



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**BIODIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ÁGUA DO MAR E
APLICAÇÃO DE CONSÓRCIO NA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL**

Flávia Virgínia Ferreira de Arruda

Recife-PE

2015

FLÁVIA VIRGÍNIA FERREIRA DE ARRUDA

**BIODIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ÁGUA DO MAR E
APLICAÇÃO DE CONSÓRCIO NA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área **Biotecnologia**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Norma Buarque de Gusmão

Recife-PE

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Arruda, Flávia Virgínia Ferreira de

Biodiversidade de fungos filamentosos em água do mar e aplicação de consórcio na
degradação de óleo diesel / Flávia Virgínia Ferreira de Arruda. – Recife: O Autor, 2015.

99 f.: il.

Orientador: Galba Maria de Campos Takaki, Norma Buarque de Gusmão
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.
Inclui referências e anexos

1. Fungos 2. Biorremediação 3. Diesel I. Campos-Takaki, Galba Maria
de (orient.) II. Gusmão, Norma Buarque de (coorient.) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-256

BIODIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ÁGUA DO MAR E APLICAÇÃO DE CONSÓRCIO NA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data de Aprovação: 10 /02 / 2015

Prof^aDra. Galba Maria de Campos-Takaki
Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP
Orientadora

Prof^aDra. Hέλvia WalewskaCasullo de Araújo
Universidade Federal de Campina Grande-UFCG

Prof^aDra. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural Pernambuco-UFRPE

Prof.Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP

Prof^aDra. Maria Cristina Motta
Universidade Federal Pernambuco-UFPE

Vencerás

Não desanimes.

Persiste mais um tanto.

Não cultives pessimismo.

Centraliza-te no bem a fazer.

Esquece as sugestões do medo destrutivo.

Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.

Avança ainda que seja por entre lágrimas.

Trabalha constantemente. Edifica sempre.

Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.

Não te impressiones nas dificuldades.

Convence-te de que a vitória espiritual é construção para o dia-a-dia.

Não desistas da paciência.

Não creias em realizações sem esforço.

Silêncio para a injúria. Olvido para o mal. Perdão às ofensas.

Recorda que os agressores são doentes.

*Não permitas que os irmãos desequilibrados te destruam o trabalho ou te apaguem a
esperança.*

Não menosprezes o dever que a consciência te impõe.

*Se te enganaste em algum trecho do caminho, reajusta a própria visão e procura o rumo
certo.*

Não contes vantagens nem fracassos.

Não dramatizes provações ou problemas.

Conserva o hábito da oração para quem se te faz a luz na vida íntima.

Resguarda-te em Deus e persevera no trabalho que Deus te confiou.

Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar.

Age auxiliando. Serve sem apego.

E assim vencerás.

*Autor: Emmanuel
Psicografia de Chico Xavier*

*A Deus,
aos familiares,
em especial ao meu irmão Jeimes Arruda
e aos amigos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sempre a Ele, eternamente a Ele;

Aos meus pais Marcelo e Edneide, pai obrigada por torcer;

Ao meu irmão Jeimes Arruda, meu maior orgulho e admiração, por toda força e incentivo mesmo de longe. Jamais poderei retribuir e agradecer a tudo. A sua família linda que também é minha família, Sandy, e minhas lindas sobrinhas, Ana Clara e Maria Valentina (Dinda);

A Andrea Carla que chegou em um momento muito importante de minha vida e também se tornou muito importante a minha vida, obrigada por todo carinho, paciência, apoio e força;

As minhas primas/irmãs Lu, Bel, Fabí e Katia, todo amor e gratidão que tenho por vocês são poucos;

Aos meus primos, Edney, Ivo, Eduardo, dentre tantos outros;

Aos meus compadres e comadres, e meus afilhados lindos e especiais: Marcelinho, Duda, Reginaldo, Sophia, Joana e Petrus, Dinda ama vocês;

Aos meus tios e tiase todos os meus familiares;

A Robson Cavalcanti (Robinho) e Luis Claudio mais que amigos, filho e irmão, obrigada, serei eternamente grata, vocês acreditaram e me fizeram acreditar, vocês me levantaram;

Aos meus amigos, em especial, Nel, Mama, Talyce, Manu, Persio, Erik, Raul, Rita, Edelvio, Diana, Camila, Rafael, Maria Claudia, Evelyne, Jaci, por todo apoio e força quando eu mais precisei vocês estavam lá, minha família Danti;

As amigas da graduação, Geo e Joana;

A professora Galba Maria Campos Takaki, por ter aceitado e ter compreendido;

A professora Kesia Xistos por todos os conselhos e força;

A professora Leonor por todo carinho, palavras tranquilizantes e horas prazerosas durante o café;

A minha eterna professora Norma Gusmão foi com ela que tudo começou e hoje não é apenas minha professora, mas minha amiga, minha mãe também.

A agencia financiadora CAPES, aos laboratórios LAMAI da Universidade Federal De Pernambuco e NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas

Obrigada a todos, por acreditarem, mesmo quando eu não achava possível!!!

RESUMO

A biorremediação é uma tecnologia na qual se utiliza micro-organismos capazes de degradar compostos químicos, como os presentes no óleo diesel e outros petroderivados, além do petróleo. O óleo diesel é um combustível fóssil, derivado do petróleo, utilizado em diferentes motores, formado basicamente por hidrocarbonetos (composto químico formado por átomos de hidrogênio e carbono, além de conter na composição, pequena quantidade, oxigênio, nitrogênio e enxofre). É o principal combustível comercializado no Brasil, possuindo inclusive refinaria no estado de Pernambuco. Vários acidentes estão relacionados a esse petroderivado. Os danos causados por esses acidentes são objetos de pesquisas na tentativa de remediar os efeitos causados por conta da contaminação, em especial por problemas com derramamento no mar e na terra. No presente trabalho foi realizado isolamento, identificação, avaliação da atividade enzimática, bem como o potencial biodegradador de micro-organismos, em culturas puras e culturas mistas, isolados de água do mar a partir da coleta realizada no Complexo Portuario de Suape, PE, Brasil. Foram isolados 187 fungos, sendo destes 25,13% do tipo leveduras e 74,87% filamentosos. Das 140 linhagens de filamentosos isolados procedentes de água do mar foram identificados 23 dos gêneros *Aspergillus* e 20 de *Penicillium*, e 97 de outras espécies de fungos. O fungo identificado como *Aspergillus terreus* foi o que apresentou uma maior atividade para a enzima manganês peroxidase com 7668U/L na concentração de 3% de óleo diesel. A produção de lacase foi observada com as três concentrações de óleo diesel (1%, 3%, e 5%) pelo fungo *Aspergillus awamori*, cuja produção foi de 1660U/L, 1650U/L e 1240U/L, respectivamente. Uma melhor produção da enzima lignina peroxidase observou-se com o fungo *Aspergillus niger*, nas concentrações de 3% e 1% de óleo diesel, com atividades de 128U/L e 102U/L, respectivamente. Nos ensaios de degradação, as concentrações utilizadas de óleo diesel foram de 1%, 5% e 10%. Os micro-organismos associados apresentaram valores de degradação até quase 50%, em 5% óleo diesel, quando apresentados na concentração de 10%, os percentuais de degradação chegaram quase a 20% dos constituintes do óleo diesel. Quando em culturas mistas entre fungos filamentosos e bactérias observou-se degradação superior a 20% e fungos filamentosos e levedura, degradação próxima aos 30%. Os resultados apresentados demonstram a eficiência do uso de micro-organismos em processos biotecnológicos, nos processos de biotratamento de poluentes derivados de petroderivados, demonstrando que os fungos filamentosos são eficientes e promissores na remoção de poluentes tóxicos.

Palavras chave: Biorremediação, fungos filamentosos, biotratamento, enzimas ligninolíticas, água do mar.

ABSTRACT

Bioremediation is a technology in which it is used degrading micro -organisms of the chemical compounds in diesel and other oil petroderivados, beyond petroleum. Diesel oil is a fossil fuel, derived from petroleum, used in different engines, consisting primarily of hydrocarbons (chemical compound made up of hydrogen and carbon atoms, and contain the composition, small amount, oxygen, nitrogen and sulfur). It is the main fuel sold in Brazil, including having refinery in the state of Pernambuco. Several accidents are related to this petroderivado. The damage caused by these accidents is research objects in an attempt to repair the effects because of contamination, in particular by problems with spill on sea and land. In the present work was carried out isolation, identification, assessment of enzymatic activity as well as the potential biodegradador of microorganisms isolated from sea water from the collection held at the Port of Suape, PE, Brazil. 195 fungi were isolated; of these 14% are type yeast and filamentous 76%. Of the 140 strains isolated from filamentous coming from seawater were 23 of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* 20 and 97 of other species of fungi. The fungus encoded as *Aspergillus terreus* was the one with a manganese peroxidase activity with 7668U / L at a concentration of 3 % diesel fuel. The production of laccase was observed with all three concentrations of diesel oil (1%, 3% and 5%) by *Aspergillus awamori*, whose production was 1660U / L, 1650U / L, 1240U / L, respectively. For the lignin peroxidase enzyme observed with *Aspergillus niger* fungus at concentrations of 3% and 1% of diesel oil with activities of 128U / l and 102u / l, respectively. In degradation testing, the concentrations used of diesel oil were 1 %, 5% and 10%. The micro -organisms associated degradation values presented to almost 40% , 5 % diesel oil and presented in a concentration of 10% , the percentage of degradation reached almost 20% of diesel oil constituents . The results show the efficiency of the use of microorganisms in biotechnological processes in bioremediation processes petroderivados derivatives pollutants, showing that filamentous fungi are efficient and promissores in removing toxic pollutants.

Keywords: Bioremediation, filamentous fungi, bioprocessing, ligninolytic enzymes, sea water

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Óleo diesel.	18
Figura 2: Esquema representativo do processamento e destilação do petróleo.	19
Figura 3: Exemplos de cadeia simples: a) Nonane; b) Decane; c) Dodecane.	20
Figura 4: Composição química dos hidrocarbonetos alifáticos de cadeia simples.	20
Figura 5: Esquema gráfico do motor a diesel.	21
Figura 6: vazamento de óleo na praia de Maresias.	29
Figura 7: Vazamento de óleo diesel, atingindo Ribeirão Lindóia, em Londrina, no norte do Paraná.	30
Figura 8: Estratégias de biorremediação.	34
Figura 9: Bioventing	39
Figura 10: Biorreatores	40
Figura 11: Biorreatores.	40

Artigo 1

Figura 1: Local de coleta da água para isolamento dos micro-organismos; (A) (B) vista aérea do local da coleta.	61
Figura 2: Total dos fungos filamentosos por pontos de coleta e meios utilizados no isolamento	65
Figura 3: Fungos filamentosos isolados de águas (<i>Aspergillus terreus</i> (A); <i>A. niger</i> (B); <i>Penicillium</i> (C) sp. Amostras cultivadas em meio Agar Sabouraud	66

Artigo 2

Figura 1: Oxidação biológica do indicador 2,4-diclorofenol-indofenol para os fungos filamentosos	80
Figura 2: Índices de degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus flavus</i> (59) na porcentagem de 5%	82

Figura 3: Degradação microbiana do consórcio 84

Figura 4: Imagens do teste de fitotoxicidade. A – Controle positivo; B – Controle 85
negativo; C – Tratamento com resíduo

Artigo 3

Figura 1: Percentuais de degradação do óleo diesel do consórcio 1 (A) e 2 (B) 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formas de comercialização do óleo diesel 23

Tabela 2: Aplicabilidade da biorremediação na remoção de derivados do petróleo 37

Artigo 1

Tabela 1: Características físico-químicas e biológicas da água do mar 64

Tabela 2: Total dos fungos isolados no meio de cultura Malte contendo óleo diesel 65

Tabela 3: quantidade de fungos filamentosos identificados por ponto de coleta 66

Tabela 4: Valores de produção das três enzimas pelos fungos filamentosos testados 67

Artigo 2

Tabela 1: valores de biomassa e pH dos fungos filamentosos no teste de aclimação na concentração de 5% de óleo diesel 83

Artigo 3

Tabela 1: Especificações do óleo diesel trabalhado 93

Tabela 2: Resultados do ensaio de fitotoxicidade com óleo diesel 94

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO GERAL

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Óleo diesel	17
3.1.1 Diesel comum	23
3.1.2 Óleo diesel automotivo	23
3.1.3 Óleo diesel interior (máximo 0,35% de enxofre)	24
3.1.4 Extra Diesel aditivado	24
3.1.5 De referência (diesel padrão)	24
3.1.6 Óleo diesel marítimo	25
3.1.7 Marítimo comercial	25
3.1.8 Especial para a Marinha / Ártico	25
3.2 PROPRIEDADES	25
3.2.1 Número de Cetano	25
3.2.2 Densidade	26
3.2.3 Teor de Enxofre	26
3.3 ACIDENTES	26
4. BIORREMEDIAÇÃO	32
4.1 Biosparging	39
4.2 Bioventing	39
4.3 Biorreatores	40
4.4 Atenuação natural ou Biorremediação intrínseca	40
4.5 Bioestimulação	41
4.6 Bioaugmentação	41

4.7 Compostagem	42
5.CONDIÇÕES QUE PODEM INTERFERIR NOS PROCESSOS BIODEGRADATIVOS	42
5.1 pH	43
5.2 Temperatura	43
5.3 Nutrientes	43
6. MICRO-ORGANISMOS AQUÁTICOS	44
7. ENZIMAS NOS PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO	45
8. REFERENCIAS	48
ARTIGO1	57
DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS AQUÁTICOS CULTIVÁVEIS ISOLADOS DO LITORAL SUL (PE, BRASIL) E POTENCIAL ENZIMÁTICO	
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Coleta do material	61
2.2 Características da água nos Pontos de Coleta	61
2.3 Isolamento de fungos	61
2.4 Identificação	62
2.4.1 Fungos	62
2.5 Caracterizações enzimática	62
2.5.1 Atividade da lacase (Lac)	63
2.5.2 Atividade da lignina peroxidase (LiP)	63
2.5.3 Atividade da Manganês Peroxidase (MnP)	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 Características da água do mar	63
3.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos	64
3.2.1 Fungos	64
3.3 Potencial lignolítico dos fungos filamentosos	67
4. CONCLUSÕES	69
5. AGRADECIMENTOS	70
6. REFERENCIAS	70
ARTIGO 2	74

ESTIMULAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

1. INTRODUÇÃO	76
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1 Óleo diesel	77
2.2 Micro-organismos	77
2.3 Teste de oxidação	77
2.4 Aclimação	78
2.5 Biomassa e pH	78
2.6 Toxicidade	78
2.7 Análises da degradação dos constituintes do óleo diesel	79
2.8 Formação do consórcio	79
2.9 Teste de Antagonismo	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1.1 Seleção de micro-organismos	80
3.1.2 Fungos filamentosos e leveduras	80
3.2 Teste de Antagonismo e aclimação	81
3.3 Biomassa e pH	82
3.4 Degradação em consórcio	83
3.5 Eliminação da fitotoxicidade do óleo diesel	84
4. CONCLUSÕES	85
5. AGRADECIMENTOS	85
6. REFERÊNCIAS	86
ARTIGO 3	88
Biorremediação de biodiesel em escala de laboratório por consórcios indígena de <i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus tamaris</i> e levedura	
1. INTRODUÇÃO	90
2. MATERIAL E MÉTODO	91
2.1 Óleo diesel	91
2.2 Micro-organismos	91
2.3 Teste de degradação em consórcio	92
2.4 Teste do resíduo gerado	92
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	92

3.1 Especificações da amostra de óleo diesel	92
3.2 Teste de degradação em consórcio	93
3.3 Teste do resíduo gerado	94
4. CONCLUSÕES	94
5. AGRADECIMENTOS	95
6. REFERENCIAS	95
9. CONCLUSOES GERAIS	97
10. ANEXO	98

1. INTRODUÇÃO

O óleo diesel é um combustível obtido a partir do refino do petróleo no processo inicial de destilação, entre outras, as frações denominadas de leve e pesadas, são básicas para a produção de óleo diesel (BAPTISTA, 2009).

Apresenta principalmente em sua composição átomos de carbono e hidrogênio, e em menores concentrações enxofre, oxigênio e nitrogênio, porém sua composição específica dependerá da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação (ANP, 2014).

É um composto volátil, límpido, tóxico de cheiro forte e o principal combustível comercializado no mercado brasileiro, utilizando-se principalmente nos transportes de cargas e de passageiros (como ônibus, caminhões, furgões, navios e locomotivas). Entre estes transportes o diesel tem uma maior utilização nas máquinas agrícolas (75%), seguido das locomotivas (16%) e por último na produção de energia (5%) (PETROBRAS, 2014).

Em 2008, o Brasil utilizou 1,8 milhões de barris de petróleo por dia, ocupando a 12ª posição mundial (2,3% do total mundial), de óleo diesel foi produzido 41 milhões de m³(ANP, 2009).

Diversas substâncias, hoje presentes no ambiente, têm sido geradas pelo homem através da síntese química. Embora muitas possam ser degradadas em poucos meses por algum organismo, outras persistem na natureza por um longo tempo. Consideradas recalcitrantes, estas moléculas alheias ao mundo dos seres vivos (xenobióticas) não são biodegradadas ou, quando o são, o processo é muito lento. Como resultado das atividades humanas, aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de substâncias químicas perigosas são liberadas anualmente no meio ambiente. Em alguns casos, trata-se de emissões deliberadas e regulamentadas (resíduos industriais), em outros, de escapamentos acidentais (manchas de óleo ou de petróleo) (MALAJOVICH, 2011).

As refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de materiais indesejáveis que poluem o meio ambiente sendo os principais poluidores do solo e dos mananciais de água. As fontes desse produto originam-se, sobretudo dos fundos de tanques-reservatórios dos navios petroleiros, das unidades de tratamento e do armazenamento (CETESB, 2014).

O Brasil demonstrou ter uma grande preocupação quanto ao meio ambiente, há inúmeros mecanismos legais que visam assegurar a proteção ambiental, mas

infelizmente esses mecanismos por si só não são capazes de acabar com a degradação desenfreada dos recursos naturais (ABBAS, 2003).

Biorremediação é um processo no qual se utilizam agentes biológicos para remover poluentes tóxicos do ambiente terrestre e aquático. Este processo teve início em 1988, quando cientistas começaram a utilizar micro-organismos para limpar poluentes e lixos tóxicos (RIZZO, 2014). A partir dessa origem vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de decompor os diversos tipos de poluentes.

Vários são os micro-organismos responsáveis por diminuir a contaminação do ambiente, tais como as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras. Embora muitos destes tenham a necessidade nutricional igual a nossa, outras metabolizam substâncias como: metais pesados, petróleo e seus derivados, enxofre, gás nitrogênio, xenobióticos e mercúrio (ABBAS, 2003).

A diversidade do meio ambiente está diretamente relacionada com equilíbrio ambiental, o qual é diretamente afetado pela liberação de resíduos industriais e urbanos. Algumas espécies de microrganismos podem atuar como decompositores, em processos de biorremediação, auxiliando na recuperação de áreas contaminadas (POLONIO *et al.*, 2014).

O sucesso da biorremediação está ligado diretamente a uma ampla compreensão das condições físicas, químicas, biológicas e de uma aprofundada avaliação da aplicabilidade das técnicas “*in situ*” e “*ex situ*” (SANTOS *et al.*, 2007).

Os ambientes marinhos são caracterizados por teores elevados de sal e a presença de uma variedade de íons, parece razoável para avaliar o uso de organismos marinhos para a biorremediação na água do mar.

A importância dos fungos para os processos biotecnológicos na área ambiental, como uma alternativa à biorremediação de ambientes contaminados por compostos xenobióticos tem sido ressaltada devido à capacidade desses organismos de produzir peroxidases e fenoxidases. Essas enzimas têm sido avaliadas para tratamento enzimático de diferentes tipos de contaminantes (ALDERETE *et al.*, 2009; PASSOS *et al.*, 2009).

Os tratamentos enzimáticos surgiram como uma alternativa a alguns processos convencionais de tratamento. Isso se deve a vantagens que apresentam como seletividade e eficiência (mesmo em baixas concentrações) e ao desenvolvimento em nível de produção de enzimas, traduzido na sua disponibilidade comercial o mais baixo preço (KARAM e NICELL, 1997).

2. OBJETIVO GERAL

Isolar micro-organismos presentes em ambientes aquáticos do complexo do Porto de Suape (PE, Brasil) e do rio Ipojuca, avaliando o potencial biotecnológico na produção de enzimas do sistema lignolítico, bem como testar consórcios microbianos entre fungos filamentosos e bactérias, leveduras e fungos filamentosos nos processos de remediação da poluição aquática pelo óleo diesel.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conhecer os parâmetros físico-químicos das águas coletadas;
- Selecionar fungos filamentosos, com potencial para degradar óleo diesel;
- Avaliar a capacidade de degradação por micro-organismos em diferentes concentrações de óleo diesel;
- Determinar os subprodutos de degradação;
- Avaliar a eficiência da degradação dos hidrocarbonetos do óleo diesel pelos fungos filamentosos;
- Avaliar a eficiência de consórcios fúngicos em degradar óleo diesel;
- Avaliar a degradação de óleo diesel por consórcio entre micro-organismos;
- Avaliar a produção de enzimas lignolíticas por fungos filamentosos com potencial aplicação biotecnológica;
- Avaliar a toxicidade dos subprodutos gerados pela degradação do óleo diesel;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Óleo diesel

Combustíveis fosseis são misturas complexas cuja composição difere de refinaria para refinaria e de acordo com o tipo de petróleo bruto processado. A fim de tornar o diesel em condições adequadas de trabalho as suas propriedades são fixadas para um valor padrão, que podem ser variados em diferentes países, de acordo com suas condições climáticas. Além disso, para reduzir a poluição, algumas regras e regulamentos têm sido moldados de modo a limitar a quantidade de componentes prejudiciais como o enxofre do combustível (AGARWAL *et al.*, 2013).

O termo óleo refere-se a uma classe de substâncias, que se apresenta no estado líquido e viscoso nas condições ambientes de temperatura e pressão ao nível do mar. São hidrofóbicos (imiscíveis com a água) e lipofílicos (miscível com outros óleos), podendo ser de origem vegetal, animal e mineral (PETROBRAS, 2014).

Os óleos de origem vegetal são muito utilizados na culinária, como no preparo de alimentos, enquanto que os óleos de origem mineral são os mais empregados na lubrificação (óleos lubrificantes) ou na manutenção de peças mecânicas, como combustíveis e ainda podem ser modificados quimicamente como é o caso dos óleos sintéticos. Os óleos de origem mineral podem ser utilizados também como anti ferruginosos ou desengordurantes. Entre eles temos o óleo diesel, que é preferencialmente utilizado como combustível nos meios de transportes e de trabalhos movidos a diesel, mas que nada impede que sejam usados, como lenha, para movimentar turbinas ou esquentar caldeiras (PETROBRAS, 2014).

É um produto pouco inflamável, tóxico, pouco volátil, límpido, livre de material em suspensão e com odor forte e característico (Figura 1). Recebeu este nome em homenagem ao engenheiro alemão Rudolf Diesel que inventou um meio mecânico para explorar reação química originada da mistura de óleo e do oxigênio presente no ar.

Figura 1: Óleo diesel.



