



ERIK JONNE VIEIRA DE MELO

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO POR CULTURA MISTA DE FUNGOS E BACTÉRIAS

RECIFE

FEVEREIRO/2011



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

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO POR CULTURA MISTA DE FUNGOS E BACTÉRIAS

NOME: ERIK JONNE VIEIRA DE MELO

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

Área de Concentração: Fungos Industriais

Orientador: Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: M^a de Fátima V. de Queiroz Sousa

RECIFE

FEVEREIRO/2011

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

Melo, Erik Jonne Vieira de
Degradação de petróleo por cultura mista de fungos e bactérias / Erik Jonne Vieira de Melo. –
Recife: O Autor, 2011.

58 f.: il.

Orientadores: Norma Buarque de Gusmão, Maria de Fátima V. de Queiroz Sousa
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências
Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2011.
Inclui referências

1. Biorremediação 2. Fungos 3. Bactérias 4. Petróleo I. Oliveira, Neiva Tinti de
(orient.) II. Sousa, Maria de Fátima V. de Queiroz (coorient.) III. Título.

628.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-274

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO POR CULTURA MISTA DE FUNGOS E BACTÉRIAS

ERIK JONNE VIEIRA DE MELO

Data da defesa: 18/02/2011

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr^a. Norma Buarque de Gusmão (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Galba Maria de Campos-Takaki
Universidade Católica de Pernambuco

Dr. Edelvio de Barros Gomes
Universidade Federal de Sergipe

O Senhor é o meu pastor, nada me faltará. Deitar-me faz em pastos verdejantes, guia-me mansamente a águas tranqüilas. Refrigera a minha alma; guia-me nas veredas da justiça por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos; unges com óleo a minha cabeça, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida, e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Agradecimentos

Seria impossível listar todos os nomes que minha alma deve gratidão. No entanto, não posso deixar de agradecer sinceramente...

... a Deus por ser uma luz que me conforta em seus braços em todos os momentos de minha vida.

... a meus pais Juraci Vieira e João Galdino pelo amor, dedicação, apoio, educação e paciência mesmo nos momentos mais difíceis desde o início da minha vida.

... ao meu irmão Klayton Jonne, a quem tributo grande respeito e afeto procurando seguir por sua idoneidade, aptidão e competência.

... à Atailha por todo amor, paciência, carinho dedicado e pelo simples motivo de existir em minha vida dando um sentido todo especial, que me inspirou na realização deste trabalho.

... à Prof^a. Norma Gusmão pela total credibilidade, orientação, incentivo e amizade.

... à Prof^a. Maria de Fátima pela oportunidade de crescimento e aprendizado.

... aos meus tios Luis, Heleno, Jair e Janeide pelo imenso apoio e por sempre acreditarem no meu potencial.

... aos meus familiares pela constante torcida.

... a meu irmão de coração Anderson Pontes pelo exemplo de perseverança.

... à Rita Miranda e Carla Maciel pelo apoio, aprendizado e orientação sem a qual este trabalho não seria realizado.

... aos amigos Persio Silva e Flávia Arruda, pela amizade quase de irmãos em todos os momentos de trabalho e descontração, este trabalho é tanto de vocês quanto meu.

... aos amigos Cynthia Souza, Aliny Almeida, Julliana Ribeiro, Maira Callou, Nelânia Queiroz, Thalice, Georgia Gomes, Bárbara Trindade, Débora Silva, Jacilene Maciel, Luis Cláudio, Evelyne, Maria Claudia, Marcio e Amanda pela amizade nestes anos de pesquisa.

... aos professores pelos ensinamentos e pesquisa ampliando meus conhecimentos acadêmicos.

... aos técnicos de laboratório do Departamento de Antibiótico, especialmente Orlando pelos ensinamentos de extrema importância.

... aos amigos do programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

... a Universidade Federal de Pernambuco por me acolher na realização desta e de outras pesquisas, especialmente aos Departamentos de Antibióticos e de Micologia.

... ao projeto Biorremediação de Ambientes Poluídos por Petróleo e Petroderivados, rede RECUPETRO-PETROBRAS.

... ao CNPq pelo apoio financeiro.

... a todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

O petróleo é o recurso energético mais utilizado na sociedade atual, porém seu uso ocasiona grandes riscos de impactos ambientais. Portanto, a aplicação de técnicas como a biorremediação, que utiliza o metabolismo dos microrganismos, para eliminação ou redução de poluentes é aplicada em acidentes com petróleo e seus derivados. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a capacidade dos microrganismos em degradar petróleo e estabelecer as melhores condições para a biorremediação. Os microrganismos (18 bactérias e 14 fungos) utilizados pertencem as Coleções de Microrganismos da UFPE. Inicialmente foram selecionados 3 bactérias e 3 fungos com potencialidade para degradação do petróleo. Essas linhagens foram submetidas à aclimatação em concentrações crescentes do poluente. O consórcio foi definido através de delineamento experimental utilizando uma matriz de Plackett & Burman e o melhor consórcio foi submetido a um ensaio em reator. Dentre os fungos o *Aspergillus oryzae* apresentou a melhor taxa de degradação com 66,05% dos compostos alifáticos e a bactéria B15 apresentou percentual de 32,43%. O planejamento experimental mostrou o consórcio número 12 com degradação de 91,96% dos hidrocarbonetos alifáticos do petróleo. Em biorreator observa-se um perfil característico para um consórcio misto, com degradação dos hidrocarbonetos de 87,52%. Com base nos resultados, isoladamente o *Aspergillus oryzae* pode ser apontado como promissor na biorremediação e o consórcio selecionado também pode ser utilizado na degradação de hidrocarbonetos alifáticos de petróleo.

Palavras-chave: Óleo cru, Biodegradação, Consórcio.

ABSTRACT

Oil is the most used energy resource in our society, but their use produces serious risks of environmental impacts. Therefore, the application of techniques such as bioremediation, which uses the metabolism of microorganisms for elimination or reduction of pollutants is applied in accidents petroderivados. The aim of this study was to evaluate the ability of microorganisms to degrade oil and establish the best conditions for bioremediation. The microorganisms (18 bacteria and 14 fungi) used belong Collections of Microorganisms, UFPE. Initially we selected three bacteria and three fungi with potential for oil degradation. These strains were subjected to acclimation at increasing concentrations of oil. The consortium was set by experimental design using a matrix of Plackett & Burman and best consortium submitted to a test reactor. Among the fungi *Aspergillus oryzae* showed the best degradation rate with 66.05% of aliphatic compounds and bacteria B15 presented a percentage of 32.43%. The planning consortium showed the number 12 with 91.96% of the degradation of aliphatic hydrocarbons from petroleum. In a bioreactor there is a characteristic profile for a mixed consortium, with degradation of the hydrocarbons of 87.52%. Based on results alone *Aspergillus oryzae* is reported as promising in bioremediation and the consortium can also be used in the degradation of aliphatic hydrocarbons from petroleum.

Keywords: Oil, Biodegradation, Consortium.

Lista de figuras

Capítulo 3	Pág.
Figura 1 - Degradação dos constituintes da fração alifática do petróleo na aclimação com 10% do óleo poluente.....	35
Figura 2 - Perfil de degradação da fração alifática do petróleo por consórcio utilizando planejamento de Plackett & Burman.....	36
Figura 3 - Perfil de crescimento da massa seca obtido no ensaio de biorreator.....	38
Figura 4 - Perfil de degradação dos constituintes do petróleo obtidos através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	38
Figura 5 – Perfil de comparação dos melhores microrganismos com o consórcio utilizado no experimento em biorreator.....	39

Lista de tabelas

Capítulo 3	Pág.
Tabela 1 - Valores de degradação, biomassa, pH, atividade das enzimas lignina e lacase e produção de surfactantes dos consórcios submetidos ao delineamento experimental do tipo Plackett & Burman.....	36
Quadro 1 - Efeito principal do delineamento experimental, mostrando a variável que apresentou significância estatística.....	37
Quadro 2 – Produção de enzimas e de biossurfactantes no ensaio em reator biológico com o consórcio.....	40

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1. Petróleo.....	14
2.2 Microrganismos Degradadores de Petróleo.....	15
2.3 Tecnologias Biorremediadoras.....	16
2.4 Aspectos Biológicos Relacionados à Degradação de Petróleo.....	17
2.4.1 Consórcios Microbianos.....	17
2.4.2 Cometabolismo.....	19
2.4.3 Aclimação.....	19
2.4.4 Produção de Biosurfactante.....	20
2.4.5. Produção Enzimática.....	21
2.5 Aspectos Físico-Químicos Relacionados à Biodegradação de Petróleo.....	22
2.5.1 pH.....	22
2.5.2 Temperatura.....	22
2.5.3 Biodisponibilidade.....	23
2.5.4 Nutrientes.....	23
2.6 Ecotoxicidade.....	24
3. DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS MISTOS.....	25
Resumo.....	25
Introdução.....	30
Material e métodos.....	27
Resultados e Discussão.....	32
Conclusões.....	41
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Embora o surgimento de tecnologias alternativas de utilização de recursos energéticos renováveis esteja crescente, o petróleo ainda é o recurso de energia predominante na sociedade. É através dele que a economia mundial é impulsionada: o petróleo sustenta atividades agrícolas, industriais e extrativistas, além de servir como matéria-prima para a produção anual de cerca de três bilhões de toneladas de produtos químicos, como combustíveis, solventes, óleos lubrificantes, parafinas, asfaltos e outros derivados (Pedrozo et al., 2002).

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e de pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, assim como baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos, principalmente níquel e vanádio. Sua composição natural pode variar entre os diferentes reservatórios dos países produtores (Tissot & Welte, 1978).

Assim como seus produtos o petróleo é liberado para o meio ambiente através de acidentes durante carga, descarga, transporte ou refino de subprodutos. O vazamento e derramamento de petróleo e derivados geram graves consequências para a biota aquática e terrestre (Knie & Knie, 2004).

Os animais expostos ao petróleo podem apresentar alterações cardíacas, respiratórias, hepatomegalia, redução no crescimento, além de diversas alterações bioquímicas, celulares, reprodutivas e comportamentais. A exposição crônica a alguns componentes do petróleo pode provocar, ainda, anomalias genéticas e carcinoma em espécies sensíveis. Já na flora, os efeitos da exposição ao óleo variam desde a redução da transpiração e fixação de carbono à morte do organismo (Vieira, 2004; Pedrozo et al., 2002).

A primeira catástrofe ambiental que mereceu atenção mundial foi com o petroleiro Exxon-Valdez em 1989, quando o vazamento destruiu parte da fauna da costa do Alasca. No Brasil, os acidentes em maiores proporções ocorreram nos oleodutos da Petrobras, na Baía de Guanabara e no Paraná com graves consequências ambientais.

Os sérios danos gerados pelos lançamentos de petróleo e derivados ao meio ambiente forçam a busca de tecnologias de recuperação de áreas contaminadas. Nas duas últimas décadas os processos biológicos têm se apresentado como alternativas poderosas aos métodos convencionais de remediação de ambientes impactados (Ururahy, 1998).

Neste sentido, estratégias devem ser utilizadas para controlar a contaminação ambiental por petróleo e seus derivados as quais vêm sendo objeto de estudos nas últimas três décadas. Quando ocorre um derramamento a primeira ação é remover a fase de óleo por ação mecânica ou por meios físico-químicos através da aplicação de tensoativos para dispersar a camada de óleo. Depois uma técnica biológica que abrange um conjunto de tecnologias que utilizam microrganismos, ou produtos microbianos para degradar poluentes ambientais, transformando-os em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade (Maier, 2000).

