESTUÁRIOS

A grande importância dos manguezais para a biodiversidade marinha é devido a ser um ecossistema que funciona como berçário e fonte de alimentos para diversos animais. Os manguezais apresentam variações em características tais como temperatura e salinidade tanto da água quanto do solo (CURY, 2002).

O excesso de poluentes orgânicos no ambiente estuarino provoca uma alta concentração de matéria orgânica. As bactérias aeróbias, durante o processo de decomposição desse substrato orgânico, consomem grande quantidade de oxigênio dissolvido aumentando assim a demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Dentre os vários poluentes orgânicos pode-se mencionar a contaminação por petróleo e seus derivados, que é grave para estuários e manguezais (LIRA *et al.*, 1992).

Apesar de poucos trabalhos terem sido realizados com manguezais, os derramamentos de óleo têm se mostrado como causa de degradações deste ecossistema (BURNS *et al.*, 2000). Os sedimentos de mangues apresentam-se em grande parte em anaerobiose, tendo geralmente menos de um centímetro da superfície aeróbia. Previamente foi sugerido que em sedimentos de manguezais a taxa de biodegradação por bactérias possam ser limitada pela concentração de oxigênio e nível de nutrientes (RAMSAY *et al.*, 2000).

Em sistema salino as degradações de substâncias, como o dimetil-sulfeto (DMS) e do metanotiol (MT), são atribuídas a grupos aeróbios e anaeróbios. Devido à limitação de oxigênio neste ambiente a degradação se dá em maior frequência com os microrganismos anaeróbios, pelos metanógenos, estes tem sido isolados em ambientes marinhos, estuarinos e em sedimentos de água salina (LOMANNS *et al.*, 1999).

O petróleo e seus derivados podem permanecer por mais de vinte anos nos manguezais, isso é explicado pela lenta biodegradação dos componentes do petróleo

devido à limitação de oxigênio e a lenta reciclagem dos nutrientes essenciais para atividade dos microrganismos aeróbios. Essa permanência também é influenciada pelo fluxo de água das marés que pode acelerar a remoção do petróleo. Os efeitos dessa contaminação podem ser tóxicos, crônicos ou ambos. Os compostos que são tóxicos/crônicos são geralmente aromáticos e causam danos duradouros, a longo prazo podem diminuir ou modificar a biodiversidade, mesmo em presença de pequena quantidade de petróleo (CURY, 2002).

Ramsay *et al.* (2000) basearam seus estudos em uma estratégia de aeração e adição de nutrientes. Dentre as vinte e duas linhagens utilizadas em seu trabalho, alguns dos isolados foram capazes de degradar hidrocarbonetos alcanos e aromáticos, destacando-se entre eles os gêneros: *Serratia*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Vibrio* e *Pseudomonas*.

Oudot *et al.* (1998) avaliaram a influência da taxa de biodegradação de óleo em sedimentos de estuários e baías com a adição de fertilizante, obtendo resultados satisfatórios nas frações de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos, não sendo significantes em resinas e asfaltenos.

As sínteses de ciclohalogenados por fungos basidiomicetos coexistem normalmente na natureza com bactérias anaeróbicas do gênero *Desulfitobacterium*, que promovem a desahaloginação e demetilação destes compostos observados em culturas enriquecida de sedimento de estuários e rios. Embora pouco se saiba sobre degradações e os metabolismos destas bactérias anaeróbicas (MILLIKEN *et al.*, 2004).

A degradação de hidrocarbonetos em ambientes marinhos é limitada pela quantidade de oxigênio, nitrogênio e fósforo, devido à utilização dos mesmos pelas bactérias aeróbias, embora se tenha relato deste processo ocorrendo em anaerobiose que utiliza o nitrogênio e o sulfato como aceptores de elétrons. Por isso é comum aplicar a adição de nutrientes na recuperação de ambientes marinhos, essa tática também é empregada na recuperação de solos, onde o processo de biodegradação, estimulado por nutrientes interage, promovendo o crescimento de plantas e portanto da microbiota da rizosfera, estimulando a biodegradação do poluente (GREER *et al.*, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

3.1.1- Óleo Diesel

A amostra do óleo Diesel para realização dos ensaios foi gentilmente cedida e caracterizada pelo Laboratório de Combustível do Departamento de Engenharia Química da UFPE (Tabela 1).

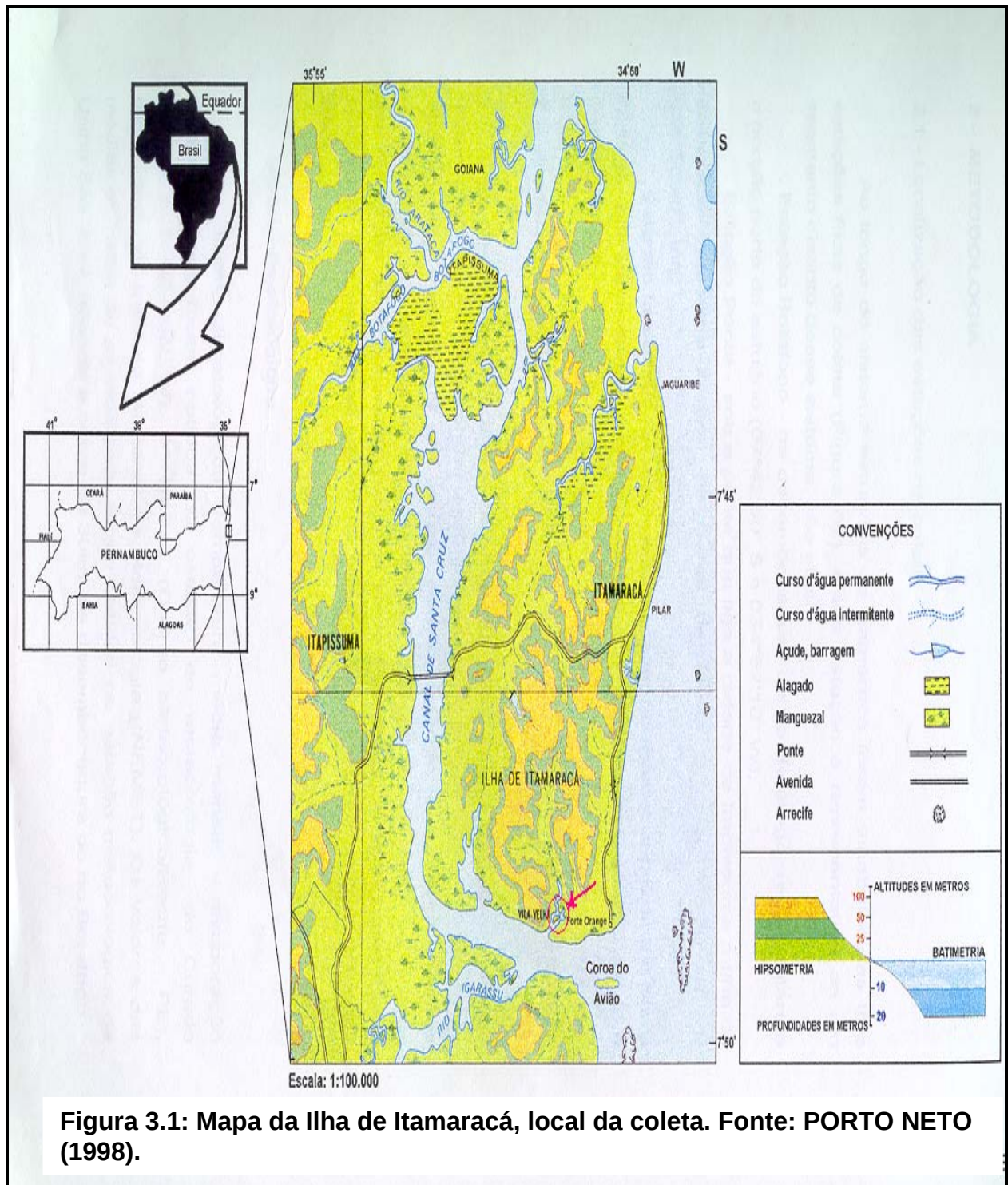
Tabela.1 Características físico-químicas do óleo Diesel

Produto	Óleo Diesel comum
Aspecto	Límpido sem impureza
Cor	Não vermelha *
Densidade	0,85 g/ cm ³
T°C	24°C
Teor de enxofre	0,22%m
Ponto de fulgor	54°C

* Cor não vermelha, indica óleo com menor teor de enxofre que o de cor vermelha.

3.1.2 Solo

As coletas foram realizada na área do Manguezal de Vila Velha no Canal de Santa Cruz na Ilha de Itamaracá (Figura 3.1). A temperatura da água encontrava-se a 28°C, e a altura da maré de 0,6 m, segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).



A área, esta localizada a cerca de 50 km ao norte da cidade do Recife no Estado de Pernambuco (Latitude. 007° 34' 00", 007°55' 16" Sul e Longitude. 034° 48' 48", 034°52' 24" oeste), recebe influência marítima e fluvial por suas interseções com o mar e com os rios Botafogo, Paripe, Igarassu, Catuama, Carrapicho, Siri e Congo (SOARES, 2001).

O solo foi coletado em diferentes pontos do manguezal de forma aleatória a uma profundidade de aproximadamente 1cm, próximo às margens da água e às raízes do mangue, sendo as mesmas homogeneizadas para obtenção de apenas uma amostragem representativa, a qual foi acondicionada em vasilhames estéreis colocadas em isopor contendo gelo, armazenados a temperatura de refrigeração a 10°C, para uso posterior.

3.1.3-Água

A água foi amostrada no centro do canal natural localizado no manguezal de Vila velha em Itamaracá equidistante das margens na profundidade de 27 cm, aferida através de uma trena (Lufkim), a temperatura de 28°C, altura da maré baixa a 0,6 m. As amostras foram depositadas em frascos esterilizados e acondicionadas sob refrigeração (8 a 10°C). No laboratório, verificou-se o pH e analisou-se microbiologicamente quanto à presença de bactérias *Pseudomonas*, coliformes totais e termotolerantes.

3.2. ANÁLISE DO SOLO E DA ÁGUA

A análise consistiu na verificação do pH e quantificação microbiana do solo e da água pela técnica dos tubos múltiplos de acordo com (STANDARD METHODS, 1998). Sendo todo o procedimento com o solo descrito no tópico 3.3.

3.2.1- pH

A verificação do pH da água foi realizada com o auxílio do potenciômetro de marca HANDELAB 1, tomando-se como procedimento para a constatação do pH no solo, 10 g de amostra em 25 ml de água deionizada, submetido a 150 rpm por 15 min para desagregação das partículas do solo deixando-o repousar por 20 minutos, verificando assim o potencial hidrogeniônico da solução obtida (SÁ, 2002; SANTO, 2002).

3.2.2. QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA

As amostras foram analisadas no laboratório de microbiologia do Departamento de Engenharia Química, sendo realizadas contagens microbiológicas de: *Pseudomonas*, coliformes totais e termotolerantes, através da técnica do Número Mais Provável (STANDARD METHODS, 1998). Para a contagem de fungos e bactérias mesófilas heterotróficas foi utilizado o método de plaqueamento *pour plate*.

A - Contagem de Microrganismos do Solo Através da Técnica de Tubos Múltiplos

A obtenção do inóculo para a contagem de coliformes totais e termotolerantes no solo, procedeu-se com a utilização de 10g do mesmo em 90ml da solução de água peptonada salina estéril (Tabela 2), contendo 0,1% de Tween 80(v/v), sendo submetida à agitação de 200 rpm por 20 min para a desagregação dos microrganismos das partículas do solo, desta suspensão foi realizada uma diluição a 10^{-1} , em solução de água peptonada salina estéril. Utilizou-se a técnica do NMP, em série de 5 repetições, em tubos contendo meio Lauril (Tabela 3) foram adicionados a estes os inóculo obtidos contendo 10 ml da amostra original, 1 ml da amostra original e 1ml da diluição 10^{-1} .

Para contagem de Coliformes Totais mostrado na figura 3.2, sendo incubadas em estufa a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Nos tubos positivos, onde houve a formação de bolhas

de gás, retirou-se três alçadas para tubos contendo o meio E.C (Tabela 4) os quais foram incubados a 40°C em banho maria por 24 h aplicando cinco repetições para cada tubos positivos, e daí obteve-se assim a Contagem do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes (STANDARD METHODS, 1998).

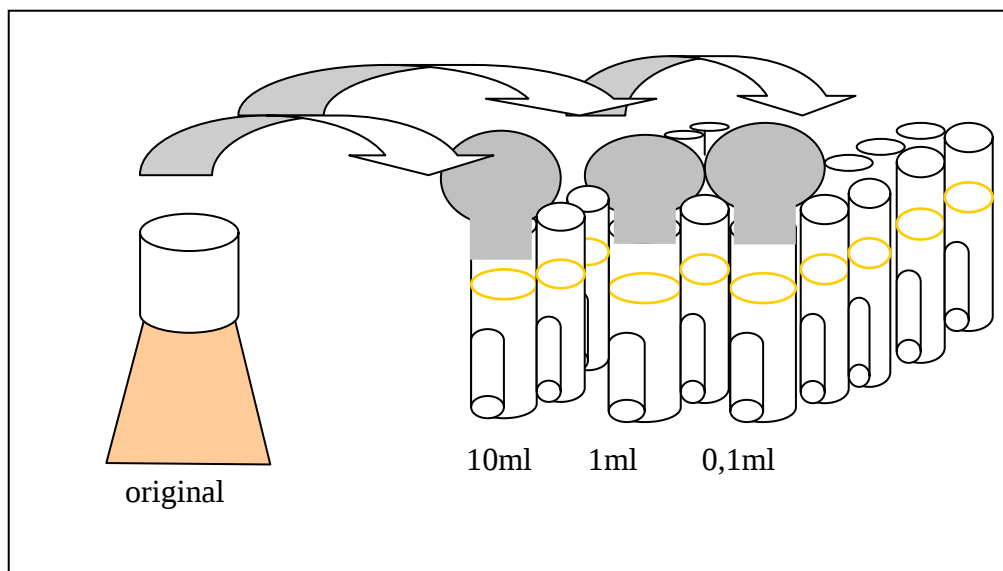


Figura 3.2: Procedimento para análise de Coliformes Totais

Tabela 2 Composição da água salina peptonada

Na Cl	8,5 g
Peptona	1 g
Água →	1 litro

Tabela 3 Composição do meio Lauril

Triptose	20g
Lactose	5g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	2,75g
KH ₂ PO ₄	2,75g
Laurilsulfato sal sódico	0,1g
Água →	1L

Tabela 4. Composição do meio Escherichia coli (E.C)

Triptona	20g
Lactose	5g
Sais biliares	1,5g
K ₂ HPO ₄	4g
KH ₂ PO ₄	1,5g
NaCl	5g
Água →	1 L

A contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas* no solo, partiu do mesmo inóculo obtido anteriormente utilizando a técnica do Número Mais Provável com o mesmo procedimento, tomando-se 10ml, 1ml e 0,1ml da amostra original que foram colocadas em tubos contendo meio de Asparagina (tabela 5) incubados a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h, tendo como resultado presuntivo positivo para as que apresentaram turbidez. Destas foram retirados três alçadas para tubos contendo meio de acetamida incubados

a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h, sendo o teste confirmativo, para as que obtiveram mudança de coloração do meio de cor laranja para vermelho cereja (Figura 3.3.), outra confirmação foi realizada semeando-se em meio sólido de cetrimide incubados a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h, o qual na presença desse microrganismo muda sua coloração para verde fluorescente como mostrado na figura 3.4.

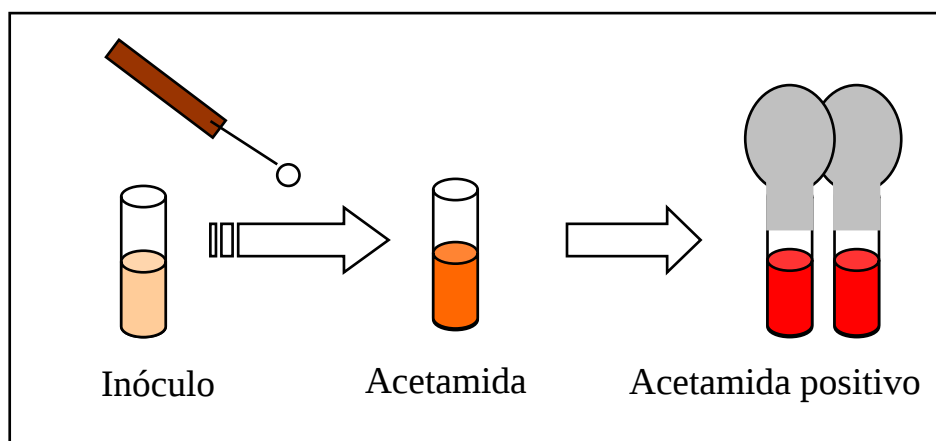


Figura 3.3: Teste confirmativo para a presença de *Pseudomonas*



Figura 3.4: Coloração do meio Agar cetrimide na presença de *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 5 Composição do meio presuntivo de Asparagina

Asparagina	4g
K ₂ HPO ₄	2g
KH ₂ PO ₄	20g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1g
Glicerol	16ml

B - Contagem dos Microrganismos da Água do Manguezal Através da Técnica de Tubos Múltiplos

Inicialmente, neste ensaio, preparou-se uma diluição de 10^{-1} da amostra original da água em solução de água salina peptonada estéril. Com a obtenção dos inóculos de 10 ml, 1ml da amostra original e 1ml da diluição 10^{-1} foi então aplicado a técnica dos tubos múltiplos em série de 5 repetições para contagem do (NMP) de coliformes totais, Termotolerantes, e bactérias do gênero *Pseudomonas* por 100 ml da amostra, cuja metodologia já descrita no item anterior de acordo com Standard Methods (1998).