Disponível em: <http://news.riosulense.com.br/?p=1372>

Acesso em agosto de 2014

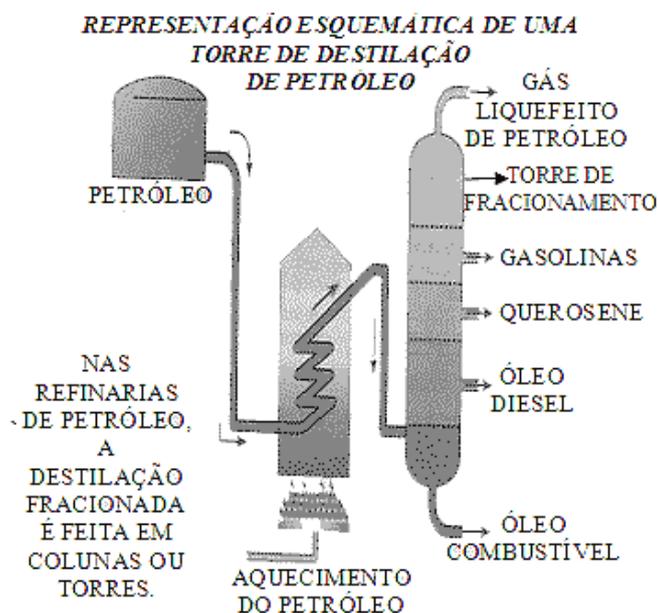
O óleo diesel, como é chamado em Portugal e no Brasil, é um derivado da destilação do petróleo bruto (Figura2) usado como combustível nos motores a diesel. É um composto constituído basicamente por átomos de carbono, hidrogênio (hidrocarbonetos) e em baixas concentrações por enxofre, nitrogênio e oxigênio, possuindo com uma faixa de ponto de ebulição variando aproximadamente entre 170°C e 370°C, o que corresponde a destilados intermediários do petróleo, o diesel é selecionado de acordo com suas características de ignição e de escoamento, adequadas ao funcionamento dos motores ciclo a diesel.

Segundo Nikanjam (1992) no óleo diesel estão presentes as misturas de hidrocarbonetos oléfínicos, saturados e aromáticos com moléculas de C₉ a C₂₀decarbono na faixa de ebulição de 170 - 350°C, com proporções menores de nitrogênio, enxofre e oxigênio contendo compostos orgânicos. Odiesel é comum em duas classes:

1-D grau (diesel N°. 1), geralmente destilado em corrida em linha reta com intervalo de ebulição 170-270 ° C.

2-D grau (diesel N° 2), a mistura de duas ou mais correntes de refinaria de petróleo, incluindo gás craqueado, pesados leves, nafta e gasóleo pesado, entre outros, com intervalo de ebulição 180 - 350 ° C. Em geral, a palavra diesel é usada principalmente com referência a essa série.

Figura 2: Esquema representativo do processamento e destilação do petróleo.



Disponível em: <http://www.supletivounicanto.com.br/modulos/q>

Acesso julho de 2014.

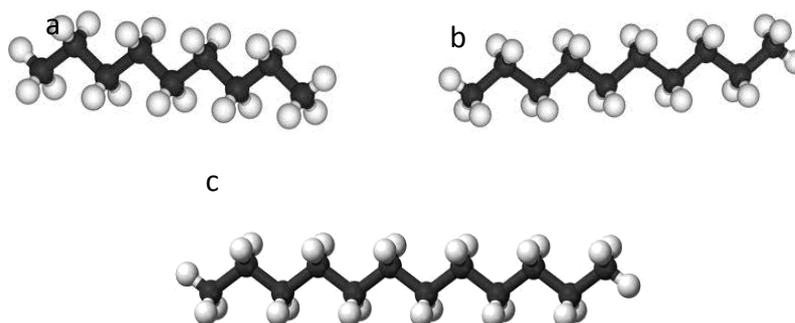
O óleo diesel deve satisfazer uma ampla gama de tipos de motores, mesmo sob condições de funcionamento e ciclos de trabalho diferente, bem como variações na tecnologia, as temperaturas e pressões do motor de sistema do combustível. Ao controlar as especificações e as propriedades, é possível satisfazer os requisitos de diferentes tipos de diesel. Diante disso, algumas diretrizes foram estabelecidas pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTMs), para a qualidade do combustível diesel, porém alguns países têm seus próprios padrões, que podem variar. (NIKANJAM, 1992).

A composição química, no que diz respeito à distribuição, é bastante variável nesses hidrocarbonetos, que podem ser classificados em quatro tipos: parafinas, ólefinas, naftênicos e aromáticos. A predominância de um ou outro tipo depende do petróleo que o deu origem e do processamento e tratamento que ele sofreu na refinaria (BAPTISTA, 2009).

A resolução da Agência Nacional do Petróleo, ANP, (2014) classifica o óleo diesel como um produto da destilação fracionada do petróleo, apresentando em sua composição principalmente hidrocarbonetos alifáticos de cadeia simples, não

ramificados, variando quando ao número de carbono entre C₉-C₂₈ (figura 3). Encontrando também em sua mistura altos teores de enxofre, que varia de 0,1% a 0,5%, como também produtos da combustão como CO, NO_x, SO_x material particulados, aldeídos, benzenos, cianetos, toluenos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo esses altamente letais aos ecossistemas e a biota neles presentes (Figura 4).

Figura 3: Exemplos de cadeia simples: a) Nonano; b) Decano; c) Dodecano.



Disponível em: [https://www. http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2013](https://www.http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2013)

Acesso em março. 2013.

Figura 4: Composição química dos hidrocarbonetos alifáticos de cadeia simples

C ₉ H ₂₀	Nonano	C ₁₆ H ₃₄	Hexadecano
C ₁₀ H ₂₂	Decano	C ₁₇ H ₃₆	Heptadecano
C ₁₁ H ₂₄	Undecano	C ₁₈ H ₃₈	Octadecano
C ₁₂ H ₂₆	Dodecano	C ₁₉ H ₄₀	Nonadecano
C ₁₃ H ₂₈	Tridecano	C ₂₀ H ₄₂	Icosano
C ₁₄ H ₃₀	Tetradecano	C ₂₁ H ₄₄	Heneicosano
C ₁₅ H ₃₂	Pentadecano	C ₂₂ H ₄₆	Docosano

Disponível em: [https://www. http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2013](https://www.http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2013)

Acesso em março. 2013.

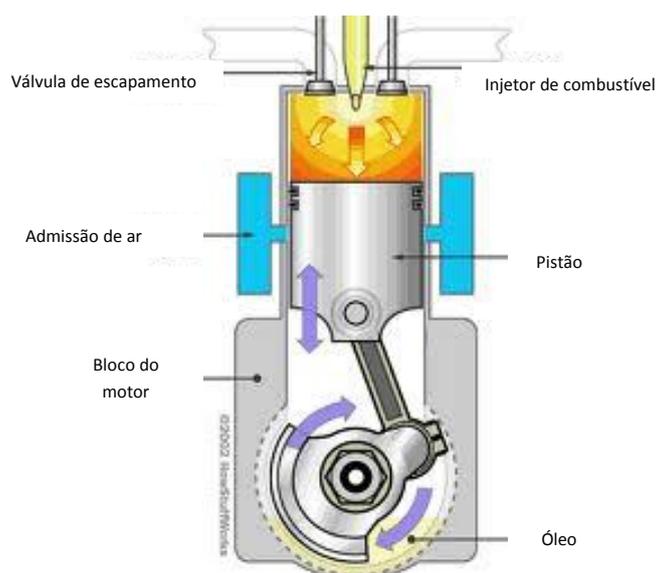
O óleo diesel, em suas variadas denominações, é o principal combustível comercializado no mercado brasileiro, sendo utilizado no transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, nas indústrias, na geração de energia, no maquinário para

construção civil, em máquinas agrícolas e locomotiva sem motores de combustão interna e ignição por compressão e empregados nas mais diversas aplicações. (PETROBRAS, 2014).

Segundo a ANP N° 65, de 09.12.2011 - DOU 12.12.2011, os diferentes tipos de diesel automotivo podem ser comercializados em três versões, diferindo pelo teor de enxofre, e pelas regiões onde são comercializados (PETROBRAS, 2014).

É um combustível líquido cuja principal característica é permitir sua queima à elevada taxa de compressão no interior da câmara de combustão. Em geral, quanto maior a taxa de compressão, maior será a eficiência na conversão da energia térmica em energia cinética. Essa característica em conjunto à baixa velocidade de combustão permite a ignição (por compressão), desse combustível, dispensando o uso de centelhas, velas de ignição e todo seu sistema elétrico (Figura 5). A simplicidade do motor diesel, seu regime de baixas rotações (queima lenta) e sua alta compressão (peças internas mais robustas) permitem seu uso em aplicações pesadas como furgões, ônibus, caminhões, embarcações marítimas, máquinas de grande porte, locomotivas, navios e aplicações estacionárias (geradores elétricos). A evolução dos projetos de motores diesel permitiu seu funcionamento em rotações maiores e o uso de peças mais leves, adequando sua utilização também aos automóveis de pequeno porte (carros de passeio) (ANP, 2014).

Figura 5: Esquema gráfico do motor a diesel.



Disponível em: <http://www.ebah.com.br>

Acesso agosto de 2014

O petróleo brasileiro possui, na média, um baixo grau API (*American Petroleum Institute*), escala que mede a densidade dos líquidos derivados do petróleo, criada pelo o que resulta em uma menor produção de diesel em comparação ao petróleo de alto grau API, comum no Oriente Médio. Em função dos tipos de aplicações, o diesel apresenta características e cuidados diferenciados para conservar sempre o mesmo ponto de fulgor (menor temperatura na qual um combustível liberta vapor em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável por uma fonte externa de calor) e não fugir dos padrões de ignição pré-estabelecidos por essa tecnologia. Porém, em alguns países, essa regra vem sendo descumprida e já é costume o governo permitir a mistura de outras substâncias ao óleo diesel. Apesar de, nos veículos motorizados a utilização de óleo diesel ser mais poluente para o meio ambiente devido à sua composição química, este oferece mais segurança na prevenção de incêndios. Isto porque este combustível é apenas inflamável pelo fogo quando encontrado em altas temperaturas ou altas pressões (ANP, 2014).

No Brasil é produzido apenas um tipo de diesel, porém são classificados em três tipos de graus, nº 1- D, nº 2- D e nº 4-D. Os dois primeiros são destilados e usados em motores diesel de alta velocidade e em motores estacionários de velocidades médias (BAPTISTA, 2011) (Tabela 1).

Tabela 1: Formas de comercialização do óleo diesel

SEGMENTO AUTOMOTIVO						
	Diesel Podium S-50	Extra Diesel S-50	Diesel Comum S-50	Extra Diesel	Diesel Comum	Diesel Inverno(*)
Presença de Biodiesel	Sim (5% em volume)					
Presença de Aditivos	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim (se extra diesel)
Enxofre Total máx. (ppm)	50			500 ou 1800 Conforme Resolução ANP N° 65, de 09/12/2011		500
Número de Cetano mín.	51	46		42		
Coloração	Incolor a amarelada (**) (Presença de corante vermelho no S1800 (***))					
Filtração Complementar nos postos	Sim	Não				

(*) Desenvolvido para alcançar o grau de desempenho necessário para operar nas regiões que apresentam temperaturas ambientes de até -5°C.

(**) Podendo alterar para marrom e alaranjada devido à coloração do biodiesel.

(***) A partir de 1º de julho de 2012 o corante vermelho deverá ser adicionado ao S500 e o S1800 passará a ter coloração incolor a amarelada.

Segundo a Petrobras (2014) o óleo diesel se diferencia pelos tipos de aplicações:

3.1.1 Diesel comum

É o óleo diesel mais simples, no recebe nenhum tipo de aditivo; possui uma coloração incolor a amarelada, podendo alterar para marrom e alaranjada devido à coloração do biodiesel. Se comercializado como diesel S1800 apresenta coloração vermelha; Apresenta teor de enxofre máximo de 500 ppm ou 1800 ppm, pode ser utilizado em qualquer veículo movido a óleo diesel; possui número de cetano de, no mínimo, 42.

3.1.2 Óleo diesel automotivo

O diesel automotivo é dividido em subgrupos que permitem sua adequação às necessidades ambientais e dos usuários. Dentre eles tem-se:

O óleo diesel rodoviário que é classificado como do tipo A (sem adição de biodiesel) e do tipo B (com adição de biodiesel). A Resolução da ANP nº 42 apresenta a seguinte nomenclatura para o óleo diesel rodoviário:

- a) Óleo diesel A S50 e B S50: combustíveis com teor de enxofre, máximo, de 50 mg/kg.
- b) Óleo diesel A S500 e B S500: combustíveis com teor de enxofre, máximo, de 500 mg/kg.
- c) Óleo diesel A S1800 e B S1800: combustíveis com teor de enxofre, máximo, de 1800 mg/kg."

3.1.3 Óleo diesel interior (máximo 0,35% de enxofre)

O óleo diesel interior é utilizado nas regiões com as maiores frotas em circulação e condições climáticas adversas a dispersão dos gases resultantes da combustão do óleo diesel, necessitando de maior controle das emissões.

3.1.4 Extra Diesel aditivado

O extra diesel aditivado é um óleo diesel que contém aditivos com objetivo de manter limpo o sistema de alimentação de combustível, reduzir o desgaste dos bicos injetores, reduzir a formação de sedimentos e depósitos, proporcionar melhor separação da água eventualmente presente no diesel e conferir maior proteção anticorrosiva a todo o sistema de alimentação.

A utilização continuada do Extra Diesel Aditivado garante uma pulverização mais eficaz do combustível na câmara de combustão, permitindo uma mistura mais homogênea do combustível com o ar, melhorando o rendimento do motor, evitando o desperdício de óleo diesel e reduzindo as emissões, contribuindo para uma melhor qualidade do ar.

3.1.5 De referência (diesel padrão)

O chamado óleo diesel de referência é produzido especialmente para as companhias montadoras de veículos a diesel, que o utilizam para a homologação de motores nos ensaios de consumo, desempenho e de emissões.

3.1.6 Óleo diesel marítimo

Também ocorrem subdivisões no caso do óleo diesel marítimo de forma a se dispor da qualidade requerida pelo usuário. São encontrados os seguintes tipos, comercializados no país e/ou destinados à exportação:

3.1.7 Marítimo comercial

Utilizado em embarcações marítimas, difere do óleo diesel automotivo comercial apenas na necessidade de se especificar a característica de ponto de fulgor relacionada à maior segurança deste produto em embarcações marítimas. Para o óleo diesel marítimo o ponto de fulgor é fixado em um valor mínimo de 60°C.

3.1.8 Especial para a Marinha / Ártico

O tipo Especial para a marinha e Ártico são produzidos para atender necessidades militares e apresentam maior rigidez quanto às características de ignição, de volatilidade, de escoamento a baixas temperaturas e de teor de enxofre.

3.2 PROPRIEDADES

3.2.1 Número de Cetano

Cetano é um hidrocarboneto parafínico (alcano) usado como padrão na avaliação das propriedades do diesel (o número de cetano), é um dos mais comuns indicadores da qualidade desse combustível. Ele mede a capacidade do combustível de entrar em autocombustão quando injetado no motor

A qualidade de ignição do diesel pode ser medida pelo seu número de cetano (NC) ou calculado pelo índice de cetano (IC). O número de cetano é obtido através de um ensaio padronizado do combustível em um motor mono-cilíndrico, onde compara-se o seu atraso de ignição em relação a um combustível padrão com número de cetano conhecido.

O índice de cetano é calculado através das correlações baseadas em propriedades físicas do combustível, rotineiramente determinadas. Esse índice é função do ponto de destilação médio (T 50%) e da densidade, apresentando boa correlação com o número de cetano.

3.2.2 Densidade

Indica a quantidade de massa por unidade de volume do combustível que é injetada no motor. Como a bomba injetora alimenta o motor com volumes constantes para cada condição de operação, variando-se a densidade, varia-se a massa de combustível injetada. Valores acima desta, causam um enriquecimento da mistura ar/combustível, provocando o aumento das emissões de particulados, monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos. Por outro lado, a variação para valores muito baixos, acarreta perda de potência e problemas de dirigibilidade.

3.2.3 Teor de Enxofre

Os petróleos contêm compostos de enxofre, muito dos quais são removidos pelo refino. Os óxidos de enxofre formados pela combustão do óleo diesel podem ser descarregados para a atmosfera ou se transformar em ácidos na câmara de combustão.

O enxofre é um poluente em potencial presente na composição do óleo diesel, que possui grande importância econômica, uma vez que é o combustível mais utilizado no Brasil abastecendo principalmente os veículos de grande porte responsáveis pelo transporte público e cargas terrestres como também embarcações marítimas. Entretanto, este combustível emite muitos poluentes. As altas concentrações de enxofre emitidas com a queima do diesel trazem diversos prejuízos não só para o motor dos veículos, mas também para o meio ambiente e para a saúde das pessoas (SILVA, 2013).

Esse composto, enxofre, é um ametal e pode ser encontrado na sua forma livre na natureza. Em seu estado fundamental, à temperatura ambiente, é encontrado no estado sólido, na forma de cristais amarelo-limão o que pode variar de acordo com o teor de impurezas presentes. É insípido e inodoro e ocorrem em diversos minerais de sulfito e sulfato (SHANG, 2013).

3.3 ACIDENTES

A forte industrialização e o desenvolvimento econômico no Brasil têm aumentado a demanda de recursos, de produção e de tecnologia, fazendo com que o meio ambiente seja muito impactado. Em contrapartida, a preocupação com o meio ambiente tem aumentado de forma significativa, o que gera diversos estudos de controle

de impactos ambientais, recuperação de áreas degradadas e contaminadas (Gonçalves 2014).

As contaminações dos solos e das águas subterrâneas trouxeram grandes preocupações nas últimas três décadas em diversos países, principalmente os Estados Unidos e na Europa. Esse problema ambiental torna-se mais grave para centros urbanos. No Brasil a empresa CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo paulista, classifica área contaminada como sendo uma área, local ou terreno onde há comprovadamente poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados ou até mesmo naturais. Nessa área, os contaminantes ou poluentes podem concentrar-se no solo, nos sedimentos, nas rochas ou, de forma geral, nas zonas não saturadas e saturadas, além de poderem concentrar-se nas paredes, nos pisos e nas estruturas de construções (CETESB, 2014).

A contaminação dos sedimentos marinhos costeiros por hidrocarbonetos representa uma preocupação quanto à qualidade de segurança desses referidos ambientes (ONWURAH *et al.*, 2007).

Durante a produção e transporte de petróleo bruto, operação inadequada e vazamento podem resultar em contaminação do solo com hidrocarbonetos de petróleo. Contaminações essas que podem provocar impactos ambientais significativos e apresentar riscos para a saúde humana (US EPA, 2010).

Contaminação por hidrocarbonetos na água do mar tem sido considerada uma preocupação internacional para o meio ambiente para a saúde. A exploração dos recursos de petróleo no mar, uso e transporte de produtos, resíduos de emissões e os acidentes de derramamentos de óleos frequentes, incorrem prejudiciais impactos para os ecossistemas marinhos (BAO *et al.*, 2012).

Udiwal e Patel (2010) afirmam que os riscos de contaminação ambiental durante a exploração, o transporte e a armazenagem de petróleo e seus derivados representa uma preocupação global. Esta contaminação é, principalmente, devido a derrames de recipientes de armazenamento e bombas ou fugas acidentais.

Suape é uma Zona portuária associado com a introdução de várias novas indústrias. A refinaria de petróleo terá a capacidade para processar 200 mil barris por dia, 60% de produção de óleo diesel. Conseqüentemente, o potencial de impactos

ambientais da refinaria e atividades relacionadas será significativo (CHAGAS-SPINELLI, 2012).

Indústrias de petróleo geram enormes quantidades de resíduos, sólido e lamas, alguns dos quais podem ser considerados perigosos devido à presença de compostos orgânicos tóxicos e metais pesados. Essas indústrias podem sofrer descargas acidentais, resultando em operações anormais ou fugas devido ao fluxo de ruptura de linha ou efluentes que podem transitar com água da chuva podendo ser de grande perigo para o ambiente. A indústria do petróleo está envolvida nos processos globais de exploração, extração, refino, transporte (muitas vezes com navios petroleiros e dutos), e produtos petrolíferos de marketing. Os produtos de maior volume dessas indústrias são óleo combustível e gasolina. O petróleo serve também como matéria-prima para muitos produtos químicos, incluindo produtos farmacêuticos, solventes, fertilizantes, pesticidas e plásticos. Os efeitos das águas residuais descarregadas acidentalmente por estas indústrias não são apenas devastadores para as pessoas, mas também para os animais, peixes e pássaros, afetando ecossistemas aquáticos. (UDIWAL e PATEL, 2010).

Vários acidentes, relacionados com o derramamento de óleo diesel foram reportados nos últimos anos (Anexo). Um dos acidentes que tomou proporções enormes foi o da plataforma P-36 na Bacia de Campos em 2001, que culminou em uma lista de desastres. No período que antecedeu o desastre da plataforma P-36, de 1998 a 2001, ocorreram 99 acidentes com 32 mortes e aproximadamente um milhão de litros de óleo foram derramados na Baía de Guanabara-RJ. (BENTO, 2005).

Na cidade do Rio Grande (RS) foram relatados vários problemas com vazamentos de petróleo e seus derivados, tais como: março de 2000, quando 18 mil litros de óleo cru vazaram em Tramandaí, no litoral gaúcho, enquanto eram transferidos de um navio petroleiro para o Terminal Almirante Soares Dutra (Tedut), da Petrobras, (disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano> - acesso dia 20 de janeiro de 2013); em março de 2001, no Porto de Rio Grande (RS), uma barcaça derramou 430L de óleo combustível, contaminando as águas do canal e provocando a morte de peixes (disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano> - acesso dia 20/01/2013); nos meses de junho, setembro e dezembro de 2004, derrame de óleo OCMAR, da embarcação Guarapuava, quando em operação de descarga, no terminal da TRANSPETRO – Rio Grande (BENTO, 2005); esse autor também relata que óleo queimado foi derramado no Arroio Carahá, afluente da Lagoa dos Patos, além de uma mancha de óleo que foi detectada no canal de navegação do porto de Rio Grande (RS).

Em 2012 um vazamento de 15 mil litros de óleo diesel ocorreu no dia 06 de setembro na praia de Maresias, em São Sebastião, no Litoral Norte de São Paulo (Figura 6). O acidente ocorreu depois que um caminhão da Petrobras tombou na Rodovia Doutor Manoel Hyppolito Rego, em São Paulo, interditando 800 metros da praia de Maresias, parte do óleo vazado atingiu as areias da praia e as águas do mar (Jornal G1. Disponível em: <http://g1.globo.com/sp/vale-do-paraiba-regiao/noticia/2012/09/vazamento-de-oleo-iesel-> Acesso em 10 de janeiro de 2014).

Figura 6: vazamento de óleo na praia de Maresias.



Disponível em: Jornal Imprensa Livre <http://www.cetesb.sp.gov.br/noticiasdatarde>

Acesso: 15 de fevereiro de 2014

Outro derrame, com cerca de 40 mil litros de óleo diesel, ocorreu após um acidente, atingindo Ribeirão Lindóia, em Londrina, no norte do Paraná (Figura 7). O acidente ocorreu no dia 19 de junho de 2012, no pátio ferroviário da América Latina Logística (ALL), em Londrina. Uma locomotiva e um vagão carregado com o óleo diesel descarrilou e o produto vazou (Jornal G1, Disponível em: <http://g1.globo.com/parana/noticia/> Acesso em; 10 jan. 2014).