As tecnologias de biorremediação fundamentam-se nas habilidades e potencialidades bioquímicas de uma grande variedade de gêneros microbianos, que atuam transformando substâncias complexas e recalcitrantes em substâncias menos tóxicas e compatíveis do ponto de vista ambiental, isso quando não geram a mineralização dos compostos, isto é, a degradação dos contaminantes até CO₂ e H₂O (Pereira Jr. 2009).

Desde então, os microrganismos têm sido descritos com potencialidade para transformar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas, comumente encontradas em resíduos provenientes da indústria do petróleo. (Prince and Sambasivam, 1993).

Bactérias e fungos (leveduras e filamentosos) são conhecidos por serem os principais agentes da biodegradação de hidrocarbonetos. Sabe-se que a introdução de resíduos de óleo causa sensíveis aumentos de ambos os grupos. Além disso, microrganismos isolados de locais, que historicamente estão expostos à poluição de hidrocarbonetos, tornam-se mais efetivos na biodegradação do que outros isolados de áreas com nenhum histórico de tal exposição (Saadoun et. al., 2008).

O interesse no isolamento dos microrganismos nativos está relacionado à legislação brasileira que impede a transferência de organismo de um local a outro, para o uso em processos de degradação, além da busca por novas linhagens capaz de degradar petróleo e derivados, oferecendo dados mais atualizados para a implementação de um processo de restabelecimento ambiental na área.

Portanto, considerando casos de desastres ambientais com áreas atingidas por petróleo e seus derivados, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade dos microrganismos isolados de áreas impactadas, assim como seus consórcios, na degradação de petróleo e estabelecer as melhores condições para que ocorra a biorremediação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Petróleo

O petróleo foi originado a partir de organismos presentes em mares rasos durante o período permiano que data de 245 a 280 milhões de anos, sendo, portanto, de origem biogênica. É constituído por uma complexa mistura de compostos orgânicos que podem ser divididos em hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos e cíclicos), hidrocarbonetos aromáticos (mono e polinucleares), asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetanos e ésteres) e compostos polares que incluem as resinas (Pereira Jr. et al., 2009). Nele, são encontradas centenas de compostos que geralmente são agrupados em quatro frações, de acordo com a sua diferente solubilidade: compostos saturados (n-alcanos, alcanos de cadeias ramificadas e cicloalcanos), compostos aromáticos (aromáticos mono-, di- e polinucleares contendo grupos alquilos e/ou anéis de cicloparafinas), resinas (agregadas com piridinas, quinolinas, carbasóis, sulfóxidos, amidas) e asfaltenos (agregados com poliaromáticos extensos, ácidos naftênicos, sulfides, fenóis polihídricos, ácidos graxos e metaloporfirinas) (Cappelli et al., 2001, Sugiura et al., 1997).

As resinas e os asfaltenos compreendem a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e com alta condensação de anéis aromáticos. Normalmente, contêm átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio, recebendo, por isso, a denominação de compostos NSO – nitrogenados, sulfurados e oxigenados. Os metais pesados níquel, cobre, ferro, chumbo e vanádio são geralmente encontrados no petróleo (Seabra, 2001).

A permanência do óleo derramado numa determinada área dependerá de sua composição e de outros fatores, como a corrente marinha, a turbulência da água, a foto decomposição e a biodegradação. Nos rios e lagos, o petróleo e seus derivados podem persistir por mais tempo, dependendo da natureza do óleo e da sua composição, além do tempo de residência da água, que nesses casos é bem maior que nos mares e oceanos (Atlas & Bartha, 1972).

2.2 Microrganismos Degradadores de Petróleo

Atlas (1981), em uma revisão, faz um relato de diversas experiências que apresentam diferentes gêneros e espécies microbianas, isolados de ambientes contaminados por óleo cru e petroderivados, utilizados em processos de biodegradação.

As bactérias e fungos têm sido descritos com potencial para transformar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas, comumente encontradas em resíduos provenientes da indústria do petróleo. Os microrganismos podem utilizar essas substâncias como fonte de carbono e energia para os microrganismos que são uma alternativa aos métodos convencionais, por ação mecânica e por meios físico-químicos, na resolução de problemas ambientais (Prince and Sambasivam, 1993).

Esses microrganismos são conhecidos por serem os principais agentes da biodegradação de hidrocarbonetos. Esses organismos são facilmente isolados do solo e sabe-se que a introdução de resíduos de óleo em solo causa sensíveis aumentos no número de ambos os grupos. Além disso, microrganismos isolados de solos, que historicamente estão expostos à poluição de hidrocarbonetos, adquirem mecanismos de biodegradação do que outros isolados de áreas com nenhum histórico de tal exposição (Saadoun et. al., 2008).

Em geral, as bactérias e leveduras mostram uma menor capacidade de degradar cadeias longas de carbono, enquanto os fungos filamentosos não demonstram preferência quanto ao tamanho das cadeias. As bactérias possuem outras características, além da sua atividade degradadora, como: variabilidade genética, rápida degradação e facilidade de adaptação em diversos ambientes. Além disso, as bactérias Gram-negativas apresentam uma alta tolerância a solventes devido à sua membrana externa (Rosato, 1998).

As bactérias são capazes de emulsificar hidrocarbonetos em solução através da produção de biossurfactantes, que são agentes tensoativos que favorecem a adesão das células a fase oleosa (Mulligan, 2005).

Entre os microrganismos que podem ser utilizados para o tratamento biológico de efluentes de refinarias de petróleo, os fungos vêm se mostrando hábeis em degradar compostos xenobióticos e outros de grandes cadeias moleculares que, em geral, são de difícil degradação. Os fungos sobrevivem e crescem em meios com concentrações elevadas de compostos recalcitrantes e são capazes de utilizá-los como fonte de energia (Eggen, 1998; Esposito, 2004; Oliveira et al., 2006; Santos, 2004). Estes microrganismos produzem enzimas extracelulares oxidativas, capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa em compostos assimiláveis ao seu metabolismo. Essa atividade é intensificada com a adição de um substrato primário, de fácil assimilação, como a glicose (Griffin, 1994; Sampaio et al., 2004A).

Segundo Eggen e Majcherczyk (1998), os fungos filamentosos são os mais eficientes na produção de enzimas extracelulares oxidativas (proteases, celulasas,

ligninases, lactases, entre outras). Dentre eles, o *Aspergillus niger* tem eficiência comprovada para degradação de compostos recalcitrantes em efluentes da indústria farmacêutica, indústria de azeite de oliva, indústria de castanha de caju, cervejarias, refinarias de petróleo e em água para remoção do pesticida agrícola (Félix et al., 2006; Freitas Neto et al., 2007; Hernández ET al., 2006; Miranda et al., 1996; Sampaio et al., 2004B; Santos et al., 2006).

Os fungos podem adaptar-se às mais variadas concentrações de oxigênio, utilizando desde o oxigênio livre até fontes de oxigênio combinado e, dependendo da concentração de oxigênio no meio em que se encontram, utilizam rotas metabólicas alternativas (desnitrificação e amonificação), além da respiração aeróbia convencional (Takaya, 2002).

2.3 Tecnologias Biorremediadoras

A biorremediação é um conjunto de técnicas biotecnológicas onde são empregados microrganismos ou produtos e processos microbianos para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes (Atlas, 1995). Estas técnicas permitem a remoção de poluentes orgânicos, tais como componentes do petróleo e combustíveis, através do favorecimento da ação dos processos naturais de biodegradação por microrganismos. Esta atividade de degradação é potencializada pela da adição de substratos, pelo melhoramento das condições do meio e, em certos casos, através da introdução de microrganismos específicos, em particular, bactérias e fungos (Korda et al., 1997). Este processo é conseguido por intermédio de microrganismos que possuem a capacidade enzimática de degradação ou transformação dos hidrocarbonetos de petróleo (Head et al., 1999 e Korda et al., 1997), utilizando-os como fonte de energia e carbono (Ron et al., 2002).

As medidas biocorretivas visam aumentar a população microbiana, criando condições ambientais propícias para o seu desenvolvimento. Tais medidas dependerão de fatores biológicos, como tipos de microrganismos presentes; e físico-químico: pH, água no solo, quantidade de nitrogênio, potássio, fosfato e a toxicidade dos poluentes. Dentre as novas estratégias, a biorremediação surge como a menos agressiva ao ambiente e a mais adequada para a manutenção do equilíbrio ecológico. Esta tecnologia tornou-se bastante empregada na recuperação de áreas poluídas por substâncias xenobióticas e tem boa aceitação pela opinião pública, tendo sido aprovada por órgãos regulamentadores de meio ambiente, como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, a Agência de

Proteção Ambiental do Canadá e de outros países. A técnica *in situ* geralmente, é economicamente viável, devido aos baixos custos energéticos necessários para as transformações bioquímicas, conduzidas por diversas espécies microbianas capazes de minimizar ou eliminar o impacto dos poluentes no ambiente (Eckenfelder, 1989; Lin et al., 1996; Semple et al., 2001).

A biodegradação de hidrocarbonetos é um processo de grande complexidade que depende da natureza e quantidade dos hidrocarbonetos presentes no ambiente poluído (Musat and Widdel, 2008). A escolha do processo mais adequado e eficiente dependerá do tipo e das características físico-químicas e toxicológicas dos poluentes; dos microrganismos que existem no local; o volume do material que será tratado; tempo e custo para a utilização da tecnologia (Lin et al., 1996; Walter & Crawford, 1997).

A biorremediação pode ser classificada quanto ao local, como: *in-situ* e *ex-situ*. Nas duas formas, a contribuição do microrganismo varia de acordo com o tipo de substrato, do equipamento utilizado e do contaminante. A biorremediação *in situ* é realizada para remediar o local onde ocorreu o derrame, utilizando os microrganismos presentes no local ou adicionado ao processo de degradação. A biorremediação *ex situ* envolve a remoção do material contaminado para outro local, a fim de tratá-lo (Alexander, 1994).

2.4 Aspectos Biológicos Relacionados à Degradação de Petróleo

2.4.1 Consórcios Microbianos

Segundo Leahy & Colwell (1990), organismos individuais metabolizam somente frações restritas dos substratos, enquanto populações mistas incrementam a capacidade enzimática requerida para atacar misturas complexas de hidrocarbonetos. Limbert & Betts (1996) ampliaram esta idéia ao afirmarem que além da complementariedade de funções metabólicas, a troca de material genético também pode explicar o aumento da capacidade de uma população mista em biodegradar poluentes.

Ururahy (1998), afirma que vários tipos de microrganismos individualmente, metabolizam um limitado número de hidrocarbonetos, e que na biodegradação de hidrocarbonetos complexos, é necessária a cooperação entre espécies distintas de microrganismos para a completa mineralização dos compostos do petróleo em gás carbônico e água ou gás metano e água.

Uyttebroek et al. (2007) afirmam que a ação combinada de microrganismos podem degradar em grau maior do que qualquer um deles sozinho. Fungos e bactérias são capazes de degradar parcialmente ou completamente hidrocarbonetos por cometabolismo, ou quando os produtos de sua degradação estão presentes, como mostrado com microrganismos isolados individuais ou por consórcios microbianos.

Os microrganismos quando consorciados apresentam maior assimilação de misturas complexas de hidrocarbonetos, como ocorre no petróleo bruto. Isso ocorre pela ampliação de aparatos enzimáticos específicos necessários na degradação desses compostos, bem como pelo fenômeno de cometabolismo, já que o cometabólito transformado por uma determinada espécie pode resultar em uma substância útil para outra, podendo ser assimilado em uma via metabólica comum (Richard & Vogel, 1999).