3.2.3 FLUXOGRAMA DA ANÁLISE DO SOLO

O procedimento consistiu, na verificação do pH, e na contagem de bactérias do gênero *Pseudomonas*, coliformes totais, termotolerantes e mesófilas heterotróficas para obter a quantificação inicial da microbiota na amostra. Prosseguindo, verificou-se o impacto na população microbiana ao adicionar o poluente sem contato prévio observando desta maneira a existência de microrganismos nativos consumidores de óleo Diesel. Visto isto prosseguiu-se a um ensaio adaptativo microbiano para averiguação da atuação desta flora na biodegradabilidade e por fim a análise do

comportamento microbiano no processo de contaminação do solo durante trinta dias verificando sua capacidade biodegradadora sobre condições de aeração e controle da fonte de carbono.

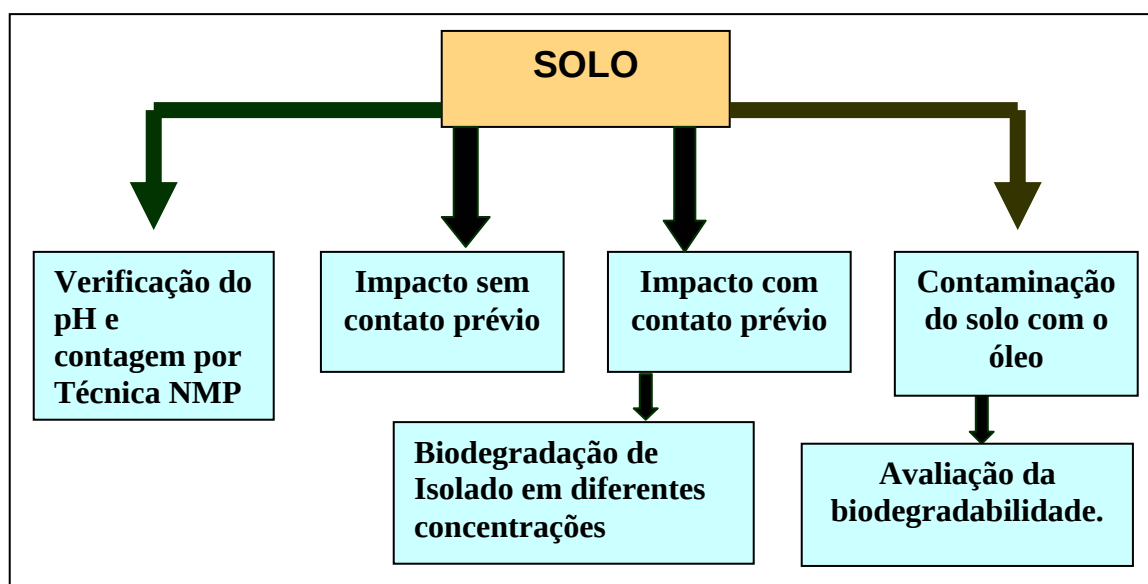


Figura 3.5 Procedimento para análise do solo, quanto à quantificação, impacto e biodegradabilidade do óleo Diesel.

3.3 IMPACTO DO ÓLEO DIESEL NO SOLO DE MANGUEZAL SEM PRÉVIA ADAPTAÇÃO

A avaliação do impacto causado pelo óleo Diesel no crescimento microbiano, sem que o inóculo estivesse adaptado ao poluente, foi observada pela quantificação do crescimento em meio de cultura, tendo a fonte de carbono conhecida e com a substituição da mesma pelo referido óleo. Seguindo-se então a preparação de uma suspensão com 10g do solo em 90 ml de água salina peptonada, 0,1% de tween 80 a uma agitação de 200 rpm durante 20 min, para desagregar os microrganismos, desta foram feitas oito diluições seriadas em 9ml da solução de água peptonada salina e

plaqueados 1ml em meios de: ANS, contendo 50µg/ml de Fluconazol, CZ com 50µg/ml de Fluconazol, CZ-Óleo contendo 50µg/ml de Fluconazol, CZ e CZ-Óleo contendo 50µg/ml de tetraciclina cujas composições são mostradas na tabela 6. As placas foram incubadas a 30°C. A substituição da sacarose pelo óleo Diesel de densidade 0,85g/cm³ foi feita levando-se em considerações a correlação massa/volume

Tabela 6. Composição dos meios AN, CZ, CZ-óleo.

COMPOSIÇÃO	AN**	CZ*	CZ*-óleo
Ext. de carne	3g	-	-
Peptona	5g	-	-
Sacarose	-	30g	-
Óleo Diesel	-	-	35,3 ml
NaNO ₃	-	3g	3g
K ₂ HPO ₄	-	1g	1g
MgSO ₄	-	0,5 g	0,5 g
KCl	-	0,5 g	0,5 g
FeSO ₄	-	0,01g	0,01g
Agar	14g	12g	12g
Água →	1L	1L	1L

* foi acondicionado antifúngico, Fluconazol (50µg/ml) na contagem para bactérias e bactericida Tetraciclina (50µg/ml) para efetuar a contagem de fungos.

** acrescentado 7,5g de NaCl para um litro, além do Fluconazol (50µg/ml).

3.4 AVALIAÇÃO MICROBIANA DO SOLO COM PRÉVIA ADAPTAÇÃO AO ÓLEO DIESEL

O inóculo foi preparado utilizando-se 10 g de solo de manguezal suspenso em 90ml de água peptonada estéril sob agitação de 200 rpm por 20 minutos, para a degradação dos microrganismos das partículas. Uma alíquota desta suspensão foi adicionada ao meio de Czapeck, sendo mantido por 24h em estufa a 34°C para crescimento microbiano. Ao fim desse período, retirou-se uma alíquota de 10 ml que foi

transferida para um frasco contendo meio de Czapeck modificado, onde se substituiu gradativamente o açúcar por concentrações variáveis de óleo Diesel (Tabela 7), de modo a adaptar a flora microbiana nativa ao poluente. Este procedimento foi repetido a cada 24h até a total substituição da fonte de carbono pelo poluente (Figura 3.6) e ao final os microrganismos permaneceram por 20 dias em estufa sob as condições anteriormente citadas.

Após esse período, o óleo remanescente foi levado à análise cromatográfica, a amostra foi submetida à coloração de Gram para classificar as bactérias presentes e ao teste bioquímico para a verificação da presença do gênero *Pseudomonas*. O microrganismo que mais se sobressaiu foi isolado pelas características do meio, res-suspenso e um novo ensaio foi realizado, colocando-o em frasco de Erlenmeyer, contendo o meio modificado com variações na concentração do óleo Diesel de 3%, 5%, e 10% (m/v), como única fonte de carbono, durante 30 dias, para verificar a sua capacidade biodegradadora.

Tabela 7: Variações da fonte de carbono no meio original de Czapeck em g/l

Frascos	Sacarose	óleo	NaNO ₃	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	KCl	FeSO ₄ ,
1	30g	0ml	3g	1g	0,5g	0,5g	0,01g
2	22,5 g	8,8 ml	3g	1g	0,5g	0,5g	0,01g
3	15 g	17,6 ml	3g	1g	0,5g	0,5g	0,01g
4	7,5 g	26,4 ml	3g	1g	0,5g	0,5g	0,01g
5	0 g	35,3 ml	3g	1g	0,5g	0,5g	0,01g

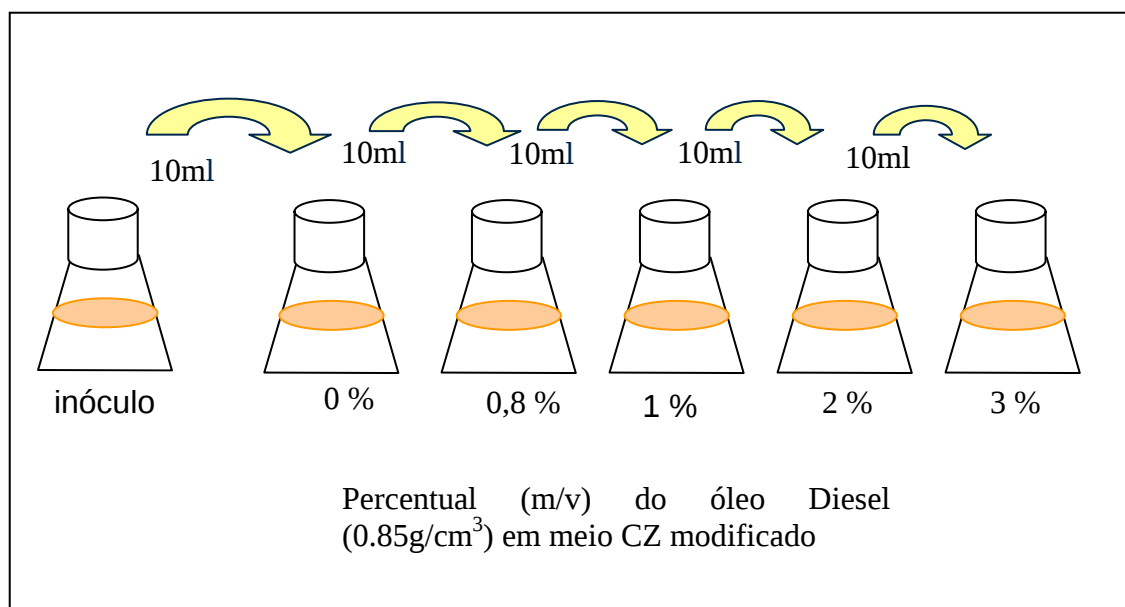


Figura 3. 6. Transferência do inóculo a cada 24 h em processo adaptativo a concentrações e variações do óleo Diesel

3.5 ANÁLISE DO SOLO IMPACTADO COM ÓLEO DIESEL

Previamente obteve-se uma suspensão com 20g do solo em 180 ml de água peptonada salina, Tween 80 (0,1%), submetido à agitação de 200 rpm por 20 mim, para desagregar os microrganismos das partículas do solo. Desta suspensão, 1 ml serviu para a realizações de diluições seriadas até 10^{-8} em 9ml de água peptonada salina por tubo, prosseguindo ao plaqueamento, semeando-se em três tipos de meios. Para contagem bacteriana utilizaram-se os meio Agar nutritivos, cuja composição é citada na tabela 6, contendo 50 μ g/ml de Fluconazol; e o Agar nutritivo salino de mesma composição acrescentando cloreto de sódio 7,5g/l. Para contagem de fungos foi usado o meio Sabouraud, (Tabela 8) com 50 μ g/ml de Tetraciclina. Estes experimentos foram realizados em duplicatas, incubados a temperatura 30°C por 48 h para bactérias e por 120h para fungos, obtendo-se assim a contagem inicial e seguindo o mesmo procedimento após o enriquecimento do solo ao longo dos trintas dias.

Tabela 8: Composição do meio Sabouraud (SB) para 1litro

COMPOSIÇÃO	
Glicose	40g
Peptona	10g
Extrato de levedura	5,0g
NaCl	7,5g
Agar-agar	15g

3.6 ENRIQUECIMENTO DO SOLO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

O enriquecimento consistiu na contaminação do solo utilizando óleo Diesel, de densidade 0,85g/l, logo após a contagem inicial da microbiota. A contaminação foi realizada em diferentes concentrações do poluente de 1%, 5% e 10% (m/v), sendo empregado 200g do mesmo para cada percentual. A mistura foi mantida durante 30 dias a temperatura ambiente sendo neste período realizadas contagens microbiana para a verificação do comportamento da flora nativa mediante a contaminação por óleo Diesel (SANTO 2002).

3.7. EFEITO DA AERAÇÃO NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS DO ÓLEO DIESEL EM TRATAMENTO UTILIZANDO CULTURA MISTA DO SOLO

Dos solos impactados durante 30 dias em diferentes concentrações de óleo anteriormente citadas, foi escolhido o solo contaminado em concentração de 10% por apresentar um maior crescimento microbiano verificado durante o tempo de impacto, deste foi extraído uma suspensão que serviu de inóculo para os frascos de Erlenmeyer de 500 ml, introduzindo em cada frasco 10ml correspondente a 20% de inóculo, junto a 37,5ml de meio mineral Bushnell-Haas (Tabela 9) e 2,5 ml do óleo equivalente a 5%,

obtendo no total 50 ml, a fim de manter mantendo uma relação de aeração de 1:10. Foram preparados cinco frascos de Erlenmeyer em duplicata, os quais foram submetidos à agitação de 200 rpm em mesa agitadora (Shaker Marconi 420), e a cada 4 dias dois frascos eram levado a análises quanto a: pH, tensão superficial e crescimento microbiano. Este ensaio teve a duração de 20 dias, sendo o conteúdo dos dois últimos frascos levado a centrifuga de marca eppendorf 5403 a 11.000 rpm por 20 min, para separar o óleo da emulsão formada no processo, e o óleo remanescente foi analisado por cromatografia em cromatógrafo GCMS de marca Shimadzu.

A cada amostragem seguia-se o plaqueamento das diluições seriada até 10^{-12} sendo inoculados em três tipos de meios, para a contagem bacteriana utilizou-se o meio Agar Nitritivo, junto com 50µg/ml de Fulconazol, e em Agar Nutritivo Salino de mesma composição, acrescentando cloreto de sódio 7,5g. Para a contagem de fungos foi usado o meio Sabouraud, (Tabela 8) contendo 50µg/ml de Tetraciclina.

Tabela 9: Meio mineral de Bushnell-Haas

COMPOSIÇÃO	
MgSO ₄	0,2g
CaCl ₂	0,02
KH ₂ PO ₄	1,0g
K ₂ HPO ₄	1,0g
NH ₄ NO ₃	1,0g
FeCl ₃	0,05g
H ₂ O	1,0L
pH	7,0± 0,2

3.9 CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO OLEOSA

Análise realizada em Laboratório no Departamento de Antibióticos da UFPE por cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massa (GCMS) em cromatógrafo de marca Shimadzu. A amostra é particionada entra na coluna DB-5 ms de 30 m sendo o carreador o gás hélio, cada componente é arrastado de acordo com seu grau de adsorção na coluna e posteriormente sofre o impacto de íons, gerando o espectro de massa característico das substâncias. Verificou-se assim a ocorrência da modificação dos espectros relativos a área dos picos correspondentes a constituição do óleo Diesel atestando assim a biodegradação do mesmo pela microbiota nativa (SANTO, 2002).

A amostra original do óleo foi diluída em (dicloro etano) obtendo uma concentração 25% (v/v) para realização da leitura dos componentes ali presentes através da cromatografia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ANÁLISE DO SOLO E DA ÁGUA

4.1.1 DETERMINAÇÃO DO pH NO SOLO E NA ÁGUA

O solo de manguezal apresenta textura coloidal e gelatinosa, sendo formado pela deposição de areia, silte-argilosa e materiais orgânicos, transportados pelas águas da qual depende a variação do sedimento e salinidade (CPRH, 2005; HILSDORF, 2005). O alto teor de umidade presente neste solo é um outro fator que influencia nos tipos de microrganismos e no processo de volatilização dos compostos químicos presentes. A textura do mesmo resulta como um fator interferente, pois afeta a permeabilidade do solo, uma vez que quando esta baixa, dificulta a aeração diminuindo o poder de biodegradação do sistema (BORGES, 2001). Outro fator a ser considerado é o pH, pois este pode influenciar na biorremediação, já que a maioria dos fungos e bactérias crescem em pH neutro, tendo os fungos maior tolerância ao pH ácido (SÁ, 2002, BACKER & HERSON, 1994).

Com relação ao valor obtido pela análise do solo e da água deste ambiente, a leitura do pH foi $7,5 \pm 0,03$, medidos através de potenciômetro, previamente aferido, tanto para o solo quanto para a água. Esse resultado foi confirmado através de duas repetições.

4.1.2 QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA DO SOLO E NA ÁGUA PELA TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL

A- Solo

A quantificação de microrganismos existentes no solo do manguezal pela presença de: coliformes totais, coliformes termotolerantes e bactérias do gênero *Pseudomonas* foram realizadas através da técnica do número mais provável (NMP/100 mL). Os resultados obtidos mostraram que os coliformes termotolerantes e coliformes totais apresentaram quantidades superiores a 1600 NMP /100 ml e para as bactérias *Pseudomonas*, apresentaram valor igual de 900 NMP /100ml, conforme está indicada na figura 4.1. A presença do grupo coliforme constitui um indicador universal de poluição, através de despejos de esgotos sanitários, sendo acompanhados por uma série de outros microrganismos mesófilos e protozoários, alguns dos quais capazes de consumir xenobióticos como fonte de carbono (ROSATO, 1997).

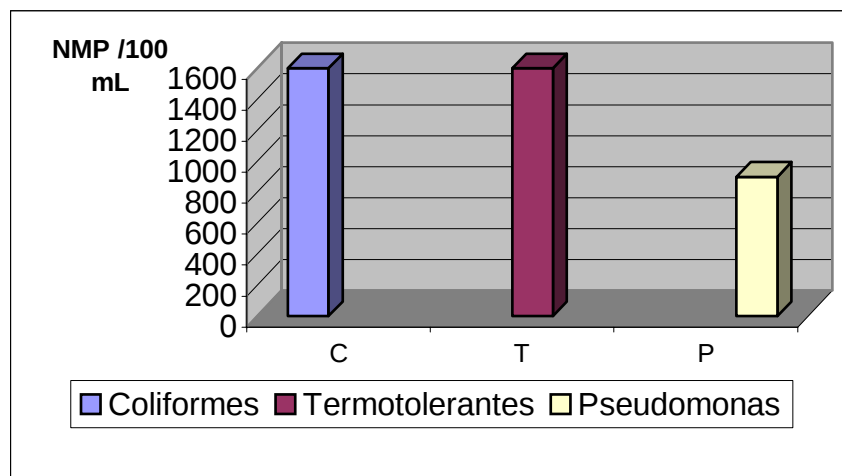


Figura 4.1 Contagem de Coliformes totais (C), Coliformes Termotolerantes (T) e *Pseudomonas* (P) no solo de Manguezal

Ramsay *et al.* (2000) e Capelli *et al.* (2001) ao pesquisarem a biodegradação de petroderivados observaram que a presença destes poluentes são capazes de estimular o crescimento de microrganismos degradadores desses compostos recalcitrantes. Esses autores citam o gênero *Pseudomonas* como participante de biorremediações. Trabalhos como o de Roane *et al.* (2001), obtiveram uma diminuição drástica no nível de metal e de hidrocarbonetos quando utilizou a estratégia de bioaumento e bioestímulo, utilizando a bactéria *Pseudomonas*. Considerando-se ainda os fatores que podem intervir no crescimento microbiano, como a quantidade da água no solo, o número de microrganismos presentes, a permanência do poluente como substrato, podendo aumentar ou diminuir devido à oscilação de maré. Em conformidade com as observações feitas por Zhou *et al.* (2002) onde os solos que se apresentam saturados, a densidade populacional e a diversidade em espécies microbianas variavam, pois o fluxo de nutrientes e partículas permitem a migração dos microrganismos neste tipo de solo.