Todos esses compostos, que entraram em contato com o meio ambiente, são produtos tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e/ ou teratogênicos.

Figura 7: Vazamento de óleo diesel, atingindo Ribeirão Lindóia, em Londrina, no norte do Paraná.



Disponível em: jornal G1 <http://g1.globo.com/sp/vale-do-paraiba>

Acesso: 15 de fevereiro de 2014

A revista brasileira, Exame.com listou em 2010 os 10 maiores acidentes causados por navios petrolíferos. Segundo a revista nos últimos 70 anos, ocorreram mais de 80 acidentes de média e alta gravidade o qual lançaram nos mares e oceanos cerca de 7,4 bilhões de litros de petróleo - o correspondente ao volume de quase 3000 piscinas olímpicas. Os dez maiores desastres respondem por 68% desse total.

1- Guerra do Golfo, Kuwait, Golfo Pérsico (janeiro/1991) Volume: 1 milhão e 360 mil toneladas (753 piscinas olímpicas) Considerado o pior vazamento de petróleo da história, porém não foi acidental, mas deliberado. Esse acidente causou enormes danos à fauna no Golfo Pérsico. Forças iraquianas abriram as válvulas de poços de petróleo e oleodutos ao se retirarem do Kuwait.

2- Ixtoc I, Campeche, Golfo do México (junho/1979) Volume: 454 mil toneladas (251 piscinas olímpicas) A plataforma mexicana Ixtoc 1 se rompeu na Baía de Campeche, derramando petróleo no mar. A enorme maré negra afetou, por mais de um ano, as costas de uma área de mais de 1.600 km².

3- Poço de petróleo Fergana Valley, Uzbequistão (março/1992) Volume: 285 mil toneladas (158 piscinas olímpicas) um poço, no Vale da Fergana explodiu, afetando uma das áreas mais densamente povoadas e agrícolas da Ásia Central.

4- Atlantic Empress, Tobago, Caribe (julho/1979) Volume: 287 mil toneladas (159

piscinas olímpicas). Durante uma tempestade tropical, dois petroleiros colidiram próximos à ilha caribenha de Tobago. O acidente despejou milhões de litros de petróleo bruto no mar.

5- Nowruz, Irã, Golfo Pérsico (fevereiro/1983) Volume: 260 mil toneladas (144 piscinas olímpicas). Durante a Primeira Guerra do Golfo, um tanque colidiu com a plataforma de Nowruz causando o vazamento de 1500 barris de petróleo por dia.

6- ABT Summer, Angola (maio/1991) Volume: 260 mil toneladas (144 piscinas olímpicas). O petroleiro Libéria ABT Summer explodiu na costa angolana, milhões de litros de petróleo vazaram para o Oceano Atlântico, afetando a vida marinha.

7- Castillo de Bellver, África do Sul (agosto/1983) Volume: 252 mil toneladas (139 piscinas olímpicas). Depois de um incêndio a bordo, seguido de explosão, o navio espanhol rachou-se ao meio, liberando cerca de 200 milhões de litros do óleo na costa de Cape Town, na África do Sul.

8 - Amoco Cadiz, França (março/1978) Volume: 223 mil toneladas (123 piscinas olímpicas) O Amoco Cadiz rompeu-se ao meio perto da costa noroeste da França. O vazamento matou milhares de moluscos e ouriços do mar.

9 - M T Haven, Itália (abril/1991) Volume: 144 mil toneladas (79 piscinas olímpicas) O Petroleiro, o navio gêmeo do Amoco Cadiz explodiu e naufragou próximo da costa de Gênova, a poluição na costa mediterrânea da Itália e da França se estendeu por 12 anos seguintes.

10 - Odyssey, Canadá (setembro/1988) Volume: 132 mil toneladas (73 piscinas olímpicas) O poço petrolífero localizado na província canadense de New founland explodiu durante uma operação de perfuração da plataforma americana Odyssey. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/mundo/noticias/10-maiores-acidentes-petroliferos-historia-556774>. Acesso 17 de novembro de 2014.

O Brasil hoje demonstra uma maior preocupação quanto ao meio ambiente, há inúmeros mecanismos legais que visam assegurar a proteção ambiental, mas infelizmente esses mecanismos por si só não são capazes de acabar com a degradação desenfreada dos recursos naturais (ABBAS, 2003).

Para proteger o meio ambiente é necessário que o desenvolvimento seja de forma sustentável, que o manejo dos recursos naturais seja feito com responsabilidade e consciência, preservando assim para as futuras gerações. Além do correto manejo, os resíduos gerados pelas atividades antropogênicas devem ser tratados e dispostos adequadamente (CARNEIRO, 2010).

Os acidentes industriais ocorridos nos últimos anos contribuíram de forma significativa para despertar a atenção das autoridades governamentais, no sentido de buscar mecanismos para a prevenção desses episódios que comprometem a segurança das pessoas e a qualidade do meio ambiente.

Estes impactos das atividades humanas, principalmente a contaminação do solo por substâncias químicas, e a mobilidade ou transporte dessas substâncias podem contribuir para a degradação dos ecossistemas e resultar na contaminação da atmosfera, do solo e da água, favorecendo o aquecimento global. Sendo assim, verifica-se a dimensão do problema, a necessidade de políticas públicas para a definição de estratégias e a criação de instrumentos de gestão relacionados à contaminação do solo e seus efeitos diretos ou indiretos à saúde humana e ao ambiente (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Por esta razão, um aumento da atenção está voltado para a pesquisa de novas estratégias de tecnologias amigas e ambientais a ser aplicada para a remediação de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos. Entre essas estratégias, encontra-se a biorremediação.

4. BIORREMEDIAÇÃO

Nos últimos anos, novas tecnologias empregando micro-organismos e outros organismos vêm sendo pesquisadas para remover hidrocarbonetos de locais contaminados (KHAN, 2013).

Biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de micro-organismos, ou suas enzimas para degradar compostos poluentes. Utiliza-se além dos micro-organismos, plantas verdes ou suas enzimas para que o ambiente contaminado retorne a sua condição original, para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em menos ou não tóxicas. O processo de biorremediação se dá pelo fato dos micro-organismos utilizarem carbono orgânico como fonte de alimentação. Convertido assim os contaminantes em CO₂ e H₂O. A biodegradação

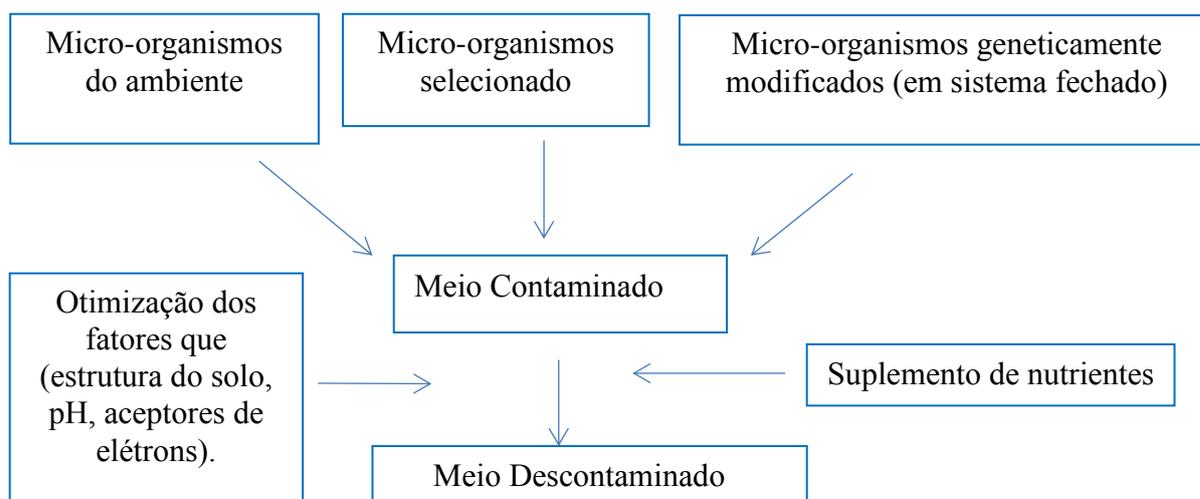
refere-se à transformação de moléculas xenobióticas por organismos. A degradabilidade é vista como um atributo desejável, pois a persistência prolongada leva à contaminação de outros ambientes e também de águas subterrâneas (EMBRAPA. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=227&func=unid> Acesso dia 12 de jan. 2013).

A biorremediação em pequena escala, é um processo natural, uma vez que micro-organismos e plantas convivem há milhões de anos com compostos orgânicos e metais, coexistindo em ambiente de limitação ou de excesso. Para a indústria, porém, não tem 40 anos e, apesar de todo este tempo, continua evoluindo com o desenvolvimento de novas tecnologias. Pode ser definida atualmente, de forma mais ampla, como a aplicação de processos biológicos à conversão, atenuação ou eliminação de contaminantes ambientais, incluindo não só os micro-organismos, mas também as plantas, enzimas e a interação entre eles. Muitos autores definem a biorremediação de uma forma mais realística como a resposta biológica ao abuso do ambiente (JACQUES *et al.*, 2006).

Biorremediação é um processo do qual se utilizam organismos na remoção de contaminantes tóxicos do meio ambiente. É técnica bastante promissora, pois visa à minimização dos impactos antrópicos e à re-estruturação dos habitats naturais. Essa tecnologia tem sido alvo de inúmeras pesquisas, pois oferece uma maior segurança, uma menor perturbação ao meio ambiente e também é uma ferramenta eficiente a custos baixos. A biorremediação possui grande aplicabilidade e a otimização do seu processo depende das condições ambientais, do tipo de contaminante e da técnica empregada. É uma inovadora que merece atenção e incentivo nos processos de recuperação ambiental (CARNEIRO, 2010).

Existem vários métodos para retirada de substâncias recalcitrantes do meio ambiente. As opções vão desde a construção de barreiras físicas, lavagem ou ventilação do solo contaminado, e sua destruição por incineração ou por biorremediação. Esta última utiliza-se agentes biológicos, operando com menor custo e mais rapidamente (MALAJOVICH, 2011). Figura 8.

Figura 8: Estratégias de biorremediação.



Fonte: Biotecnologia, 2011. Capítulo 11: Biotecnologia e meio ambiente.

Métodos usando barreiras físicas e dispersantes químicos para resolver o problema de contaminação são muito caro e limitado em eficácia. Por isso têm aumentado a expectativa para inovar tecnologias utilizadas na remoção de contaminantes de petróleo (BAO *et al.*, 2012).

Até a data, muitos métodos físicos e químicos têm sido usados em todo o mundo para remoção de petróleo e seus derivados, porém muitos deles são muito caros para serem aplicados a uma escala completa e em geral, movem apenas o contaminante de um local para outro. Por isso os processos que utilizam a degradação natural, tornaram-se, nos dias atuais, a ferramenta de escolha para remediação dos ambientes contaminados por hidrocarboneto (KHAN *et al.*, 2004; RAYNER *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009).

Outros autores (MARGESIN e SCHINNER, 2001; WANG *et al.*, 2008), também afirmam que a tecnologia de biorremediação, para limpar hidrocarbonetos presentes no solo é considerada benéfica comparada com métodos físicos e químicos, devido à sua eficácia de custo juntamente com baixo impacto ambiental.

Segundo Seabra, (2006) a biorremediação é um processo que utiliza organismos (bactérias, fungos e vegetais), na degradação de determinados compostos que afetam o ambiente. Na última década têm sido identificados e caracterizados diferentes espécies de fungos filamentosos utilizados nos processos de biorremediação (OLIVEIRA e

LEMOS, 2007), considerando sua capacidade de crescer sob condições ambientais de estresse (MOLLEA *et al.*, 2005).

Baird (2002) definiu a biorremediação como “o uso de micro-organismos vivos utilizados para degradar ou eliminar resíduos ambientais”. Zobell (1946) afirmou que certos micro-organismos eram capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. Ele também verificou que estes organismos estão amplamente difundidos na natureza e que a natureza do óleo e as condições ambientais eram altamente importantes no seu comportamento.

A técnica de remediação microbiana tem desempenhado um importante papel no tratamento de contaminantes de petróleo. Comparado com os métodos convencionais, que têm contado com trabalho humano, descontaminação microbiana tem a vantagem de baixo custo e alta eficiência sem poluição secundária (BEOLCHINI *et al.*, 2010; BRODKORB e LEGGE, 1992; VOGEL, 1996; SOLANO-SERENA *et al.*, 2004; TOWNSEND *et al.*, 2004; HII *et al.*, 2009; MOHAJERI *et al.*, 2010.; MURADO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; WARDLAW *et al.*, 2011; RIZZO, 2014).

Bao (2012) observou que os resultados dos experimentos nos locais de laboratório e de campo demonstraram a viabilidade de biorremediação no tratamento em campo do petróleo.

A biorremediação é uma tecnologia que pode ser utilizada nos mais variados fins, como por exemplo: na remoção de toxinas de poços subterrâneos, na descontaminação dos solos, em derrames químicos, locais de lixo tóxicos, derrames de óleo, degradação de herbicidas, decomposição de substâncias orgânicas e inorgânicas, desentupimento de bueiros entre outros (ANDRADE *et al.*, 2010). A utilização de micro-organismos indígenas para degradar hidrocarbonetos de petróleo é importante e tem sido bem documentada em ambientes terrestre e aquáticos (WANG *et al.*, 2008).

A interação entre as bactérias e hidrocarbonetos tem sido pesquisada há décadas por um grande número de pesquisadores (BACHOON *et al.*, 2001; SEI *et al.*, 2003; MCKEW *et al.*, 2007; CHRISTOPH *et al.*, 2009; OBAYORI *et al.*, 2009).

Hao e Lu (2009) Nie *et al.*(2010) observaram em seus estudos que o tratamento biológico de petróleo que ocorre no meio ambiente marinho é um processo complexo. A extensão de óleo degradado é frequentemente limitada por fatores ambientais (ATLAS e BARTHA, 1972). Como a condição experimental torna-se cada vez mais próximo do ambiente marinho, fatores incluindo o estado físico do óleo, salinidade, pH, oxigênio

dissolvido (OD), temperatura e competição com outras comunidades microbianas podem tornar limitante a eficácia dos agentes de biorremediação (BAO, 2012).

Biorremediação é o principal mecanismo para limpar poluentes de petróleo sob condição de atenuação natural (KRISTENSEN *et al.*, 2010).

Vários são os micro-organismos responsáveis por diminuir a contaminação do ambiente, tais como as bactérias, os fungos e as leveduras. Embora muitos destes tenham a necessidade nutricional igual a nossa, outras metabolizam substâncias como: metais pesados, petróleo, enxofre, gás nitrogênio, xenobióticos, mercúrio e até mesmo os PCBs (bifenilpoliclorados) (ABBAS, 2003; ANDRADE *et al.*, 2010).

Para que a biorremediação seja eficiente é necessário que o poluente seja transformado metabolicamente por algum micro-organismo, os produtos finais sejam seguros e as condições ambientais favoreçam a atividade microbiana. O processo deve ter uma relação custo/benefício satisfatória (MALAJOVICH, 2011).

Fatores ambientais, biodisponibilidade dos poluentes, propriedades intrínsecas estruturais de composto individual determinam o grau e velocidade de degradação (LEAHY e COLWELL, 1990; OKOH, 2006; SCHERR *et al.*, 2007; EHLERS *et al.*, 2010).

Alguns autores defendem que, para que ocorra a degradação se aplica uma relação inversa entre o peso molecular e a degradabilidade de hidrocarbonetos (PETERS *et al.*, 2005; SETTI *et al.*, 1993; SCHERR *et al.*, 2012). A maioria dos estudos concorda em uma sucessão distinta da degradação microbiana dos grupos estruturais, com ordem decrescente de biodegradação: n-alcanos > i-alcanos > compostos aromáticos de baixos pesos moleculares > aromáticos de alto peso molecular e alcanos cíclicos (LEAHY e COLWELL, 1990; WANG e FINGAS, 2003). Esta sucessão reflete em progressivas alterações da composição do petróleo no campo da química, isto é, o desenvolvimento de “impressões digitais” de hidrocarbonetos (WANG e FINGAS, 2003; ROQUES *et al.*, 1994).

A tabela 2 lista as principais classes de contaminantes, suas aplicações e eficácia da aplicação da biorremediação.

Tabela 2: Aplicabilidade da biorremediação na remoção de derivados do petróleo

Classe do Contaminante	Frequência	Evidência de sucesso	Limitações
1. Hidrocarbonetos e derivados			
Gasolina e óleo	Muito frequente	Fácil, biorremediação aeróbia e anaeróbia.	Formação de fase livre e leve (LNAPL).
Poliaromáticos (naftaleno e antraceno)	Comum	Biorremediação aeróbia sob condições específicas.	Forte absorção em superfície.
Álcool, acetona e éster	Comum	Fácil remediação aeróbia e anaeróbia.	
Éter	Comum	Biorremediação aeróbia e anaeróbia sob condições específicas.	
2. Halogenados alifáticos			
Altamente clorados – PCE, TCE	Muito frequente	Cometabolizado em condições anaeróbias e aeróbias em casos específicos	Forma fase livre densa (DNAPL).
Fracamente clorados – VC	Muito frequente	Biorremediação aeróbia em condições específicas e cometabolizado em condições anaeróbias.	Forma fase livre densa (DNAPL).
3. Halogenados aromáticos			
Altamente clorados (hexaclorobenzeno Pentaclorofenol)	Comum	Biorremediação aeróbia sob condições específicas e cometabolizado em condições anaeróbias.	Absorve em superfície. Forma fase líquida (NAPL) e sólida (NASP).
Fracamente clorados – cloro e diclobenzeno	Comum	Fácil biorremediação aeróbia.	Forma fase líquida (NAPL).
4. BifenilasPolicloradas			
Altamente clorados	Pouco frequente	Cometabolizado em condições anaeróbias.	Absorve fortemente em superfície.
Fracamente clorados	Pouco frequente	Biorremediação aeróbias sob condições específicas.	Absorve fortemente em superfície.
Nitroaromáticos	Comum	Biorremediação aeróbia e anaeróbia.	
5. Metais			
Cr, Cu, Ni, PB, Hg, Cd, Zn etc	Comum	Processos microbianos afetam sua solubilidade e reatividade.	Disponibilidade altamente variável, controlada pelas condições químicas.

Fonte: Adaptado de CETESB – GTZ, 2014

A terra possui um vasto recurso genético capaz de solucionar problemas de limpeza do meio ambiente (MADIGAN e MARTINKO, 2006).

Biorremediação de poluição causado por óleo é uma forma eficiente de resolver o problema. O petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos contendo n-alcanos, alcanos ramificado, cicloalcanos, compostos aromáticos, isoprenóides, asfalteno e muitos outros. Diversos micro-organismos têm o potencial de usar diferentes hidrocarbonetos como fonte de energia. Verificou-se que de 70 gêneros, existem mais do que 200 tipos de micro-organismos, que pode oxidar um ou mais hidrocarbonetos de petróleo (BAO *et al.*, 2012).

Jaques *et al.* (2006) observaram que os processos da biorremediação utilizam a competência fisiológica dos micro-organismos, nativos ou introduzidos, com potencial degradador, associados muitas vezes a adição de nutrientes, principalmente Nitrogênio e Fósforo.

Um estudo realizado pela CETESB (2011) observou que diversos processos físicos, químicos e biológicos têm sido utilizados para descontaminação de 1275 áreas impactadas apenas no estado de São Paulo, como solo e águas subterrâneas, porém a biorremediação ainda é uma tecnologia pouco utilizada no Brasil.

Dentro da biorremediação existem alguns tipos de tratamento para biodegradar o poluente, podendo ser:

“*In situ*” (Latim = no seu lugar de origem) – o tratamento é realizado no seu próprio local de origem, não há necessidade de remoção do material. Isso evita custos e distúrbios ambientais associados ao movimento do material contaminado para o local de tratamento (JACQUES *et al.*, 2007; MARIANO, 2006).

“*ad situ*” – os resíduos, solo, são levados a um local próximo a área impactada;

“*ex situ*” (Latim =fora do lugar de origem) – ocorre o transporte do resíduo até um local adequado para remediação, distante da fonte poluidora. (ZHANG *et al.*, 2000; MENEGHETTI, 2007). É necessária para evitar o alastramento do contaminante e é muito utilizada em contaminações de cursos de água e lençóis freáticos (ALEXANDER, 1999 apud SANTOS *et al.*, 2007). As técnicas de biorremediação “*ex situ*” produzem um resultado mais rápido, pois são mais fáceis de serem controladas e apresenta uma maior versatilidade para o tratamento de vários tipos de contaminantes (ABBAS, 2003).

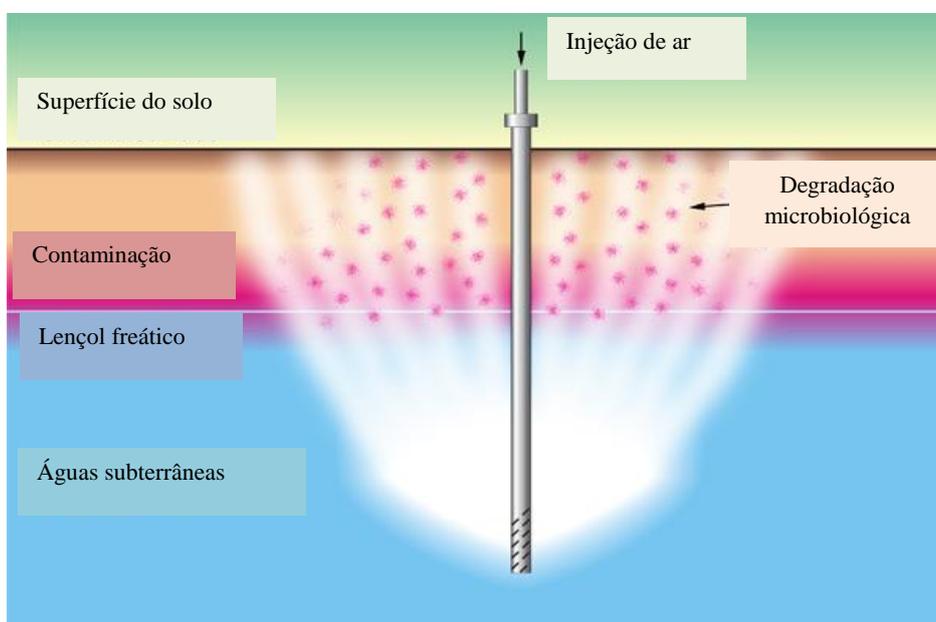
Entre os tipos acima citados algumas técnicas são apresentadas, destacando-se:

4.1 Biosparging– é uma técnica de Biorremediação *in situ* onde ocorre a injeção de ar na zona não saturada, proporcionando o fornecimento de oxigênio aos microorganismos aeróbios para degradar os compostos orgânicos. Esta é uma tecnologia considerada promissora, pois a disponibilidade de oxigênio molecular tem um grande efeito na biodegradação de vários compostos (MARIANO, 2006; MENEGHETTI, 2007) (Figura 9).