Apesar do enorme potencial de alguns microrganismos em degradar compostos orgânicos em condições favoráveis, nenhuma espécie de microrganismo conhecida, natural ou geneticamente modificada, consegue degradar a totalidade dos compostos presentes no petróleo. Deste modo, para conseguir uma bioremediação efetiva dos contaminantes torna-se, em certos casos, necessário optar por uma população mista, composta por vários gêneros bacterianos, cada um capaz de metabolizar determinados compostos (Korda et al., 1997).

Na última década as atenções têm sido voltadas para a utilização de consórcios microbianos degradadores de hidrocarbonetos consistindo de bactérias e fungos. Em comparação com culturas puras, esses consórcios têm sido mais eficazes na degradação destes compostos, devido à capacidade de uma maior degradação e mineralização (Boonchan et al., 2000; Kohlmeier et al., 2005; Wick et al., 2007).

Kataoka (2001) afirma que em uma cultura mista o produto metabólico pode ser degradado só por uma única espécie, sendo que o ataque de outros microrganismos leva a uma completa degradação do composto, mesmo que dentro da comunidade não exista um microrganismo capaz de degradar a substância completamente.

A interação entre diferentes microrganismos, em condições de consórcio, como o cometabolismo ou antagonismo pode ser importante, e a biodegradação de compostos orgânicos tóxicos como hidrocarbonetos pelo consórcio poderiam ser diferentes das de uma única cultura (Fernandez-Sanchez 2001).

2.4.2 Cometabolismo

A superioridade dos consórcios com relação às culturas puras é acentuada pelo fenômeno do cometabolismo. Uma única espécie de microrganismo dificilmente será capaz de mineralizar misturas complexas de hidrocarbonetos; portanto, consórcios microbianos permitem a atuação de enzimas distintas, com a finalidade de degradar completamente o poluente (Kobayashi & Rittmann, 1982).

Richard & Vogel (1999), estudando um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel em amostras de solo, verificaram que, dos sete membros deste consórcio, quatro não utilizavam diretamente o óleo como fonte de carbono e energia; no entanto, a presença destes aumentava a produção de CO₂ pelo consumo de intermediários produzidos pelos demais membros.

Segundo Alexander (1999), esses consórcios microbianos representam tipos de sinergismo que envolve vários mecanismos: a) Uma ou mais espécies fornecem vitaminas do complexo B, aminoácidos ou outros fatores de crescimento para um ou mais microrganismos consorciados; b) Uma espécie cresce sobre o poluente e realiza uma degradação incompleta para produzir um ou vários produtos orgânicos, que por sua vez se torna disponível para a mineralização por uma segunda espécie; c) A primeira espécie converte o substrato em um metabólito tóxico que pode reduzir a transformação, mas a reação procede rapidamente se o segundo membro da associação destrói o inibidor, ou seja, é capaz de usá-lo como uma fonte de carbono para crescimento.

2.4.3 Aclimação

Em muitos estudos foi possível observar que a exposição prévia de microrganismos aos compostos orgânicos atua como importante fator de favorecimento e agilização do consumo de tais poluentes por via microbiana, gerando um aumento nas taxas de biodegradação (Ururahy, 1998; Gomes, 2004).

Alguns fatores, como características culturais dos microrganismos, aclimação, suplementação de nutrientes essenciais, disponibilidade de água e de oxigênio, pH, temperatura e estrutura química dos compostos orgânicos, entre outros, são fundamentais na efetividade do processo de biodegradação de hidrocarbonetos, por isso devem ser analisados e/ ou ajustados antes do início da implantação de uma tecnologia biorremediadora (Leahy & Colwell, 1990; Yu et al.,2005).

Os microrganismos podem desenvolver a habilidade de degradar certos poluentes. Porém, estes compostos podem ser degradados por microrganismos que tenham sido expostos ao poluente por períodos prolongados, e não por aqueles provenientes de sítios não poluídos (Zagato e Bertolotti, 2006).

2.4.4 Produção de Biossurfactante

Outra alternativa para resolver o problema da permanência dos poluentes é a utilização de surfactantes para aumentar a desorção e a disponibilidade dos compostos, o que muitas vezes leva a sua degradação e remoção do ambiente. Entretanto, os surfactantes sintéticos podem diminuir a degradação por microrganismos devido a alta toxicidade. Dessa forma, o uso de biossurfactantes no controle da biodisponibilidade de poluentes presentes no ambiente é uma opção atrativa devido a sua biodegradabilidade e baixa toxicidade (Christofi & Ivshina, 2002).

Os surfactantes são agentes ativos de superfície com propriedades que variam largamente, incluindo redução de tensões superficial e interfacial dos líquidos. A tensão superficial está definida como a entalpia de superfície livre por unidades de área (Christofi & Ivshina, 2002).

Os biossurfactantes são compostos de origem biológica, que possuem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas comuns as moléculas anfifílicas, e por esta propriedade, reduzem a tensão superficial formando agregados chamados micélios (Kosarica, 2001).

Biossurfactantes são moléculas produzidas por bactérias, fungos filamentosos ou leveduras, que apresentam propriedades biológicas aplicáveis a varias indústrias, tais como a indústria de petróleo. Estes compostos, nos últimos anos, têm recebido atenção especial devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e aceitabilidade ecológica (Desai & Banat, 1997).

O uso de biossurfactante tem ajudado na degradação de compostos. Estes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos. Alternativamente, podem ser utilizados produtos ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos capazes de produzir estes compostos (Banat et al., 2000). Alguns estudos confirmam o aumento da biodisponibilidade de compostos de hidrocarbonetos pouco solúveis, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos Zhang et al., 1997).

2.4.5. Produção Enzimática

Existe uma procura crescente de enzimas que podem ser usadas em muitos processos de remediação, como o tratamento de poluentes. O potencial de aplicação de enzimas ligninolíticas tem sido alvo de grande interesse acadêmico e industrial, devido à sua capacidade de biodegradar uma série de poluentes tóxicos e recalcitrantes (Duran & Esposito, 2000).

Silva et al. (2008), descreve que alguns grupos de microrganismos têm atraído a atenção como um potencial de fonte de geração de produtos naturais e nos processos de biodegradação. De forma que, o estudo da produção de enzimas extracelulares por microrganismos é muito importante. Entre as enzimas produzidas, o sistema ligninolítico é de grande importância na recuperação ambiental, processo no qual os sistemas biológicos são utilizados para diminuir ou neutralizar poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que representam risco à saúde por causa de seus efeitos biológicos prejudiciais (Arun et al., 2008).

A presença de hidrocarbonetos no ambiente por tanto tempo resulta numa pressão seletiva sobre microrganismos e sistemas enzimáticos degradadores desses compostos. Entretanto, os hidrocarbonetos não são igualmente degradados. A capacidade dos fungos se adaptarem rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia é um fator essencial para sua sobrevivência. Essa flexibilidade metabólica se deve a produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, não específicas, capazes de degradar uma série de compostos, inclusive polímeros complexos. Graças a essas enzimas com grande capacidade catalítica e o fato de possuírem hifas que penetram no substrato, alcançando mais facilmente os poluentes, os fungos se apresentam como agentes eficientes na biorremediação (Espósito & Azevedo, 2010)

A produção dessas enzimas é frequentemente sintetizada durante o metabolismo secundário dos fungos, porém em diferentes meios de cultivo os fungos podem produzir diferentes enzimas (Nyanhongo et al., 2002).

2.5 Aspectos Físico-Químicos Relacionados a Biodegradação de Petróleo

2.5.1 pH

O pH é um fator que influencia no desenvolvimento dos microrganismos, atuando como agente selecionador da microbiota. A maioria das bactérias heterotróficas e os fungos apresentam melhor desenvolvimento, tanto em solo como em água, em pH próximo à neutralidade, ou seja, pH na faixa entre 6,5 a 7,5, embora os fungos sejam mais tolerantes às condições ácidas do que as bactérias (Balba et al., 1998).

Em diferentes tipos de solo, o pH pode apresentar valores bastante variáveis, abrangendo a faixa de 2,5 a 11,0. Encontrando-se, em cada caso, uma microbiota nativa já adaptada que cresce numa faixa específica de pH, o que corresponde ao pH do ambiente extracelular, se bem que o pH intracelular permanece próximo a neutralidade a fim de evitar a destruição de macromoléculas que fazem parte da estrutura celular (Pelczar et al., 1996).

O pH do meio de cultura age como agente selecionador dos microrganismos ativos. Em valores baixos, predominam fungos filamentosos e leveduras, enquanto em limites superiores, actinomicetes são favorecidos. As bactérias heterotróficas, em geral, preferem valores de pH próximos à neutralidade, que corresponde a faixa entre 6,0 e 8,0 (Gomes, 2004).

Leahy e Colwell (1990) sugerem que valores de pH entre 6 e 8 são os mais favoráveis à ação de microrganismos degradadores de petróleo, sendo que os fungos são mais tolerantes a condições ácidas, afirmando que a queda dos valores de pH se deve, provavelmente, a produção de intermediários ácidos que se formam durante o processo de biodegradação.

O gênero *Aspergillus* tem eficiência comprovada para degradação de compostos recalcitrantes em efluentes de refinarias de petróleo, trabalhando em uma faixa ótima de pH entre 4,0 e 6,0 (Griffin, 1994)

2.5.2 Temperatura

Leahy & Colwell (1990), bem como Atlas (1991), sugerem que a biodegradação ocorre em valores de temperatura situados na faixa entre 30° C e 40° C e Nyer (1992) relata que a faixa ótima de temperatura ocorre entre 20° C e 45° C.

Song et al. (1990) realizaram um estudo sistematizado, a nível laboratorial, sobre a degradação microbiana em solos poluídos com: óleo diesel, *marine fuel* “bunker”, gasolina, combustível de aviação e óleo para fornalha, nas temperaturas de 17°, 27° e 37° C e concluíram que a 27° C, todos os petroderivados testados foram completamente degradados.

2.5.3 Biodisponibilidade

A estrutura dos compostos pode influenciar a velocidade de biodegradação por estar relacionada com a disponibilidade do composto à ação microbiana. Em alguns substratos, a taxa e a extensão da biodegradação de compostos orgânicos, principalmente para compostos hidrofóbicos, são afetadas pelas complexas interações entre as moléculas dos contaminantes, as partículas do solo, a água intersticial e os microrganismos degradadores (Seabra, 2008).

A natureza do contaminante presente no solo vai interferir na extensão da degradação microbiana, por ser esta uma função do peso molecular do composto orgânico e da razão de hidrocarbonetos saturados e aromáticos. Segundo Trindade (2002), os microrganismos apresentam uma habilidade degradadora decrescente com o aumento da cadeia dos hidrocarbonetos, bem como com o aumento da complexidade de suas estruturas.

2.5.4 Nutrientes

O petróleo e seus derivados são constituídos, principalmente, de hidrocarbonetos que servem como fonte de carbono, elemento vital para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos. Entretanto, outros nutrientes são também necessários, como o nitrogênio, imprescindível para a síntese de proteínas, de ácidos nucléicos e de componentes da parede celular e o fósforo, fundamental na síntese de ATP, de ácidos nucléicos e da membrana celular. Os micronutrientes, tais como Fe, Al, Ca, Mn, Mg e Cu atuam como cofatores de reações enzimáticas, porém não são indispensáveis para todos os microrganismos, sendo adicionados em concentrações muito reduzidas (Liebeg & Cutright, 1999).