B- Água do Manguezal

Na análise microbiológica da água oriunda do manguezal obteve uma quantificação superior a 1600 NMP /100ml, para os coliformes totais, 110 NMP /100ml para os coliformes termotolerantes e 9 NMP/100ml, para as bactérias do gênero *Pseudomonas*, como pode ser observado na figura 4.2.

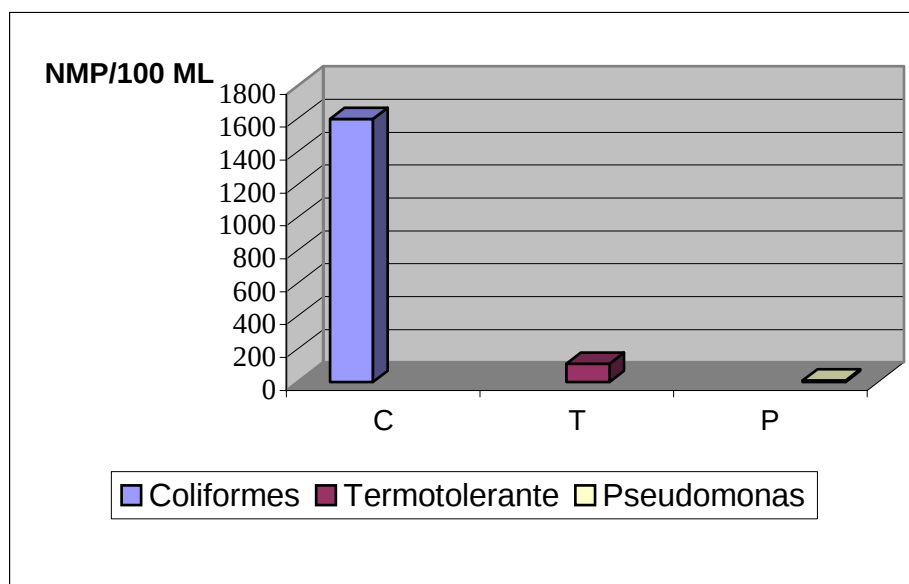


Figura 4.2 Contagem microbiana de Coliformes totais(C), Termotolerantes (T), *Pseudomonas* (P) em água do Manguezal.

Segundo Soares *et al.* (2001) e CPRH (2005), os manguezais dessa região estão sujeitos a impactos variáveis entre depósitos de esgotos sanitários, dejetos de indústrias químicas e aterros, causando assim, a degradação e transformações deste ecossistema, sendo, portanto necessárias medidas de prevenção. Esses valores apenas confirmam a presença desses microrganismos neste local, uma vez que devido à dinâmica do sistema as quantificações podem ser alteradas em função dos inúmeros fatores, entre eles o fato de que os manguezais recebem influências dos rios e movimentos das marés.

C- Análise Comparativa da Contagem Microbiana Entre o Solo e a Água

Correlacionando ainda a presença de coliformes totais na água com a do solo, observou-se nos resultados a equivalência, porém neste paralelo, pode-se notar uma redução nos coliformes termotolerantes de 93% nos números encontrados na água enquanto que a contagem do gênero *Pseudomonas* apresentou-se cem vezes menor que no solo (Figura 4.3).

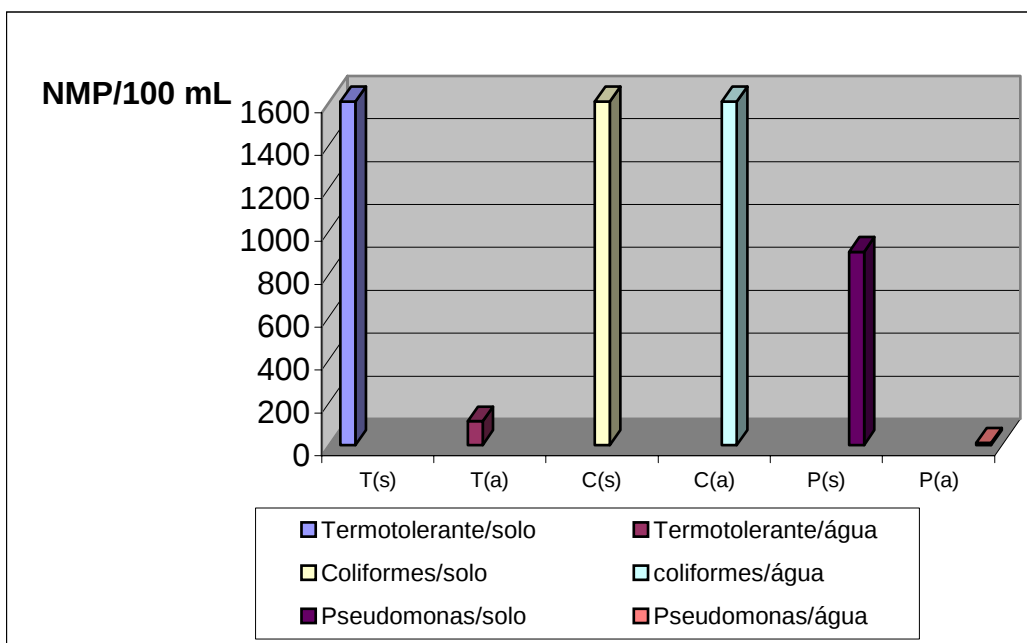


Figura 4.3. Comparação da contagem microbiana do solo e da água do manguezal Termotolerantes do solo T(s), Termotolerantes da água T(a), Coliformes Totais do solo C(s) Coliformes Totais da água C(a), *Pseudomonas* do solo P(S) e *Pseudomonas* do solo P(a)

4.2 IMPACTO DO ÓLEO DIESEL EM SOLO DE MANGUEZAL SEM PRÉVIA ADAPTAÇÃO

O desenvolvimento microbiano se dá sob condições favoráveis, em presença de sais minerais e fonte de carbono (PELCZAR *et al.*, 1996; CUNHA, 1996). Com o intuito de observar o impacto causado na população microbiana pela substituição total da fonte de carbono por óleo Diesel, realizou-se a extração da microbiota nativa do solo, acondicionando-se o inóculo ao meio de crescimento com e sem a substituição da fonte de energia. Obteve-se como resultado, para a contagem bacteriana, após 48 horas em meio CZ igual a $1,3 \cdot 10^4$ UFC/ ml, sendo observado ainda o crescimento do mesmo inóculo em meios complexos ANS igual a $2,7 \cdot 10^4$ UFC/ ml, onde se obteve um maior crescimento e variedade de colônias, comparando este ao crescimento em meio CZ. Isto pode ser explicado devido ao meio ANS apresentar fontes de carbono complexas, em contraste ao outro meio que contém alta concentração de sacarose como uma única fonte de carbono com uma redução de 50% na quantificação das bactérias, indicando que este meio é seletivo e dentre os microrganismos que conseguiram sobreviver, poucos foram capazes de utilizar o óleo Diesel como fonte de carbono, demonstrando um impacto de 90%, com contagem para os microrganismos crescidos em CZ-óleo igual a $1,27 \cdot 10^3$, como pode ser visto na figura 4.4.

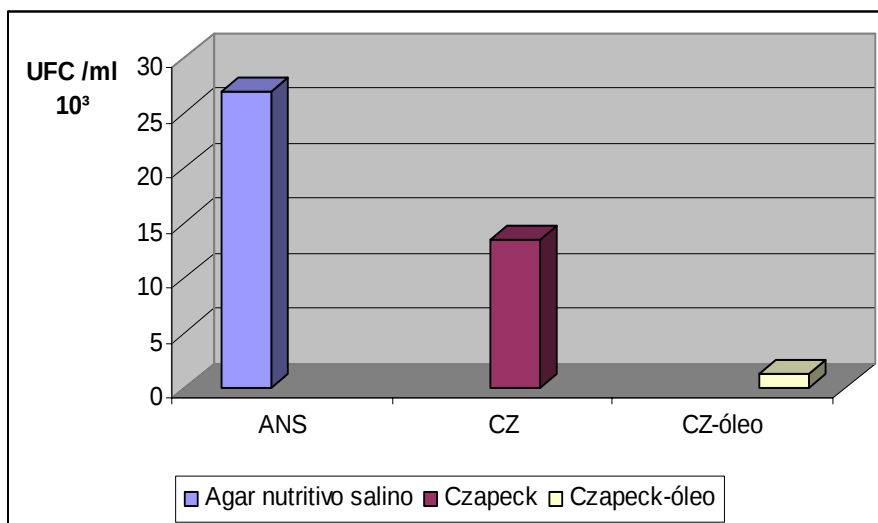


Figura 4.4 Impacto no crescimento bacteriano oriundo do solo de manguezal inoculadas em meios: Agar Nutritivo (ANS), Czapeck (CZ), Czapeck-óleo (CZ-óleo) todos contendo Fluconazol.

O impacto do óleo Diesel sobre o crescimento de colônias fúngicas foi observado, utilizando-se o meio de Czapeck contendo tetraciclina e o crescimento da população foi de 210 UFC/ ml. Em meio CZ-óleo contendo Tetraciclina cuja única fonte de carbono, agora foi o óleo Diesel, o crescimento dos fungos apresentou resultados entorno de 50 UFC/ml, observando assim um impacto com uma redução populacional de 77% na quantificação (Figura 4.5), mostrando também diminuição na variedade, na forma das colônias e sua sensibilidade à presença do óleo. Houve também, neste meio, o crescimento bacteriano com 84 UFC/ ml, que além de sobreviver a este impacto se mostrou resistente ou pouco sensível a Tetraciclina, confirmada posteriormente em teste antibiograma em disco em placas em mesma concentração (Tabela 7).

Tabela 10 Valores dos diâmetros dos halos de inibição em mm da Tetraciclina frente às colônias isoladas de meio Cz.

Isolado de Bactérias	Halo de inibição em meio AN/ Tetraciclina	Halo de inibição em meio CZ/ Tetraciclina
Bactérias crescida em Cz C/ Fluconazol	27	30
Bactérias crescida em Cz óleo c/ Tetraciclina	10	-
Bactérias crescida em Cz óleo c/ Tetraciclina (2 amostra)	-	-

(-) Nenhuma atividade

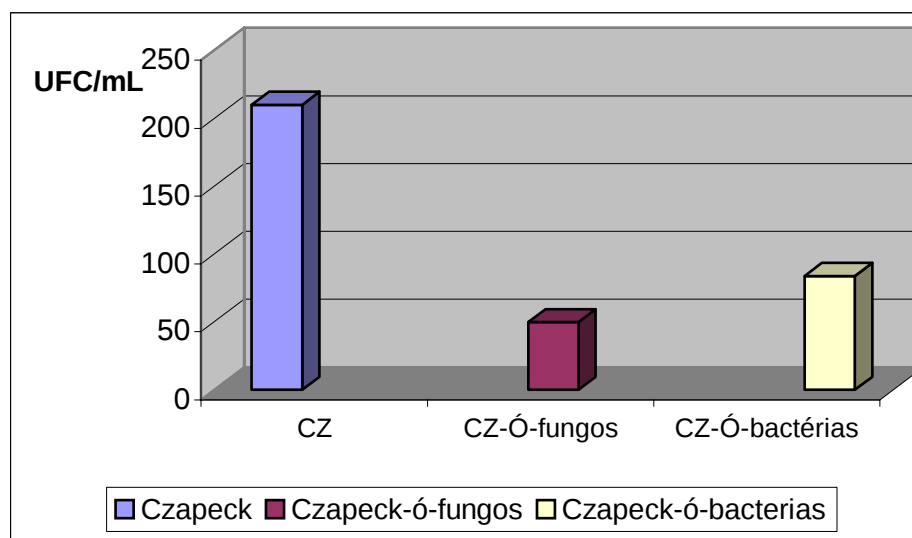


Figura 4.5 Crescimento microbiano para verificação do impacto de fungos em meio CZ com Tetraciclina; fungos em CZ-óleo com Tetraciclina; bactérias em CZ-óleo com Tetraciclina.

Os microrganismos presentes nesta suspensão foram extraídos da amostra do solo sem ter um contato prévio com o poluente, ou seja, sem um período adaptativo ao óleo e sem lhes ser fornecido alguma condição de bioestímulo, verificando-se que nestas condições eles sofreram um impacto, reduzindo sua população. Por outro lado é novamente confirmada a presença de bactérias que conseguem utilizar o poluente em seu crescimento. Capelli *et al.* (2001) relataram que as condições de um ambiente acidentalmente poluído onde a flora nativa fosse exposta à alta concentração do poluente, ocorre interferência no substrato natural junto aos microrganismos não degradadores, favorecendo aos que conseguem degradar, dependendo assim a biorremediação da quantidade de microrganismos degradadores, do nível e da persistência do poluente no ecossistema. Demonstrando assim mais uma vez, que este solo possui microrganismos capazes de mineralizar ou transformar esse substrato não convencional e é o óleo Diesel para o seu desenvolvimento, pela notificação da sobrevivência de espécies microbianas sob as condições oferecidas. De acordo com Ramsay *et al.* (2000) a adição de óleo estimula o número de microrganismos degradadores de alcanos, e isto foi reafirmado por Capelli *et al.* (2001) que os organismos adaptados a presença do poluente se sobressaem.

4.3 AVALIAÇÃO MICROBIANA DO SOLO EM SUCESSIVOS CONTATOS COM ÓLEO DIESEL

Este ensaio teve como objetivo avaliar a presença de microrganismos nativos do solo de manguezal, que em contato com quantidades variáveis de óleo Diesel, foram capazes de utilizar o derivado do petróleo como única fonte de carbono. Neste ensaio, tem-se indicativo que a cultura mista submetida ao impacto sofre estímulo para o desenvolvimento de alguns microrganismos degradadores de hidrocarbonetos através do processo adaptativo; mostrado na figura 3.6. Após o período de vinte dias, obteve-se como resultado visível mudança de coloração do meio e a formação de emulsão, como pode ser visto na figura 4.6 A e B.

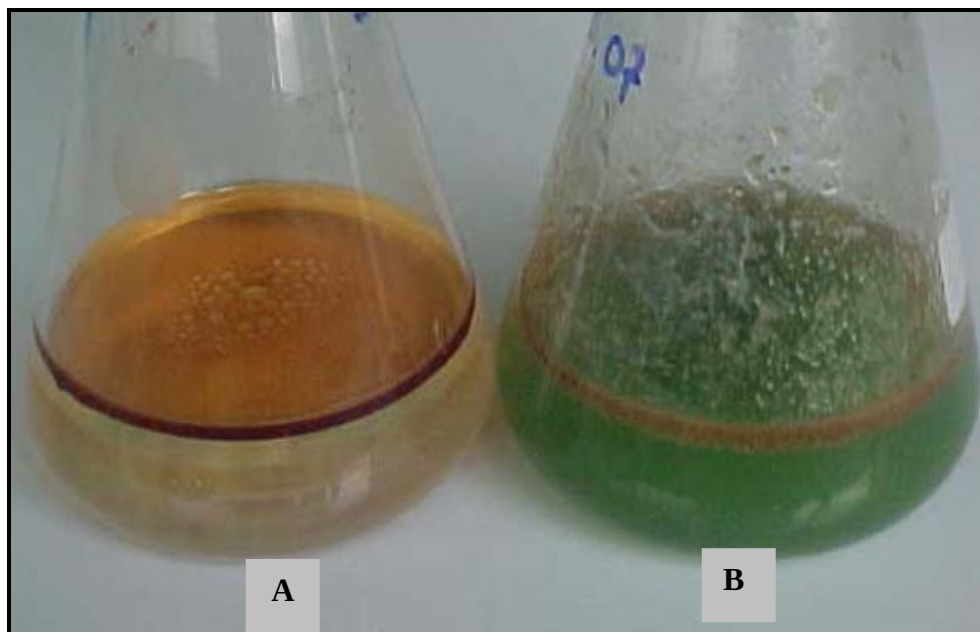


Figura 4.6: Mudança da coloração após vinte dias de incubação.
A- no momento da inoculação; **B-** após vinte dias de crescimento.

Após o referido período verificou-se através do método de coloração de Gram que houve predominância de bactérias Gram-negativas. Isolando-se os microrganismos do ensaio e submetendo-os a testes bioquímicos, confirmou-se a presença do gênero *Pseudomonas*, como indicado na figura 4.7 onde o gênero foi confirmado em meio de acetamida pela modificação da coloração do meio (A) e isolando-os em meio de Agar cetrimide (B).