Este processo tem como vantagem a minimização da extração de vapores, a utilização de equipamentos de fácil instalação e aquisição, a atuação em locais de difícil acesso e o pequeno impacto na área contaminada (CETESB, 2014).

4.2 Bioventing – semelhante ao Biosparging é uma técnica onde também se utiliza o oxigênio para ativar a microbiota aeróbia presente em regiões subterrâneas para degradar compostos orgânicos absorvidos no solo e em zonas não saturadas, diferenciando da técnica de Biospargin, pois o fluxo de ar é fornecido em baixas taxas para impedir a volatilização de alguns contaminantes (KIRTLAND e AELION, 2000) (Figura 10).

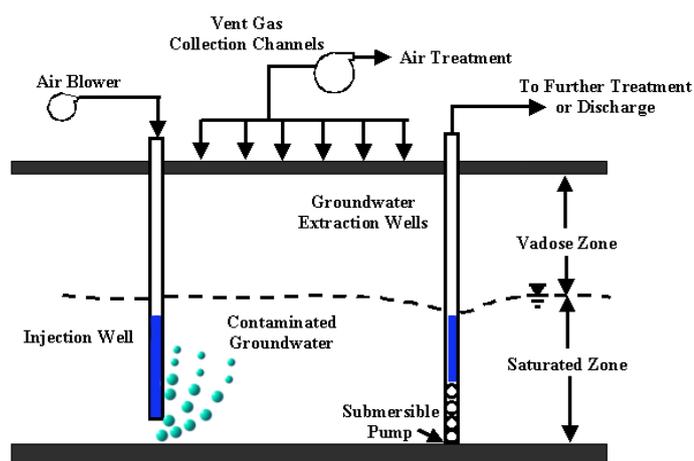
Figura 9: Biosparging



Disponível em: <http://www.iegtechnology.com/images/SAC>

Acesso em novembro de 2014

Figura 10: Bioventing.



Disponível em: <http://www.iegtechnology.com/images/SAC%20Bioventing>

Acesso em novembro de 2014.

4.3 Biorreatores – estratégia *ex situ* em que necessita da remoção e transporte do material contaminado para um local adequado, por ser tratar de um sistema fechado apresenta um maior controle das condições abióticas e bióticas, podendo ser melhorado com a adição de nutrientes, de micro-organismos, oxigênio e umidade adequados (KHAN *et al.*, 2004) (Figura 11).

Figura 11: Biorreatores.



Disponível em: <http://www.br.com.br/wps/portal>. Acesso em novembro de 2014.

4.4 Atenuação natural ou Biorremediação intrínseca – técnica de Biorremediação *in situ* de baixo custo, sem que haja acréscimo de nutrientes ou adequação de qualquer condição ambiental. Os micro-organismos presentes no local passam a utilizar o

composto orgânico poluente como fonte de carbono, reduzindo assim sua concentração com o tempo (MENEGHETTI, 2007). Depende de três eventos:

- ✓ Ocorrência de biotransformação dos contaminantes por populações indígenas;
- ✓ Sorção do contaminante com a matriz ou fases minerais que o tornam compostos menos biodisponíveis e menos tóxicos aos ecossistemas.
- ✓ Perda da toxicidade por volatilização ou diluição.

A remediação natural não se trata de uma alternativa sem nenhuma ação de tratamento, mas sim uma forma de minimizar os riscos para a saúde humana e para o meio ambiente (CORSEUIL e MARINS, 1998 -apud MARIANO, 2006).

A biorremediação passiva por ser uma técnica que depende exclusivamente dos processos naturais, é uma técnica muito lenta, o que exige o uso conjunto de outras técnicas e o monitoramento do local por um longo período de tempo (JACQUESN *et al.*, 2007).

4.5 Bioestimulação – semelhante à atenuação natural, a diferença é que são adicionados ao sistema nutrientes orgânicos e inorgânicos que visam estimular a atividade microbiana como Nitrogênio e Fósforo, para estabelecer relações de C:N:P eficientes para o aumento das populações microbianas, aumentando significativamente as taxas de degradação dos contaminantes orgânico do ambiente (EVANS *et al.*, 2004; TRINDADE *et al.*, 2005; JACQUES *et al.*, 2006).

4.6 Bioaugmentação – estratégia que ajuda a melhorar a capacidade de uma matriz contaminada removendo os contaminantes por meio de adição de uma linhagem isolada ou de consórcios microbianos. O inóculo utilizado pode ser do próprio local contaminado (autóctone) ou de outros ambientes impactados (exógeno) (FANTROUSSI e AGATHOS, 2005). O bioaumento é um processo de importante utilização em locais contaminados, principalmente naqueles que não possuem ou possuem em pequenas quantidades as populações de micro-organismos necessários para que o processo de biodegradação ocorra (MARIANO, 2006).

Sendo assim todos os fatores bióticos e abióticos do sistema são responsáveis pelo sucesso da biodegradação, podendo reduzir a mobilidade, a massa, os riscos do contaminante no ambiente impactado (FRANKENBERGER e KARLSON, 2004; HINCHEE *et al.*, 1995).

Para que o processo de biorremediação ocorra de forma eficiente, os micro-organismos devem estar ativos e saudáveis. Para isso algumas medidas biocorretivas devem ser adotadas; estas medidas visam aumentar a população microbiana proporcionando uma condição ambiental ótima para o seu desenvolvimento. Essas medidas podem ser aplicadas em condições aeróbias (na presença de oxigênio) ou anaeróbias (na ausência de oxigênio) (ABBAS, 2003).

Os poluentes orgânicos possuem uma estrutura química que influencia diretamente na habilidade dos micro-organismos metabolizarem estas moléculas, principalmente na biodegradação (MARIANO, 2006).

4.7 Compostagem – segundo Fernandes e Silva (1999), “a compostagem pode ser definida como uma bioxidação aeróbia exotérmica de um substrato orgânico heterogêneo, no estado sólido, caracterizado pela produção de gás carbônico, água, liberação de substâncias minerais e formação de matéria orgânica estável”.

5. CONDIÇÕES QUE PODEM INTERFERIR NOS PROCESSOS BIODEGRADATIVOS

Quando o petróleo entra em contato com água do mar, vários processos físico-químicos e biológicos são passíveis de ocorrer e a intensidade de cada um deles varia ao longo do tempo, existem alguns processos que ocorrem com o petróleo, tais como: espalhamento, evaporação, dissolução, dispersão, emulsificação, fotoxidação, sedimentação e biodegradação do petróleo Clark (1989) e Marques Jr. (2002).

O sucesso da biorremediação está ligado diretamente a uma ampla compreensão das condições físicas, químicas, biológicas e de uma minuciosa avaliação da aplicabilidade das técnicas “*in situ*” e “*ex situ*” (SANTOS *et al.*, 2007).

Segundo Rosa e Triguís(2005); Pereira e Lemos (2005), apud Meneghetti(2007), para que ocorra uma boa taxa de degradação alguns fatores devem ser considerados tais como:

- ✓ Presença do micro-organismo com capacidade metabólica;
- ✓ Disponibilidade do contaminante;
- ✓ Condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade microbiana;
- ✓ Disponibilidade de nutrientes;

- ✓ Umidade;
- ✓ Temperatura;
- ✓ pH;
- ✓ Concentração de minerais;
- ✓ Potencial redox;
- ✓ Natureza do contaminante;
- ✓ Características físicas e químicas dos ambientes contaminados.

5.1 pH

O pH é um fator que influencia no desenvolvimento dos micro-organismos, atuando como agente selecionador da microbiota. Em valores baixos, predominam fungos filamentosos e leveduras. Bactérias heterotróficas, em geral, preferem valores de pH próximos à neutralidade, o que corresponde a faixa entre 6,0 e 8,0 (GOMES, 2004). No processo de degradação, é necessário que o pH seja compatível ao crescimento dos micro-organismos.

5.2 Temperatura

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

5.3 Nutrientes

Por ser composto principalmente de hidrocarbonetos que podem servir como fonte de carbono, o óleo diesel, torna-se eficiente para o desenvolvimento dos micro-organismos. Entretanto, há necessidade de outros nutrientes como, o nitrogênio e o fósforo. O nitrogênio é indispensável à síntese protéica, um constituinte essencial às células, uma vez que é necessária a formação de aminoácidos e ácidos nucléicos, enquanto o fósforo é umas das peças-chave do mecanismo de acúmulo de energia a nível celular. As fontes de nitrogênio mais utilizadas nos protocolos de biorremediação são uréia, cloreto de amônio e nitrato de amônio. Existe também uma demanda por

micronutrientes, como: enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio. A disponibilidade desses elementos varia em diferentes ambientes e eles podem ser adicionados para estimular a biodegradação. No solo, o ajuste das relações C:N:P lista de figuras pode ser facilmente efetuado pela adição de fertilizantes, porém, em ambiente aquático, o ajuste dessas relações oferece maiores problemas, pois deve ser efetuado de forma criteriosa de modo a não ser dissipado na interface óleo-água (ROSATO, 1997).

O oxigênio também é necessário para o processo de biodegradação, pois os passos iniciais no catabolismo dos hidrocarbonetos envolvem a oxidação dos mesmos por oxigenases (FLOOGATE, 1984).

Por isso o estudo da biorremediação é de grande importância ambiental, econômica e social, uma vez que o processo consiste em degradar substâncias tóxicas do meio ambiente (CERQUEIRA E COSTA, 2006).

6. MICRO-ORGANISMOS AQUÁTICOS

Os micro-organismos podem ser encontrados praticamente em todos os lugares no nosso planeta, eles contribuem enormemente para a manutenção do equilíbrio entre os seres vivos e os compostos químicos do nosso ambiente (QIN *et al.*, 2012).

Micro-organismos halófilos estão adaptados às condições de elevada salinidade e requerem certa concentração de NaCl para o seu crescimento ótimo que forma um grupo altamente diverso pertencente Archaea, Bacteria e Eukarya (OREN, 2002).

Ulrich *et al.* (2009) afirmam que o teor de sal é o principal fator que afeta a biorremediação processo de petróleo em solo. A salinidade é um fator principal que afeta o crescimento microbiano (QIN *et al.*, 2012).

Diks *et al.* (1994), verificaram que a inibição do crescimento microbiano aumentou com o teor de sal mais elevado, enquanto que a degradação do substrato foi muito menos inibida pelo sal durante a degradação. Pesquisas mostraram que a inibição da decomposição orgânica foi geralmente encontrada com teor de sal aumentado em diversos processos biológicos de decomposição de petróleo (MILLE *et al.*, 1991; RHYKERD *et al.*, 1995; ULRICH *et al.*, 2009).

Os fungos são agora reconhecidos como uma parte integrante de comunidades microbianas indígenas, como halófilos eles podem crescer e se ajustar em toda a gama de salinidade, a partir de água doce para soluções quase saturada de NaCl (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2009; ZALAR *et al.*, 2005). Assim, algumas espécies fúngicas

como *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii*, e *Wallemia chthyophaga* foram isolados de ambientes natural hipersalino (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2009).

De acordo com Nunes (2008), a presença de substâncias químicas estranhas ao ambiente natural provoca um desequilíbrio físico-químico que, por sua vez, induzirá uma série de transformações nesse local até que seja atingida uma nova condição de equilíbrio. A biorremediação tem se mostrado como uma alternativa promissora na descontaminação do solo e da água.

Entre as formas de biorremediação cabe destacar a utilização de micro-organismos que sobrevivem no aquático ambiente contaminado, por ter sistemas enzimáticos capazes de digerir os poluentes alvos, ligeiramente diferentes de seus substratos normais. Esta propriedade, denominada metabolismo gratuito, possibilitou a descontaminação do Rio Savannah (Estados Unidos) de tricloroetileno (TCE), utilizado como desengordurante na fabricação de componentes de armas. Despejado no solo, o TCE contaminara as águas subterrâneas, causando um problema ambiental de grandes proporções (MALAJOVICH, 2011).

7. ENZIMAS NOS PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Os micro-organismos sintetizam inúmeros compostos de importância industrial, tais como vitaminas, antibióticos e enzimas. Dentre esses metabólitos, as enzimas têm sido utilizadas em diversos processos industriais, principalmente no processamento de produtos alimentícios (celulases e xilanaes) e despoluição ambiental (fenoloxidades) (Gray & William, 1975).

As enzimas oxigenases desempenham importante papel nas rotas de catabolismos de hidrocarbonetos em condições aeróbias. Essas pertencem a dos subgrupos: as monoxigenases e as dioxigenases.

As monoxigenases, uma classe de enzimas conhecidas como alcanohidroxilases catalisam a oxidação das cadeias mais frágeis dos hidrocarbonetos, os alcanos. A hidroxilação ocorre nas regiões terminais, subterminais ou biterminais de compostos alifáticos lineares e ramificados, alicíclicos, alquil-cicloalcanos ou terpenos, atuando na clivagem das ligações (VAN BEILEN e WITHOLT, 2004; VAN BEILEN e FUNHOFF, 2007).

As dioxigenases são enzimas presentes em micro-organismos sendo responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos, os quais são transformados pela inserção de dois átomos de oxigênio na molécula.

A introdução de enzimas específicas, principalmente do grupo das dioxigenases são importantes na fase inicial de oxidação do anel benzênico (GIBSON e LANGWALDT, 2000).

Algumas enzimas podem ser extraídas facilmente dos tecidos ou dos órgãos de seres vivos, a extração de enzimas de origem vegetal ou animal está sujeita à disponibilidade de terra e colheitas. Por isso, a tendência é substituí-las por outras de origem microbiana que, por serem obtidas mediante processos fermentativos em grande escala, garantem uma produção regular de qualidade constante (MALAJOVICH, 2011).

Considerando que a biodiversidade microbiana ainda começa a ser desvendada, assim como a arte de alterar suas vias metabólicas, existem grandes chances de se encontrar enzimas com propriedades diferentes que possibilitem o desenho de processos industriais inovadores.

As enzimas são insumos para outras indústrias, especialmente as de alimentos e bebidas, rações, detergentes, analíticas e farmacêuticas. Estima-se que o mercado global de enzimas poderá alcançar, em 2013, um valor aproximado de US\$ 7 bilhões/ano. Atualmente, o maior produtor é Novozyme, uma empresa pertencente ao grupo Novo (Dinamarca), que responde por 47% do mercado. A empresa mantém em funcionamento vários fermentadores de 80.000 l, contabiliza mais de 4.000 patentes e dedica a quase totalidade de seu orçamento de pesquisa e desenvolvimento à otimização de micro-organismos, produtos enzimáticos e tecnologia (MALAJOVICH, 2011).

Os micro-organismos podem crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz) ou sobre a superfície, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (MITCHELL *et al.*, 2006). O material sólido é insolúvel e age como suporte físico e como fonte de nutrientes, poderá ser um substrato sólido natural, como resíduos da agricultura, ou um suporte inerte, como poliuretano ou resinas poliméricas (FERNANDES, 2006 b).

Os fungos são de grandes importâncias para os processos biotecnológicos na área ambiental, sendo utilizados na biorremediação de ambientes contaminados por compostos químicos estranhos, por terem a capacidade de produzir peroxidases e fenoloxidasas. Essas enzimas vêm sendo avaliadas para tratamento enzimático de diferentes efluentes industriais (ALDERETE *et al.*, 2009; PASSOS *et al.*, 2009).

O equilíbrio ambiental está ligado a diversos fatores, incluindo o balanço nas cadeias alimentares, nas quais os microrganismos, principalmente os fungos, ocupam papel de destaque como decompositores. Esses organismos se nutrem por absorção, sendo capazes de produzir enzimas que os tornam aptos a utilizar como fonte de carbono e energia uma ampla gama de substratos, tanto de alto e baixo peso molecular. O processo tecnológico de biorremediação utiliza sistemas biológicos para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental por meio da degradação ou absorção de poluentes (SILVA e ESPOSITO, 2010).

8. REFERENCIAS

ABBAS, M., MARIOTTI,Z. A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola de Agricultura Luiz de Queiroz. 2003.

ALDERETE,L.G. S.; TALAMO, M.A.; IBANEZ, S.G.; PURRO, S.; AGOSTINI, E.; MIBAD,S.R.; MEDINA, M.I. Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidases and its application for phenol removal. *Journal of Biotechnology*. n. 139, p.273-279. 2009.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, São Paulo, v.35, n.3 – setembro. 2010.

ANP – Agência Nacional do Petróleo. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/> Acesso 20 de novembro de 2013.

ANP – Agência Nacional do Petróleo. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>, Acesso 03 de fevereiro de 2014.

ATLAS, R.M., BARTHA, R. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol.Bioeng*. 14, 309–318. 1972.

BACHOON, D.S., HODSON, R.E., ARAUJO, R.,. Microbial community assessment in oil-impacted salt marsh sediment microcosms by traditional and nucleic acidbased indices.*J.Microbiol.Methods* 30, 37–49. 2001

BAPTISTA, A.C.C. O derivado mais importante do Petróleo: o Óleo Diesel uma análise multidimensional. Monografia de Conclusão de Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Reservatórios Petróleo e Gás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Especialista. Rio de Janeiro, Universidade Católica de Petrópolis. 2009.

BAPTISTA, N.M.Q.; SANTOS, A.C.; ARRUDA, F.V.F.; GUSMÃO, N.B. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos, *Scientia Plena*, v.1,n.07,2011.

BAIRD, C.. *Química Ambiental*. Ed. Bookman. São Paulo-SP. p. 662. 2002.

BENTO, D.M. Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, dissertação de Mestrado Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica. 2005.

BRODKORB, T.S., LEGGE, R.L., Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar contaminated soils with *PhanerochaeteChrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3117–3121. 1992.

CARNEIRO, D.A.; GARIGLIO L.P. A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. *Revista Tecer - Belo Horizonte* – vol. 3, nº 4, maio 2010.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo <http://www.cetesb.sp.gov.br>/acesso dia 25 de fevereiro de 2014.

CERQUEIRA, V. S.; COSTA, J. A.V. Produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.

CHAGAS-SPINELLI, A.C.O.; KATO, M.T.; LIMA, E.S.; GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *J Environ Manage* Dec 22;113:510-6. Epub 2012 Jun 22. 2012.

CHRISTOPH, G., GUNNAR, G., KENNETH, N.T., PETER, N.G., Microbial consortia in mesocosm bioremediation trial using oil sorbents, slow-release fertilizer and bioaugmentation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 288–300. 2009.

CLARK, R. B. *Marine Pollution*. Chaper 3 Oil Pollution. Oxford University Press, Oxford, p. 33-64. 1989.

DIKS, R.M.M., OTTENGRAF, S.P.P. VAN DEN OEVER, A.H.C. The influence of NaCl on the degradation rate of dichloromethane by *Hyphomicrobium* sp. *Biodegradation* 5, 129–141. 1994.

EMBRAPA – <http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=227&func=unid>
Acesso dia 12 de jan 2013.

EHLERS, G.C.A., FORRESTER, S.T., SCHERR, K.E., LOIBNER, A.P., JANIK, L.J., Influence of the nature of soil organic matter on the sorption behaviour of pentadecane as determined by PLS analysis of mid-infrared DRIFT and solid-state ¹³C NMR spectra. *Environmental Pollution* 158, 285–291. 2010.

EVANS, F.F.; ROSADO, S.; SEBASTIAN, G.V.; CASELLA, R.; MACHADO, P.L.O.A. HOLMSTRÖM, C.; STAFFAN Kj.; JAN, D.V.E.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* Volume 49, Issue 2, pages 295–305, August 2004.

FANTROUSSI, E.S.; AGATHOS, S.N. Is Bioaugmentation a Feasible Strategy for Pollutant Removal and Site Remediation *Curr.Opin.Microbiol.*,8, 268-275. 2005.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. "Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media". *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.*, v. 263, 8-13. a2006.

FERNANDES, F.; SILVA, S.M.C.P. Manual prático para a compostagem de biossólidos. Londrina: Universidade Estadual de Londrina. 1999.

FLOOGATE, G. D. The fate of petroleum in marine ecosystem. In: ATLAS, R. M. *Petroleum Microbiology*. New York: MacMillan, p. 355-397. 1984.

FRANKENBERGER, W.T.J.R.; KARLISON, U. Biorremediation of seleniferous soils contaminated with crude oil, *Geoderma, Itália*, v. 121, n. 1-2, p. 17-30. 2004.

GIBSON D.T. ePERI, R.E. "Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology", *Current Opinion in Biotechnology*, v.11, n.3, 236-243. 2000.

GOMES, E. B. Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário de Suape – PE. Dissertação de Mestrado – UFPE – Recife. 2004.

GRAY, T.R.G.; WILLIAMS, S.T. *Soil microorganisms*. Logman, Lectures in Botany, TheUniversity of Liverpool. 1975.

GUNDE-CIMERMAN N, RAMOS J, PLEMENITA_S A. Halotolerantand halophilic fungi. *MycolRes*, n.113. 2009.

HII, Y.S.; LAW, A.T.; SHAZILI, N.A.M.; ABDUL-RASHID, M.K.; LEE, C.W. Biodegradation of Tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* v.63, p.142–150. 2009.

HINCHEE, R. E. WILSON, J. T.; DOWNEY, D. C. (editors). *Intrinsic Bioremediation*. Battelle Press. Columbus, OH. 1995.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201, jul-ago. 2007.

KARAM, J., NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste. *Jounal Chemical Technology Biotechnonology*, v69, pp 141-153, 1997.

KIRTLAND, B. C.; AELION, C. M. Petroleum mass removal from low permeability sediment using air sparging/soil vapor extraction: impact of continuous or pulsed operation. *Journal of Contaminant Hydrology*, EUA, n. 41, n. 3 - 4, p. 367–383, 2000.

KHAN, F.I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* n.71, p.95-122. 2004.

KHAN S.; AFZAL M.; IQBAL S.; KHAN Q.M. Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils *Chemosphere*, n.90, p. 1317–133. 2013.

KRISTENSEN, A.H.; POULSEN, T.G.; MORTENSEN, L.; MOLDRUP, P. Variability of soil potential for biodegradation of petroleum hydrocarbons in a heterogeneous subsurface. *J Hazard Mater* n.179, p.573–580. 2010.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. *FEBS Lett.* n.169, p.247-250. 1984.

LANGWALDT, J.H.; PUHAKKA, J.A. On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environmental Pollution* n.107, p.187-197. 2000.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* n.54, p.305–315. 1990.

MALAJOVICH M. A. *Biotecnologia 2011*. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.*n.67, p.3127–3133. 2001.

MARQUES JR. A.N.; MORAES, R.B.C.; MAURAT C.M. *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro. P: 311-334, IN: Pereira, R. C.; Gomes, A. S. (org.):Interciência, p382. 2002.

MARIANO, A.P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

MCKEW, B.A.; COULON, F.; OSBORN, A.M.; TIMMIS, K.N.; MCGENITY, T.J. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environ. Microbiol.* v.9, p.165–176. 2007.

MENEGHETTI, L.; RIBEIRO R. Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. Passo Fundo: UPF, 2007.

MILLE, G.; ALMALLAH, M.; BIANCHI, M.; VAN WAMBEKE, F.; BERTRAND, J.C. Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius J Anal Chem* n.339, p.788–791. 1991.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006.

MOHAJERI, L.; AZIZ, H.A.; ISA, M.H.; ZAHED, M.A.; A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresour. Technol.* N.101, p.893–900. 2010.