Os microorganismos mostram grande diversidade na utilização de fontes de nitrogênio. Alguns são autotróficos em relação a este nutriente, sendo capazes de crescer

em nitrato, amônia, e algumas vezes em nitrogênio gasoso; outros, necessitam de aminoácidos, purinas e pirimidinas (Rhodes & Fletcher, 1966).

2.6 Ecotoxicidade

Segundo Wang & Keturi (1990), a avaliação da fitotoxicidade tem sido um teste bastante utilizado por se tratar de uma técnica simples, rápida, segura e reproduzível para avaliar os danos causados pelas combinações tóxicas presentes em vários compostos.

Os primeiros projetos no campo da ecotoxicologia surgiram junto com a necessidade de se estabelecer critérios para o estudo dos efeitos tóxicos de determinadas substâncias poluentes sobre a biota, a fim de se ter um controle da emissão de poluentes no ambiente e/ ou estabelecer parâmetros para saber quais os níveis toleráveis de poluição (Knie & Knie, 2004). Ambientes poluídos por substâncias contaminantes e submetidos à algum tipo de tratamento remediador devem ser avaliados quanto à ecotoxicidade (Pedrozo et al., 2002).

A redução da absorção de água e de oxigênio gerada pela impermeabilização das sementes pelo óleo é um dos fatores inibitórios da germinação (Souza, 2008). Segundo Rivera-Cruz e Trijillo-Narcia (2004), a inibição da germinação de sementes e a redução do crescimento vegetal são indicadores da toxicidade dos hidrocarbonetos.

As sementes são excelentes organismos para bioensaios porque, enquanto estiverem desidratadas, elas permanecem dormentes e podem ser armazenadas por longos períodos, sem perder viabilidade. No entanto, assim que são reidratadas, elas entram no processo de germinação, durante o qual, sofrem rápidas mudanças fisiológicas, e tornam-se altamente sensíveis ao estresse ambiental (Rodrigues, 2003).

Testes ecotoxicológicos são metodologias que permitem avaliar a toxicidade de substâncias sobre um ambiente através da exposição de organismos vivos (bioindicadores). As plantas são muitas vezes sensíveis a substâncias tóxicas e podem ser utilizadas como bioindicadores. Muitos estudos têm demonstrado a eficiência de espécies como pepino e agrião, alface e soja em testes de toxicidade (Gundersson et al., 1997; Helfrich et al., 1998), sendo que a fitotoxicidade pode ser determinada pela germinação das sementes, alongamento da raiz e crescimento da muda (OECD, 1984)

3. DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS ALIFÁTICOS DO PETRÓLEO POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS MISTOS¹

Resumo

O petróleo é o recurso energético mais utilizado na sociedade atual, porém seu uso ocasiona grandes riscos de impactos ambientais. Portanto, a aplicação de técnicas como a biorremediação, que utiliza o metabolismo dos microrganismos, para eliminação ou redução de poluentes é aplicada em acidentes com petroderivados. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a capacidade dos microrganismos em degradar petróleo e estabelecer as melhores condições para a biorremediação. Os microrganismos (18 bactérias e 14 fungos) utilizados pertencem as Coleções de Microrganismos da UFPE. Inicialmente foram selecionados 3 bactérias e 3 fungos com potencialidade para degradação do petróleo. Essas linhagens foram submetidas à aclimatação em concentrações crescentes de petróleo. O consórcio foi definido através de delineamento experimental utilizando uma matriz de Plackett & Burman e o melhor consórcio submetido a um ensaio em reator. Dentre os fungos o *Aspergillus oryzae* apresentou a melhor taxa de degradação com 66,05% dos compostos alifáticos e a bactéria B15 apresentou percentual de 32,43%. O planejamento mostrou o consórcio número 12 com degradação de 91,96% dos hidrocarbonetos alifáticos do petróleo. Em biorreator observa-se um perfil característico para um consórcio misto, com degradação dos hidrocarbonetos de 87,52%. Com base nos resultados, isoladamente o *Aspergillus oryzae* é apontado como promissor na biorremediação e o consórcio também pode ser utilizado na degradação de hidrocarbonetos alifáticos de petróleo.

Palavras-chave: Remediação, toxicidade, Bactérias, Fungos, Combustível.

¹ Trabalho submetido para publicação como Melo, E. J. V., Silva, P. A., Arruda, F. V. F., Sousa, M. F. V. Q., Gusmão, N. B. 2011. Degradação dos Compostos Alifáticos do Petróleo por Consórcios Microbianos Mistos. *Biotechnology Advances*

1. Introdução

O petróleo foi originado a partir de organismos presentes em mares rasos durante o período permiano que data de 245 a 280 milhões de anos, sendo, portanto, de origem biogênica. É constituído por uma complexa mistura de compostos orgânicos que podem ser divididos em hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos e cíclicos), hidrocarbonetos aromáticos (mono e polinucleares), asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetanos e ésteres) e compostos polares que incluem as resinas (Pereira Jr. et al., 2009). As resinas e os asfaltenos compreendem a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e com alta condensação de anéis aromáticos. Normalmente, contêm átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio, recebendo, por isso, a denominação de compostos NSO – nitrogenados, sulfurados e oxigenados. Os metais pesados níquel, cobre, ferro, chumbo e vanádio são geralmente encontrados em diferentes concentrações no petróleo dependendo do local de extração (Sugiura et al., 1997; Seabra, 2001, Cappelli et al., 2001).

As tecnologias de biorremediação fundamentam-se nas habilidades e potencialidades bioquímicas de uma grande variedade de gêneros microbianos, que atuam transformando substâncias complexas e recalcitrantes em substâncias menos tóxicas e compatíveis do ponto de vista ambiental, isso quando não geram a mineralização dos compostos, isto é, a degradação dos contaminantes até CO_2 e H_2O (Pereira Jr. et al., 2009).

A biorremediação é um conjunto de técnicas biotecnológicas onde são empregados microrganismos ou produtos e processos microbianos para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes (Atlas, 1995). Bactérias e fungos são conhecidos por serem os principais agentes da biodegradabilidade de hidrocarbonetos. Esses microrganismos são facilmente isolados do solo e sabe-se que a introdução de resíduos de óleo em solo causa sensíveis aumentos no número de ambos os grupos. Além disso, microrganismos isolados de solos, que historicamente estão expostos à poluição de hidrocarbonetos, adquirem mecanismos de biodegradabilidade do que outros isolados de áreas com nenhum histórico de tal exposição (Saadoun, I. et. al., 2008).

As bactérias e fungos (filamentosos e leveduras) têm sido descritos com potencial para transformar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas, comumente encontradas em resíduos provenientes da indústria do petróleo. Os microrganismos podem utilizar essas substâncias como fonte de carbono e energia, constituindo para esses microrganismos uma alternativa aos métodos convencionais, por ação mecânica e por

meios físico-químicos, na resolução de problemas ambientais (Prince and Sambasivam, 1993).

A bioremediação é uma técnica que permite a remoção de poluentes orgânicos, tais como componentes do petróleo e combustíveis, através do favorecimento da ação dos processos naturais de biodegradação por microrganismos. Esta atividade de degradação é potenciada através da adição de substratos, do melhoramento das condições do meio e, em certos casos, através da introdução de microrganismos específicos, em particular, bactérias e fungos (Korda et al., 1997).

No caso particular da bioremediação do petróleo e seus derivados, este processo é conseguido por intermédio de microrganismos que possuem a capacidade enzimática de degradação ou transformação dos hidrocarbonetos de petróleo (Head et al., 1999 e Korda et al., 1997), utilizando-os como fonte de energia e carbono (Ron et al., 2002).

Segundo Leahy & Colwell (1990), organismos individuais metabolizam somente frações restritas dos substratos, enquanto populações mistas incrementam a capacidade enzimática requerida para atacar misturas complexas de hidrocarbonetos. Limbert & Betts (1996) ampliaram esta idéia ao afirmarem que além da complementar as funções metabólicas, a troca de material genético também pode explicar o aumento da capacidade de uma população mista em biodegradar poluentes.

Os microrganismos quando consorciados apresentam maior assimilação de misturas complexas de hidrocarbonetos, como ocorre no petróleo bruto. Isso ocorre pela ampliação dos sistemas enzimáticos específicos necessários na degradação desses compostos, bem como pelo fenômeno de cometabolismo (Richard & Vogel, 1999).

2. Material e Métodos

2.1. Condições de cultivo

Foram utilizadas 18 linhagens de bactérias e 14 linhagens de fungos filamentosos isolados de áreas impactadas com petróleo e previamente depositados na coleção de culturas do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) e na Micoteca URM do Departamento de Micologia. A manutenção dos isolados foi feita por repiques sucessivos, a cada três meses, em placa de Petri, contendo o meio Tryptic Soy Agar – TSA (15g de Trypticase, 5g de Peptona, 5g de Cloreto de sódio e 15g de Agar para 1L de água) para as bactérias e o meio Agar Sabouraud – SAB (10 de Peptona, 40g de Glicose e 15g de Agar

para 1L de água) para os fungos. Após a aclimatação com o composto os microrganismos foram mantidos em placas de Petri, com meio Bushnell Haas-BH (1g de KH_2PO_4 , 1g de K_2HPO_4 , 1g de NH_4NO_3 , 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 de FeCl_3 e 0,02 de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para 1L de água destilada), acrescido de Agar e 10% da fonte oleosa e a cada três meses foram realizados repiques de manutenção.

Os isolados bacterianos e de fungos filamentosos foram submetidos a uma seleção inicial para avaliar a potencialidade de degradar o petróleo, utilizando a técnica do indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol (DCPIP) em placas multipoços (24 poços), preconizada por Hanson et al. (1993). O indicador redox DCPIP atua comoceptor final de elétrons no processo de oxidação biológica. Se o isolado testado for capaz de oxidar o petróleo, é observada a mudança de coloração do meio de cultura de azul para incolor. Esta técnica emprega para cada cultura: o poço teste, o poço controle negativo (abiótico) e o poço controle positivo (biótico). Após o preenchimento das placas multipoços, estas foram incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2. Ensaios de Degradação do petróleo por microrganismos isoladamente

Dos fungos e bactérias selecionados foi realizada em frascos Erlenmeyer (500 mL), contendo o meio mineral Bushnell Haas-BH, 20% (v/v) do inóculo padronizado (três blocos de gelose de 8mm de diâmetro) e concentrações crescentes de 1 a 12% de petróleo como fonte de carbono, totalizando um volume final de 100 mL. Os frascos foram incubados em condições estáticas, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias. Em cada uma dessas concentrações foram coletadas alíquotas, para avaliação da toxicidade, pH, biomassa, teor de óleos e graxas e a quantificação da degradação.

2.2.1. Avaliação do pH

Para avaliação do pH durante o processo, após o período de incubação foi realizado uma medição para cada alíquota, utilizando o potenciômetro da marca PHTEK modelo PHS-3B.

2.2.2. Biomassa

A cada alíquota retirada, a amostra foi lavada com detergente e centrifugado até a retirada total do óleo, foi pesada a massa de células em membranas filtrantes de porosidade(\emptyset) de 0,45 μ m para avaliação do crescimento microbiológico por gravimetria (g/L).

2.2.3. Determinação das Concentrações de Óleos e Graxas

Um método comumente utilizado para determinação do teor de óleo e graxa é o gravimétrico, a determinação das concentrações será realizado de acordo com American Public Association-ALPHA, (2005). As culturas foram separadas para filtração e a cada 100mL do material filtrado foram colocados 20mL de n-Hexano. Este procedimento foi realizado três vezes e ao final a fase orgânica foram reunidas e evaporadas. O peso do material seco foi o valor total do teor de óleos e graxas (TOG). Para realização do método foi utilizando evaporador rotatório da marca Fisatom (Fisatom558 0836768).