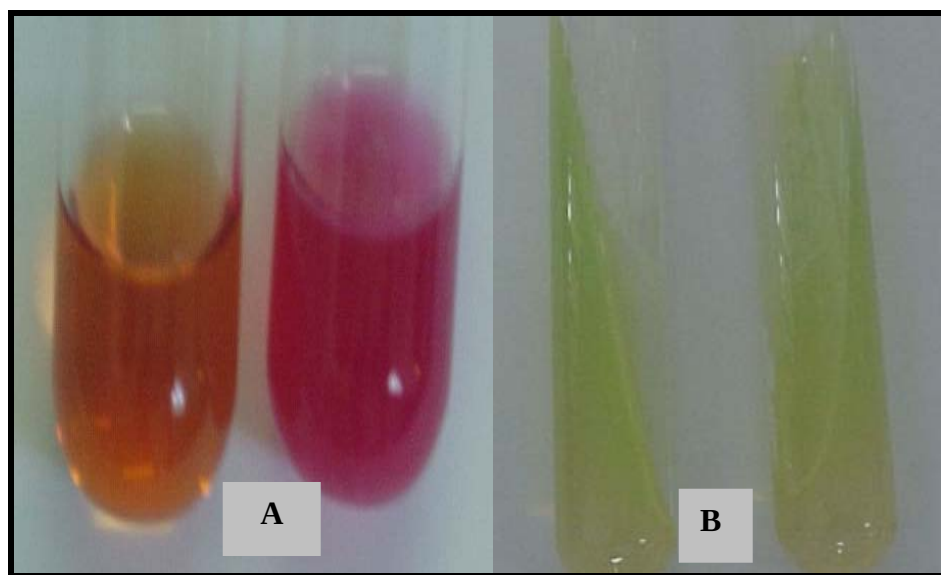


Figura 4.7 Ensaios bioquímicos confirmativos a presença de *Pseudomonas* (A) em meio de acetamida (B) meio de Agar cetrimide.

O processo adaptativo é importante para que os microrganismos se sobressaiam biologicamente à presença do poluente. Por isso, com o intuito de observar o comportamento dos mesmos após este processo, fornecendo-lhes neste período, condições extremas de estresse, sem estímulo quanto à aeração e a adições de nutriente, nestas condições, sobressaíram-se as bactérias Gram-negativas e entre elas o gênero *Pseudomonas* que conseguiram degradar o óleo e sobreviver às competitividades.

A importância do processo adaptativo para a microbiota é relatada por vários autores como sendo a forma necessária para que eles possam se desenvolver em ambientes impactados por contaminantes (BECKER & HERSON, 1996; ROSATO, 1997; CUNHA, 1996).

O mecanismo de bioestimulos por adição de co-fatores ou nutrientes que promovem a aceleração do crescimento, não foi utilizado neste ensaio, porém são relatados em trabalhos, como estudos com *Acinobacter* que utilizou o ácido úrico como bioestimulo para obtenção de nitrogênio, favorecendo o processo de biodegradação de petróleo (KOREN *et al.*, 2003).

Sabaté *et al.* (2004) trabalhando, com solos contaminados hidrocarbonetos policíclico derivado do petróleo e adicionados de glicose e nutrientes obtiveram uma redução em 72% do poluente em 270 dias de contato, constatando a eficiência deste tratamento.

Durante o decorrer do presente experimento, mesmo sem a utilização de técnicas que pudessem acelerar o processo de biodegradação no período de 20 dias, foi verificada a formação de emulsão, o que pode indicar uma possível produção de substâncias tenso-ativas através da redução ou transformação do poluente em estudo.

A utilização de plantas, bactérias e fungos na biotransformação de poluentes energéticos têm sido relatada (AKEN *et al.*, 2004). Em pesquisa das vias de degradação oxidativa com a utilização de microrganismos como *Rhodococcus rhodochrus*, foi observada a presença de enzimas responsáveis pela quebra do anel do composto ciclopropanocarboxilato (TORAYA *et al.*, 2004).

O processo utilizando-se microrganismos para a degradação de hidrocarbonetos poderá ocorrer até mineralização completa ou ainda, obtenção de metabólicos. Sullivan *et al.* (2001) relataram a transformação do 2-metil naftaleno no produto metabólico ácido 2-naftálico. O resultado de uma biodegradação ou biotransformação nem sempre é benéfico ao meio ambiente. Por isso, para verificação deste processo de biodegradação ou mineralização, o óleo remanescente desta amostra foi submetido a análise cromatográfica que apresentou uma redução de alguns compostos, sendo escolhidos cinco constituintes com resultados expressivos (Figura 4.8), dentre estes estão o Decano com 83% de redução e o octadecano que não sofreu redução. No entanto, sob as mesmas condições, desta feita sob aeração, houve redução do composto octadecano como pode ser visto na figura 4.21. ALEXANDRE (1994) relata a mineralização de octadecano através do uso de misturas de bactérias e pelo fungo *Cladosporium resinae* sob condições de bioestimulos.

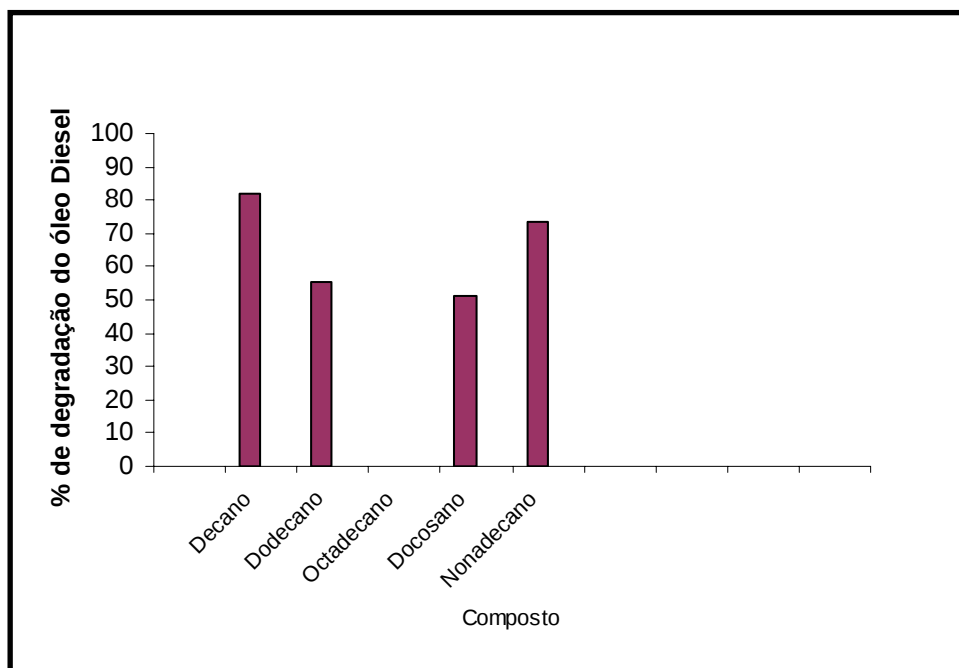


Figura 4.8: Análise gráfica do Percentual de degradação dos cinco compostos no óleo Diesel.

Por ser a estrutura dos alcanos menos complexas que a dos aromáticos sua degradação pelos microrganismos se torna mais fácil e a sua redução no ambiente geralmente é maior (RAMSAY *et al.*, 2000). Fator esse que explica a redução desses alifáticos do óleo Diesel, em 20 dias, sem a indução de aeração e adição de nutrientes.

4.3.1 AÇÃO DO GÊNERO *PSEUDOMONAS* SOB O ÓLEO DIESEL

A fim verificar a capacidade biodegradadora das bactérias *Pseudomonas*, a mesma foi isolada, re-suspensa e inoculada em meio de Czapeck modificado, onde a sacarose foi substituída por óleo Diesel nas concentrações de: 3%, 5% e 10% (m/v). Observou-se que em 20 dias houve mudanças de coloração nas suspensões para as concentrações de 3% e 5% e formação de emulsão. Na concentração de 10% essas observações ocorreram a partir do trigésimo dia, os meios fermentados de cada

concentração foram levados à análise cromatográfica e efetuada a contagem microbiana através da técnica NMP, que indicou uma redução do número de bactérias à proporção que a concentração do óleo era maior, obtendo-se os seguintes valores: para o óleo a 3%, 210 NMP/100ml; 5%, 23 NMP/100ml; 10%, 14 NMP/100ml como pode ser observado no gráfico da figura 4.9.

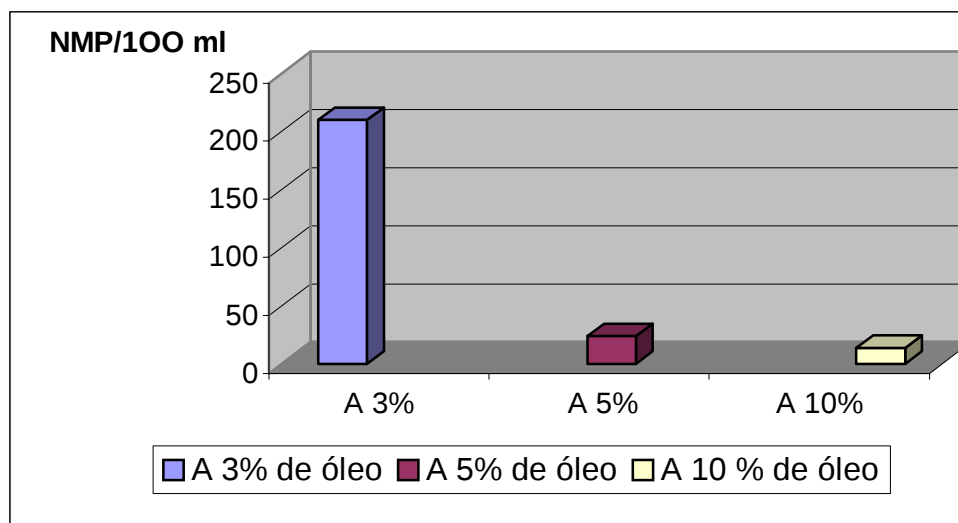


Figura 4.9 Crescimento do gênero *Pseudomonas* em diferentes concentrações do óleo Diesel 3%, 5% e 10% (m/v) após 30 dias de contato.

O aumento da concentração do poluente resultou em inibição do crescimento da bactéria *Pseudomonas*, mostrando que a concentração de substrato é um fator limitante para o crescimento, levando-se em consideração que não foi aplicado bioestimulo, como aeração ou adição de nutrientes. Não foi pesquisada a possível influência, porém entre os fatores que intervêm no desenvolvimento de uma população, está a disponibilidade de nutrientes e a concentração de oxigênio (SESSITCH *et al.*, 2001; MARGESIN & SCHINNER, 2001; ROANE *et al.*, 2001; CAPELLI *et al.*, 2001; BALBA *et al.*, 1998).

Os resultados da cromatografia com a cultura pura nativa, Gênero *Pseudomonas*, isolada do solo de manguezal, mostraram nas menores concentrações

de óleo Diesel (3% e 5%) uma maior redução nos picos de hidrocarbonetos, comparado com a amostra do óleo Diesel original, verificada nas figuras 4.10 e 4.11. Resultado esse esperado pelo aspecto do emulsificado formado nas concentrações 3% e 5% (m/v), embora essas concentrações tenham mostrado crescimentos populacionais diferenciados (Figura 4.9). Em ambas concentrações obtiveram-se uma redução melhor que a indicada pela cromatografia para 10% do óleo (Figura 4.12).

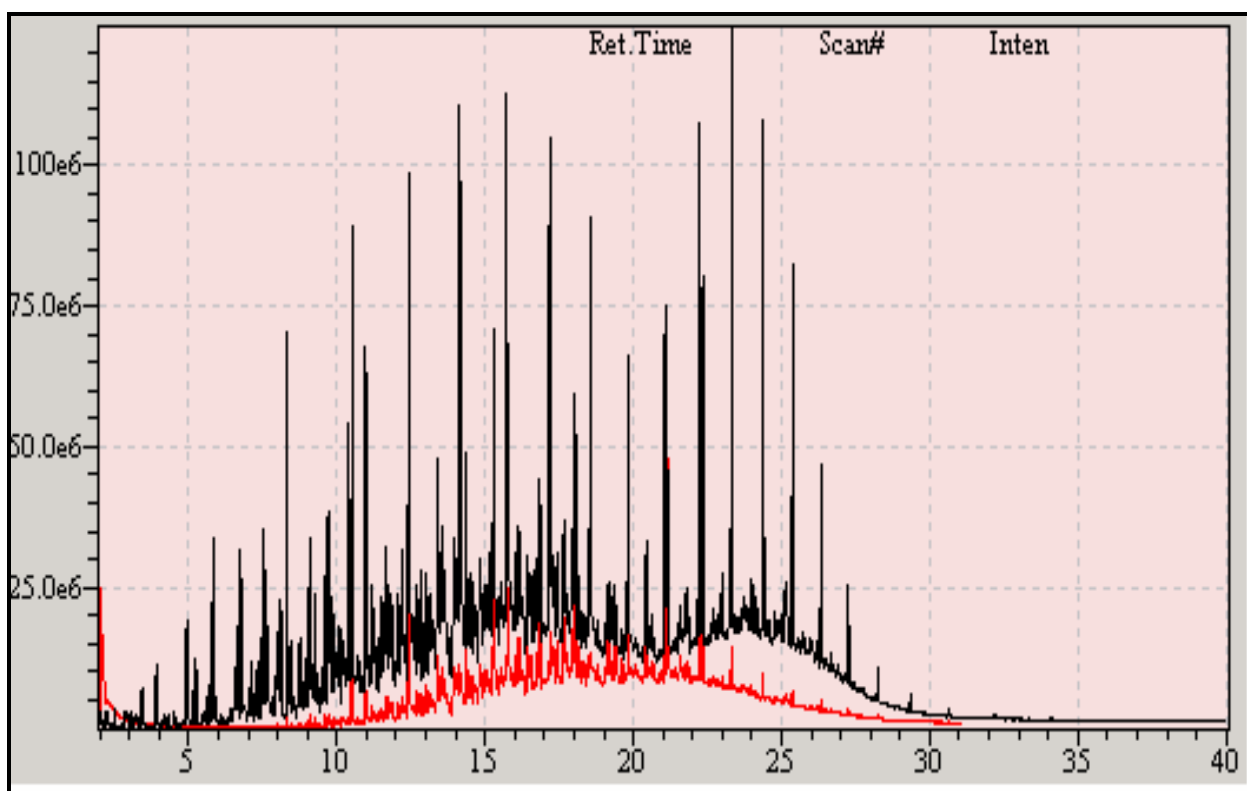


Figura 4.10 Cromatografia em meio fermentado contendo óleo Diesel a 3% (m/v) após 30 dias de fermentação em presença da cultura pura do Gênero *Pseudomonas* isolado do solo de manguezal. (eixo y: intensidade kW; eixo X: tempo de retenção min).

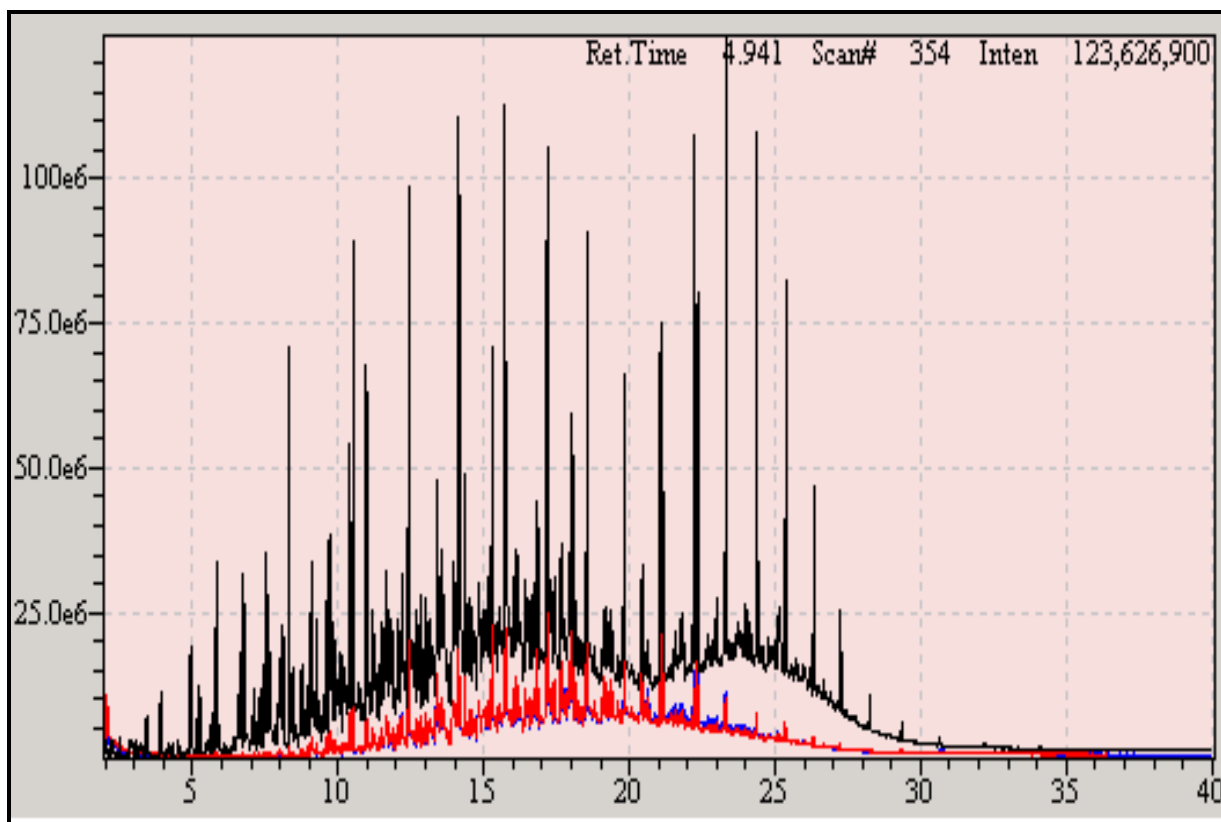


Figura 4.11 Cromatografia em meio fermentado contendo óleo Diesel a 5%(m/v) após 30 dias de fermentação em presença de cultura pura do Gênero *Pseudomonas* isolado do solo de manguezal. (eixo y: intensidade kW; eixo X: tempo de retenção min).