BAO Mu-tai; WANG, Li-na; SUN, Pei-yan; CAO, Li-xinb; JIE Z; LI Yi-ming. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Marine Pollution Bulletin* n.64 p.1177–1185. 2012.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. Itália, Jan. 2005. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/chemosphere> Acesso em 10 de maio de 2014.

NIE M.; YIN X.; REN C.; WANG Y.; XU F.; SHEN Q. N. Rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3 *Biotechnology Advances*, v.28 p.635–643. 2010.

NIKANJAM M.; HENDERSON P.T. Lubricity of low aromatics diesel fuels. *SAE* n. 920825. 1992.

NUNES, G. Contaminação do solo e água subterrânea por hidrocarbonetos de petróleo e o caso da gasolina brasileira. Santa Maria: UFSM , 2008.

OBAYORI, O.S.; ADEBUSOYE, S.A.; ADEWALE, A.O.; OYETIBO, G.O.; OLUYEMI, O.O.; AMOKUN, R.A.; ILORI, M.O. Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* Strains. *J. Environ. Sci. (China)* v.21, p.243–248. 2009.

OKOH, A.I. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* v.1, p.38–50. 2006.

OLIVEIRA, S.D; LEMOS, J.L.S. Biodegradação de petróleo de solo arenoargiloso por fungo filamentosos. In: XIII Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT. 2005.

ONWURAH, I.N.E.; OGUGUA, V.N.; ONYIKE, N.B.; OCHONOGOR, A.E.; OTITOJU, O.F. Crude oil spills in the environment, effects and some innovative clean-up biotechnologies, *Int. J. Environ. Res.* v.1. p.307–3202. 2007.

OREN A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J. Ind Microbiol Biotechnol*; v.28. p.56e63. 2002.

PASSOS, C.T.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKET, C.A.V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. *Quím. Nova*, v. 32, n. 4, p. 950-954. 2009.

PETERS, K.E.; WALTERS, C.C.; MOLDOWAN, J.M. Biodegradation parameters. In: *The Biomarker Guide*, second edn. Cambridge University Press, Cambridge. 2005.

POLONIO, J.C.; POLLI, A.D.; BULLA, L.M.C.; ROSSETO, P.; SANTOS, C.M.; RHODEN, S.A.; PAMPHILE J.A.; CONTE, H. Potencial biorremediador de microrganismos: Levantamento de resíduos industriais e urbanos tratáveis no município de Maringá-PR. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports Jul./Dez.*, v.3, n.2, p.31-45. 2014.

QIN, X.; TANG, J.C.; LI, D.S.; ZHANG, Q.M. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil. *Letters in Applied Microbiology*, p.210–217. 2012.

RAYNER, J.L.; SNAPE, I.; WALWORTH, J.L.; HARVEY, P. M.A.; FERGUSON, S.H. Petroleum hydrocarbon contamination and remediation by microbioventing at sub-Antarctic Macquarie Island. *Cold Regions Science and Technology* n.8, p.139e153. 2007.

RHYKERD, R.L.; WEAVER, R.W.; MCINNES, K.J. Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. *Environ Pollut* n.90, p.127–130. 1995.

RODRIGUES, J. C.; BUENO, P. C.; FONSECA, F. R.; ALONZO, H. G. A.; VILLARDI, J. W. R.; COSTA, L. C. A.; ROHLFS, D. B. Aplicabilidade do sistema de informação de vigilância em saúde de populações expostas a solo contaminado – SISOLO. Trabalho realizado na Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental/DSAST/SVS/MS. *Cad. Saúde Colet.* Rio de Janeiro, 19 (4): p411. 2011.

ROQUES, D.E.; OVERTON, E.B.; HENRY, C.B. Using gas chromatography/mass spectroscopy fingerprint analyses to document process and progress of oil degradation. *Journal of Environmental Quality* n.23, p.851–855. 1994.

ROSA, A.P.; TRIGUIS, J.A. Estudos experimentais da análise dos processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), 2005.

ROSATO, Y.B. Biodegradação do Petróleo. In: MELO I.S & AZEVEDO, J.L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cap.14, p.307-334.1997.

SANTOS FILHO, L. *Manual de Microbiologia Clínica*. 3ª edição, João Pessoa: Editora Universitária, 341p. 2003.

SANTOS, R.M.; RIZZO, A.C.L.; SOBRAL, L.G.S. Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas – escala piloto. Campinas: Centro de tecnologia mineral CETEM, 2007.

SCHERR, K.; AICHBERGER, H.; BRAUN, R.; LOIBNER, A.P. Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology* n.43, p.341–350.2 007.

SCHERR, K.E.; LUNDAA, T.; KLOSE, V.; BOCHMANN, G.; LOIBNER, A.P. Changes in bacterial communities from anaerobic digesters during petroleum hydrocarbon degradation. *Journal of Biotechnology* n.157, p.564–572.2 012.

SEABRA VALSECHI, O.A. *Microbiologia de Alimentos*. Departamento de Tecnologia Industrial e Socioeconomia Rural-Departamento de Ciências Agrárias. Araras-SP. 2006.

SEI, K.; SUGIMOTO, Y.; MORI, K.; MAKI, H.; KOHNO, T., Monitoring of alkanedegrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes. *Environ. Microbiol.* v.5, p.517–522. 2003.

SETTI, L.; LANZARINI, G.; PIFFERI, P.G.; SPAGNA, G. Further research into the aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a *Pseudomonas* sp. *Chemosphere* v.26, p.1151–1157. 1993.

SHANG, H., ZHANG, H., DU, W., LIU, Z. Development of microwave assisted oxidative desulfurization of petroleum oil. A review. *Journal Ing. Eng. Chemy*, v.19,1426. 2013.

SILVA, T.E.P., CARVALHO, D.O., SILVA, M.J.P., SANTOS, N.E.S., COSTA, P.P.R. Enxofre: um poluente em potencial na composição do óleo diesel brasileiro. IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. 2013.

SILVA, M.; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul (EDUCS) p. 335-375. 2010.

Site G1, Globo.com <http://g1.globo.com/sp/vale-do-paraiba-regiao/noticia/2012/09/vazamento-de-oleo-diesel-atinge-praia-de-maresias-no-litoral-norte.html>

Site G1, Globo.com <http://g1.globo.com/parana/noticia/2012/06/oleo-diesel-vaza-apos-acidente-e-atinge-o-ribeirao-lindoiia-em-londrina.html>

SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; HEISS, S.; VANDECASTEELE, J.P. Degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173: growth and catabolic pathway. *J. Appl. Microbiol.*n.97, p.629–639. 2004.

TOWNSEND, G.T.; PRINCE, R.C.; SUFLITA, M. Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer. *FEMS. Microbiol. Ecol.* n.49, p.129–135. 2004.

TRINDADE, P.V.O.; SOBRAL, L.G.; RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere, Rio de Janeiro*, v. 58, n.4, p. 515 – 522, 2005.

UDIWAL, K.H.; PATEL, V.M. Restoration of oil contaminated soil by bioremediation for ground water management and environment protection. *International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research* v.1, p.17e26. 2010.

ULRICH, A.C.; GUIGARD, S.E.; FOGHT, J.M.; SEMPLE, K.M.; POOLEY, K.; ARMSTRONG, J.E.; BIGGAR, K.W. Effect of salt on aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated groundwater. *Biodegradation* v.20, p.27–38. 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY 2010. <http://www.cluin.org/> . Acessodia 15 de 2014.

VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.74,p.13-21. 2007.

VAN BEILEN, J.B.; WITHOLT, B. Alkane degradation by pseudomonads. In *Pseudomonas* Vol.III. Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism. J. Ramos, Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, The Netherlands. 2004.

VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF E.G. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr.Opin.Biotechnol.* v.16, p.1-7. 2005.

VOGEL, T.M. Biaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr.Opin. Biotechnol.* V.7, p.311–316. 1996.

WANG, Z.; FINGAS, M.F. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin* n.47, p.423–452. 2003.

WANG, Z.Y.; GAO, D.M.; LI, F.M.; ZHAO, J.; XIN, Y. Z., SIMKINS, S.; XING, B.S. Petroleum hydrocarbon degradation potential of soil bacteria native to the Yellow River Delta. *Pedosphere*.1v.8: 7p.07–716. 2008.

WANG, X.B.; CHI, C.Q.; NIE, Y.; TANG, Y.Q.; TAN, Y.; WU, G.; WU, X.L. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresour. Technol.* n.102, p.7755–7761. 011.

WARDLAW, G.D.; NELSON, R.K.; REDDY, C.M.; VALENTINE, D.L. Biodegradation preference for isomers of alkylated naphthalenes and benzothiophenes in marine sediment contaminated with crude oil. *Org. Geochem.* n.42, p.630–639. 2011.

YANG, S.Z.; JIN, H.J.; WEI, Z.; HE, R.X.; JI, Y.J.; LI, X.M.; YU, S.P. Bioremediation of oil spills in cold environments: a review. *Pedosphere* v.19, p.371–381. 2009.

ZALAR, P.; DE HOOG, SCHROERS, H.J.; FRANK, J.M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek* ,v.87,p.311-328. 2005.

ZHANG ,C.; HUGHES, J.B; NISHINO, S.F.; SPAIN, J. Slurry-Phase Biological Treatment of 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitrotoluene: Role of Bioaugmentation and Effects of High Dinitrotoluene Concentrations. *Environmental Science and Technology*, 34(13), p.2810-2816. 2000.

ZOBELL, C.E. Action of microorganisms on hidrocarbons. *Bacteriological Reviews*, V.10, p. 1-49. 1946.

ARTIGO1

**DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS AQUÁTICOS CULTIVÁVEIS
ISOLADOS DO LITORAL SUL (PE, BRASIL) E POTENCIAL ENZIMÁTICO**

**DIVERSITY OF CULTURABLE AQUATIC FILAMENTOUS FUNGI FROM
LITORAL SOUTH (PE, BRAZIL) AND ENZYMATIC POTENTIAL**

Water

Fator de Impacto: 1.291

DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS AQUÁTICOS CULTIVÁVEIS ISOLADOS DO LITORAL SUL (PE, BRASIL) E POTENCIAL ENZIMÁTICO

Flavia Virginia Ferreira Arruda^{1†}, Erik Jonne Vieira Melo^{1†}, Nelania Maria Baptista Queiroz^{1†}, Persio Alexandre Silva^{1†}, Diana Duarte Lira^{1†}, Norma Buarque Gusmão^{1†}, Galba Maria Campos-Takaki^{2*}

¹ Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901, fvfarruda@yahoo.com.br

² Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

Resumo

Micro-organismos são relatados em diferentes ambientes, como em altas concentrações de sal. Esses são de grande interesse por possuírem grande potencial de utilização industrial, como as enzimas. As do grupo das fenoloxidasas atuam sob compostos poluentes recalcitrantes, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar micro-organismos de área aquática e quantificar as enzimas lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac) por fungos filamentosos, em meio mineral contendo óleo diesel, com o propósito destas serem usadas em processos biotecnológicos, como a biorremediação. Após o isolamento, os micro-organismos foram incubados em meio de cultura específico, os fungos filamentosos foram analisados quanto a seus aspectos macroscópicos e microscópicos. Foram registrados 140 fungos filamentosos, desses, foram identificadas 23 pertencentes ao gênero *Aspergillus* e 20 de *Penicillium*, e 97 de outras espécies de fungos. Dos 4 fungos filamentosos testados, *Aspergillus terreus* foi o que apresentou melhor resultado para a produção de manganês peroxidase com 7668U/L na concentração de 3% de óleo diesel. Para a produção de lacase e lignina peroxidase, foi observada uma melhor produção pelo fungo *Aspergillus niger* na concentração de 5% (lacase) e de 3% (lignina peroxidase) quando produziram 2070 U/L e 128U/L respectivamente. O ambiente aquático demonstrou ter uma microbiota capaz de produzir enzimas a serem utilizados em processos de biorremediação, com perspectivas para tratamentos de resíduos e efluentes enólicos.

Palavras chave: Isolamento, fungos filamentosos, enzimas, fenoloxidasas.

Abstract

Micro-organisms are reported in different environments, such as high salt concentrations. These are of great interest because they have great potential for industrial use, such as enzymes. The phenoloxidases of the group operate under compounds recalcitrant pollutants by removing them or turning them into other less toxic products. The objective of this study was to isolate and identify aquatic area of microorganisms and enzymes lignin peroxidase quantify (LiP), manganese peroxidase (MnP) and laccase (Lac) by filamentous fungi in mineral medium containing diesel fuel, with the purpose of these being used in biotechnological processes such as bioremediation. After isolation, the microorganisms were incubated in culture medium specific, filamentous fungi were analyzed for their macroscopic and microscopic aspects. 140 filamentous fungi were recorded, of these, 23 were identified belonging to the genus *Aspergillus* and *Penicillium* 20, and 97 other species of fungi. 4 of filamentous fungi tested, *Aspergillus terreus* showed the best result for manganese peroxidase production with 7668U / L at a concentration of 3% diesel fuel. For the production of lignin peroxidase and laccase, better production was observed by *Aspergillus niger* fungus at a concentration of 5% (laccase) and 3% (lignin peroxidase) as produced 2070 U / L to 128U / L respectively. The aquatic environment demonstrated a microbiota able to produce enzymes for use in bioremediation processes, with prospects for waste and phenolic wastewater treatments.

Keywords: Isolation, filamentous fungi, enzymes, phenoloxidases.

1. INTRODUÇÃO

Ambientes com alta concentração de sal são muitas vezes povoados por diversas comunidades microbianas que toleram ou necessitam deste tipo de ambiente. Micro-organismos halotolerantes ou halófilos podem ser isolados a partir de diferentes ambientes salinos e podem pertencer a diferentes estirpes (Zhuang *et al.*, 2010).

A vida microbiana pode ser encontrada em locais com diferentes concentrações de sal, ocorrendo tanto em água doce como em ambientes marinhos podendo ou não conter níveis de NaCl acima da saturação (Oren, 2002). Ravindran *et al.*(2012) afirmam que os fungos podem tolerar o estresse de um ambiente aquático e que a tolerância ao estresse é um mecanismo derivado de sua quantidade de componentes antioxidante.

O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo, constituído basicamente por hidrocarbonetos (Gangwar, 2012). A contaminação da água do mar por hidrocarbonetos tem sido considerada uma preocupação constante, por se tornar uma problemática ambiental cada vez mais grave. Mu-Tai Bao *et al.*, (2012) relatam que os frequentes acidentes de derramamento geram impactos incalculáveis para os

ecossistemas marinhos. Por esta razão, vem aumentando a atenção para novas pesquisas e estratégias de tecnologias ambientais a ser aplicada para a remediação. Entre essas estratégias biotecnológicas, encontra-se a estimulação das comunidades microbianas endógenas, com o objetivo de acelerar os processos de degradação de poluentes orgânicos (Beolchini *et al.*, 2010).

Nie *et al.* (2010) demonstraram que o tratamento biológico de petróleo é um processo que pode ser realizado por micro-organismos. Beolchini *et al.* (2010) observaram a biorremediação de sedimentos marinhos contaminados por hidrocarbonetos sendo utilizando micro-organismos nesse tratamento.

A importância dos fungos em processos biotecnológicos na área ambiental, visando à biorremediação de ambientes contaminados por compostos xenobióticos tem sido ressaltada devido à capacidade desses organismos em produzirem peroxidases e fenoloxidasas (Alderetei, 2009; Passos *et al.*, 2009).

Dentre as várias técnicas que vêm sendo aplicadas com o objetivo de acelerar o processo de biodegradação de contaminantes, a introdução de enzimas específicas, como as pertencentes ao grupo das fenoloxidasas, são essencialmente importantes. A esse grupo pertence o complexo enzimático degradador da lignina, que consiste de lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases (Gibson e Langwaldt, 2000; Silva, 2004).

O uso das enzimas permite o processo de degradação sobre diferentes condições biológicas. Fenóis podem ser oxidados por certas enzimas empregando peróxido de hidrogênio (Singh, 2006). Várias técnicas vêm sendo aplicadas com o objetivo de acelerar o processo de biodegradação de contaminantes em solos, como por exemplo a adição de nutrientes e oxigênio ou a introdução de enzimas (Gibson e Langwaldt, 2000). O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de fungos presentes em ambiente aquático e avaliar a capacidade desses em produzir enzimas do grupo das fenoloxidasas para aplicação na biorremediação do meio ambiente.

Objetivo: isolar e identificar fungos filamentosos de ambientes aquáticos e testar quanto a produção enzimática

2. MATERIAL E MÉTODOS

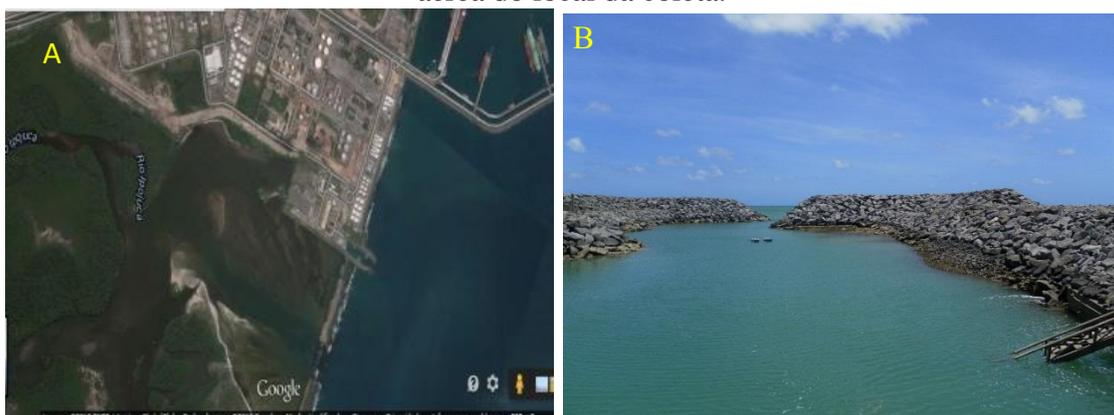
2.1 Coleta do material

Foram coletadas amostras de água marinha (ponto 1 e ponto 2) e dulcícola, do rio Ipojuca (ponto 3), de uma área situada no Complexo Portuário de Suape – Pernambuco (Figura 1), próximo a empresa Termopernambuco S/A, (19°3' S de Lat. e 42°46'W de Long.), no mês de janeiro de 2012. Um total de 60 Litros foi coletado de cada ponto de coleta, estas amostras foram armazenadas em recipientes plásticos esterilizados e levadas ao laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras foram mantidas em câmara fria à -4 °C. No local de coleta não foi observado nenhuma contaminação por óleo diesel, caracterizando assim uma área sem contaminação.

2.2 Características da água nos Pontos de Coleta

A água coletada nos três diferentes pontos, foram caracterizados “in loco” quanto a temperatura, pH, oxigênio dissolvido, salinidade e presença de micro-organismos (unidades formadoras de colônias - UFC). Os resultados foram expressos pela média dos três valores para cada ponto.

Figura 1: Local de coleta da água para isolamento dos micro-organismos; (A)(B) vista aérea do local da coleta.



2.3 Isolamento de fungos

O isolamento de fungos foi realizado através de duas metodologias:

1) *Isolamento em meio sólido*. De cada ponto coletado cerca de 200 mL foi filtrado em membrana Millipore de 0,45µm, e em seguida, as membranas foram transferidas para

microplacas contendo os meios de cultura Bushnell Haas Agar e Ágar Marine, ambos acrescidos de 0,5% Tetraciclina e Cloranfenicol. As placas foram incubadas a temperatura de 30°C, por cinco dias. Após o período de incubação as colônias de fungos filamentosos foram isoladas e transferidas para placas e Petri contendo Agar Sabouraud. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2) *Isolamento em meio líquido*: O isolamento foi realizado utilizando-se frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo cada 44,5 mL os meios líquidos, “Marine”, Malte e “Bushnell Haas – BH”, adicionados de 0,5% dos mesmos antibióticos, 5mL da água do mar sem prévia filtração em Millipore e 0,5mL de óleo diesel. Os frascos foram incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sob condição estática. Os experimentos foram realizados em triplicata. Após o período de 7 dias alíquotas de 10 μL foram coletadas e transferidas para placas de Petri contendo Ágar Sabouraud, acrescidos dos antibióticos Tetraciclina e Cloranfenicol (0,5%) incubadas por 5 dias a temperatura de 30°C. Em seguida, as colônias dos fungos filamentosos foram transferidas para o mesmo meio e as leveduras para o meio de Agar Extrato de Levedura.

2.4 Identificação

2.4.1 Fungos

As colônias de fungos filamentosos crescidos foram transferidas para placas contendo os meios Czapek (CZ), Yeast Extrato Agar (CYA), Extrato de Malte (MEA) e Agar Sabouraud (SAB) para promover a esporulação. As culturas fungicas foram mantidas a 30°C durante sete dias. Após esse período, foram analisados seus aspectos macroscópicos e microscópicos.

2.5 Caracterizações enzimática

Foram utilizados 4 fungos filamentosos, por apresentarem menor tempo de cultivo, dois isolados do meio por incorporação do óleo diesel (*Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*) e dois do meio sem incorporação (*Aspergillus awamori* e *Penicillium* sp), estes foram inoculados em meio mineral líquido Bushnell Haas, utilizando o óleo diesel como única fonte de carbono em diferentes concentrações (1%; 3% e 5%). As amostras utilizadas foram cultivadas sob condições estáticas por um

período de 7 dias a 30°C. Após esse tempo o líquido (meio de cultura contendo os micro-organismos) foi filtrado, separado do líquido metabólito, e utilizado para determinar a produção das enzimas lacase-LaC, lignina peroxidase-LiP e manganês peroxidase-MnP, através da verificação em espectrofotômetro da oxidação do ABTS (420 nm), álcool veratrílico (310 nm) e vermelho de fenol (610 nm), respectivamente.

2.5.1 Atividade da lacase (Lac)

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

2.5.2 Atividade da lignina peroxidase (LiP)

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

2.5.3 Atividade da Manganês Peroxidase (MnP)

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características da água do mar

A coleta da água do mar foi realizada no período de estiagem (janeiro de 2012), porém houve uma condição atípica com a pluviosidade (14mm), segundo a Agencia

Pernambucana de Águas e Climas - APAC, no dia anterior a coleta divergindo das condições encontradas por esse período, que geralmente é de 40 °C. Foi observada uma temperatura em torno dos 34,36 °C nos 3 pontos de coleta. O valor de O₂ encontrado nos pontos 1 e 2 (água do mar) foram semelhantes, porém no ponto 3 (Rio Ipojuca) o valor mostrou-se um pouco menor de oxigenação. O pH em todos os pontos foi neutro ou básico (Tabela 1), observou-se uma maior de unidades formadoras de colônias no ponto 3, que correspondia água do rio, uma água com o teor de sal mais baixa em relação aos pontos 1 e 2.