2.3. Delineamento experimental

Os parâmetros obtidos no processo de aclimatação serviram como dados para definição das melhores linhagens, onde foi realizado um delineamento experimental utilizando um planejamento de Plackett & Burman-(PB) de 12 ensaios com três pontos centrais, totalizando 15 ensaios (Rodrigues, 2009). A variável independente foi a concentração do inóculo (2, 3 e 4 blocos de gelose) de cada microrganismo e a variável dependente, foi o percentual de degradação. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statisticatm v6,0. Para padronização do inóculo foram utilizados blocos de gelose de 8mm de diâmetro.

2.4. Ensaios de Degradação em Consórcio

Os ensaios de degradação foram conduzidos utilizando uma matriz experimental de PB-12 em frascos Erlenmeyer (capacidade de 500mL), contendo inóculo padronizados utilizando níveis mais baixos e mais altos (-1 e +1), meio mineral de Bushnell Haas e o petróleo como fonte de carbono, totalizando um volume final de 100mL, os quais foram submetidos à temperatura de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O processo de degradação do petróleo, pelos consórcios, foi acompanhado através das determinações da análise cromatográfica em fase gasosa para avaliar a degradação efetiva do petróleo pelas linhagens, através do decaimento do pico dos hidrocarbonetos em função da degradação. Além da análise cromatográfica foi realizado o acompanhamento da produção enzimática e de emulsificantes.

2.5. Toxicidade dos Compostos

Para avaliar a toxicidade do material residual, proveniente da degradação do petróleo, foram empregadas sementes de *Cucumis sativus* (pepino) de acordo com Tiquia et. al. (1996). Após a desinfestação, dez sementes colocadas equidistantes em placas de Petri forradas com papel filtro duplo, nos quais foram embebidos com 2mL do material residual nas concentrações de petróleo. Os experimentos foram realizados em triplicata e com dois controles, um com água destilada como controle positivo e outro apenas com petróleo como o controle negativo. Após o período de incubação (± 30 °C por 5 dias) foi calculada a porcentagem do índice de germinação.

2.6. Preparação da Amostra e análise do petróleo residual

Para a determinação da degradação, as amostras (fases aquosas e oleosas) foram submetidas a uma etapa de preparação. Para a separação dos subprodutos da fase aquosa foi realizada uma extração com o solvente diclorometano em funis de separação e a fase oleosa foi filtrada em papel de filtro (faixa amarela). Após a separação da fase aquosa foi realizada a segunda etapa de preparação da amostra onde se separa as frações do petróleo. O “clean up” foi realizado em colunas empacotadas com sílica ativada a 800°C por 4 horas, e eluída com 60 mL de hexano. Em seguida é preparada uma massa com o 1,5 mL do material residual e sílica que é adicionada na parte superior da coluna, após a adição da massa, 20 mL de diclorometano foi eluído na coluna para remoção da fase de hidrocarbonetos alifáticos. Esta fase foi injetada no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM modelo SHIMADZU®) para quantificação da degradação. A biodegradação do petróleo foi avaliada, após a etapa de preparação da amostra, por cromatografia acoplada a espectrômetro de massa, através do decaimento dos picos de concentração dos constituintes do petróleo em função da degradação.

2.7. Determinação Qualitativa de Atividade Enzimática

Os extratos metabólicos livres de células foram utilizados para a determinação das atividades da lignina e lacase. A atividade da lignina foi determinada por uma mistura composta por 1mL de tetrato de sódio (125mM-pH 3), 500µL de álcool veratrílico (10mM), 500µL de peróxido de hidrogênio e 500µL do extrato metabólico. O comprimento de onda utilizado para a leitura da lignina foi de 310nm. A atividade da lacase foi determinada usando 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolína) (ABTS) por uma mistura composta por 0,1mL de acetato de sódio (0,1 M-pH 5), 0,8 mL de uma solução de 3% de ABTS e 0,1 mL da solução enzimática, o comprimento de onda utilizado para leitura da lacase foi de 420nm.

2.8. Produção de emulsificantes pelos microrganismos em consórcio

Os extratos metabólicos livres de células foram utilizados para investigação da produção de biossurfactantes. Em tubos de ensaios foram adicionados 1mL do extrato metabólico e 1mL do óleo. Os óleos utilizados neste teste foram: petróleo, soja, lubrificante automotivo queimado, lubrificante automotivo, biodiesel de óleo de algodão e óleo diesel. Cada tubo de ensaio foi mantido sob agitação por 2 minutos. A leitura foi feita após 24 horas segundo a metodologia preconizada por Paraszkievicz et al., (2002).

2.9. Ensaio de Degradação com Consórcio em Biorreator

O consórcio que melhor degradou o petróleo foi submetido a um aumento de escala de 100mL do meio Bushnell Haas- BH para 3L do mesmo meio BH em biorreator (capacidade de 5 litros). A batelada simples foi preparada com 600 mL do inoculo padronizado de acordo com os resultados obtidos em frascos do consórcio, na mesma condição de pH e temperatura ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) do melhor ensaio e aeração controlada de 1vvm e utilizando 10% da concentração de petróleo.

3. Resultados e Discussão

3.1. Seleções das Linhagens Bacterianas e Fúngicas

Os testes qualitativos utilizando o indicador DCPIP mostram somente 9 isolados bacterianos apresentaram maior velocidade na oxidação biológica, o que pode ser evidenciado pela mudança da coloração do meio de azul para incolor, sendo nomeadas por B1, B5, B14 e B15 apresentaram um menor tempo de oxidação (24 horas de incubação). As demais linhagens apresentaram um tempo superior 48 horas.

O resultado obtido neste trabalho corrobora com o de outros autores como Hanson et al. (1993), utilizando o potencial degradador de cinco isolados bacterianos com relação ao óleo cru, verificaram que dois isolados foram selecionados porque ocasionaram a mudança na coloração do meio de cultivo, contendo o indicador DCPIP, após 12 horas de incubação a 35°C. Enquanto que os demais isolados responderam com menor rapidez ao processo de oxidação biológica apresentando a viragem da coloração do indicador após 24 horas de incubação na mesma temperatura. Os resultados obtidos com o teste de biodegradabilidade utilizando o indicador redox DCPIP mostraram que os inóculos de microrganismos nativos utilizados nos experimentos de biodegradação foram capazes de degradar a fonte oleosa (Mariano, 2009). Segundo Pirollo, (2008) ao testar a capacidade de degradação de vários óleos combustíveis pelos consórcios bacterianos que apresentaram oxidação do indicador DCPIP com 4 dias, resultado superior as linhagens isoladamente.

Em relação aos fungos filamentosos após o período de incubação foram observados que todas as linhagens apresentaram mudança da coloração azul para incolor. Destacando os *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger* que promoveram a descoloração do meio com 24 horas de incubação, enquanto que as demais linhagens testadas apresentaram um tempo de oxidação superior a 72 horas.

3.2. Ensaio de degradação

Todas as linhagens, fúngicas e bacterianas envolvidas no ensaio de degradação do petróleo isoladamente apresentaram crescimento da massa seca durante o período de incubação, mostrando que os microrganismos envolvidos no processo estavam aclimatados. Em um processo fermentativo de biorremediação, a produção de biomassa indica a adaptabilidade do microrganismo ao substrato e a transformação do composto

original, enquanto que a acidificação é justificada geralmente pela produção de ácidos orgânicos, indicadores indiretos de biodegradação (Rao, 2005). Segundo Maliyekkal et al. (2004), etapas de aclimações são importantes, pois revelam que inóculos de microrganismos pré-cultivados em compostos mais tóxicos podem degradar mais facilmente um composto menos tóxico.

Quanto ao pH, às linhagens tanto de fungos como de bactérias apresentaram valores próximos da faixa de neutralidade, entre 6,0 e 7,0 entrando de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura. O pH do meio age como agente selecionador dos microrganismos ativos. Em valores baixos, predominam fungos filamentosos e leveduras, enquanto em limites superiores, actinomicetes são favorecidos. As bactérias heterotróficas, em geral, preferem valores de pH próximos à neutralidade, que corresponde a faixa entre 6,0 e 8,0 (Gomes, 2004). O pH é um fator que influencia no desenvolvimento dos microrganismos, atuando como agente selecionador da microbiota. A maioria das bactérias heterotróficas e os fungos apresentam melhor desenvolvimento, tanto em solo como em água, em pH próximo à neutralidade, ou seja, pH na faixa de 6,5 a 7,5, embora os fungos sejam mais tolerantes às condições ácidas do que as bactérias (Balba et al., 1998).

Segundo Griffin (1994), o pH ótimo para o desenvolvimento de vários fungos encontra-se na faixa entre 4,0 e 6,0, porém, a maioria dos fungos filamentosos tolera variações de pH entre 2,0 e 9,0. Valores de pH entre 6,0 e 8,0 são os mais favoráveis à ação de bactérias degradadoras de petróleo, afirmando que a queda dos valores de pH se deve, provavelmente, a produção de ácidos intermediários que se formam durante o processo de biodegradação (Leahy e Colwell, 1990).

3.2.1. Teor de Óleo e Graxas

A taxa de degradação efetiva obtida através da avaliação do teor de óleo e graxas do resíduo com 10% do poluente teve media de 61,20%. Nos fungos o maior percentual de degradação foi apresentada pelo *Aspergillus terreus* com 61,45% e a menor degradação foi evidenciada pelo *A. oryzae* com 60,13%. Em relação às bactérias a maior degradação foi apresentada pela linhagem B5 com 62,52% e a pior taxa de degradação foi obtida pela Bactéria B15 com 60,79%. Segundo Ururahy, (1998) a utilizando um consórcio formado por 6 bactérias, 2 leveduras e 2 fungos filamentosos, foi obtida taxas de degradação de borra oleosa de 66,3%, a eficiência da biodegradação pode ser devido inibição de substrato ou aumento dos efeitos tóxicos.

Os percentuais obtidos no presente trabalho foram menores que os percentuais de redução do teor de óleos e graxas apresentada por Azevedo, (2010) onde foi encontrada um residual que variou de 84,02% obtido por *Aspergillus oryzae* na concentração de 6% de petróleo e 97,62% por *A. terreus* na concentração de 2% de petróleo. Nas condições de 10% da concentração do poluente, Souza (2009) avaliando a biodegradação em biorreator, observou uma redução no teor de óleos e graxas de 70,46%.

3.3. Preparação da Amostra e Análise do Petróleo Residual

A análise das frações dos principais compostos da amostra de petróleo evidenciou que o óleo em estudo é constituído por 71,05% de hidrocarbonetos saturados, 20,62% de hidrocarbonetos aromáticos e 8,33% de compostos nitrogenados, sulfurados e oxigenados-NSO.

Os hidrocarbonetos saturados representam para os microrganismos uma fonte de substrato em potencial, sendo mais facilmente biodegradados que os aromáticos, contudo uma análise mais específica poderia revelar se saturados recalcitrantes, como os alcanos ramificados pristano e fitano, estão presentes. A baixa concentração dos compostos NSO, em relação às demais frações, sugere uma certa susceptibilidade do petróleo ao ataque microbiano. A composição do petróleo de 636 navios petroleiros de diversas regiões do mundo foi avaliada, apresentando variação dentro das seguintes faixas: 40% a 80% de hidrocarbonetos saturados, 15% a 40% de hidrocarbonetos aromáticos e 0 a 20% de compostos NOS - nitrogenados, sulfurados e oxigenados (TISSOT & WELTE, 1978).