Em conformidade com o experimento realizado por Ururahy *et al.*, (1998) em que foi utilizada as concentrações de 5% e 10%, do poluente (borra oleosa), onde observam um maior crescimento microbiano na concentração menor. Sendo relatado na literatura a importância da aeração ao experimento analisado, através da interrupção no fornecimento da mesma, observaram quedas bruscas populacionais no processo de biodegradação.

Neste ensaio pode-se observar que as bactérias *Pseudomonas* conseguem sobreviver e utilizar o óleo Diesel como fonte de carbono, ainda assim tem seu crescimento impactado pelo poluente, haja vista a diminuição do número de microrganismos à proporção que se aumenta a concentração do poluente recalcitrante.

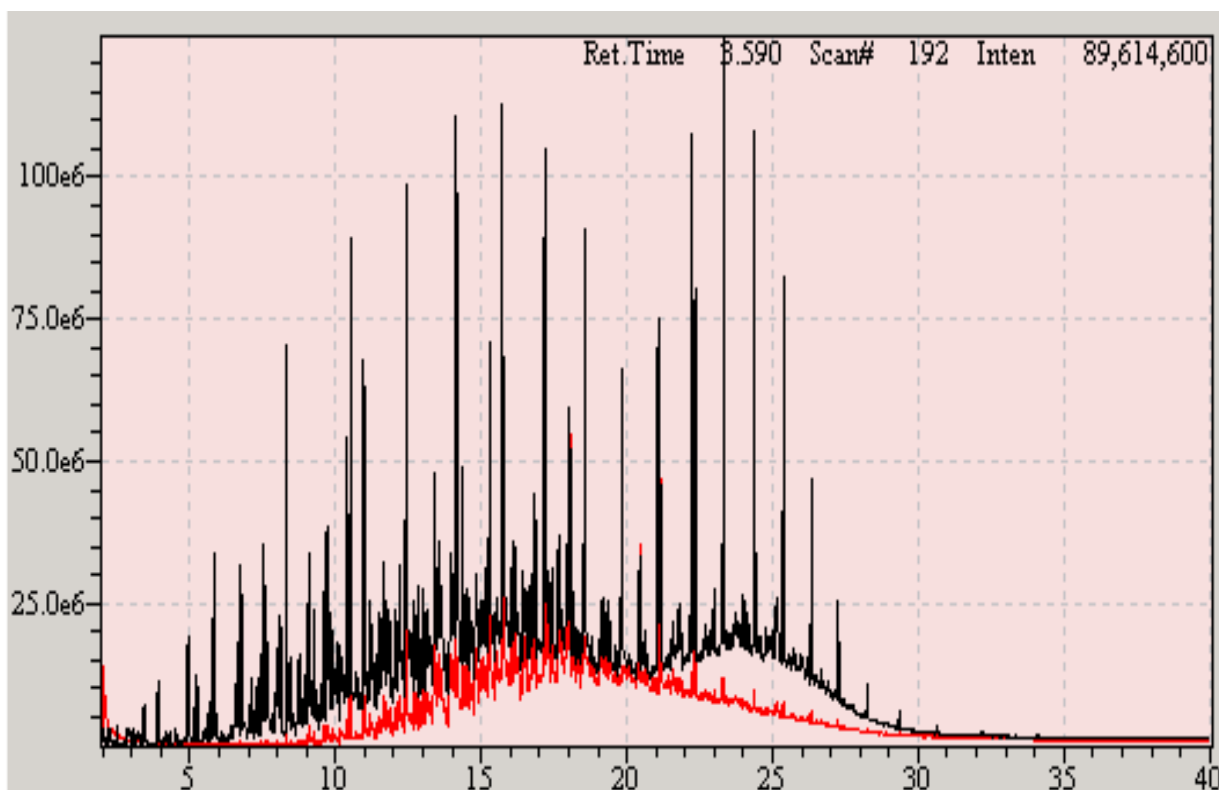


Figura 4.12 Cromatografia em meio fermentado contendo óleo Diesel a 10%(m/v) após 30 dias de fermentação em presença de cultura pura do Gênero *Pseudomonas* isolado do solo de manguezal. (eixo y: intensidade kW; eixo X: tempo de retenção min).

4.4 ANÁLISE DO SOLO IMPACTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO DIESEL

Os experimentos de enriquecimento do solo com diferentes concentrações de óleo Diesel (1%, 5% e 10%) permitiram a análise da dinâmica da população durante os trinta dias em contato com o poluente. Analisando-se as figuras 4.13 e 4.14, observa-se que em meio de AN obteve-se, inicialmente, $7,9 \times 10^3$ UFC/mL enquanto que em ANS, $2,0 \times 10^4$ UFC/mL. O desenvolvimento maior em ANS deve-se a população microbiana ser oriunda de solo que recebe influência marinha. Ramsay et al. (2000) e

Cury (2002) afirmam que uma população microbiana pode ser melhor estimada quando o número de células viáveis são avaliadas em meios de cultura que se assemelhem em conteúdo de nutrientes do seu habitat natural.

Analisando-se as figuras 4.13, e 4.14, observa-se que ao longo dos 30 dias, houve um aumento no crescimento microbiano para o solo impactado com 10% de óleo, enquanto que nas demais concentrações não houve crescimento significativo. Considerando-se que esse solo não recebeu bioestímulo tais como aeração, nutrientes, entre outros, durante este período, sugere-se que o óleo tenha promovido o crescimento de algumas espécies de bactérias, servindo como fonte de carbono, visto que em contrapartida a este crescimento houve uma diminuição no número de espécies, como pode ser visto na figura 4.15. Esses resultados estão de acordo com Ramsay et al. (2000) os quais afirmam que o poluente e o bioestímulo causam um aumento populacional em solo de manguezal. Já Coulon & Delille (2003) usaram o controle da temperatura e adição de fertilizantes como bioestímulo para o aumento do número de bactérias degradadoras de óleo. A presença de hidrocarbonetos em um ecossistema pode aumentar ou diminuir uma população, porém o efeito deste depende da composição química do poluente e da flora microbiana presente originalmente (ROSATO, 1997).

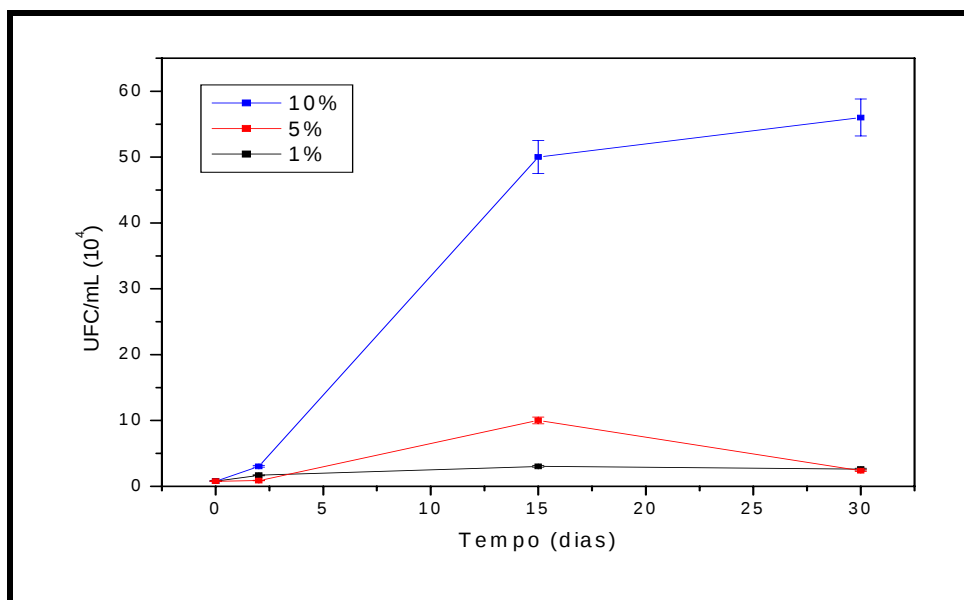


Figura 4.13: Crescimento bacteriano de solo impactado em diferentes concentrações de óleo Diesel em meio AN (barras com erro de 5%).

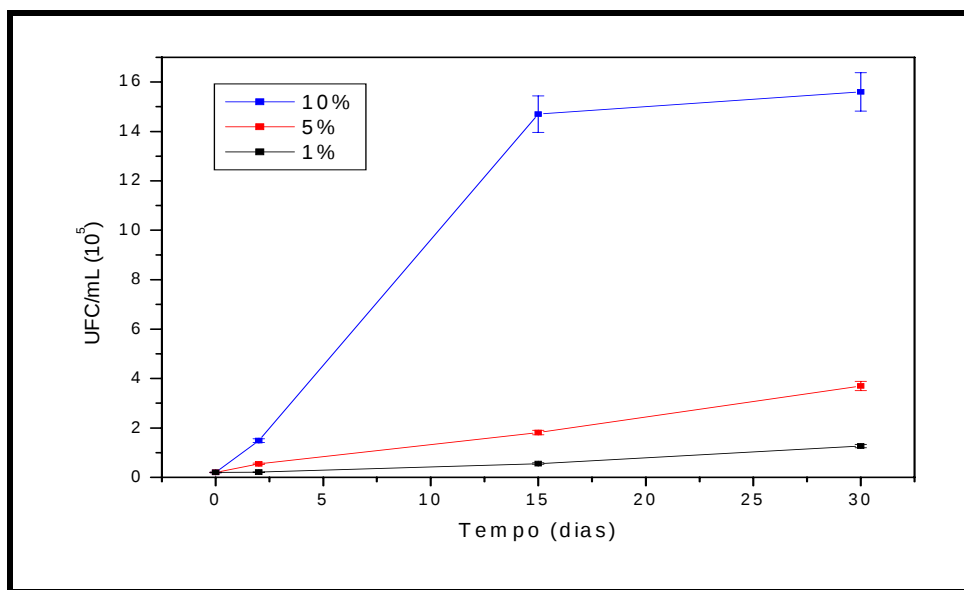


Figura: 4.14 Crescimento bacteriano de solo impactado em diferentes concentrações de óleo Diesel em meio ANS. (barras com erro de 5%).

NA Figura 4.15 A e B pode-se observar as características de colônias isoladas durante a contagem inicial (A), mostrando uma diversidade de bactérias que ao longo do experimento foi sendo reduzida (Figura 4.15 B). Esse comportamento também pôde ser observado nos ensaios com colônias de fungos, porém os resultados foram menos expressivos. Cury (2002) e Zhou *et al.* (2002) confirmam e justificam essa diversidade em seus trabalhos ao afirmarem que a mesma se dá devido à migração de microrganismos e nutrientes pelos fluxos e refluxos da maré, porém a diminuição desta diversidade deve-se ao período adaptativo, que proporciona o desenvolvimento de micróbios que conseguem sobreviver ao impacto do poluente, em detrimento de outros.

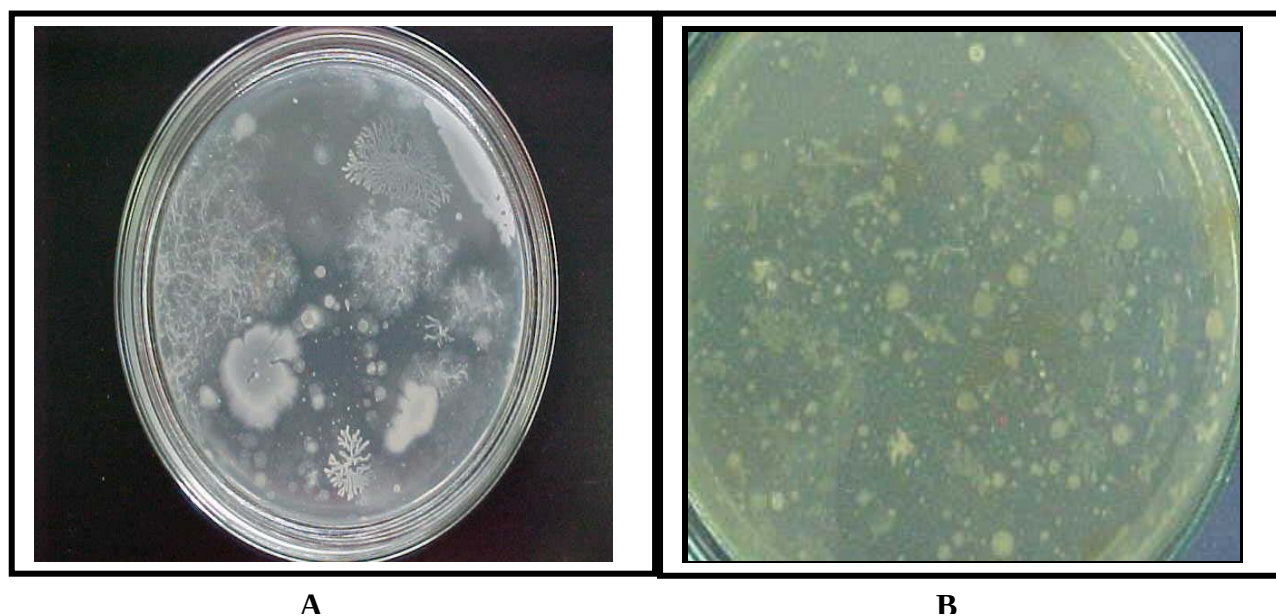


Figura 4.15: Características de colônias isoladas durante a observação inicial (A), mostrando uma diversidade de bactérias que ao longo do experimento foi sendo reduzida (B).

Analisando-se o crescimento de fungos em solo impactado por 30 dias, (Figura 4.16) verifica-se que os resultados foram semelhantes aos observados para bactérias, sugerindo um maior crescimento para o solo impactado a 10%. As colônias fúngicas foram quantificadas em meio SB, obtendo-se um aumento inicial no número de colônias em torno do 5º dia e decrescendo ao longo dos 30 dias, para todas as concentrações.

Na concentração de 10% sugere um aumento populacional no 25º dia, que logo decaiu no 30º dia a valores semelhantes aos apresentados desde o 7º dia, indicando um possível erro.

O comportamento apresentado por bactérias e fungos neste trabalho sugere que alguns dos microrganismos presentes nesse solo conseguem utilizar, além da matéria orgânica e minerais presentes, o óleo Diesel para o seu desenvolvimento. Já se tem conhecimento desse potencial dos fungos relatados por Zheng & Obbard (2003) quando em suas pesquisas trabalharam com culturas isoladas de fungos que se mostraram hábeis em reduzir, através de oxidação, compostos aromáticos.

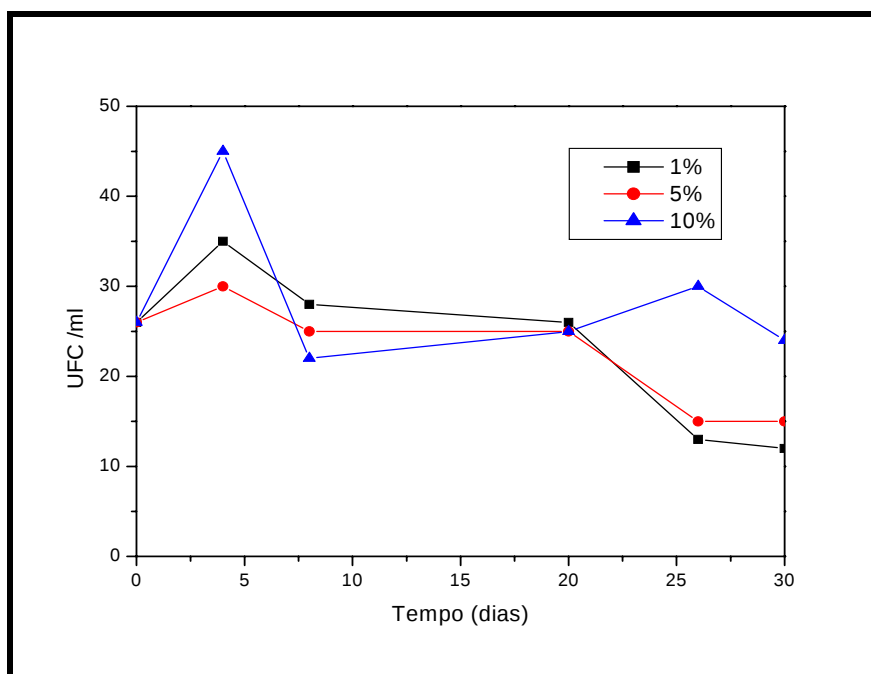


Figura 4.16: Contagem de fungos do solo impactado com óleo Diesel por 30 dias.

4.5 EFEITO DA AERAÇÃO NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS DO ÓLEO DIESEL EM TRATAMENTO UTILIZANDO CULTURA MISTA DO SOLO

O solo impactado por 30 dias com 10% de óleo Diesel foi submetido a tratamento de modo a se extrair um inóculo microbiano e analisar o efeito da aeração no crescimento e biodegradação do poluente. O experimento ocorreu em frascos agitados a submetidos a agitação de (200 rpm) em meio mineral de BH tendo como única fonte de carbono o óleo Diesel, por vinte dias. Foram feitas amostragens a cada 4 dias e o resultado pode ser analisado na figura 4.17, que mostra o crescimento populacional tanto para fungos como para bactérias. Verifica-se que a quantificação bacteriana atinge um nível Máximo no 8º dia, a partir daí quando o número de bactérias declina e os fungos continuam a crescer sutilmente.