Tabela 1: Características físico-químicas e biológicas da água do mar

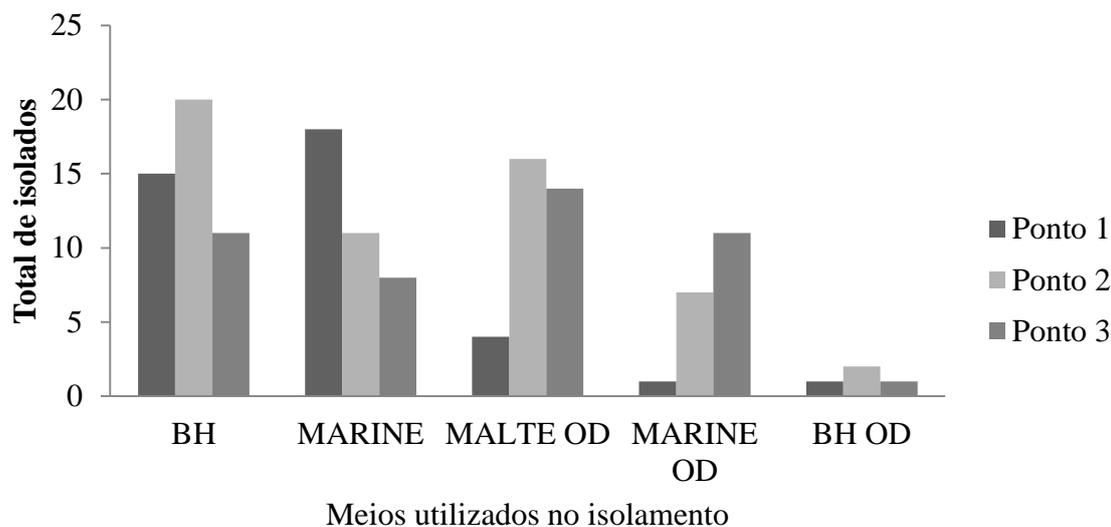
	UFC/mL	pH	Oxigênio (mg/L)	Temperatura (°C)	Salinidade (‰)
Ponto 1	75	8,19	4,82	34,30	36,45
Ponto 2	96	8,13	4,17	35,20	37,18
Ponto 3	105	7,78	2,98	33,60	25,51

3.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos

3.2.1 Fungos

Um total de 187 fungos foi isolado, sendo destes 47 do tipo levedura e 140 filamentosos. Em relação ao isolamento de fungos filamentosos por pontos (1, 2 e 3), foi observado um maior número de colônias isoladas no meio mineral Bushnell Haas, destacando-se o ponto 2 com 20 isolados, seguido do ponto 1 com 15 isolados (Figura 2).

Figura 2: Total dos fungos filamentosos por pontos de coleta e meios utilizados no isolamento



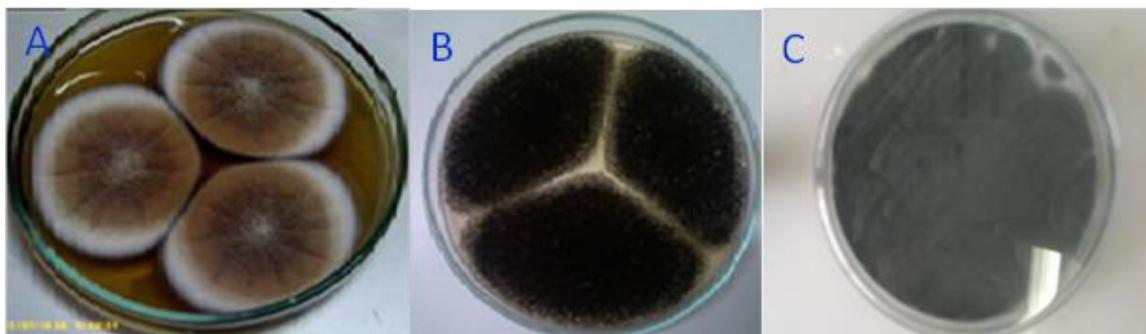
Entre os meios utilizados com adição de óleo diesel, o meio Malte OD, apresentou 55 ao total, sendo 21 leveduras e 34 filamentosos (Tabela 2). E em menor quantidade no meio BH contendo óleo diesel, 6 leveduras e 5 filamentosos. Tabela 3.

Tabela 2: Total dos fungos isolados no meio de cultura Malte contendo óleo diesel

Malte OD		
	Filamentoso	Levedura
Ponto 1	4	0
Ponto 2	16	1
Ponto 3	14	20
Total	55	

Das 140 linhagens de fungos filamentosos isolados procedentes de água do mar, foram identificadas 23 linhagens pertencentes ao gênero *Aspergillus* (16,43%) e 20 linhagens de *Penicillium*, (14,29%) e 97 (69,28%) de outras espécies de fungos (Figura 3).

Figura 3: Fungos filamentosos isolados de águas (*Aspergillus terreus* (A); *A. niger* (B); *Penicillium* (C) sp. Amostras cultivadas em meio Agar Sabouraud



A taxonomia clássica é baseada em observações de características microscópicas e macroscópicas de estruturas fúngicas. Neste tipo de identificação é observado o desenvolvimento de características fenotípicas e produção de esporos (Harish *et al.*, 2005).

Santos (2010) pesquisou potencial de ecossistemas marinhos com aplicações biotecnológicas, avaliando a diversidade de fungos e seu potencial na biorremediação de poluentes ambientais contaminados. Em 2008, Gomes *et al.*, pesquisaram a diversidade de fungos em água e solo das praias de Casa Amarela e Bairro Novo, Olinda-PE, e dentre os 20 gêneros isolados, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. janus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. terreus* foram alguns representantes do gênero *Aspergillus*.

Tabela 3: quantidade de fungos filamentosos identificados por ponto de coleta

Amostras	Água do mar*	Água do rio**
<i>Aspergillus aculeatus</i>	8	0
<i>A. flavus</i>	5	1
<i>A. japonicus</i>	3	0
<i>A. awamori</i>	2	0
<i>A. níger</i>	1	1
<i>A. terreus</i>	0	1
<i>A. tamaritii</i>	0	1
Total	19	4

*Ponto 1 e 2; **Ponto 3

3.3 Potencial lignolítico dos fungos filamentosos

Dos 4 fungos filamentosos testados frente a produção das enzimas o fungo *Aspergillus terreus* foi o que apresentou melhor resultado para a produção de manganês peroxidase com 7668U/L na concentração de 3% de óleo diesel, seguido pelo *A. awamori* com 6950U/L na concentração de 1%.

Para a produção de lacase foi observada uma melhor produção pelo fungo *A. níger* na concentração de 5%, porém foi observada uma melhor produção nas três concentrações pelo fungo *A. awamori*, cuja produção foi 1660U/L, 1650U/L e 1240U/L respectivamente.

A produção de lignina peroxidase foi melhor apresentada pelo *A. níger*, seguido pelo *Penicillium* sp. nas concentrações de 3% e 1% quando produziram 128U/L e 102U/L respectivamente (Tabela4).

Tabela 4: Valores de produção das três enzimas pelos fungos filamentosos testados

OD	<i>Aspergillus niger</i>			<i>Aspergillus terreus</i>			<i>Aspergillus awamori</i>			<i>Penicillium</i> sp.		
	MnP	Lac	LiP	MnP	Lac	LiP	MnP	Lac	LiP	MnP	Lac	LiP
1%	3434	200	52	0	0	0	6950	1600	28	5496	440	102
3%	6916	430	128	7668	570	96	5678	1550	30	5344	910	46
5%	5104	2070	52	5910	72044		6336	1240	82	6296	480	42

OD: óleo diesel; MnP: Manganês Peroxidase; Lac: Lacase; LiP: Lignina Peroxidase

Chakroun *et al.* (2010) observaram que a lacase produzida pelo fungo *Trichoderma atroviride* era capaz de oxidar compostos aromáticos.

Segundo Wesenberg *et al.* (2003) a lignina peroxidase pode ser utilizada para mineralizar compostos aromáticos, como os hidrocarbonetos. Baptista *et al.* (2011) observaram que o fungo *Penicillium commune* apresentou maior produção para a enzima, atingindo valores de 2.500 U/L para lignina.

Em 2010, Maciel obteve valores para lignina peroxidase pelos fungos, *Paecilomyces* sp. (94 U/L±9), *Penicillium* sp. (100 U/L±22), *Aspergillus* sp. (100 U/L±14) e *Penicillium* sp. (144 U/L±13), seguindo a mesma metodologia descrita no presente trabalho.

Clemente *et al.* (2001) investigaram a degradação de hidrocarbonetos por treze fungos deuteromicetos ligninolíticos e constataram que o grau de degradação varia de

acordo as enzimas ligninolíticas. Moreira (2006) relata em seu trabalho realizado com *Psilocybe castanella* produziu uma alta atividade ligninolítica, provavelmente em resposta a concentração do poluente orgânico, hexaclorobenzeno. Anastasi *et al.*, (2009), observaram uma produção de lipase por Basidiomycetes de 19U/L.

Silva *et al.*, (2004) estudaram oito linhagens fúngicas usados na biorremediação foram isoladas de solos agrícolas sob cultivo de arroz, aonde as maiores atividades enzimáticas detectadas estiveram relacionadas à produção de lignina peroxidase. O nível máximo detectado foi de 6.079 U/L⁻¹ (linhagem P11SA4F), seguida de 3,332 U/L⁻¹ (linhagem P11SA4F). Nenhum dos fungos testados pode ser comparado em produção de LiP ao *Ganoderm* sp linhagem GASI3.4 (18,851U L⁻¹), considerado controle.

Anastasi *et al.*, (2009), em seu estudo, observaram uma produção de LiP por Basidiomycetes em torno de 19 U/L. A produção de lignina peroxidase para os ensaios dos fungos crescidos em culturas puras pode ser observada pelo *Penicillium commune* com maior produção enzimática, atingindo 2.515 U/L (ARRUDA, 2011).

O máximo de atividade de LiP encontrada foi de 20µmol/L em 24 horas de incubação. A atividade de LiP detectada, 3,58U/L, foi maior que a atividade detectada por (Zhao *et al.*, 1996; Arora *et al.*, 2002), que detectaram apenas 0,173U/g e 1U/mL respectivamente de outros fungos de podridão branca da madeira.

Em trabalho realizado por Baptista (2014) para enzima manganês peroxidase no para o meio Sabouraud foi maior do que para o meio com adição de milhocina, respectivamente 4U/L e 3U/L, no período de 24h houve a mesma produção para os dois meios de 2U/L, em 48h e 72 ocorreram a produção enzimática. Os resultados foram diretamente proporcionais ao aumento das horas, sendo que para a enzima manganês houve os melhores resultados para o meio contendo a milhocina no valor de 4U/L.

Regina e Broett (2009) obtiveram valores máximos de atividade de manganês peroxidase em torno de 1400U/L⁻¹ para *Lentinus edodes* cultivado em meio líquido à base de infusão de bagaço de mandioca e dextrose. Entretanto, os mesmos autores também observaram a influência do substrato na expressão da enzima.

Gloeophyllum striatum e *Coriolopsis byrsina* são excelentes produtores de manganês peroxidase, tendo produzido 67,1 U/mL (21 dias em bagaço de cana) e 590,3U/mL (28 dias em palha de arroz), respectivamente se comparados com os de Nüske *et al.*(2002), com *Nematoloma frowardii* que produziu 1,5U/mL após 11 dias de fermentação em lascas de madeira como substrato, e *Phanerochaetechryso sporium*, um

fungo bastante estudado por sua capacidade de produção de ligninases (Fujian *et al.*, 2001).

Maciel *et al.* (2010) analisaram a produção de manganês peroxidase foi de 60U/L±8 produzidos por *Penicillium* p., cerca de 56U/L±6 gerados por *Curvularia lunata* e 51 U/L±4 por *Paecilomyces* sp.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gomes *et al.*, (2009), realizando descoloração de corantes, utilizando arroz como substrato, onde obtiveram 0,6 U/ mL de manganês peroxidase. Contudo, resultados superiores foram observados por Anastasi *et al.* (2009) em testes de degradação usando basidiomicetos mostrando que houve produção de Manganês Peroxidase em torno de 124 U/L.

Os fungos *Penicillium* sp. (290U/L±28) e *Curvularia lunata* (210U/L±17), se destacam estatisticamente em comparação à produção da enzima lacase em comparação pelos demais fungos (Maciel *et al.*, 2010). Em trabalho realizado por Quarantino *et al.* (2008), a produção de lacase por *Paecilomyces* sp variou de 0,024 U/mL e 2,04U/mL.

Em meio caldo Sabouraud acrescido de óleo diesel, tendo a glicose como controle e óleo diesel como indutor da atividade enzimática, Baptista *et al.* (2011) encontraram para lacase, atividades variando de 4,35 U/L a 4,62 U/L, destacando a mais alta produção para os fungos *Cunninghamella echinulatae* *Penicillium commune*, com 4,62 U/L para ambos.

As funções biológicas da lacase nos micro-organismos ainda não estão muito claras. Em fungos há relatos sobre sua participação no rápido crescimento celular, esporulação (Gianfreda *et al.*, 1999) e degradação de lignina (Eggert *et al.*, 1996) Baptista *et al.*, (2011) observaram uma produção de lacase em meio líquido Sabouraud, contendo óleo diesel, para o fungo *Penicillium commune*, atingindo 1.947U/L

De acordo com Rothschild *et al.* (2002) a atividade da Lipase e da Lacase tem sua produção relatada por alguns fungos da podridão branca. Arruda (2011), utilizando óleo diesel como substrato conseguiu obter o valor 2.594 U/L *Cunninghamella echinulata*.

4. CONCLUSÕES

Observou-se nesse trabalho que em relação ao isolamento de fungos filamentosos por pontos de coletas, um maior número de colônias foram isoladas no meio mineral Bushnell Haas, destacando-se o ponto 2, seguido do ponto 1, dentre os meios com adição de óleo diesel, o que apresentou maior número de isolados foi o meio Malte OD. Das linhagens de fungos filamentosos isolados de ambiente aquático foi

observado um maior número os pertencentes aos dos gêneros *Aspergillus*. Esses microorganismos apresentam-se como produtores das enzimas do sistema lignolítico, sendo possíveis suas aplicações em processos biotecnológicos como a aplicação dessas enzimas na remoção de petroderivados e águas contaminadas.

5. AGRADECIMENTOS

As agências financiadoras CAPES, e CNPq, aos laboratórios LAMAI da Universidade Federal De Pernambuco e NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco.

6. REFERENCIAS

Alderete, L.G.S, Talamo, M.A, Medina, M.I., 2009. Establishment of trasgenic tobacco hairy roots expressing basic.; Ibanez, S.G.; Purro, S.; Agostini, E.; Mibad,S.R.; peroxidases and its application for phenol removal. Journal of Biotechnology. n. 139, p.273-279.

Anastasi, A., Coppol,a T., Prigione, V., Varese, G.C., 2009. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. Journal of Harzardous Materials, v. 165, p. 1229-1233.

Arora, D.S., 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and lacase in degradation and selective lignolysis of wheat straw.InternationalBiodegradation and biodeterioration.50:115-120.

Arruda, F.V.F., 2011. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*. Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Recife, p.56.

Baptista, N.M.Q., Santos, A.C., Arruda, F.V.F., Gusmão, N.B., 2011. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos, Scientia Plena, v.1,n.07.

Baptista, N.M.Q., 2014. Efeitos da radiação gama em fungos filamentosos na produção enzimática do complexo lignolítico Scientia Plena Vol.14(7), pp. 612-621.

Beolchini, F., Rocchetti, L., RegoliF, Dell'anno, 2010. A Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: experimental analysis and kinetic modeling. Journal of Hazardous Materials.n.182, p.403-407.

Bonugli-Santos, R.C., Durrant, L.R., Silva, M., Sette, L.D., 2010. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. Enzyme Microbiology Technology, v. 46, n. 1, p. 32-37.

Buswell, J.K., Cai, Y.J., Chang, S.T., 1995. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol Lett*;128:81–8.

Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M.J., Dhouib, A.S., 2010c. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, Volume 45 (4) Elsevier – Apr 1.

Clemente, A.R., Anazawa, T.A., Durrant, L.R., 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi, *Braz. J. Microbiol.* 32:255–261.

Durán, N., Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review *Applied Catalysis B: Environmental*.v.28, n.2, p. 83–99.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L., 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by lacase. *Febs Letters*, v.391 ,p.144-148.

Fujian, X., Hongzhang, C., Zuohu., 2001. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*. v. 80, p. 149-151.

Gangwar, J.N., Gupta, T., Agarwal, A.K., 2012. Composition and comparative toxicity of particulate matter emitted from a diesel and biodiesel fuelled CRDI engine. *Atmospheric Environment*.

Gianfreda, F.X., Bollag, J.M., 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes, *Bioremediation Journal*, vol. 3, no. 1, pp.1–25.

Gibson, D.T., Parales, R.E., 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, v.11, n.3, 236-243.

Gomes, E., Aguiar, A.P., Carvalho, C.C., Bonf,á M.R.B., Silva, R., Boscolo, M. 2009. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of microbiology*, v. 40, p. 31-39.

Gomes, D.N.F., Cavalcanti, M.A.Q., Fernandes, M.J.S., Lima, D.M.M., Passavante, J.Z.O., 2008. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Biol.*,68(3): 577-582.

Harish, P.K.V., Kshama, L.T.R., Shamalab, R.N.T., 2005. Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films. *International Biodeterioration & Biodegradation*,v.56, p.115–120.

Langwaldt, J.H., Puhakka, J.A., 2000. n-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environmental Pollution* n.107, p.187-197.

Klich, M.A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. First Ed. 122 pp. Central albureauvoorSchimmel cultures, Utrecht, The Netherlands.

Maciel, C.C.S., Souza, M.A., Gusmão, N.B., Campos-Takaki, G.M., 2010. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactado por petroderivados. *Exacta*, São Paulo. 8(2): 133-144.

Moreira, S.L.M.N., 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, p. 124.

Mu-Tai Bao, A., Li-Na, W., Pei-Yan, S.B., Li-Xin, C.B., Jie, Z.B., Yi-Ming, L.A. 2012. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 64 p.1177–1185.

Neto, W.C., Carvalho, Q.C., Eliana, P.E., 2011. Avaliação do potencial de biodegradação de petróleo por fungos isolados da macrófita aquática *Eichornia crassipes* Mart Solm. *Anais da Iniciação Científica* ISSN 1982-5498

Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., Shen, Q., 2010. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3 *Biotechnology Advances*, v.28 p.635–643.

Nüske, J., Scheibner, K., Dornberger, U., Ullrich, R., Hofrichter, M., 2002. Large scale production of manganese-oxidase using agaric white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 30, p. 556-561.

Oren, A., 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiology Biotechnol.* n.28, p.56-63.

Passos, C.T., Burkert, J.F.M., Susana, J.K., Carlos, A.V., 2009. Burkert Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. *Quím. Nova*, v. 32, n. 4, p. 950-954.

Quarantino, D., Ciaffi, M., Federici, E., D'annibale, A., 2008. Response surface methodology study of laccase production in *Panustigrinus* liquid culture. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 236-245.

Ravindran, C., Varatharajan, G.R., Rajasabapathy R, Vijayakanth S, Kumar AH, Meena R. M (2012) A role for antioxidants in acclimation of marine derived pathogenic fungus (*nioc 1*) to salt stress. *Microbial Pathogenesis* n.53p.168-179.

Regina, M., Broetto, F., Giovannozzi-Sermanni, G., Marabotini, R., Peranni, C., Linde, G.A., Colauto, N.B., Paccola-Meirelles, L.D. 2009. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. *Ciências Agrárias*. v. 30, n. 4, p. 881-888.

Russell, N.J., 1989. Adaptive modification in membrane of halotolerant and halophilic microorganism. *J. Bioenerg Biomembr*, n.21, p.93-113.

Santos, R.C.B., 2010. Fungos isolados de macro-organismos marinhos brasileiros: diversidade genética e potencial biotecnológico. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.

Silva, C.M.M.S., Melo I.S., Oliveira, P.R., 2004. Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado /. - Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.

Singh, H., 2006. Mycoremediation – Fungal Bioremediation. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Hoboken, New Jersey. ISBN-13: , p. 592978-0- 471-75501-2.

Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.v.2,n.62p.504-544.

Zhao, J., Koker, T.H., Janse, B.J.H., 1996. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiology Letters*145, 393–399.

Zhuang, A.B., Zhen, H.A.C., Zhihui, B.A., Guoqiang, Z.A., Hoja, S.D., 2010. Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil xuliang. *Environmental Pollution* n.158, p.1119–1126.

Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22: 161-187.

**ESTIMULAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL POR
CONSÓRCIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

**STIMULATION OF DIESEL FUEL BIODEGRADATION BY
INDIGENOUS FILAMENTOUS FUNGI CONSORTIA**

Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)

Fator de impacto: 1.356

ESTIMULAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Flavia Virginia Ferreira Arruda^{1†}, Erik Jonne Vieira Melo^{1†}, Nelania Maria Baptista Queiroz^{1†}, Persio Alexandre Silva^{1†}, Diana Duarte Lira^{1†}, Norma Buarque Gusmão^{1†}, Galba Maria Campos-Takaki^{2*}

¹ Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901, fvfarruda@yahoo.com.br

² Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

Resumo

Durante seu processamento, transporte e armazenamento do óleo diesel, que é um produto carcinogênico com odor forte, podem ocorrer vazamentos acidentais, ocasionando sérios problemas ao meio ambiente. Diante disto, o desenvolvimento de biotecnologias para a recuperação de ambientes poluídos torna-se cada vez mais necessário. Consórcios são formados por população de espécies que, em sinergismo, são potencialmente aplicados na biodegradação de poluentes derivados do petróleo. Objetivou-se nesse estudo encontrar micro-organismos, como os fungos filamentosos, capazes de mineralizar os compostos químicos presentes no óleo diesel. Utilizou-se fungos filamentosos em culturas isoladas e mistas para avaliar a degradação de compostos presentes no óleo diesel. Os resultados demonstram que o fungo *Penicillium commune* obteve valor de degradação de 80% para o Nonadecano. *Aspergillus flavus* linhagens, 10, 13, 46 e 59 degradaram 40% (Tetradecano), 45% (Tridecano), 35% (Nonadecano) e 80% (Tetradecano) respectivamente. Quando em cultura mista (consórcio) *Penicillium commune*, *Aspergillus flavus* 59, *Aspergillus tamaritii* 122, associados apresentaram valores de degradação próximos a 50%, de todos os constituintes do óleo diesel. O teste de toxicidade avaliou que os subprodutos gerados pelo ensaio de biorremediação não foram tóxicos. Os resultados demonstram a eficiência da utilização de fungos filamentosos na biorremediação de áreas impactadas.

Palavras chave: Biotecnologia, biorremediação, consórcio fungico, óleo diesel

Abstract

During processing, transportation and storage of diesel oil, which is a carcinogenic product with a strong smell, accidental leaks can occur, causing serious problems to the environment. Hence, the development of biotechnologies for remediation of polluted environments becomes increasingly necessary. Consortia are formed by species population that, in synergy, are potentially applied in biodegradation of petroleum pollutants. This study aimed to find micro-organisms, such as filamentous fungi, able to mineralize the chemical compounds present in diesel oil. Was used in filamentous fungi isolated and mixed cultures to assess the degradation of compound present in the diesel fuel. The results show that the fungus *Penicillium Commune* obtained 80% degradation value for nonadecane. *Aspergillus flavus* strains 10, 13, 46 and 59 have degraded 40%

(tetradecane), 45% (tridecane), 35% (nonadecane) and 80% (tetradecane), respectively. In mixed culture (consortium) *Penicillium commune*, *Aspergillus flavus* 59 and 122 *Aspergillus tamaritii* associated degradation showed values close to 50% of all diesel fuel components. The toxicidade test evaluated the products generated by bioremediation trial were not toxic. The results demonstrate the efficiency of the use of filamentous fungi in bioremediation of impacted areas.