A biodegradação do petróleo foi avaliada, após as etapas de extração e preparação da amostra por “clean up”, em cromatografia acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM, SHIMADZU®), através do decaimento dos picos de concentração dos constituintes da fração alifática do petróleo em função da degradação. De maneira geral os microrganismos apresentaram degradação em todos os constituintes, com exceção das bactérias B5 e B14 que não apresentaram degradação do undecano. Os fungos mostraram-se mais eficientes em degradar a fração alifática do que as bactérias, os quais chegaram a uma degradação de mais de 60% no total dos constituintes (Figura 1).

Entre os microrganismos que podem ser utilizados para o tratamento biológico de efluentes de petróleo, os fungos vêm se mostrando hábeis em degradar compostos xenobióticos e outros de grandes cadeias moleculares que, em geral, são de difícil degradação. Os fungos sobrevivem e crescem em meios com concentrações elevadas de

compostos recalcitrantes e são capazes de utilizá-los como fonte de energia (Santaella et al., 2009).

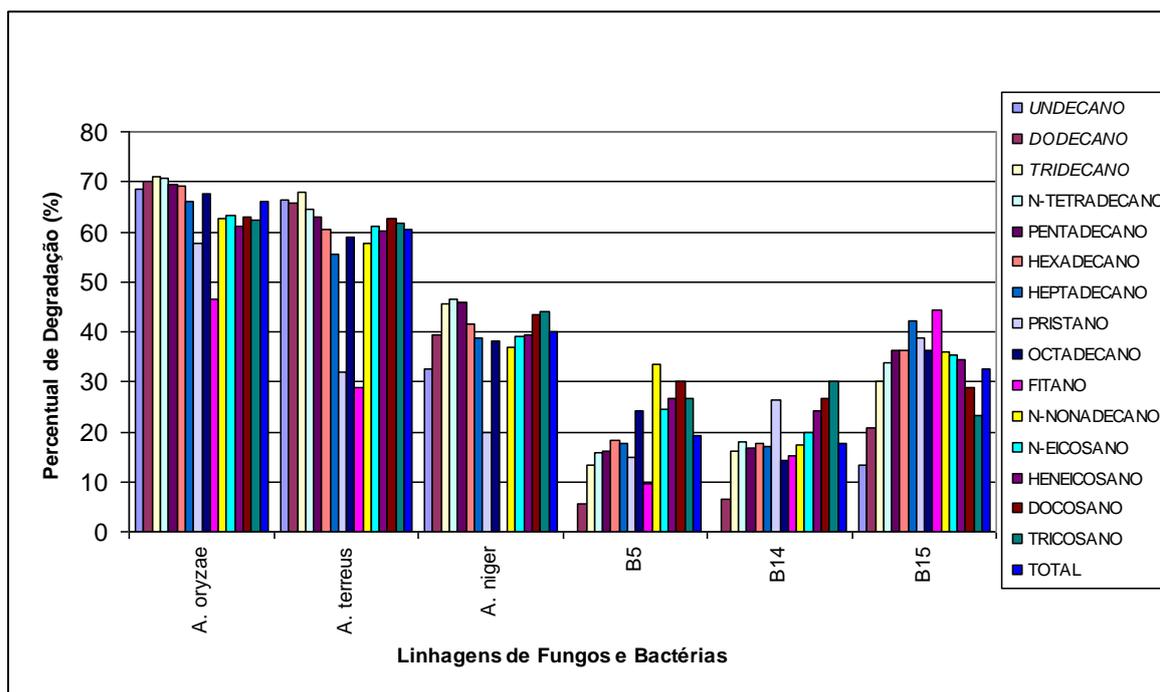


Figura 1 - Degradação dos constituintes da fração alifática do petróleo na aclimação com 10% do óleo poluente.

3.4. Degradação do petróleo por Consórcio

Após o período de incubação no processo de degradação do petróleo em frascos, pelos consórcios, observa-se na figura 2 que o melhor resultado obtido foi o ensaio do consórcio de número 12, onde os níveis das 6 variáveis independentes foram todos inferiores (2 blocos de gelose), com 91,96% de degradação dos constituintes da fração alifática do petróleo. Na tabela 1 podemos observar os resultados obtidos no delineamento experimental como degradação, biomassa, pH e produção de enzimas.

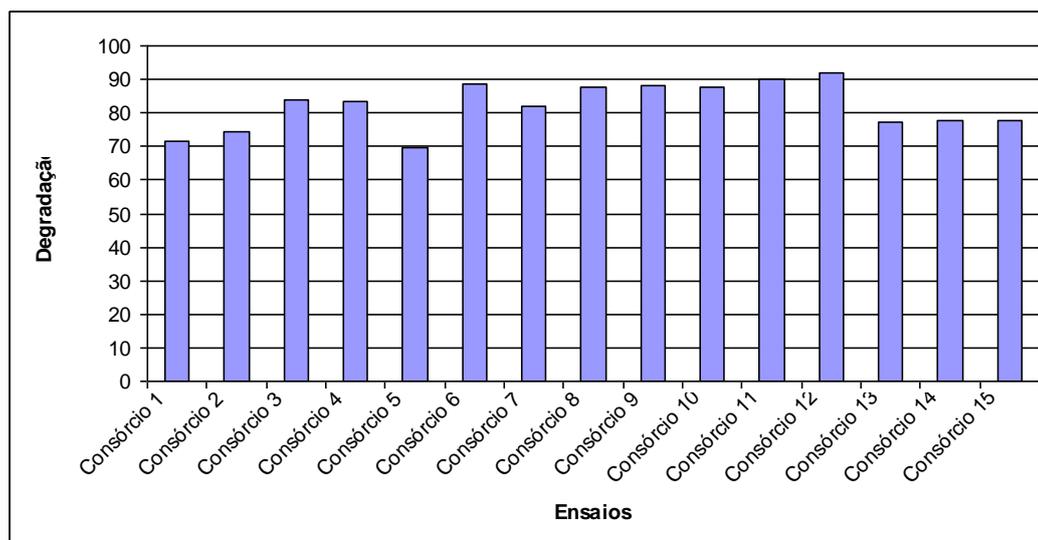


Figura 2 - Perfil de degradação da fração alifática do petróleo por consórcio utilizando planejamento de Plackett & Burman.

Tabela 1 - Valores de degradação, biomassa, pH, atividade das enzimas lignina e lacase e produção de surfactantes dos consórcio submetidos ao delineamento experimental do tipo Plackett & Burman.

Consórcio	Percentual de Degradação	Biomassa (g/L)	pH	Lignina (U/L)	Lacase (U/L)	Emulsificante de óleo automotivo (E24%)	
						Lubrificante	Lubrificante Queimado
1	71,70	0,059	6,5	606	7060	100	100
2	74,34	0,061	6,5	1348	3830	65	84
3	84,11	0,045	6,8	666	6350	67	71
4	83,33	0,059	6,7	672	5350	85	65
5	69,75	0,061	6,7	732	3500	84	73
6	88,42	0,309	6,6	1300	4310	89	75
7	81,87	0,288	6,5	830	5300	75	82
8	87,50	0,394	6,5	1288	4600	81	68
9	88,07	0,101	6,7	690	6600	89	92
10	87,86	0,062	6,9	200	2990	83	90
11	89,90	0,043	6,6	32	4200	67	81
12	91,96	0,057	6,7	546	5360	100	100
13	77,46	0,054	6,5	596	5820	70	70
14	77,66	0,067	6,7	672	5480	75	75
15	77,58	0,046	6,5	270	6060	73	73

Utilizando o software STATISTICATM (versão 6,0) para analisar as variáveis dependentes, que é a análise dos compostos degradados em cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa - CG-EM, o quadro 1 apresenta os efeitos principais das variáveis

sobre a degradação. A variável 1 (Bactéria 5) foi a que apresentou efeito estatisticamente significativo ($p=0,032911$). Então como apresentado na matriz do delineamento experimental de Plackett & Burman gerando 12 corridas e 3 pontos centrais, as condições empregadas pela corrida 12 foi a que apresentou o menor nível (2 blocos de gelose) em todas as variáveis independentes. Com base no resultado supracitado o inoculo do consórcio 12 foi escolhido para ser utilizado no ensaio de biorreator, pois apresenta o menor nível para todos os microrganismos e o inoculo da bactéria B5 é a única que interfere na degradação, comprovado com o valor de p inferior a 0,05.

Quadro 1 - Efeito principal do delineamento experimental, mostrando a variável que apresentou significância estatística.

Microrganismos	Efeito	Erro Padrão	T(8)	P	-95,%	+95,%
Média	82,10067	1,390116	59,06029	0,000000	78,8951	85,30628
Bactéria B5	-8,00167	3,108394	-2,57421	0,032911	-15,1696	-0,83370
Bactéria B14	-3,67167	3,108394	-1,18121	0,271442	-10,8396	3,49630
Bactéria B15	-0,82500	3,108394	-0,26541	0,797404	-7,9930	6,34297
<i>Aspergillus oryzae</i>	-4,84833	3,108394	-1,55975	0,157438	-12,0163	2,31964
<i>Aspergillus terreus</i>	2,10167	3,108394	0,67613	0,518026	-5,0663	9,26964
<i>Aspergillus niger</i>	6,68167	3,108394	2,14956	0,063819	-0,4863	13,84964

3.5. Ensaio em Biorreator

Definido o melhor inoculo através do delineamento experimental (item anterior), foi realizado um ensaio em biorreator em batelada simples que foi conduzido sob as condições de pH, sem agitação e taxa de aeração controlada, temperatura $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e no caldo de Bushnell Haas, com volume final de 3L. A cada 24 horas foram retidas alíquotas para avaliação da biomassa, onde podemos acompanhar o perfil de crescimento da massa seca (Figura 3). Segundo Mazzeo (2010) perfis de consórcios microbianos mistos apresentam uma similaridade característica, onde há um crescimento primário de um microrganismo degradando inicialmente o composto que dá a oportunidade de um segundo microrganismo degradar esses compostos degradados inicialmente e esse segundo microrganismo por sua vez dá oportunidade para um terceiro e assim por diante.

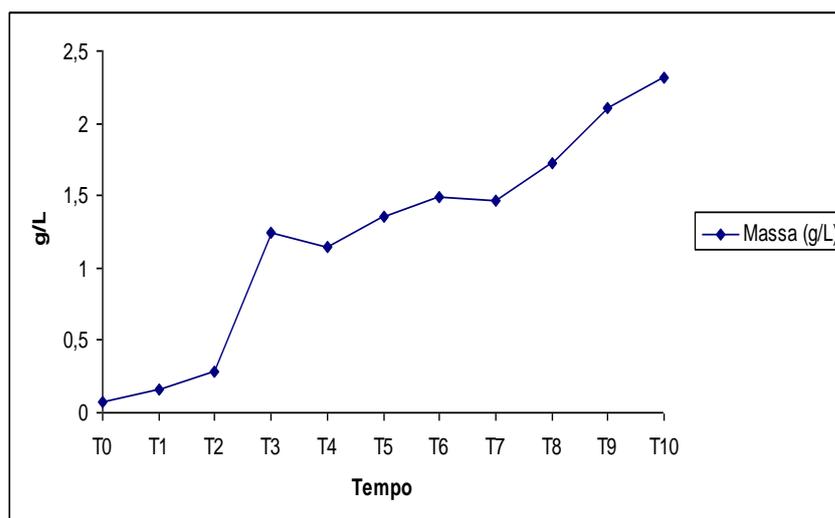


Figura 3 - Perfil de crescimento da massa seca obtido no ensaio de biorreator.