A aeração pode explicar o salto no crescimento bacteriano, na ordem de 6.10^7 a $8,8. 10^{10}$, de três magnitude. Em conformidade com o trabalho de (RAMSAY *et al.*, 2000; MARGESIN & SCHINNER 2001) que obtiveram em seus trabalhos, um melhor resultado no crescimento de bactérias biodegradadoras quando aplicou a técnica de bioestimulo com aeração e adição de nutrientes.

O oxigênio é um fator determinante no processo de biodegradação aeróbia como o primeiro passo no catabolismo para oxidação dos hidrocarbonetos (ROSATO 1997). O fornecimento de oxigênio pode ser efetuado através de agentes oxidantes e aeração (SÁ, 2002).

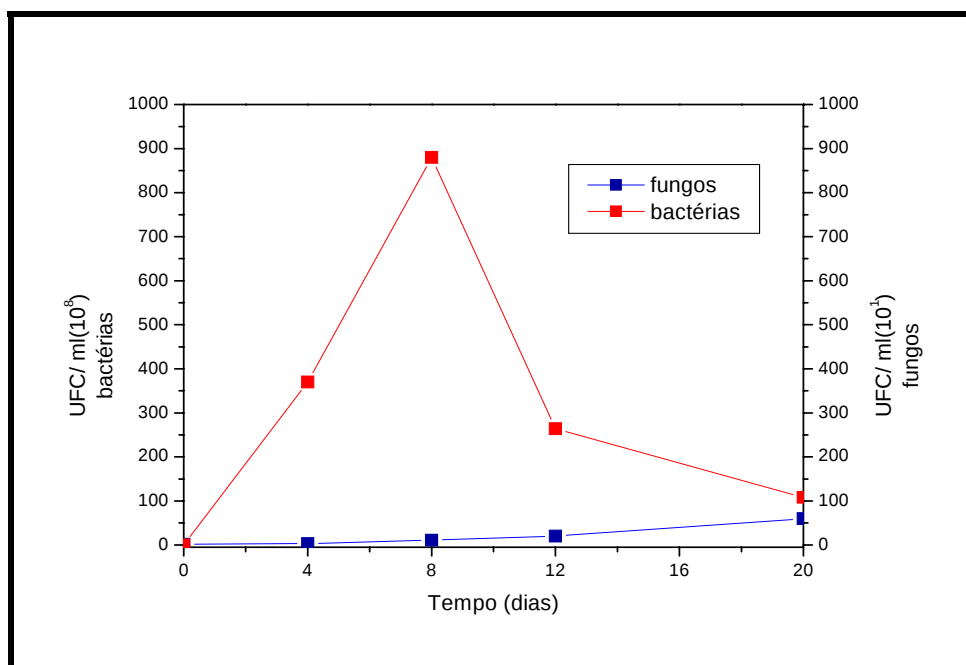


Figura 4.17 Crescimento microbiano em experimento de frascos agitados no período de vinte dias

As análises da tensão superficial e do pH durante este trabalho mostraram decréscimo nos seus valores do pH (Figura 4.18 e 4.19) o que vem a favorecer o desenvolvimento dos fungos mostrado na figura 4.17

Segundo Margesin & Schinner 2001 a neutralidade do pH favorece a biorremediação, por isto a correção do pH se torna um importante bioestímulo.

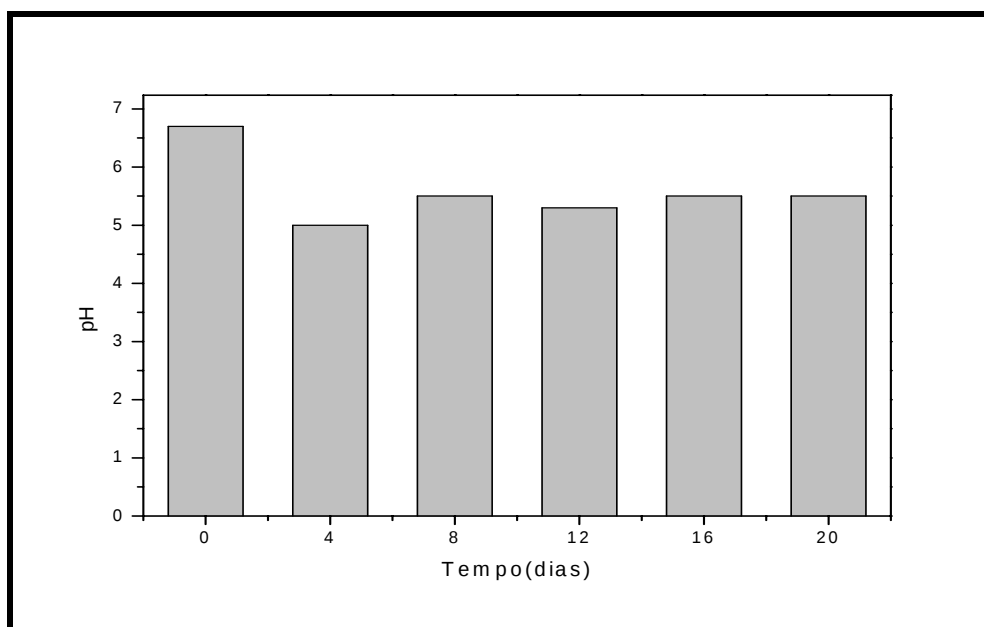


Figura 4.18 Variação do pH durante os vinte dias em frascos agitados

Os resultados da tensão superficial (Figura 4.19) apresentaram redução em torno de 31%, durante do processo inicialmente (com 64 mN/m para 44 mN/m) ao final da experiência. Presumindo-se que houve a produção de substancias ácidas e tenso ativas que podem ser tóxicas ou inibitórias ao crescimento microbiano, observado durante o plaqueamento através da formação de halo de inibição entre algumas colônias (Figura. 4.20).

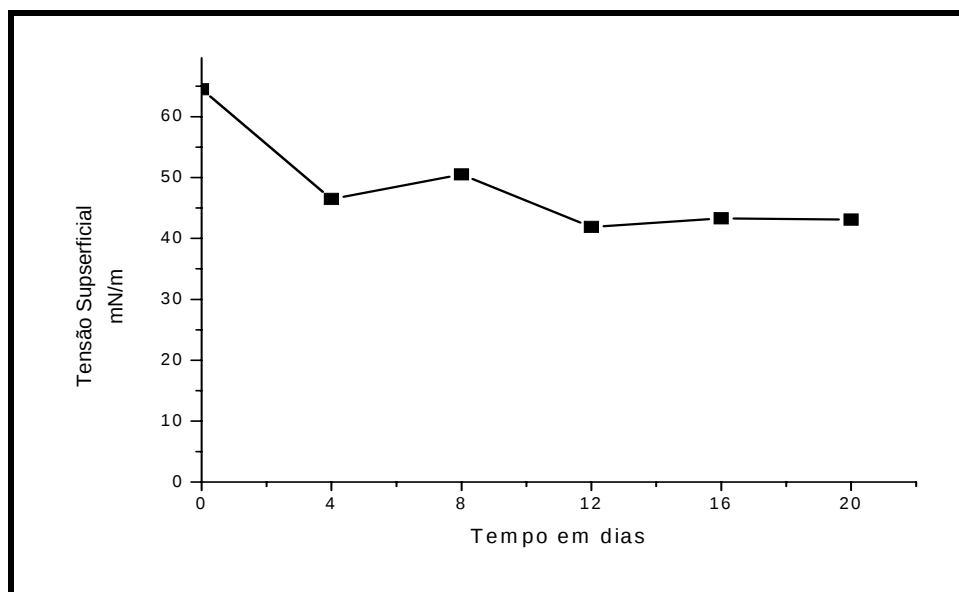


Figura 4.19 Decréscimo da Tensão superficial nos 20 dias de aeração em frasco agitado

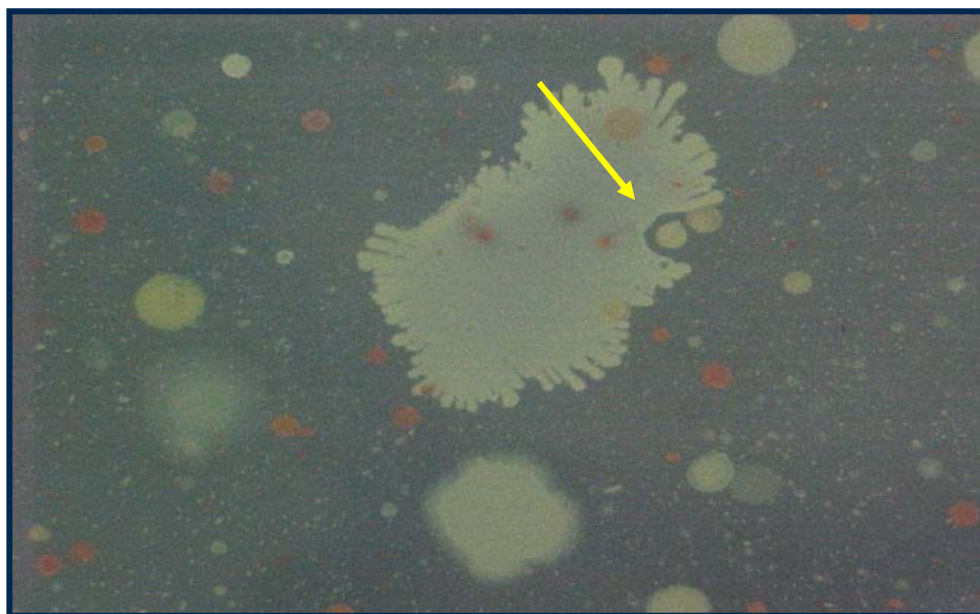


Figura 4.20. Halo de inibição entre colônias em isolados do solo de manguezal

Santo (2002), em seus experimentos observou aumento na concentração de células em processo ocorrido em biorreator em relação ao experimento em frascos agitados, atribuindo a isto a maior disponibilidade de oxigênio, concluindo através da redução do pH, da tensão superficial a possível produção de substâncias tenso ativas e aos resultados cromatográfico o consumo do petroderivado óleo Diesel.

Queiroga *et al.* (2003) Observaram que a espécie *Bacillus subtilis* promoveu a formação de emulsão em meio líquido contendo petróleo, sendo observado a redução da tensão superficial durante a produção de biosurfactantes e consumo da fração de parafinas.

O trabalho de Cassidy *et al.* (2000) que comparou a eficiência entre dois reatores, utilizando microrganismos para degradação de óleo Diesel, observaram que a tensão superficial não diminuiu, não houve a formação de surfactantes, nem a presença de emulsificação e espumas, porém houve degradação do poluente em ambos os reatores.

A utilização de microrganismos produtores de agente ativos de superfície que atuem na fase aquosa mostra um aumento na taxa de crescimento na utilização de hidrocarbonetos quando comparando a microrganismos não produtores de surfactantes (ALEXANDRE 1994).

O mecanismo de produção de substâncias surfactantes por microrganismos envolvem enzimas das células em crescimentos e o “stress” nutricional submetido (SANTO 2002).

Alguns microrganismos degradadores necessitam de um outro substrato como um co-fator para induzir enzimas que permitam a biodegradação total ou parcial do composto, que pode ter como fator inibitório à presença de substâncias tóxicas pré-existentes ou produzidas durante o processo de biodegradação (SÁ, 2002).

A análise cromatográfica deste ensaio revelou que durante o processo de vinte dias onde o óleo Diesel foi imposto à cultura mista extraída do solo do manguezal, houve uma grande redução dos compostos comparando-a com a amostra original observada na figura 4.21. Considerando-se os resultados da figura 4.10 e 4.11 onde mostram os resultados cromatográficos de cultura pura do gênero *Pseudomonas* sem

estímulo a aeração durante trinta dias e comparando-os com os da figura 4.21, observando-se uma redução podendo ser explicado pela presença de cultura mista e estar sob aeração constante, induzindo a um aumento na população microbiana e reduzindo o tempo para degradação dos hidrocarbonetos.

Dentre os compostos selecionados com reduções expressivas, quando comparado entre os ensaios realizados não se notam grandes diferenças exceto pelo composto octadecano, onde em experimento com cultura mista sem indução de aeração em 20 dias não mostrou redução (Figura 4.8), porém nas mesmas condições em presença do gênero *Pseudomonas* e também em presença de cultura mista com indução de aeração mostrou um bom percentual de redução (Figura 4.22).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* pode produzir raminolipídios, que é um biosurfactante, dependendo do substrato. Os estudos de Mulligan, (2005) relatam o envolvimento destes compostos em processos de biodegradação, onde se observou o aumento de raminolipídio na mineralização de octadecano.

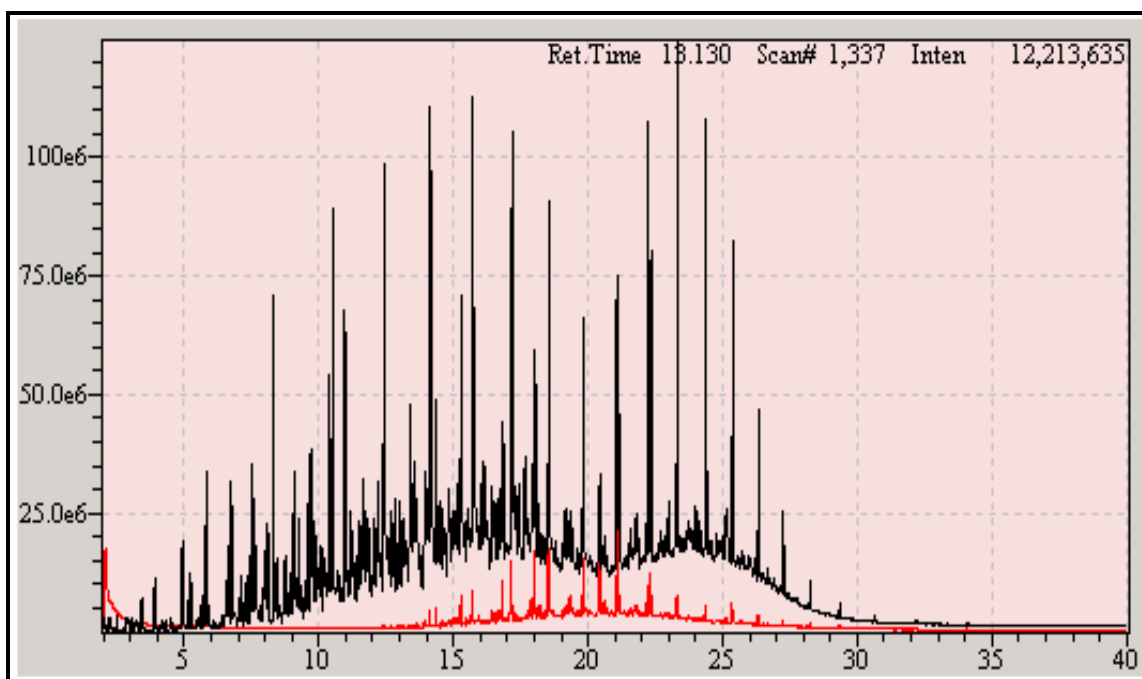


Figura 4.21 Cromatografia em meio fermentado com cultura mista do solo de manguezal durante vinte dias sobre frasco agitados em condições de aeração 1:10, (eixo y: intensidade kW; eixo X: tempo de retenção min).

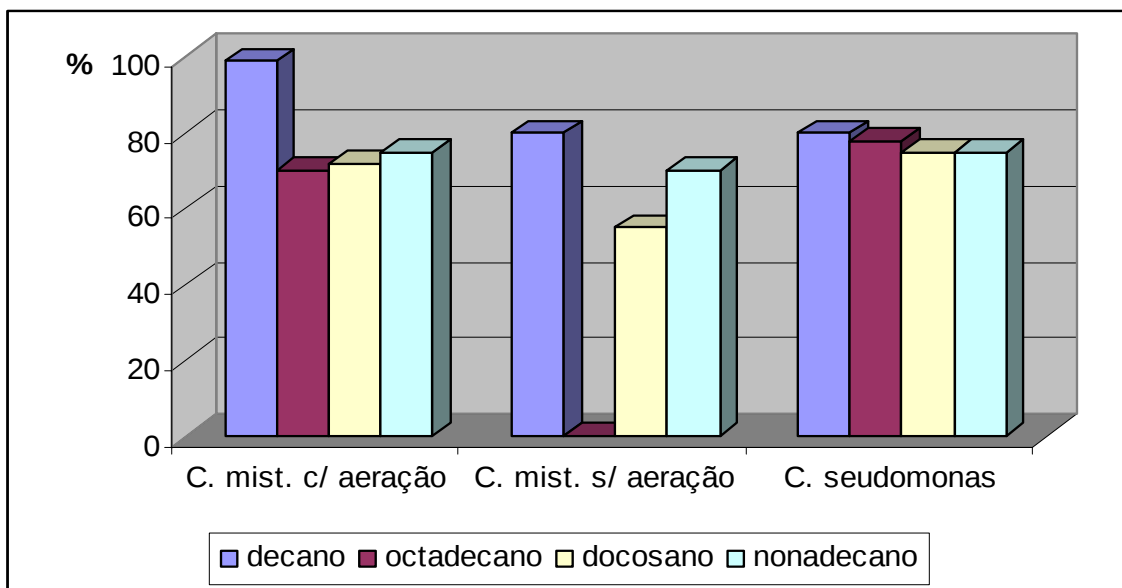


Figura 4.22. Redução dos componentes do óleo Diesel por cultura mista, com e sem aeração e gênero *Pseudomonas*, submetidos à análise cromatográfica.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- A análise da microbiota nativa do solo e da água de manguezal demonstrou a presença de microrganismos como o grupo Coliformes e *Pseudomonas* Indicativo que este ambiente recebe influências de contaminantes oriundos de despejos sanitários.
- No ensaio preliminar da análise do impacto de óleo Diesel na microbiota nativa do solo de manguezal, sem previa adaptação, observa-se um decréscimo na contagem microbiana tanto de fungos quanto de bactérias.
- A presença do poluente como única fonte de carbono diminuiu a diversidade microbiana, porém aumentou a quantificação microbiana especialmente de bactérias Gram-negativas.
- A aeração contribuiu para o aumento microbiano confirmando sua aplicação como bioestímulo, acelerando o processo de biodegradação. Demonstrado através da cromatografia de cultura mista após vinte dias de contato.
- Nos ensaios preliminares da biodegradação do óleo Diesel, em sucessivos contatos do isolado durante o processo adaptativo com o poluente foram observados que dentre os microrganismos presentes sobressaiu-se o gênero *Pseudomonas*, indicando que esse gênero é capaz de utilizar o óleo Diesel como única fonte de carbono.