Keywords: Biotechnology, Bioremediation, Consócio fungal, diesel

1. INTRODUÇÃO

O óleo diesel é um produto possivelmente carcinogênico e volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico. Pode ser irritante aos olhos causando vermelhidão, dor e lacrimejamento pode também causar danos ao trato gastrointestinal, sistema nervoso central e pulmões, dano ao fígado e rins, se ingerido, efeitos narcóticos se inalado tontura, vertigens e perda de consciência. Porém esse composto é bastante utilizado para movimentar automóveis e máquinas de grande porte, entre outras aplicações (Gangwar, 2012). Durante seu processamento, transporte e armazenamento podem ocorrer vazamentos acidentais, ocasionando sérios problemas ao meio ambiente. Diante disto, o desenvolvimento de biotecnologias para a recuperação de ambientes poluídos torna-se cada vez mais necessário. No caso de óleos, como a gasolina e o óleo diesel, os hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são mutagênicos e carcinogênicos (Souza, 2010).

Em caso de grandes derramamentos o produto pode ser perigoso para o meio ambiente devido à possível formação de uma película do produto na superfície da água diminuindo os níveis de oxigênio dissolvido (Gangwar, 2012).

A maior parte dos componentes do petróleo, de 60% a 90%, é biodegradável. Entretanto, o restante (10% a 40%), em estado bruto ou refinado, se encontra de forma recalcitrante, ou seja, de difícil degradação pela sua grande estabilidade, tanto à foto-oxidação quanto à oxidação química. Mesmo tratando-se de uma porção menor, deve-se ressaltar que isto representa toneladas de poluentes impactando ecossistemas e sendo bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O destino destes compostos após um derrame irá depender da interação entre vários fatores, podendo-se destacar a degradação microbiana (Crapez *et al.*, 2002).

A biorremediação baseia-se no processo de degradação do poluente por ação microbiana (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) sendo considerada uma estratégia ecologicamente viável, de alta eficiência e de baixo custo (Cruz, 2012).

A complexidade dos compostos presentes no petróleo e seus derivados torna-se necessário a utilização de consórcios, com micro-organismos de diferentes gêneros e espécies. A maior eficácia dos consórcios com relação às culturas puras é evidenciada, provavelmente, pela ocorrência do cometabolismo, fenômeno no qual, alguns micro-organismos são considerados primários, sendo responsáveis pelo ataque inicial ao poluente, produzindo compostos intermediários que serão em seguida assimilados por outros gêneros e espécies diferentes, denominados micro-organismos secundários (Jacques *et al.* 2007).

Objetivo: Avaliação do potencial oxidativo de fungos de ambientes aquáticos além de avaliar o gradiente de aclimação de utilizando óleo diesel e selecionar fungos com posterior aplicação na Biorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Óleo diesel

O óleo diesel utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Petrobrás Transporte S.A. – TRANSPETRO/SUAPE, PE.

2.2 Micro-organismos

Os fungos filamentosos utilizados nesse trabalho foram isolados do ambiente aquático do complexo portuário de Suape, Pernambuco, Brasil. A manutenção das linhagens foi realizada através de repiques em placas de Petri contendo o meio Agar Sabouraud - SAB. O período e a temperatura de incubação tiveram um tempo médio de 36 horas em temperatura de 30°C. Após esse tempo de incubação, as placas foram reservadas em refrigerador com temperatura de 4°C até os ensaios subsequentes.

2.3 Teste de oxidação

Para avaliar a viabilidade das culturas e a comprovação da capacidade degradadora, utilizou-se a técnica do indicador redox 2,4-diclorofenol-indofenol – DCPIP (Hanson *et al.*, 1993) adaptada para frascos Erlenmeyer por Gomes *et al.*, (2004). Cada frasco continha o 45mL do meio Bushnell Haas – BH, pH7,0; 3 blocos de

gelose (8mm de diâmetro) do micro-organismo (um total de 187); 0,5mL do óleo diesel e 0,5mL do indicador redox DCPIP. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, além dos controles negativo (abiótico - indicador, óleo diesel e meio BH) e controle positivo (biótico – fungo filamentoso, glicose, indicador e meio BH) a 30⁰C, em condição estática, por um período de até 7 dias.

2.4 Aclimação

As linhagens que apresentaram um melhor resultado para o teste qualitativo passaram por um período de adaptação ao poluente. A aclimação foi realizada em frascos de Erlenmeyer (500mL), contendo 100 mL do meio mineral Bushnell-Haas, 3 blocos de gelose (8mm de diâmetro) de cada cultura e concentrações crescentes de óleo diesel (1%, 5%, 7% e 10%) como fonte de carbono.

2.5 Biomassa e pH

A biomassa foi avaliada através do método de peso seco, obtido pela diferença do peso final pelo inicial, após filtragem de 20mL do meio de cultivo, a amostra foi centrifugada, lavada com detergente para retirada do óleo, e em seguida filtrada. A massa de células foi pesada em membrana filtrante de porosidade (\emptyset) 0,45 μ m para avaliação do crescimento microbiano por gravimetria (g/L). A análise do pH do meio durante o experimento foi realizada utilizando o potenciômetro digital DIGIMED modelo DM-1.

2.6 Toxicidade

Para cada concentração foram retiradas alíquotas no qual se avaliou a eficiência do resíduo gerado do material biodegradado seguindo o método utilizado por de Tiquia *et a.* (1996) e quantificação da degradação por análise cromatográfica. Nesses ensaios foram utilizadas sementes de pepino (*Cucumis sativus*) que foram previamente desinfestados com hipoclorito de sódio e água destilada. Dez sementes foram distribuídas de forma equidistantes em placas de Petri forradas com papel de filtro duplo esterilizados e posteriormente impregnados com 5mL do líquido residual. Placas controle contendo 5mL de água destilada esterilizada, além de uma placa contendo 5mL de óleo diesel foi realizado, as placas mantiveram-se a 25^o C durante sete dias. Após esse período, foram avaliados os percentuais de germinação, crescimento da raiz e índice de germinação, de acordo com as equações abaixo:

- Percentual de germinação (% G) = $\frac{\text{Média de sementes testes germinadas} \times 100}{\text{Média de sementes germinadas no controle}}$
- Crescimento da raiz (% CR) = $\frac{\text{Média do crescimento da raiz das sementes} \times 100}{\text{Média do crescimento das raízes no controle}}$
- Índice de germinação (IG) = $\frac{(\text{Germ. da semente}) \times (\% \text{ Crescimento da raiz})}{100}$

2.7 Análises da degradação dos constituintes do óleo diesel

Ao final dos ensaios, nas concentrações de 5% e 10%, foi determinada a degradação do poluente por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM modelo SHIMADZU®). Inicialmente as fases aquosas e oleosas das amostras foram separadas através de três extrações consecutivas com diclorometano em funis de separação, filtradas em papel de filtro e em seguida injetadas no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa (CG-EM).

2.8 Formação do consórcio

O consórcio microbiano foi formado com base nos resultados obtidos durante as aclimações das culturas. Os fungos filamentosos que apresentaram melhores valores de degradação dos constituintes do óleo diesel. Foram realizados em frascos de Erlenmeyer (500mL), contendo 100 mL do meio mineral Bushnell-Haas, 3 blocos de gelose (8mm de diâmetro) de cada cultura e óleo diesel como fonte de carbono. Todo o material foi mantido a 30° C sob condições estáticas durante 7 dias.

2.9 Teste de Antagonismo

O teste de antagonismo foi realizado utilizando-se placas de Petri contendo meio Agar Sabouraud. Cada micro-organismo foi repicado em forma de tapete e após seu crescimento foram retirados blocos de gelose e colocados frente a outro micro-organismo. A leitura foi realizada a cada 24 horas e considerou-se como inibição qualquer tamanho de halo produzido.

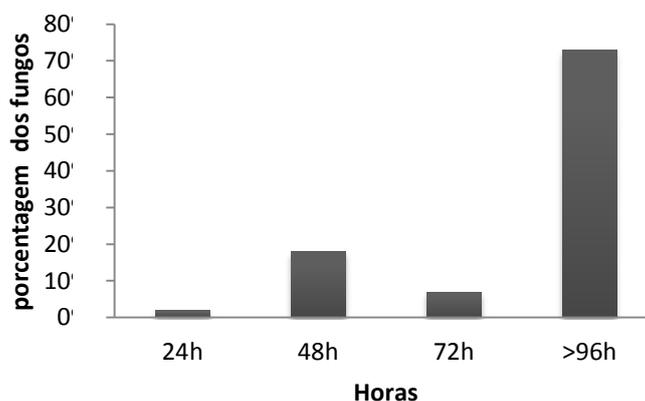
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.1 Seleção de micro-organismos

3.1.2 Fungos filamentosos e leveduras

Foi observado que de um total de 140 fungos filamentosos e 47 leveduras testadas quanto a sua capacidade de biodegradar o óleo diesel, 20% dos fungos filamentosos apresentaram oxidação em até 48 horas (Figura 1) e as leveduras mostraram uma oxidação de 2% em um tempo de até 24 horas.

Figura 1: Oxidação biológica do indicador 2,4-diclorofenol-indofenol para os fungos filamentosos



Desses fungos filamentosos testados, 23 foram do gênero *Aspergillus* e dois do gênero *Penicillium*. Das 23 linhagens de *Aspergillus* testadas, oito mudaram intensamente de cor o corante em 24 horas, cinco viraram em 48 horas, seis em 72 horas, uma em 120 horas e uma em 192 horas. Duas linhagens não apresentaram mudança do corante (Tabela 1). Para o gênero *Penicillium*, observou uma descoloração de 17 e 66 horas por *Penicillium aurantiogriseum* e *Penicillium commune*, respectivamente.

Maciel *et al.*, (2010) estudando *Aspergillus tamarii*, tanto isolado como em consócio mostrou uma degradação de lubrificantes automotivos limpos e usados.

Neto (2010) verificou a ocorrência da oxidação biológica em todas as amostras testadas com variação entre 24 a 72 horas para mudança de cor do indicador DCPIP. Dentre as 5 linhagens de fungos testadas todas apresentaram um bom potencial de degradação para o óleo cru, por terem mostrado ação positiva em até 72 horas. Contudo o

fungo filamentoso *P. commune* mostrou ser mais promissor por ter apresentado resultado positivo em menos de 24 horas.

Cavalcanti (2012) observou a potencialidade de degradação de óleo diesel por uma levedura, utilizando o mesmo indicador (DCPIP), nesse ensaio foi observada a mudança de coloração após 12 horas.

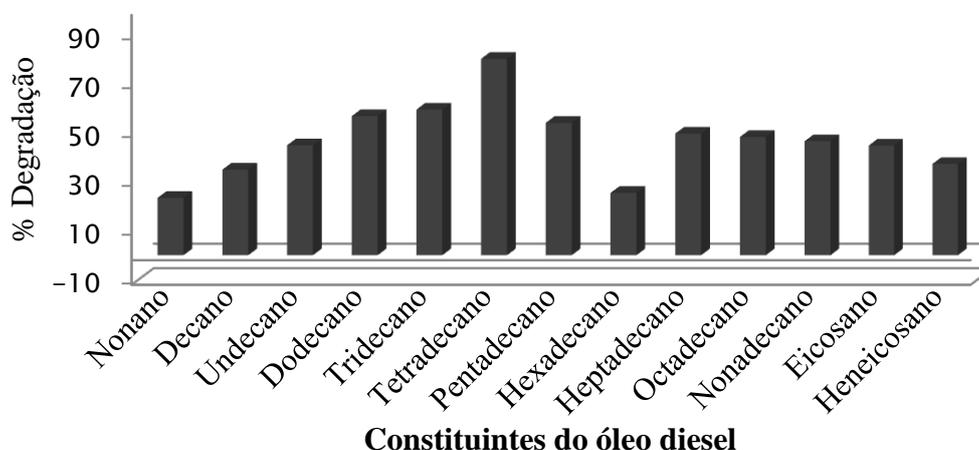
Silva (2012) empregando a técnica do indicador DCPIP para investigar o potencial de fungos em degradar o óleo diesel, selecionou dois fungos por promoverem a descoloração do meio de cultivo em até 24 horas. Melo (2011) empregando a mesma técnica em ensaios com petróleo, selecionou três fungos filamentosos que descoloriram o meio de cultivo em até 24 horas.

3.2 Teste de Antagonismo e aclimação

Foram selecionados dez fungos filamentosos que apresentaram menor tempo para o teste de oxidação biológica, e entre eles observou-se que todos foram capazes de interagir entre si, demonstrando assim não existir problemas com suas interações. Todos os micro-organismos testados foram capazes de degradar constituintes do óleo diesel nas concentrações testadas. *Penicillium commune*, apresentou percentuais de degradação entre 60% e 80%, *Penicillium aurantiogriseum* mostrou degradação de 50%. As linhagens de *Aspergillus aculeatus* (03 e 38) apresentam picos próximos a 30% e 45% de degradação de óleo diesel, respectivamente. A linhagem *A. níger* (107) obteve resultados de degradação semelhantes a 30%.

A linhagem *A. flavus* (10, 13, 46 e 59) apresentou picos que chegaram em torno de 40%, 45%, 35% e 80% respectivamente. *A. tamarii* (122) teve degradação de 50% da fonte oleosa (Figura 2).

Figura 2: Índices de degradação de óleo diesel por *Aspergillus flavus* (59) na porcentagem de 5%.



Souza (2008), aclimatando fungos em 24% de óleo diesel verificou uma redução de 70% a 80% para os hidrocarbonetos alifáticos e Miranda (2007) utilizando leveduras em processos de degradação de óleo diesel na concentração de 12%, obteve valores de degradação entre 21,4% e 93%.

Em trabalho realizado por Melo (2011), foi analisado o potencial de degradação do petróleo na concentração de 10%, por uma bactéria e um fungo filamentoso, nesse estudo observaram-se percentuais de degradação de 32,43% e 66,05% respectivamente.

Experimentos de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, que compõe o petróleo e seus derivados, demonstraram que os fungos degradam mais facilmente os compostos alifáticos e com menor eficiência a fração aromática, por ser a fração mais recalcitrante (Miranda, 2007).

3.3 Biomassa e pH

Todos os micro-organismos foram capazes de produzir biomassa nas diferentes concentrações testadas. O fungo filamentoso, *Penicillium aurantiigrise* apresentou, 0,9g/L de biomassa, seguido do *Penicillium commune* com 0,3g/L, ambos em 5% de fonte oleosa.

Aspergillus aculeatus (03 e 38) e a linhagem *A. niger*(107) apresentaram pH entre 6,0 e 7,0 e produção de biomassa 0,01g. A linhagem *A. flavus* (10, 13, 46 e 59) apresentaram valores de pH variando entre 3,0 e 3,5 e uma biomassa de até 0,13g o qual

foi inferior a 35% com pH abaixo de 4 e biomassa próxima de 0,1g. *A. tamaritii* (122) teve pH 5,1 e biomassa 0,07g.

Como observado nos resultados obtidos, todas as linhagens pertencentes do grupo *A. flavus* tiveram um padrão quanto ao pH, todos se mantiveram próximos de 3,0 e crescimento micelial entre 0,09g e 0,1g. (Tabela 1).

Tabela 1: valores de biomassa e pH dos fungos filamentosos no teste de aclimação na concentração de 5% de óleo diesel

	Biomassa g/L	pH
<i>Penicillium aurantiogrise</i>	0,90	3,5
<i>Penicillium commune</i>	0,30	3,5
<i>Aspergillus aculeatus 03</i>	0,01	6,0
<i>A. aculeatus 38</i>	0,01	6,5
<i>A. niger 107</i>	0,01	6,5
<i>A. flavus 10</i>	0,13	3,5
<i>A. flavus 13</i>	0,09	3,5
<i>A. flavus 46</i>	0,10	3,0
<i>A. flavus 59</i>	0,12	3,0
<i>A. tamaritii 122</i>	0,07	5,5

Cruz *et al.*, (2010) sugerem que as variações nos valores de biomassa durante os ensaios de degradação devem-se provavelmente a um período de adaptação às condições adversas, já que a fonte oleosa apresenta toxicidade à produção de metabólitos ácidos.

Pereira (2009) e Leahy e Colwell (1990), afirmam que a faixa de pH mais favorável ao crescimento da maioria dos micro-organismos envolvidos em processos de biodegradação situa-se entre 6.0 e 8.0, sendo os fungos mais tolerantes a condições ácidas. Outros autores, Rao (2005) e Aislabie *et al.*, (2006) sugerem que a acidez pode ser justificada pela produção de ácidos orgânicos e uma maior atividade microbiana, indicativos indiretos da biodegradação.

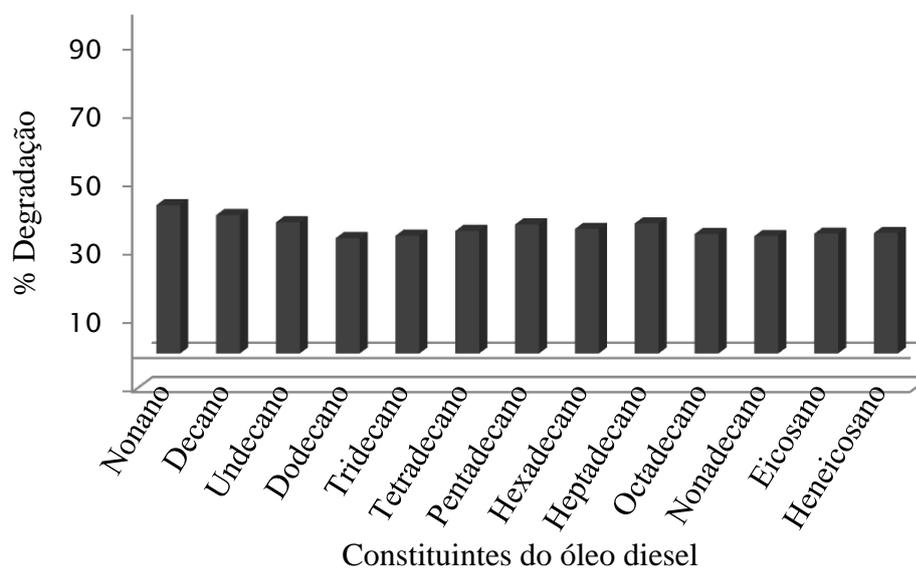
3.4 Degradação em consórcio

Com base nos resultados dos ensaios anteriores, os fungos filamentosos foram selecionados para a formação do consórcio.

Os fungos (*P. commune*, *A. flavus 59*, *A. tamaritii 122*), associados apresentaram valores de degradação dos constituintes do petroderivado próximos a 50%, em 5% óleo

diesel, quando apresentados na concentração de 10%, os percentuais de degradação foram inferiores a 20% (Figura 3).

Figura 3: Degradação microbiana do consórcio



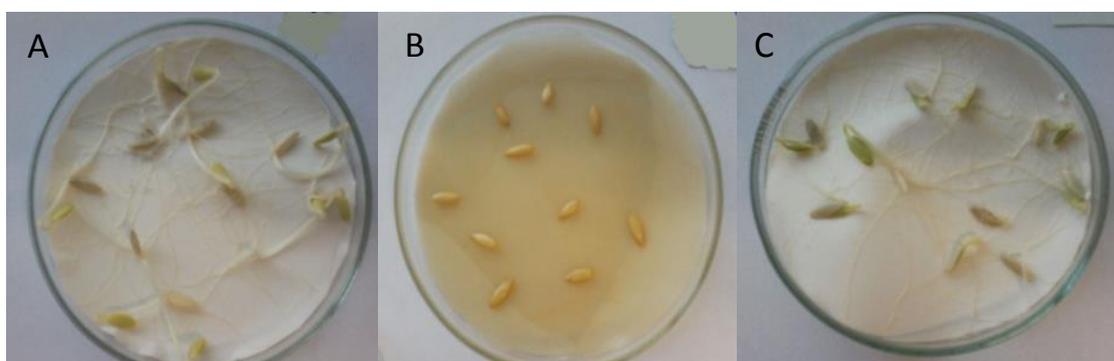
Cruz (2012), utilizando um consórcio misto em ensaios de degradação de querosene em concentrações de 4% e 10%, verificou percentuais de degradação inferiores a 5%. Arruda (2011) em ensaios de degradação de óleo diesel, utilizando *Penicillium commune*, *Aspergillus terreus* e *Cunninghamella echinulata* mostrou que estes quando testados isolados demonstraram bons degradadores, porém quando utilizados em consórcio diante da mesma fonte oleosa e em outras condições de cultivo suas interações não foram tão eficientes no processo de degradação.

3.5 Eliminação da fitotoxicidade do óleo diesel

Ao final dos ensaios de aclimação nas concentrações 1%, 5% e 10%, foram realizados testes de fitotoxicidade, estes revelaram índices de germinação entre 60% e 100%, indicando que os micro-organismos além de serem capazes de degradar o óleo diesel, também reduziram sua toxicidade (Figura 4). Na concentração de 1% e 10% os resultados demonstram que o fungo *P. commune* reduziu a toxicidade do óleo diesel em 100%. Estes resultados foram semelhantes aos de Cruz (2009), que em ensaios de fitotoxicidade do material residual de óleo diesel e gasolina biodegradados por um fungo, verificaram índices de germinação de 100%.

Maciel *et al.* (2010) analisando a fitotoxicidade do material residual proveniente da degradação do querosene por uma espécie de *Penicillium*, também observou índices de germinação de 100%, indicando que este fungo reduziu significativamente a toxicidade do querosene. Segundo o autor referência parra esse ensaio, Tiquia *et al.* (1996), quando o índice de germinação é superior a 80%, é um indício que a toxicidade do composto desapareceu. Rivera-Cruz e Trujillo-Narcia (2004), afirmam que o crescimento vegetal reduzido, germinação inibida e morte vegetal indicam o grau de toxicidade de poluentes.

Figura 4: Imagens do teste de fitotoxicidade. A – Controle positivo; B – Controle negativo; C – Tratamento com resíduo



4. CONCLUSÕES

Os micro-organismos testados apresentaram eficiência na biorremediação da contaminação por óleo diesel. Quando em cultura isolada apresentaram índices de degradação próximos ao total para alguns constituintes do óleo diesel, porém quando em culturas mistas, em consórcio, os índices foram semelhantes, com índices chegando a metade da degradação para todos os constituintes do óleo diesel, demonstrando assim a importância dessa pesquisa para o tratamento biotecnológico como a biorremediação de ambientes impactados por petroderivados, utilizando consórcios fungicos.

5. AGRADECIMENTOS

A agência financiadora CAPES, aos laboratórios LAMAI da Universidade Federal De Pernambuco e NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco.

6. REFERENCIAS

Aislabie J, Saul DJ, Foght JM. 2006. Biorremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* **10**, 171-179.

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

Cavalcanti RFN. 2012. Abordagem Proteômica de *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 na biodegradação de combustíveis derivados de petróleo. Monografia da graduação em Ciências Biológicas. UFPE. Recife – PE.

Crapez MAC, Borges ALN, Bispo MGS, Pereira DC. 2002. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência Hoje*, v. **30**, p. 32 - 37, 179.

Cruz GG. 2012. Degradação de Querosene por Consórcio Microbiano. Dissertação de Mestrado. UFPE – Recife.