Na figura 4, observa-se o perfil de degradação da fração alifática do petróleo durante o ensaio em biorreator, determinado através da cromatografia gasosa. O 4º dia a degradação fica em torno de 51,04% para o undecano e 67,35% para heptadecano, no entanto um aumento mais acentuado acontece a partir do 7º e continua até o 10º dia de ensaio, onde se pode observar uma degradação total, dos constituintes da fração alifática, de 86,27% e 87,52% respectivamente.

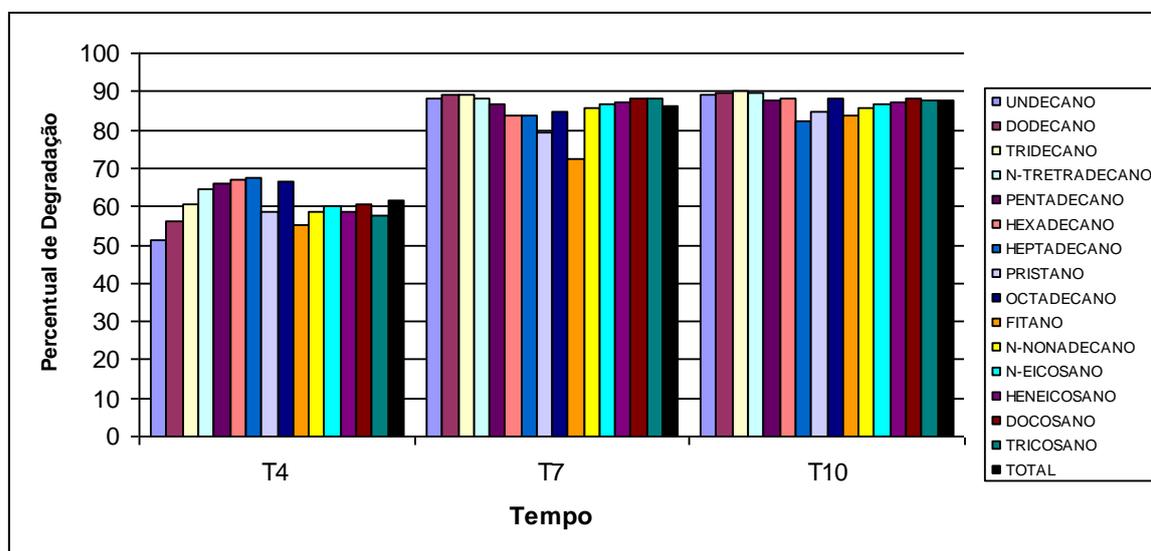


Figura 4 - Perfil de degradação dos constituintes do petróleo obtidos através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

Quando comparado aos melhores resultados com os microrganismos isoladamente o consórcio utilizado apresentou uma maior degradação dos hidrocarbonetos alifáticos estudados no décimo dia do experimento em reator biológico (figura 5). Na degradação de hidrocarbonetos complexos a utilização de consórcios de microrganismos mistos geralmente serão mais promissoras que as linhagens aplicadas separadamente. Este resultado corrobora com os obtidos por Uyttbroek et al. (2007), onde a ação combinada de microrganismos podem degradar em grau maior do que qualquer um deles sozinho. Fungos e bactérias são capazes de degradar parcialmente ou completamente hidrocarbonetos por cometabolismo, ou quando os produtos de sua degradação estão presentes, como mostrado com microrganismos isolados individuais ou por consórcios microbianos.

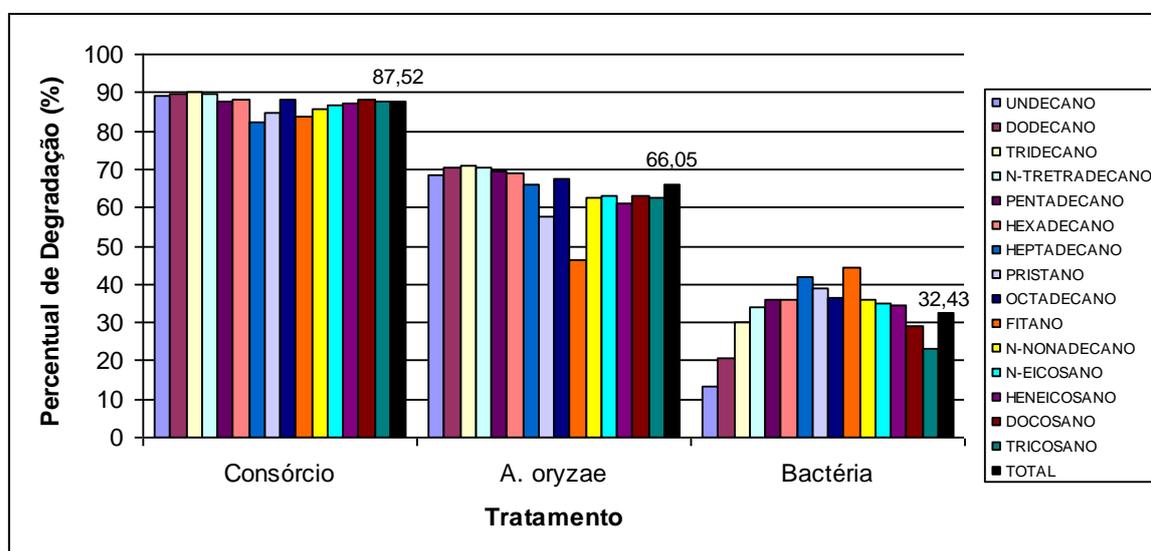


Figura 5 – Perfil de comparação dos melhores microrganismos com o consórcio utilizado no experimento em bioreator.

O consórcio mostrou no ensaio em reator uma produção de enzimas e de biossurfactante conforme observado no quadro 2, o que é importante no processo de degradação de hidrocarbonetos recalcitrantes e xenóbioticos. Estes metabolitos possuem uma grande capacidade de emulsificar e solubilizar hidrocarbonetos, fazendo com que passem a ter uma maior interação com a água, e facilitem o acesso de microrganismos aos contaminantes, contribuindo assim para que a degradação desses compostos ocorra de forma rápida (Pirolo, 2006).

O uso de biossurfactantes no controle da biodisponibilidade de poluentes presentes no ambiente é uma opção atrativa devido a sua biodegradabilidade e baixa toxicidade (Christofi & Ivshina, 2002).

Entre as enzimas produzidas, o sistema ligninolítico é de grande importância na recuperação ambiental, processo no qual os sistemas biológicos são utilizados para diminuir ou neutralizar poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que representam um risco à saúde humana por causa de seus efeitos biológicos prejudiciais (Arun et al., 2008).

A biodegradação de alcanos por microrganismos ocorre em etapas sucessivas de oxidação promovidas por enzimas do tipo monoxigenases e desoxigenases. Inicialmente pela ação de enzimas formam-se alcoóis, que logo são oxidados a aldeídos e em seguida a ácidos graxos que são oxidados novamente a propionato e acetato. O principal fator que varia nesse processo configurando um tempo maior é a capacidade dos microrganismos de degradar cadeias de tamanhos diferentes (Soriano et al., 2007).

Quadro 2 – Produção de enzimas e de biossurfactantes no ensaio em reator biológico com o consórcio.

Tempo	Enzimas		Emulsificantes (%)					
	Lignina (U/L)	Lacase (U/L)	Óleo Lubrificante Automotivo			Óleo Lubrificante Automotivo Queimado		
			E24	A	B	E24	A	B
1	732	3500	100	100	12,5	100	100	13,0
2	1300	4310	64	100	11,1	80	100	10,0
3	830	5300	63	33	83,0	64	100	18,7
4	1288	4600	89	100	8,0	52	58	16,6
5	690	6600	89	100	8,3	69	100	17,6
6	200	2990	88	100	17,3	70	91	10,5
7	32	4200	74	33	77,7	75	100	5,5
8	546	5360	85	100	8,6	68	100	20,0
9	596	5820	84	75	10,0	92	100	8,3
10	672	5480	80	75	9,5	100	100	4,0

* E24: Porcentagem da emulsificação total produzida; A: porcentagem do óleo emulsificado; B: Conteúdo de óleo não emulsão.

3.6. Toxicidade

Em relação a fitotoxicidade do extrato residual das linhagens causaram um **impacto médio** de 64,49% no índice de germinação (IG) das sementes de pepino. Entre os fungos maior índice foi observado no *Aspergillus oryzae* (65,12%) e o menor índice foi apresentado pelo *Aspergillus niger* (52,07%). Nas bactérias a melhor linhagem alcançou um índice de 87,96% e o menor índice foi de 61,03%. No final do ensaio de degradação em reator biológico o extrato residual apresentou IG das sementes de 67,90%, que é um resultado muito próximo quando comparado as linhagens separadamente. E a inibição da germinação de sementes e a redução do crescimento vegetal são indicadores da toxicidade dos hidrocarbonetos do petróleo. O estudo de toxicidade necessita de avaliações dos riscos indiretos provenientes da acumulação, magnificação e transformação que ocorrem com o poluente que podem afetar a flora e a fauna. Os parâmetros para utilizados para quantificar os efeitos adversos dos poluentes sobre a biota são variados como o número de organismos, taxa de reprodução, comprimento e massa corpórea, presença e quantificação anomalias, alterações fisiológicas, densidade, diversidade de espécies em uma comunidade (Zagatto & Bertolotti, 2006).

Segundo Souza (2008), além da toxicidade do poluente um dos motivos para que ocorra a redução da absorção de água e de oxigênio é gerada pela impermeabilização das sementes pelo óleo contaminante, este é um dos fatores inibitórios da germinação.

4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, observa-se que a toxicidade mostrou que os resíduos gerados pelas linhagens causaram um impacto no índice de germinação (IG) das sementes de pepino alcançando uma faixa entre 52,07% e 87,96%. A degradação efetiva do poluente avaliada pelo teor de óleo e graxas ficou próxima a 60%. Os fungos apresentaram melhores percentuais de degradação que as bactérias em todos os compostos alifáticos. No planejamento de Placket e Burman, destaca-se o ensaio do consórcio 12 com 91,96% de degradação da fração de hidrocarbonetos alifáticos. No ensaio em bioreator, observa-se no quarto dia de crescimento apresenta uma degradação de 62% dos hidrocarbonetos e ao final do experimento o consórcio apresentou uma degradação de 87% dos hidrocarbonetos alifáticos estudados.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Todas as linhagens tanto fúngicas como bacterianas apresentaram crescimento na massa seca, enquanto que o pH de todas as linhagens ficou em uma faixa próximo a neutralidade (6,0 e 7,0).
- A toxicidade mostrou que os resíduos gerados pelas linhagens em cultura pura causaram um impacto no índice de germinação (%IG) das sementes de pepino, alcançando valores na faixa entre 52,07% e 87,96%.
- A degradação efetiva do poluente avaliada pelo teor de óleo e graxa ficou em media de 60%.
- Os fungos apresentaram melhores resultados do que as bactérias na degradação de todos os compostos alifáticos.
- No planejamento fatorial do tipo Placket e Burman, os consórcios apresentaram uma degradação acima de 65%, onde teve destaque o ensaio do consórcio 12 com 91,96% de degradação da fração de hidrocarbonetos alifáticos.
- O consórcio número 12 ainda apresentou produção enzimática (lignina e lacase), assim como a produção de emulsificantes dentro dos padrões encontrados na literatura.
- No ensaio em bioreator, observa-se no quarto dia uma degradação de 62% dos hidrocarbonetos e ao final do experimento o consórcio apresentou uma degradação de 87% dos hidrocarbonetos alifáticos estudados.
- Em reator biológico o consórcio mostrou-se promissor na degradação de hidrocarbonetos alifáticos do petróleo podendo ser usado em áreas impactadas por petróleo e seus derivados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. Effect of Chemical Structures on Biodegradation. In: *Biodegradation and Bioremediation*. 2. ed. New York: Academic Press, 1999. cap 11, p.177-194.
- Arun A., Praveen R. A., Arthi A., Ananthi M., Sathish K. K., Eyini M. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, pseudomonas isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. *Appl Biochem Biotechnol* 151:132–42.
- Atlas, R. M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbial Reviews*, v. 45, p. 180-209. 1981.
- Atlas, R. M. Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Spill. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 52, p. 149-156. 1991.
- Atlas, R. M. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, v. 31, p. 178-182. 1995.
- Atlas, R. M.; Bartha, R. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. California: Benjamin Cummins Company. 1972.
- Azevedo, J. L. (Eds) *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2008.
- Balba, M. T.; Al-Awandhi, N.; Al-Daher, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: Microbiology methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiology Methods*. V. 32, p. 155-164, 1998b.
- Banat, I. M.; Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 495-508, 2000.
- Boonchan S.; Britz M. L.; and Stanley G. A. 2000. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, N. 3p. 1007-1019.
- Christofi, N & Ivshina, I. B. Microbial Surfactants and their use in Field Studies of Soil Remediation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 915-929, 2002.
- Desai, J. D. & Banat, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47-64, 1997.
- Duran, N.; Esposito, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B: Environm.*, 28, 83-99, 2000.
- Eckenfelder, W. W. *Industrial Water Pollution Control*. New York. McGraw-Hill Publishing Company, 1989.
- Eggen, T.; Majcherczyk, A. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v. 41, n. 2, p. 111-117, 1998.
- Esposito, E.; Azevedo, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004.