6. SUGESTÕES

6. SUGESTÕES

Como aprimoramento e complemento deste trabalho, sugere-se que:

- Identificar as bactérias e fungos que se desenvolveram utilizando o óleo Diesel como única fonte de carbono.
- Identificar as espécies dos microrganismos que surgiram durante o impacto do solo com o poluente.
- Verificar o comportamento desses microrganismos em período de sazonalidade.
- Comparar a atuação na redução do poluente entre as espécies identificadas e isoladas.
- Isolar e verificar bactérias anaeróbias no processo de biodegradação, visto que o solo é de predominância anaeróbia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEN, B. V; YOON, J. M; SCHNOOR, J.L. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides-nigra* DN34). of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. **Applied Environmental Microbiology**. V. 70, n. 1, p. . 508–517, 2004.

ALEXANDRE, M. Biodegradation and Bioremediation. San Diego: Academic Press, 452p.1994.

AMERICAN PLUBIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), STANDARD Methods for The examination of water and wastewater. 20 ed. Washington, APHA -AWA / WEF, 1998.

BAEK K.H; KIM H, OH, H.M; YOON, B.D; KIM, J; LEE I.S. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng**. V.39, n.9, p.2465-2472, 2004.

BALBA, M.T; AL-AWADHI, N; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for fesaibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods** v.32, p. 155-164, 1998.

BAKER, K.H. & HERSON, D.S. Microbiology and Biodegradation (ed). Bioremediation, McGraw Hill, Inc: USA, p 11-60, 1994.

BENNET, J. W; WUNCH, K. G. & FAISON, B. D. Use of Fungi Biodegradation in: Manual of Environmental Microbiology. Second Edition. ASM Press Washington, D.C., Cp. 87 p.960-971, 2002.

BORGES, R.M.H. Biodegradação de solo argiloso contaminado com petróleo. Rio de Janeiro, 2001 (Dissertação de mestrado da Escola de Química UFRJ).

BURNS, K.A; CODI, S; DUKE, N.C. Gladstone, Australia field studies: weathering and degradation of hydrocarbons in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol. **Marine Pollution Bulletin**, v.41, p. 392-402, 2000.

CAPELLI, S.M; BUSALMEN, J.P and SANCHEZ, S.R. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 47, p. 233-238, 2001.

CASSIDY, D.P; EFENDIEV, S; WHITE, D. M. A Comparison of CSTR and SBR Bioslurry Reactor Performance. **Water Research**. V.34, n.18, p. 4333-4342, 2000.

CLEMENTE, A. R., ANAZAWA, T. A., DURRANT, L. R. Biodegradation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons By Soil Fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, n.4, 2001.

CORGIE, S. C., BEGUIRISTAIN, T., LEYVAL C. Spatial Distribution of Bacterial Communities and Phenanthrene Degradation in the Rhizosphere of *Lolium perenne* L. **Applied Environmental Microbiology**. V. 70, n. 6, p.3552–3557, 2004.

COULON F. & DELILLE D. Effects of Biostimulation on Growth of Indigenous Bacteria in Sub-Antarctic Soil Contaminated with Oil Hydrocarbons. **Oil & Gas Science and Technology** V. 58, N. 4, p. 469-479, 2003.

CUNHA, C.D. Avaliação da biodegradação de gasolina em solo. Rio de Janeiro, R.J, 1996 (Dissertação de mestrado da Escola de Química UFRJ).

CURY, J.C. Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado por petróleo. Piracicaba, S.P, 2002 (Dissertação de mestrado da Escola superior agrícola USP).

CHEUNG, P.Y & KINKLE, B.K. *Micobacteruim* diversity and pyreno mineralization in petroleum-contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 5, p. 2222-2229, 2001.

DIAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **Int Microbial**. V.7, n.3, p. 178-180, 2004.

DIAZ-RAVINA, M; BAATH, E. Development of Metal Tolerance in Soil Bacterial Communities Exposed to Experimentally Increased Metal Levels. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 8, p. 2970-2977, 1996

DUARTE, G.F., ROSADO, A.S., ARAUJO, L.S.W; ELSAS, J.D.V. Analysis of bacterial community structure en sulfurous-oil-containing soil and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 3, p. 1052-2062, 2001.

FIORENZA, S. & RIFAI, H.S. Review of MTBE biodegradation and bioremediation. **Bioremediaton Journal**. v. 7, n.1, p.1-35, 2003.

GARCÍA-GONZALEZ, V. ; GOVANTES, F.,. SHAW, L. J ;. BURNS, R. G ; SANTERO, E. Nitrogen Control of Atrazine Utilization in *Pseudomonas* sp. Strain. **.Applied and Environmental Microbiology** V. 69, n. 12 , p. 6987–6993, 2003.

GENTRY, T.J. & WOLF, D.C. Pyrene and phenanthrene influence on soil microbial populations. **Bioremediation Journal**. v. 7, n.1, p.53-68, 2003.

GLAZER, A.N. & NIKAIDO, H. Environmental applications: Microbial biotechnology: Fundamentals Applied microbiology. New York, p.562-618, 1998.

GRAWFORD, R.L. & GRAWFORD, D.L. Biorremediation principles and applications: (ed). **Bioremediation of petroleum contamination**. P. 100-119, 1996.

GREER, C.W., FORTIN, N., ROY, R., WHYTE, L.G., LEE, K. Indigenous sediment microbial activity in response to nutrient enrichment and plant growth following a controlled oil spill on a freshwater wetland. **Bioremediation Journal**. v. 7, n.1, p.69, 2003.

GROSSER, R.J., WARSHAWSKY, D. and VESTAL, J.R. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 57, p.3462-3469, 1991.

HATZINGER, P.B., McCLAY, K., VAINBERG, S., TUGUSHEVA, M., CONDEE, C.W., STEFFAN, R.J. Biodegradation of tert-butyl ether by a pure bacterial culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n.12, p. 5601-5607, 2001.

HOU, B.K.G.; ELLIS, L.B.M.; WACKETT, L. Encoding microbial metabolic logic: predicting biodegradation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. V. 31, N. 6. p. 261 – 272, 2004.

JOHNSEN, A. R. WICKB, L. Y. HARMSB, H. Principles of microbial PAH degradation in soil. **Environmental Pollution**. v.133, p. 71-84, 2005.

KANE, S. R., BELLER, H.R., LEGLER, T.C., KOESTER, C.J., PINKART, H.C., HALDEN, R.U., HAPPEL, A.M. Aerobic biodegradation of methyl tert-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n.12, p. 5824-5829, 2001.

KOREN, O., KNEZEVIC, V.; RON, E.Z. ; ROSENBERG E. Petroleum Pollution Bioremediation Using Water-Insoluble Uric Acids as the Nitrogen Source. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 69, n. 10 , p. 6337–6339, 2003

LIRA, A. M., PINHO, H., AMADOR, J., CAVALCANTE, R. Manguezais, importância de sua preservação “Aspectos de degradação dos manguezais de PE”, 87 p. 1992.

LOMANS, B.P., CAMP. H.J.O., POL. A., VOGELS, G. D. Anaerobic versus Aerobic Degradation of Dimethyl Sulfide and Methanethiol in Anoxic Freshwater Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n.2, p. 438-443, 1999.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. Metabolic diversity among the microorganisms. *Biology of Microorganisms*. 8ª ed. New Jersey: ed. Upper Saddle, p. 437-531. 1997.

MARGESIN, R. & SCHINNER, F. Bioremediation (natural attenuation and Biostimulation) of Diesel-oil-contaminated soil in Alpine Glacier Skiing area. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 7, p. 3127-3133, 2001.

MILLIKEN, C. E ; MEIER, G. P. ; WATTS, J. E. M. ; SOWERS, K. R. ; MAY, H.D. Microbial Anaerobic Demethylation and Dechlorination of Chlorinated Hydroquinone Metabolites Synthesized by Basidiomycete Fungi. **Applied Environmental Microbiology**. V. 70, n. 1, p. 385–392, 2004.

MOODY, J. D; FREEMAN, J. P; FU, P.P; CERNIGLIA C. E. Degradation of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 70, n. 1, p. 340–345, 2004.

MORASCH, B; RICHNOW, H. H. ; VIETH, A.,SCHINK, B., MECKENSTOCK, R. U. Stable Isotope Fractionation Caused by Glycyl Radical Enzymes during Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. . **Applied Environmental Microbiology**. V. 70, n. 5, p. 2935–2940, 2004.

MÜLLER, J.A.; GALUSHKO, A. S; KAPPLER, A & SCHINK, B. Initiation of Anaerobic Degradation of *p*-Cresol by Formation of 4-Hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum*. **Journal of Bacteriology**, V. 183, n. 2, p. 752–757, 2001.

MULLIGAN C.N. Environmental applications for biosurfactants **Environmental Pollution**.v. 133, p.183–198, 2005.

OUDOT, J. MERLIN, F.X. and PINVIDIC, P. Weathering rates of oil components in estuarine sediments. **Marine environmental Research**, v. 45. n.2,p.113-125, 1998.

PELCZAR JR., M.J; CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. Microbiologia: conceitos e aplicações, v. 1, 2ª ed . São Paulo: Makron Books, 1996. 76 p.

POFFO, I.R.F; XAVIER, J.C.M; SERPA, R. R. A História dos 27 anos de Vazamento de Óleo no Litoral Norte do Estado de São Paulo (1974-2000). Revista Meio Ambiente Industrial. n. 30, p.98-104, 2001.

PORTO NETO, F.F. Variação Nictemeral e Sazonal do Zooplâncton no canal de santa cruz. Itamaracá–PE 1998 (Dissertação no mestrado de oceanografia da UFPE).

PRINCE, R.C., LESSARD, R.R. & CLARK, J.R. Bioremediation of Marine Oil Spills. **Oil & Gas Science and Technology**. V. 58, n. 4, p. 463-468, 2003.

QUEIROGA; C.L., NASCIMENTO; L. R., SERRA G. E. Evaluation of Paraffins Biodegradation And Biosurfactant Production By *Bacillus subtilis* in the Presence of Crude Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34, n.4, 2003.

RADOSEVICH, M., TRAINA, S.J., HAO, Y.L., TUOVINEN, O.H. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. **Applied Environmental Microbiology**. V.61, n.1, p. 297–302, 1995.

RAMSAY, M.A. SWANNELL, R.P.J. SHIPTON, W.A. DUKE, N.C. RUSSELL, T.H. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine pollution bulletin**. v. 41, p.413-419, 2000.

ROANE, T. M., JOSEPHON, K. L. and PEPPER, I. L. Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of cotaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 7, p. 3208-3215, 2001.

ROSATO, Y.B. Biodegradação de petróleo In: MELO, I.S & AZEVEDO, J.L. Microbiologia Ambiental. p. 307-333, 1997.

SABATÉ, J. VIÑAS, M. SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International biodeterioration & biodegradation**. V.54, p. 19-25, 2004.

SÁ, M.C.C. Tratamento biológico de solo contaminado com hidrocarboneto de petróleo. Rio de Janeiro R.J, 2002 (Dissertação de mestrado da Escola de Química UFRJ).

SANTO, L.S.E. Biodegradabilidade de óleo diesel por microrganismos nativos da areia da praia de Suape-PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente; Recife-PE, 2002.(Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco).

SCHNEIDER, J., GROSSER, R., JAYASIMHULU, K., XUE, W., WARSHAWSKY, D. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene and benz[o]pyrene by *Micobacterium* sp strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p.13-19, 1996.

SCHULTZ, A., JONAS, U., HAMMER, E., SCHAUER, F. Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 9, p.4377-4381, 2001.

SESSITSCH, A; WELHARTER, A. GERZABEK, M.H; KIRCHMANN, H. KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67,n.9, p.4215-4224, 2001.

SIETMANN, R., HAMMER, E., SPECHT, M., CERNIGLIA, E.C., SHAUER, F. Novel ring cleavage products in the biotransformation of biphenyl by the yeast *Trichosporon mucoides*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n.9, p. 4158-4165, 2001.

SINGH, B. K; WALKER, A; MORGAN, J. A .W; WRIGHT D.J. Role of Soil pH in the Development of Enhanced Biodegradation of Fenamiphos. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 69, n.12, p. 7035–7043, 2003.

SMITH, C.A; REILLY, K.T. O; HYMAN M.R. Cometabolism of Methyl tertiary Butyl Ether and Gaseous *n*-Alkanes by *Pseudomonas mendocina* KR-1 Grown on C5 to C8 *n*-Alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**. V.69, n.12, p. 7385 -7394, 2003.

SOLANO-SERENA, F; MARCHAL, R; CASARÉGOLA, S; VASNIER, C; LEBEAULT, J.M; VANDECASTEELE, J.P. A *Mycobacterium* Strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 13, p.2392-2399, 1996.

SOARES, T.A.A; SILVA, J.D; SILVA, H.P; COSTA, M.F. Geoprocessamento de pontos de coletas no monitoramento ambiental no canal de Santa Cruz - PE. Anais X do SBSR, Foz do Iguaçu, p-671-673. Abril 2001

SULLIVAN, E.R; ZHANG, X., PHELPS, G. and YOUNG, L.Y. Anaerobic mineralization of stable-isotope-labeled 2-methylnaphthalene. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 9, p. 4353-4357, 2001.

TORAYA, T., OKA, T., ANDO, M; YAMANISHI, M., NISHIHARA H. Novel Pathway for Utilization of Cyclopropanecarboxylate by *Rhodococcus rhodochrous*. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 70, n. 1, p. 224–228, 2004

URURAHY, A. F. P., MARINS, M. D. M., VITAL, R. L; GABARDO, I.T., PEREIRA N.J. Effect of Aeration on Biodegradation of Petroleum Waste. **Revista de Microbiologia**. v.29, n. 4, 1998.

VILA, J; LOPEZ, Z; SABATÉ, J., MINGUILLON, C., SOLANAS, M. A; GRIFOLL, M.. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain AP1: Actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n.12, p. 5497-5505, 2001.

ZHENG, Z. & OBBARD J.P. oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal isolates from an oil contaminated refinery soil. **Environ Sci Pollut Res Int**. v.10, n.3, p. 173-176, 2003.

ZHOU, J; XIA, B; TREVES, D.S; WU, L.Y; MARSH, T.L; NEILL, R.V.O; PALUMBO, A.V; TIEDJE, J.M. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 68, n.1, p.326-334, 2002.

YANG, X ;SUN, Y ; QIAN, S. Biodegradation of seven polychlorinated biphenyls by a newly isolated aerobic bacterium (*Rhodococcus* sp. R04). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. V.39,n.9, p. 415 – 420, 2004.

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.

AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (CPRH) www.cprh.pe.gov.br/downloads/21_Geologia_e_Relevo.pdf.. **[PDF] 2 O MEIO FÍSICO DA ÁREA**-(acessado em jan/ 2005)

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) Acidentes Ambientais www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/legislacao/legislacao_nac.asp - 45k pdf (acessado 12-1-05)

DRAGO, T. O acidente marítimo mais caro da história
www.tierramerica.net/2003/0728/particulo.shtml - 22k
(acessado em set/2003)

ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) Bioventing www.epa.gov (acessado em set 2003) EPA/540/MR-94/514.

ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA); Ex-situ anaerobic bioremediation www.epa.gov (acessado em set 2003)

HILSDORF, L.V. Programa Ambiental A Ultima Arca De Noe Ecoturismo www.aultimaarcadenoe.com/canoagem.htm - 13k(acessado em jan/2005)

PETROBRAS (BR) Petrobras distribuidora Matéria: Características do Óleo Diesel
www.br.com.br/portalbr/calandra.nsf/0/ (Acessado em jan/ 2005)

PETROBRAS - VAZAMENTO DE ÓLEO NO PARANÁ
[.www.ambicenter.com.br/petrobras07.htm](http://www.ambicenter.com.br/petrobras07.htm) - 31k - (Acessado em jan/ 2005)

SERVIÇOS GEOLÓGICOS DO BRASIL (CPRM); Cartografia Geomorfológica do município do cabo de Santo Agostinho/PE www.cprm.gov.br/recife/rel04 pdf (acessado em set 2003)

SUAPE- Meio ambiente. www.suape.pe.gov.br/meio ambiente. (acessado em set 2003).

8.0 ANEXOS

ANEXO I

- Certificado do trabalho em apresentação painel no congresso da ABQ (Fortaleza).
- Certificado do trabalho em apresentação oral no congresso da PETROGÁS (Recife).
- Certificado do trabalho em apresentação painel no congresso da SINAFERM (Recife).



Química e
Humanismo

Associação Brasileira de Química

Certificado



Certificamos que

Beltrão, E. P. S.; Costa, C. P.; Albuquerque, S. S. M. C.; Lima, M. A. G. A.; Lopes, C. E.; Palha, M. A.

P. F.; apresentaram o trabalho "IMPACTO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO EM SOLOS DE MANGUEZAIS" no

XLIV Congresso Brasileiro de Química - CBQ, realizado de 20 a 24 de setembro de 2004, no Ponta Mar Hotel em Fortaleza-CE.