Cruz GG, Villela ALS, Silva DPS, Santos BRT, Maciel JM, Silva PA, Sousa MFVQ. 2010. Estudo Comparativo da Degradação de Petróleo por Consórcios Bacterianos. *Cobeq*. Foz do Inguaçú – PR.

Cruz GG. 2009. Degradação de gasolina, óleo Diesel e querosene por *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil..

Gangwar, J.N., Gupta, T., Agarwal, A. K. 2012. Composition and comparative toxicity of particulate matter emitted from a diesel and biodiesel fuelled CRDI engine. *Atmospheric Environment*.

Hanson KG, Desai JD, Desai AJ. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*; v. 7, **10**, p. 745 – 748.

Jacques RJS, Bento FM, Camargo FAO. 2007. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência e Natura*. Universidade Federal de Santa Maria /Universidade Federal do Pampa, São Gabriel/RS UFSM, 29 (1), p. 7 – 24.

Leahy JG e Colweel RR. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environmet. *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315.

Maciel CCS, Souza CS, Silva R, Villela ALS, Souza MFVQ, Gusmão NB. 2010. Degradação de Querosene de Aviação por *Penicillium* spp. *Diálogos & Ciência*, ano IV, **14**.

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

Miranda RC, Souza CS, Gomes EBG, Lovaglio RB, Lopes CE, Sousa MFVQ. 2007. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape port in the state of Pernambuco - Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**, 147-152.

Pereira JrN, Gomes EB, Soriano AU. 2009. Biodegradação de hidrocarbonetos. Rio de Janeiro: Escola de Química/ UFRJ.

Souza DB, Brito GCB, Vasconcelos FCW, Braga LC. 2010. Estudo de Microrganismos Presentes em uma Área Contaminada por Gasolina Comercial. *REA – Revista de Estudos Ambientais (Online)* v.12, **2**, p. 38 -46.

Souza CS. 2008. Degradação de Óleo Diesel por Fungos. Dissertação de Mestrado. UFPE. Recife – PE.

Rao KR, Rashmi K, Latha JNL, Mohan PM. 2005. Bioremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waste. *Indian Journal of Biotechnology* **4**, 139-143.

Rivera-Cruz MC, Trujillo-Narcia A. 2004. Estudio de toxicidade vegetal em suelo com petróleos nuevo e inteperizado. *Interciência* **29**. 369-376.

Tiquia SM, Tam NFY, Hodgkiss IJ. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *R. Environmental. Pollution.*,v. **93**, p. 249-256.

ARTIGO 3

**Biorremediação de biodiesel em escala de laboratório por consórcios
indígena de *Bacillus sp.*, *Aspergillus tamarii* e levedura**

**Laboratory scale bioremediation of diesel hydrocarbon by indigenous
consortium with *Bacillus sp.*, *Aspergillus tamarii* and levedura**

International Journal of Environmental Science and Technology

Fator de impacto: 1.794

Biorremediação de biodiesel em escala de laboratório por consórcios indígena de *Bacillus sp.*, *Aspergillus tamaritii* e levedura

Flavia Virginia Ferreira Arruda^{1†}, Erik Jonne Vieira Melo^{1†}, Nelania Maria Baptista Queiroz^{1†}, Persio Alexandre Silva^{1†}, Diana Duarte Lira^{1†}, Norma Buarque Gusmão^{1†}, Galba Maria Campos-Takaki^{2*}

¹ Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901, fvfarruda@yahoo.com.br

² Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900

Resumo

O óleo diesel é o principal petroderivado comercializado no mercado brasileiro, A obtenção, o armazenamento, o transporte e o uso são considerados os contaminantes principais do meio ambiente. Biorremediação é uma tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. A biodegradação do óleo requer a ação de consórcios microbianos por ser, bioquimicamente, extremamente complexa. O objetivo dessa pesquisa visa estudar a degradação do óleo diesel por micro-organismos em um consórcio. Foram utilizados a bactéria *Bacillus sp*, levedura L24 e o fungo filamentoso, *Aspergillus tamaritina* formação de dois consórcios, verificou-se que o consórcio 1 (*Bacillus sp* + *Aspergillus tamaritii*) observou uma degradação dos compostos do óleo diesel, superior a 20%, o consórcio 2 (L24 + *Aspergillus tamaritii*) apresentou um índice de degradação próximo aos 30%. Os resultados. A toxicidade dos resíduos tratados apresentou índice de germinação entre 89,60% e 90,80% consórcio 1 e 2, respectivamente, o que demonstra que o resíduo proveniente do tratamento não foram tóxicos, potencializando o uso dos mesmos em processos de biorremediação.

Palavras chave: Consórcio misto, biorremediação, levedura, bactéria

Abstract

The diesel and the main petroderivado marketed in Brazil, obtaining, storage, transportation and use are considered the main contaminants of the environment. Bioremediation is a technology for treating contaminated sites by the use of biological agents capable of modifying or decomposing target contaminants. Oil biodegradation requires the action of microbial consortia to be biochemically extremely complex. The objective of this research aims to study the diesel oil degradation by microorganisms in consortium. *Bacillus* sp bacterium was used, yeast and filamentous fungi L24 in the formation of two consortia, it was found that the consortium 1 (*Bacillus* sp *Aspergillus tamaritii* +) observed the degradation of diesel compounds, more than 20%, the consortium 2 (L24 + *Aspergillus tamaritii*) presented a degradation rate close to 30%. The results. The treated waste toxicidade showed germination rates between 89.60% and 90.80% consortium 1 and 2, which shows that the residue from the treatment were nontoxic, increasing their use in bioremediation processes.

Keywords: mixed Consortium; bioremediation; yeast; bacteria

1. INTRODUÇÃO

A forte industrialização e o desenvolvimento econômico experimentados pelo Brasil principalmente a partir da década de 70 exigiram grande estruturação de toda a cadeia produtiva dos derivados do petróleo, desde novas descobertas de campos de petróleo passando pela formação de vários polos petroquímicos e o aumento das redes de distribuição, a ponta dessa cadeia [1]. O óleo diesel e o principal petroderivado comercializado no mercado brasileiro, utilizado no transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas [2].

A obtenção, o armazenamento, o transporte e o uso do petróleo e de seus derivados fizeram com que os hidrocarbonetos de petróleo sejam considerados os contaminantes principais do meio ambiente [3]. Diante de toda essa estrutura logística de produção e comercialização do petróleo e de seus derivados, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação, principalmente por vazamentos, vêm crescendo [4].

A biorremediação configura-se como uma das técnicas menos impactantes de remediação do por contaminantes de hidrocarbonetos, Entretanto, esta técnica requer o acompanhamento de alguns fatores capazes de influenciar na atividade microbológica responsável pela degradação, um desses fatores que merece destaque é a biodisponibilidade dos contaminantes [5].

Biorremediação pode ser considerada como uma tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou depor poluentes alvos [6]. Derivados do petróleo constituem uma mistura complexa de muitas diferentes classes de hidrocarbonetos. Assim um único organismo não é capaz de degradar completamente uma área contaminada. Portanto, é interessante o uso de um consórcio microbiano com várias amostras, para promover uma biorremediação mais efetiva. Não existe uma única espécie microbiana com capacidade metabólica de degradar todos os constituintes do óleo diesel. A biodegradação do óleo requer a ação de consórcios microbianos por ser, bioquimicamente, extremamente complexa [7].

O objetivo dessa pesquisa usou estudar a degradação do óleo diesel por micro-organismos em consórcio

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Óleo diesel

O combustível, óleo diesel, utilizado foi cedido gentilmente pela Empresa Petrobrás Transporte S.A. – TRANSPETRO/SUAPE.

2.2 Micro-organismos

As linhagens utilizadas foram isoladas de amostras de água do mar e Rio, coletadas às margens da empresa Termopernambuco S/A, no Complexo Industrial e Portuário de Suape – PE. A manutenção das linhagens foi realizada através de repiques em placas de Petri contendo o meio Agar Sabouraud - SAB. O período e a temperatura de incubação tiveram um tempo médio de 36 horas em temperatura de 30°C. Após esse tempo de incubação, as placas foram reservadas em refrigerador com temperatura de 4°C até os ensaios subsequentes.

2.3 Teste de degradação em consócio

A avaliação da biodegradabilidade de cada composto que constitui o óleo diesel foi realizada por comparação entre os picos dos compostos encontrados no controle com os testes. Foram utilizados a bactéria *Bacillus* sp, a levedura codificada como L24 e o fungo filamentoso *Aspergillus tamaritii*, na formação dos consórcios (1-*Bacillus* SP *Aspergillus tamaritii*, e o consórcio 2- levedura L24 +*Aspergillus tamaritii*). Em frascos de Erlenmeyer de 500mL, adicionou-se 100 mL do meio mineral Bushnell-Haas - BH, 3 blocos de gelose (8mm) para os fungos e 20% da suspensão ($3,0 \times 10^8$) para bactéria e 5% óleo diesel. Em paralelo foi realizado um controle positivo, com o BH + glicose + micro-organismo e outro abiótico. Todo o material foi mantido sob condição estática a 35°C e 30°C, por sete dias.

2.4 Teste do resíduo gerado

Para se avaliar a presença ou ausência da toxicidade do subproduto gerado dos testes de degradação empregou-se a técnica no qual se utiliza espécie de vegetal e avalia a sua germinação [8] Utilizou-se sementes de *Cucumis sativus* (pepino), em placas de Petri forradas com papel de filtro esterilizados e posteriormente impregnados com 5mL do líquido residual e placas controle contendo o mesmo volume de água destilada esterilizada (controle positivo) e óleo diesel (controle negativo), todos mantiveram-se a 25° C durante sete dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Especificações da amostra de óleo diesel

O óleo diesel foi caracterizado quanto aos parâmetros presentes na tabela a seguir

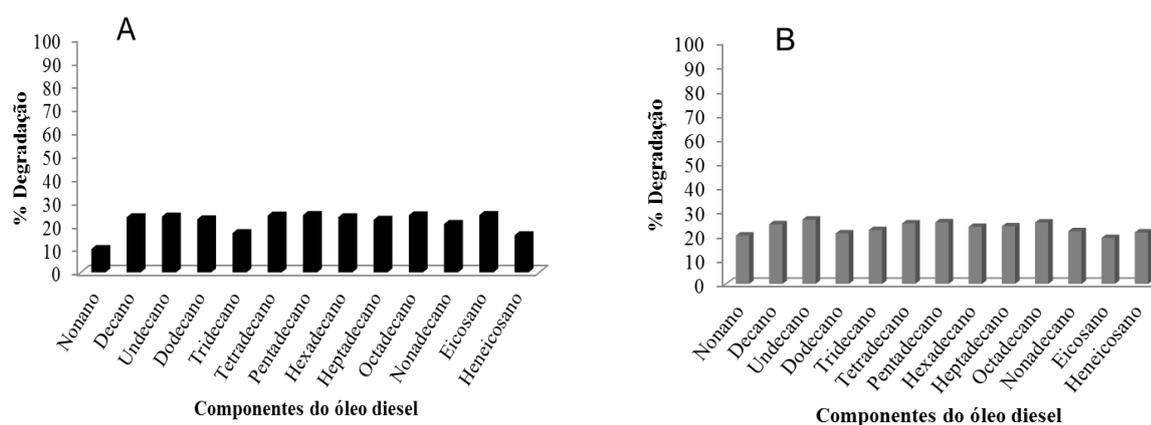
Tabela 1: Especificações do óleo diesel trabalhado.

PARAMETRO	
Massa específica a 20/4°C (kg/m ³)	837
Aparência	límpido/isento de impurezas
Ponto de fulgor (C°)	63
Destilação inicial e final (C°)	175,3 - 341,9
Tipo	D
Cor (ASTM)	L 1,5
Enxofre total (% m/m)	0,18
C (% m/m)	85,9
H (% m/m)	13,1
N (% m/m)	< 0,3

3.2 Teste de degradação em consórcio

A avaliação da biodegradação por cromatografia gasosa, verificou-se que o consórcio 1 (*Bacillus sp* + *Aspergillus tamaritii*) observou uma degradação dos compostos do óleo diesel, superior a 20% (Figura 1A), já o consórcio 2 (L24 + *Aspergillus tamaritii*) apresentou um índice de degradação próximo aos 20% (Figura 1B). Os resultados entre os dois consórcios mostraram-se semelhantes, pois os valores de degradação dos componentes do óleo diesel foram próximos.

Figura 1: Percentuais de degradação do óleo diesel do consórcio 1 (A) e 2 (B)



Em estudos utilizando água do mar, [9] conseguiram uma redução na fração dos hidrocarbonetos de 35 % em 28 dias de experimento. Em estudo obtido em 2007, trabalhando com consórcio bacteriano, também se verificou degradação de

hidrocarbonetos [7]. A utilização de comunidades mistas pode apresentar maior degradabilidade das substâncias tóxicas, em função da maior interatividade de diferentes micro-organismos com compostos específicos [10]. [11] descreve eficiências de 60 % na redução de hidrocarbonetos.

Em 2012, [12] observou uma degradação, por consócio de fungos e bactérias, de 20,75 % dos compostos do óleo diesel, e em estudos realizados em 2001, informam que bactérias capazes de degradar óleo diesel, são responsáveis pela degradação dos n-Alcanos [13]. Em trabalho realizado com consócio misto avaliou-se uma degradação de 60% dos constituintes do óleo diesel [14].

3.3 Teste do resíduo gerado

A toxicidade dos resíduos tratados apresentou índice de germinação de 89,60%, consócio 1 e o consócio 2 de 90,80% (Tabela 2), o que demonstra que os resíduos provenientes do tratamento não foram tóxicos. Os ensaios de fitotoxicidade nas placas de controle com óleo diesel não apresentaram germinação, o que comprova a toxicidade dos petroderivados, e nas placas de controle com água destilada apresentaram crescimento de todas as sementes (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados do ensaio de fitotoxicidade com óleo diesel.

Parâmetros	Consócio 1*	Consócio 2**	Controle (+)	Controle (-)
Germinação (%)	100	100	100	0
Crescimento Raiz (%)	89,60	90,80	100	0
Índice Germinação	89,60	90,80	100	0

* Consócio 1: bactéria + fungo ** consócio 2: levedura + fungo

4. CONCLUSÕES

Comunidades microbianas em atuação conjuntas apresentaram uma alternativa frente aos problemas causados por contaminação de óleo diesel, diminuindo o efeito tóxico desse composto. Foi observada a eficiência de consórcios microbianos entre fungo filamentosos e bactéria ou fungo filamento e levedura, quando esses apresentaram

degradação para todos os constituintes presentes no óleo diesel, além de reduzirem suas toxicidade.

5. AGRADECIMENTOS

Aa agências financiadoras CAPES e CNPq, aos laboratórios LAMAI da Universidade Federal De Pernambuco e NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco.

6. REFERENCIAS

1. Gangwar, J.N., Gupta, T., Agarwal, A. K. Composition and comparative toxicity of particulate matter emitted from a diesel and biodiesel fuelled CRDI engine. **2012**. *Atmospheric Environment*.
2. Mkoma, S. L., da Rocha, G. O., Regis, A. C. D., Domingos, J. S. S., Santos, J. V. S., de Andrade, S. J., Carvalho, L. S., de Andrade, J. B. Major ions in PM_{2.5} and PM₁₀ released from buses: The use of diesel/biodiesel fuels under real conditions. **2014**. *Fuel*.
3. Tyagi, M.M.; Manuela, R.F.; Carla, C.C.R.C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. **2011**. v.22, p.231–241.
4. Sadiktsis, I., Koegler, J. H., Benham, T., Bergvall, C., Westerholm, R. Particulate associated polycyclic aromatic hydrocarbon exhaust emissions from a portable power generator fueled with three different fuels – **2014** A comparison between petroleum diesel and two biodiesels. *Fuel*.
5. Rizzo, A.C.L. Aplicação de ensaios biológicos na avaliação da biodisponibilidade de hidrocarbonetos de petróleo em solos impactado Rio de Janeiro: *CETEM/MCTI*, **2014**. 55p. (Série Tecnologia Ambiental, 73).
6. Bento, F.M.; Camargo, F.A.O.; Okeke, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, *Brazilian Journal of Microbiology*, **2003**.v.34 (Suppl.1), p. 65-68.
7. Dias, F.G. Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo. Campinas, SP: [s.n.], *Universidade Estadual de Campinas*. **2007**. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

8. Tiquia SM, Tam NFY, Hodgkiss IJ. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *R. Environmental. Pollution*. 1996,v. 93, p. 249-256.
9. Aldrett, S.; Bonner, J.S.; Mills, M.A.; Autenrieth, R.L.; Stephens, F.L. Microbial degradation of crude oil in marine environments tested in a flask experiment. *Water Research*. **1997**.v. 31, nº. 11, p. 2840-2848.
10. Vaz, M. Biodegradação ex-situ e avaliação da atividade biológica de solos contaminados por hidrocarbonetos. **2010**. 106 f. Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul.
11. Lin, T.; Pan, P.; Cheng, S. Ex situ bioremediation of oil-contamited soil. *Journal of Hazardous Materials*, **2010**.v. 176. p. 27-34.
12. Bisognin, R.P. Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. **2012**. Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.
13. Zhengzhi, Z. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, **2011**.v.102, p. 4111-4116,
14. Silva, D.S.P. Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído. **2012**. Universidade Federal de Pernambuco.

9. CONCLUSÕES GERAIS

- O ambiente marinho estudado demonstrou ser um local favorável a isolamento de fungos, uma vez que foram isolados mais de 100 desses micro-organismos;
- Dos fungos filamentosos isolados e identificados foi observada uma predominância do gênero *Aspergillus*, seguido do gênero *Penicilium*;
- Os fungos testados quanto a sua capacidade de produzirem enzimas mostraram-se eficientes, para a produção enzimática dos grupos das fenoloxidasas, Manganes Peroxidase, Lacase e Lignina Peroxidase;
- Os micro-organismos testados quanto a biodegradação, demonstram eficiência ao degradarem os compostos presentes no óleo diesel;
- Os resíduos gerados durante o processo de biodegradação demonstraram não serem tóxicos, comprovando assim a eficiência desse processo de descontaminação ambiental.

ANEXO

Tabela1.OcorrênciasenvolvendopetróleoederivadosnoBrasil(1960-2012)

Fonte/Causa	Data	Local/áreas atingidas	Vol.vazado estimado
Transporte marítimo Explosão do navio SinclairPetrolore	dez/1960	Costa do Espírito Santo próximo da Ilha de Trindade	66.530 m ³ de petróleo
Transporte marítimo colisão do navio TakimiyiaMarucom rocha	ago/1974	Canal de SãoSebastião(SP) praias e costões/ Ubatuba	6.000 m ³ de petróleo
Transporte marítimo colisão do navio Tarik IbnZyiadcom rocha	mar/1975	Baía de Guanabara (RJ) praias e costões,	6.000 m ³ de petróleo
Transporte marítimo colisão do navio Brazilian Marinac/ rocha submersa	jan/1978	Canal de S.Sebastião (SP) praias e costões	6.000 m ³ de petróleo
Rompimentode oleodutoBertioga Linha S. Sebastião-Cubatão	out/1983	Canal de Bertioga (SP) mangue, praias e costões	2.500 m ³ de petróleo
Rompimentode oleoduto -Vila Socó LinhaCubatão/Santos	fev/1984	Cubatão (SP) mangue/mortos e feridos	Não estimado de gasolina
Terminal deArmazenamento Incêndio noCórrego do Outeiro	jun/1984	Centro urbano de S. Sebastião um óbito, pânico, praias	Não estimado
Transporte marítimo colisão do navio Marina ³ compier do terminal	mar/1985	S. Sebastião(SP) praias e costões litoral norte	2.500 m ³ de petróleo
Refinaria deCubatão Explosão em tanque de armazenamento	jul/1985	Cubatão (SP) Rio Cubatão	500 m ³ de óleo combustível
Transporte marítimo Vazamento de embarcação perto daREDUC	jan/1987	Baia da Guanabara (RJ)	12 m ³ de óleo lubrificante
Transporte marítimo Navio HortaBarbosa/Terminal TORGUA	ago/90	Baia da Guanabara (RJ)	20 m ³ de petróleo
Transporte marítimo - Petroleiro Theomana não apurada	set/1991	Bacia deCampos(RJ) alto mar	2.150 m ³ de petróleo
Rompimentode oleoduto -Costão do Navio linha São Sebastião/Cubatão	mai/1994	São Sebastião (SP) Vegetação, praias e costões	2.700 m ³ de petróleo
Rompimentode oleoduto LinhaREDUC/Ilha d'Água	mar/1997	Baía da Guanabara (RJ) manguezal	2.700/2.800 m ³ de bunker MF 180
Transporte marítimo colisãoentrenavios Smyrni e ElizabethRickmers	jul/1998	Porto de Santos	40 m ³ de bunker MF 180
Rompimentode oleoduto Refinaria deManaus -REMAN	ago/1999	Manaus (AM) Igarapés eRio Negro	3 e 1 m ³ de óleo combustível
Exploração eProdução dePetróleo Sonda emcampo terrestre	nov/1999	Carmópolis (SE) Rio Iriri/pesca	Não estimado de petróleo
Rompimentode oleoduto Refinaria Duque de Caxias- Ilha d'Água	jan/2000	Baía da Guanabara (RJ) Praia/costão/mangue/pesca	1.300 m ³ de Óleo MF 180
Transporte marítimo/monobóia ⁺ Falha transferência de petroleiro para terminal	mar/2000	Tramandaí (RS) mar/praiap/pesca	18 m ³ de petróleo
Refinaria doParaná Falha interna	jul/2000	Paraná Rios Barigui e Iguazu	4.000 m ³ de óleo
Rompimentode oleoduto	fev/2001	Mato Grosso Córrego Caninana	4 .000 m ³ deóleo diesel
Exploração eProdução dePetróleo Plataforma P36	mar/2001	Bacia deCampos(RJ) alto mar	1.200 m ³ diesel e 350 m ³ petróleo
Exploração eProdução dePetróleo Plataforma P7	abr/2001	Bacia deCampos(RJ) alto mar	124.000 m ³ de petróleo
Transporte marítimo encalhedonavio Norma em banco de areia	out/2001	Baía de Paranaguá (PR) um óbito/fauna	5.000 m ³ de nafta
Aparecimento de manchas de petróleotipo árabe, origem não identificada, naBahia	ago/2001	Litoral norte da Bahia 30 km de praias	Não estimado

Transporte marítimo Explosão do navio Alina P, estava fundeado	dez/2001	Canal de S. Sebastião Um óbito	Não estimado (pequena quantia)
Transporte marítimo Falha transferência do navio Nortic Marita para terminal Canal de S. Sebastião (SP)	jun/2003	Praias, costões, mangue e lagoacosteira de S. Sebastião a Ubatuba	25 m ³ de petróleo
Rompimento de oleoduto Linha S. Sebastião-Cubatão	fev/2004	Guaecá – S. Sebastião (SP) Vegetação, rio, praia	300 m ³ de petróleo
Transporte marítimo Explosão do navio Vicuña no píer do terminal	nov/2004	Porto Paranaguá (PR) praias, costões, mangue, fauna	4079,23 ton metanol 285 ton bunker
Transporte marítimo Naufrágio de barça próximo de Manaus	nov/2005	Rio Negro (AM)	Não estimado Óleo combustível
Transporte marítimo	jan/2008	Baía de S. Francisco (SC)	116.000 L de

Fonte: CETESB