Fortaleza, 24 de setembro de 2004

Antonio Carlos Magalhães
Presidente do XLIV CBQ

Certificado

Conferido a:

EUDINICE PEREIRA DA SILVA BELTRÃO, CHARLENI PEREIRA COSTA, ANDREZA
BARBOSA DA SILVA, MARIA ALICE GOMES DE ANDRADE LIMA, CARLOS EDISON LOPES,
MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ PALHA,

pela participação no I Simpósio da Região Nordeste sobre Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo
e Gás Natural, realizado no período de 27 a 29 de outubro de 2004.

Sessão Oral - AVALIAÇÃO MICROBIANA EM SOLO DE MANGUEZAL EM SUCESSIVOS CONTATOS COM ÓLEO DIESEL

Recife, 29 de outubro de 2004

Virgínia Henrique de M. L. Neumann
Presidente



2 a 5 de Agosto • Recife • Pernambuco

Certificado

Certificamos que o trabalho Estudo microbiológico de solo de manguezal impactado com diferentes concentrações de óleo diesel de autoria de Beltrão, E.P.S.; Costa, C.P.; Barbosa, A.S.; Marques, O.M.; Albuquerque, S.S.M.C.; Lima, M.A.G.A.; Lopes, C.E.; Palha, M.A.F.P., foi apresentado na Sessão Pôster do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, realizado no período de 02 a 05 de agosto de 2005, em Recife, Pernambuco

Recife, 05 de Agosto de 2005

ALGO ANILLOU SIMES

Presidente da Comissão Organizadora.

ANEXO II: Trabalho completo apresentado no SINAFERM/2005

Estudo microbiológico de solo de manguezal impactado com diferentes concentrações de óleo Diesel

Beltrão, E. P. S.; Costa, C. P.; Barbosa, A. S.; Marques, O. M.; Lima, M.A.G.A.; Albuquerque, S. S. M. C.; Lopes, C. E.; Palha, M. A. P. F.

Universidade Federal de Pernambuco – Depto de Antibióticos e Depto de Engenharia Química
Recife – PE – E-mail: eudinice@iibest.com.br

RESUMO

O solo de manguezal foi impactado com óleo Diesel por um período de trinta dias com o objetivo de observar o comportamento da microbiota natural. Neste trabalho foram demonstrados o crescimento e redução na diversidade microbiana após o impacto, sendo observada a presença de microrganismos que utilizam esse poluente como fonte de carbono para o seu desenvolvimento, destacando-se bactérias Gram-negativas, notadamente o gênero Pseudomonas.

INTRODUÇÃO

A tecnologia de biorremediação natural pode ser uma aliada no combate ao impacto ambiental causado por vazamentos de petroderivados por estimular microrganismos que utilizem estes contaminantes como fonte de crescimento. Os manguezais constituem um importante ecossistema que vem despertando interesse em sua preservação e recuperação devido às agressões sofridas, uma vez que funcionam como fonte de alimentação e berçário à biodiversidade marinha. Para isso, é necessário conhecer o ambiente das áreas de risco. Tais informações podem ser obtidas através da simulação e monitoramento de vazamentos controlados. Esses dados servem como suporte ao desenvolvimento de modelos matemáticos que permitem prever o risco potencial ao ambiente, de forma a criar estratégias de gerenciamento dos possíveis derramamentos antes mesmo que ocorram. Com o objetivo de observar o comportamento da flora nativa em diferentes concentrações de óleo Diesel, impactou-se amostras do solo do manguezal de Vila Velha na Ilha de Itamaracá, Pernambuco, obtendo assim dados sobre a área em estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras do solo foram coletadas do manguezal de Vila Velha na Ilha de Itamaracá, Pernambuco. Estas foram separadas em três lotes de 200g, os quais permaneceram em contato com o contaminante por trinta dias, sendo escolhidas as concentrações de 1%, 5% e 10% (m/v) do poluente, óleo Diesel, para a avaliação do comportamento da flora nativa. Fizeram-se as contagens iniciais dos microrganismos, fungos e bactérias, presentes antes do impacto e após 2, 15 e 30 dias de contato. Para cada amostra, foi preparada uma suspensão com 10 g do solo do manguezal em 90 ml de água peptonada estéril e 0,1 ml de Tween 80, sendo submetidas à agitação de 200 rpm por 30 minutos, de modo a extrair os microrganismos presentes. Desta suspensão foram feitas diluições sucessivas e inoculadas em meios de Agar nutritivo-AN (constituído por (g/L): extrato de carne, 3,0; peptona, 5,0; Agar, 14; tetraciclina, 50µg/mL), Agar nutritivo salino-ANS (mesma composição do AN acrescido de cloreto de sódio 7,5g/L) e Saboraude-SB (constituído por (g/L): peptona, 10; cloreto de sódio, 7,5; extrato de carne, 3,5; glicose, 40; Agar, 15; fluconazol, 50µg/mL). O AN foi utilizado na contagem de bactérias heterotróficas mesófilas enquanto que o ANS para halófilos e por último, o SB para contagem de fungos e leveduras.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os experimentos de enriquecimento do solo com diferentes concentrações de óleo Diesel permitiram a análise da dinâmica da população durante os trinta dias em contato com o poluente. Analisando-se as figuras 1 e 2, observa-se que em meio AN obteve-se, inicialmente, $7,9 \times 10^3$ UFC/mL enquanto que em ANS, $2,0 \times 10^4$ UFC/mL. O número inicial de bactérias em meio AN foi menor que no meio ANS, isto se deve ao fato da população microbiana ser oriunda de solo que recebe influência marinha, o que é justificado por Ramsay *et al* (2000) e Cury (2002), quando afirmam que a população microbiana heterotrófica pode ser adequadamente estimada medindo-se o crescimento em meio apropriado contendo nutrientes e sais que sugiram o seu *habitat* natural.

Analisando-se a figura 1, observa-se que ao longo dos 30 dias, houve um aumento no crescimento microbiano para o solo impactado com 10% de óleo, enquanto nas demais concentrações não houve crescimento significativo. Considerando-se que esse solo não recebeu bioestímulo tais como aeração, nutrientes, entre outros, durante este período, sugere-se que o óleo tenha promovido o crescimento de algumas espécies de bactérias, servindo como fonte de carbono, visto que em contrapartida a este crescimento houve uma diminuição no número de espécies, como mostra a figura 3. Estes resultados estão de acordo com Ramsay *et al.* (2000) os quais afirmam que o poluente e o bioestímulo causam um aumento populacional em solo de manguezal. Já Coulon e Delille (2003) usaram o controle da temperatura e adição de fertilizantes como bioestímulo para o aumento do número de bactérias degradadoras de óleo. A presença de hidrocarbonetos em um ecossistema pode aumentar ou diminuir uma população, porém o efeito deste depende da composição química do poluente e da flora microbiana presente (ROSATO, 1997).

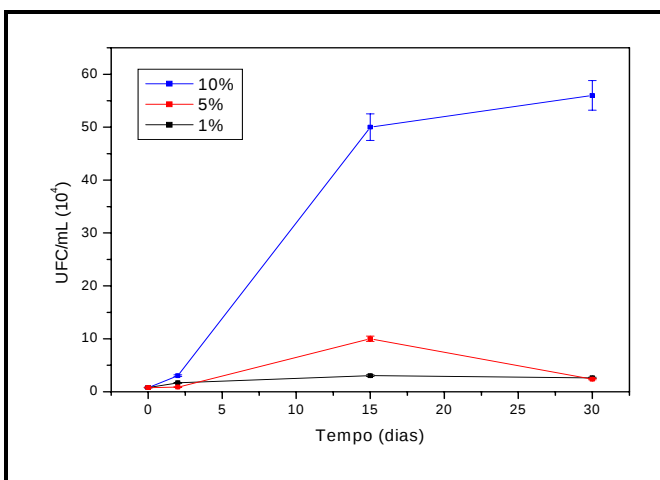


Figura 1: Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de óleo Diesel em meio AN (Tratamento Estatístico Aplicado: barras com erro de 5%).

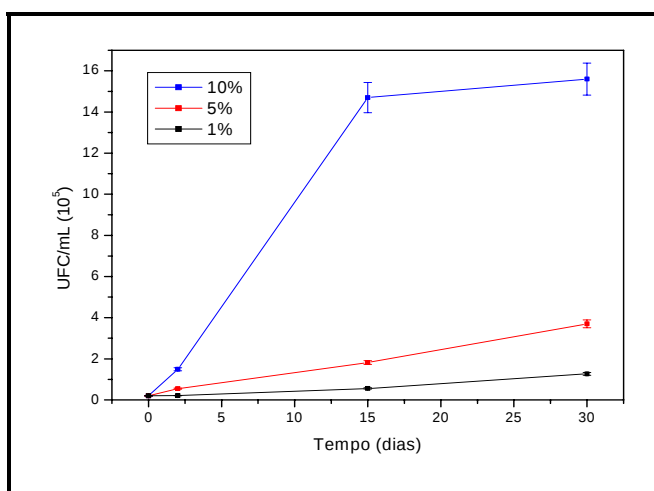


Figura 2: Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de óleo Diesel em meio de ANS (Tratamento Estatístico Aplicado: barras com erro de 5%).

Neste trabalho podem-se observar as características de colônias isoladas durante a contagem inicial, mostrando uma diversidade de bactérias que ao longo do experimento foi sendo reduzida (Figura 3 A e B). Esse comportamento também pôde ser observado nos ensaios com colônias de fungos, porém os resultados foram menos expressivos. Cury (2002) e Zhou *et al.* (2002) confirmam e justificam essa diversidade em seus trabalhos ao afirmarem que a mesma se dá devido à migração de microrganismos e nutrientes pelos fluxos e refluxos das marés. Porém a diminuição desta diversidade deve-se ao período adaptativo que proporciona o desenvolvimento de micróbios que conseguem sobreviver ao impacto do poluente.

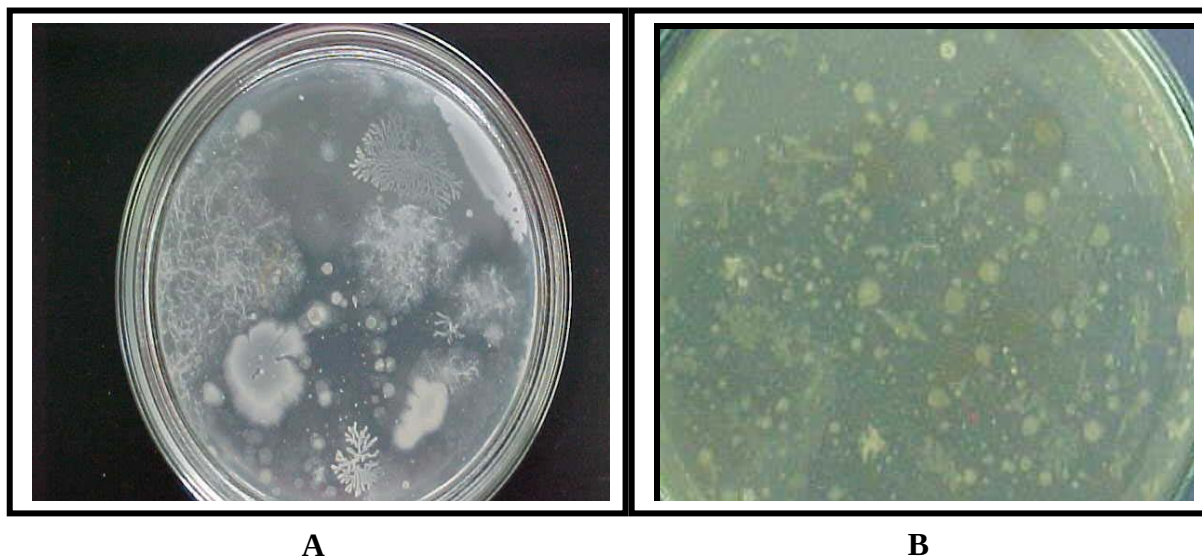


Figura 3: Características das colônias isoladas durante a contagem inicial (A) e em (B) mostrando a redução na diversidade de bactérias ao longo do experimento.

As colônias fúngicas foram quantificadas em meio SB obtendo-se como resultado um aumento populacional inicial para concentração do poluente de 10% (m/v). Comportamento similar ocorreu nas demais situações (5% e 1%), no entanto, nessas concentrações, apresentaram um maior decréscimo a partir do 20º dia (figura 4).

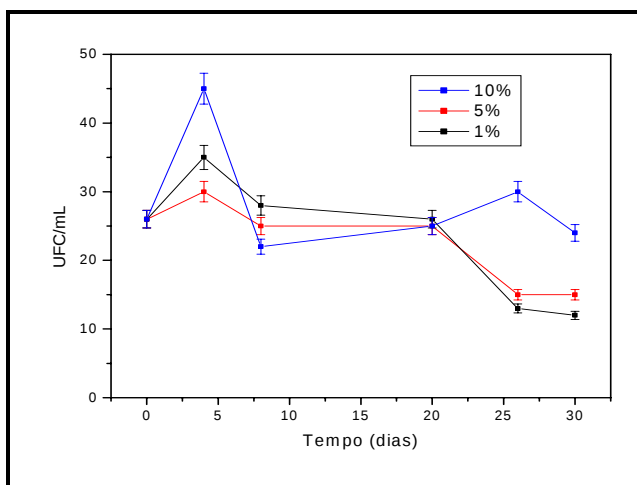


Figura 4: Impacto no crescimento de fungos em diferentes concentrações de óleo Diesel em meio de SB (Tratamento Estatístico Aplicado: barras com erro de 5%).

O comportamento apresentado por bactérias e fungos neste trabalho sugere que alguns dos microrganismos presentes nesse solo conseguem utilizar além da matéria orgânicas e minerais presentes, o óleo Diesel para o seu desenvolvimento (Zheng & Obbard, 2003).

Microrganismos isolados de amostras do solo em estudo foram inoculados em meios de cultura com quantidades variáveis de óleo Diesel para avaliação da capacidade de crescimento destes microrganismos utilizando como única fonte de carbono o óleo. Nessas condições, desenvolveram-se alguns microrganismos degradadores de hidrocarbonetos através do processo adaptativo. Após o período de vinte dias, obteve-se como resultado visível mudança de coloração do meio e a formação de emulsão, como pode ser visto na figura 5 A e B.



Figura 5: Mudança da coloração após vinte dias de incubação.

A - no momento do inóculo; **B** - após vinte dias de crescimento.

Através do método de coloração de Gram verificou-se a predominância de bactérias Gram-negativas. Isolando-se os microrganismos desse ensaio e submetendo-os a testes bioquímicos, confirmou-se a presença do gênero *Pseudomonas* como indicado na figura 6, em meio de acetamida pela modificação da coloração (A) e confirmado em meio de Agar cetrimide (B).

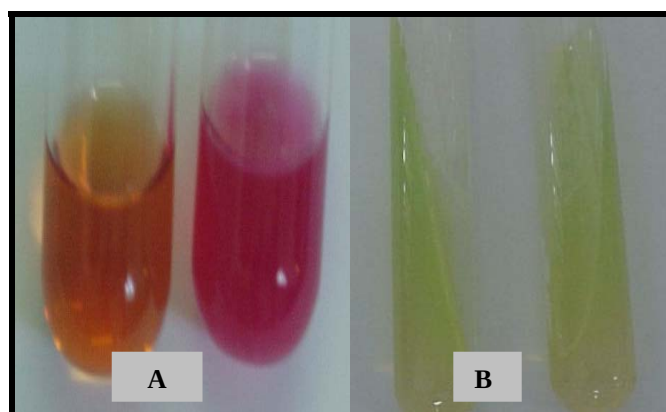


Figura 6: Ensaio bioquímicos confirmativos a presença de *Pseudomonas*. **A** - em meio de acetamida; **B** - meio de Agar cetrimide.

Varias espécies da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, em presença do substrato adequado, produzem raminolipídios que têm características surfactantes (MULLIGAN, 2005). Os biosurfactantes podem ser utilizados na formulação de defensivos agrícolas, na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e como agente de biorremediação de solos e águas contaminadas, além da recuperação secundária de petróleo (RON E ROSENBERG, 2002)

CONCLUSÃO

Os experimentos realizados com solo de manguezal, impactados com o óleo Diesel, sugerem que o poluente foi capaz de promover o crescimento microbiano nas concentrações de 1%, 5% e 10% (m/v), com melhor desenvolvimento na maior concentração. Por outro lado, houve diminuição na diversidade das colônias, destacando-se, entre as que cresceram, bactérias Gram-negativas, notadamente o gênero *Pseudomonas*.

BIBLIOGRAFIA

COULON F. & DELILLE D. Effects of Biostimulation on Growth of Indigenous Bacteria in Sub-Antarctic Soil Contaminated with Oil Hydrocarbons. **Oil & Gas Science and Technology** V. 58, N. 4, p. 469-479, 2003.

CURY, J.C. Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado por petróleo. Piracicaba, S.P, 2002 (Dissertação de mestrado da Escola superior agrícola USP).

MULLIGAN C.N. Environmental applications for biosurfactants **Environmental Pollution**.v. 133, p.183-198, 2005.

RAMSAY, M.A. SWANNELL, R.P.J. SHIPTON, W.A. DUKE, N.C. RUSSELL, T.H. Effect of Bioremediation on the Microbial Community in Oiled Mangrove Sediments. **Marine pollution bulletin**. v. 41, p.413-419, 2000.

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

ROSATO, Y.B. Biodegradação de petróleo In: MELO, I.S & AZEVEDO, J.L. *Microbiologia Ambiental*. p. 307-333, 1997.

ZHOU, J; XIA, B; TREVES, D.S; WU, L.Y; MARSH, T.L; NEILL, R.V.O; PALUMBO, A.V; TIEDJE, J.M. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 68, n.1, p.326-334, 2002.

ZHENG, Z. & OBBARD J.P. oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal isolates from an oil contaminated refinery soil. **Environ Sci pollut Res Int**. v.10, n.3, p. 173-176, 2003.