- Esposito, E.; Azevedo, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2ª. Ed. 2010.
- Félix, J.P.L. *et al.* Remoção de DQO e fenóis totais presentes em efluentes de indústria petrolífera utilizando reatores de leito fixo e fluxo contínuo inoculados com *Aspergillus niger* AN400. In: KATO, M.T. *Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos*. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2006. p. 183-198.
- Fernandez-Sanchez, J. M.; Ruiz-Aguilar, G. M. L.; Kane, S. R.; Kim, D.; Alvarez, P. J. J. 2001. biodegradation in aged contaminated soil: interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. *Science and Health*, v. 9. p. 105-114.
- Freitas Neto, M. A. 2007. Remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias de refinarias de petróleo através de reatores biológicos com fungos. *Revista Tecnologia*, Fortaleza, v. 28, n. 1, p.85-96.
- Gomes, E. B. Biodegradabilidade de Querosene de Aviação Movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-PE. Dissertação de mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos. Departamento de Antibióticos, UFPE. Pernambuco. 2004.
- Gomes, D. N. F. 2007. Análise qualitativa enzimática de fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. *Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal barra das jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco*. Cap. 2, pp. 56-71.
- Griffin, D.H. *Fungal physiology*. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1994.
- Gundersson, C.A.; Kostuk, J.M.; Mitcell, H.G.; Napolitano, G.E.; Wicker, L.F.; Richmond, J.E.; Stewart, A.J. Multispecies toxicity assessment of compost produced in bioremediation of an explosives-contaminated sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.16, p.2529-2537, 1997.
- Hanson, K. G.; Desai, D.; Desai, A. J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques* v7. n10. p. 745-748.
- Head, I.A., Swannell, R.P.J. (1999), Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, pp 234-239.
- Helfrich, P.; Chefetz, B.; Hadar, Y.; Chen, Y.; Schnabl, H. A novel method for determining phytotoxicity in compost. *Compost Science and Utilization*, v.6, p.6-13, 1998.
- Hernández, M.S. *et al.* Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, v. 73, n. 1, p. 93-100, 2006.
- Jones, W.R. (1998), Practical Applications of Marine Bioremediation, *Current Opinion in Biotechnology*, 9, pp 300-304
- Kataoka, A.P.A.G. 2001. *Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming"*. Rio Claro, Brasil (Ph.D Thesis. Instituto de Biociências, Unesp-Rio Claro).
- Knie, J. L. W.; Knie, E. W. B. L. Testes Ecotoxicológicos: Métodos, Técnicas e Aplicações. Florianópolis: FATMA. 2004.

- Kobayashi, H.; Rittmann, B. E. Microbial Removal of Hazardous Organic Compounds. *Environmental Science Technology*, v. 16, p. 170A-183A. 1982.
- Kohlmeier S.; Smits T. H. M.; Ford R. M.; Keel C.; Harms H. and Wick L. Y. 2005. Taking the Fungal Highway: Mobilization of Pollutant-Degrading Bacteria by Fungi. *Environmental Science Technology*, v. 39, p. 4640–4646.
- Kosaric, N. Biosurfactants and their Application for Soil Bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, no. 4, p. 295-304, 2001.
- Korda, A., Santas, A., Tenente, A., Santas, R. (1997), Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, pp 677-686
- Leahy, J. G.; Colwell, R. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*; v. 54, n° 3, p. 305-315, 1990.
- Liebeg, E. W. & Cutright, T. J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PHA contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 44, p. 55-64, 1999.
- Limbert, E. S.; Betts, W. B. Influences of Substrate Chemistry and Microbial Metabolic Diversity on the Bioremediation of Xenobiotic Contamination. *The Genetic Engineering and Biotechnologist*, v. 16, p. 159-180. 1996.
- Lin, G. H. ; Sauer, N. E., Cutright, T. J. Environmental regulations: A brief overview of their applications to bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, p.1-8, 1996.
- Maier, R. M. 2000. Microorganisms and organics pollutants. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C.P. IN: *Environmental Microbiology*. New York: Academic Press, Cap. 16, pp. 363-402.
- Maliakkal, S.M.; Rene, E. R.; Philip, L.; Swaminathan, T. Performance of BTX under substrate versatility conditions. *Journal of Hazardous Materials* v. 109: p. 201-211. 2004.
- Mariano, A. P.; Angelis D. F. Pirollo, M. P. S.; Contiero, J.; Bonotto, D. M. 2009. Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soils. *Braz. arch. biol. technol.* [online]. 2009, vol.52, n.5, pp. 1297-1312.
- Mazzeo, D. E. C.; Levy, C. E.; Angelis, D. F.; Marin-Morales, M. A. 2010. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment*. Article in press.
- Miranda, M. P. *et al.* Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 57, n. 3, p. 229-235, 1996.
- Mulligan, C.N. Environmental Applications For Biosurfactants. *Environmental Pollution*; v.133, p.183-198, 2005.
- Musat, F. and Widdel, F. 2008. Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype. *Environmental Microbiology*, 10: 10–19
- Nyer, E. K. *Groundwater treatment technology*. New York: Van Nostrand Reinhold, p.306, 1992.

- Nyanhongo G. S., Gomes J., Gübitz G., Zvauya R., Read J.S., Steiner W. 2002. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresour Technol* 84: 259–63.
- OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals nº207, 1984
- Oliveira, E.C. *et al.* Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. In: *Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos*. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2006. p. 133-148.
- Paraszkiewicz, K.; Kanwal, A.; Dlugonki, J., 2002. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology*. 92: 287-294.
- Pedrozo, M. F. M.; Barbosa, E. M.; Corseuil, H. X.; Schneider, M. R.; Linhares, M. M. *Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo*. Salvador: CRA, 2002.
- Pelczar Jr., M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*, v. 2. 2. ed. São Paulo: Makon Books, 1996.
- Pereira Jr., N.; Gomes, E. B.; Soriano, A. U. *Biodegradação de Hidrocarbonetos*. Rio de Janeiro: Escola de Química/ UFRJ. 2009.
- Pirollo, M P. S. Estudo da Produção de Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos. Dissertação apresentada ao Instituto da Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – São Paulo, 2008.
- Prince, M.; Sambasivam, Y. Bioremediation of Petroleum Wastes from the Refining of Lubricant Oils. *Environmental Progress*, v. 12, p. 5-11. 1993.
- Rao, K. S.; Rashmi, K.; Latha, J. N. L.; Mohan, P. M. 2005. Biorremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waster. *Indical Journal of Biotechnology*, v. 3, p. 139-143.
- RECUPETRO. 2004. *Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas*. Disponível em: http://www.recupetro.ufba.br/rec_001.htm. Acesso em: 16 de Maio de 2009.
- Richard, J. Y.; Vogel, T. M. Characterization of a Soil Bacterial Consortium Capable of Degrading Diesel Fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.44, p. 93-100. 1999.
- Rivera-Cruz, M. C.; Trujillo-Narcía, A. Estudio de toxicidad vegetal em suelos com petróleos nuevo e intemperizado. *Interciências.*; v. 29, p. 369-376, 2004.
- Rodrigues, M. I.; Lemma, A. F. *Planejamentos de Experimentos e Otimização de Processos*. Ed. 2ª. Campinas, SP: Casa do Espirito Amigo Fraternidade Fé e Amor. 2009.
- Rodrigues, M. T. T. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* v.41, n.3, p.2-3. 2003.
- Ron, E. Z.; Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotachnology* 13: 249-252.

- 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, 1998.
- Rhodes, A. & Fletcher, D.L. (1966). Principles of industrial microbiology. Pergamon Press, Oxford.
- Saadoun, I. et al. 2008. Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia region). *Braz. J. Microbiol* 39, pp. 453-456.
- Santaella, S.T. et al. *Remoção de fenol em reatores biológicos com fungos (RBF) utilizando meio suporte e água residuária sintética*. In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, CBESA, Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, 2005. CD-ROM.
- Santaella, S. T. 2009. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*
- Santos, E.M.A. et al. Influência do tempo de detenção hidráulica em um sistema UASB seguido de um reator biológico com fungos para tratar efluentes de indústria de castanha de caju. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 11, n. 1, p. 39-45, jan./mar. 2006.
- Santos, V.L.; Linardi, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potencial. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1001-1006, 2004.
- Sampaio, G. M. M. S. et al. *Emprego de reatores biológicos com fungos para remoção de parathion*. In: XI SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL – SILUBESA, Natal: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, 2004A. CD-ROM.
- Sampaio, G. M. M. S. et al. Pós-tratamento de efluente de um reator UASB através de um reator biológico com fungos. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 9, n.1, p.73-81, jan./mar, 2004B.
- Seabra, P. N. Uso da Biorremediação em Áreas Impactadas pela Indústria do Petróleo. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Eds.) Biodegradação. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p.41-60.
- Seabra, P. N. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Derivados. In: MELO, I. S.;
- Semple, K. T.; Reid, B. J.; Fermor, T. R. Impact of contamination strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants: *Review Environmental Pollution*, v.112, p.269-283, 2001.
- Silva M., Passarini M. R. Z., Bonugli R. C., Sette L. D. 2008. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environ Technol* 29:1331–9.
- Song, H. G.; Wang, X.; Bartha, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied Environmental Microbiology*, v.56, 652-656, 1990.
- Souza, C. S. Degradação de Óleo Diesel por Fungos. Dissertação de mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos. Departamento de Antibióticos, UFPE. Pernambuco. 2008.

- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., Harayama, S. (1997), Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil, *Environmental Science e Technology*, 31, pp 45-51
- Takaya, N. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p. 506-510, 2002.
- Tiquia, S. M., Tam, N. F., Hodgkiss, I. J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution* 93(3), pp. 249-256.
- Tissot, B. P.; Welte, D. H. 1978. Petroleum Formation and Occurrence. Berlim. Springer-Verlag.
- Trindade, P. V. O. (2002). “Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo”. *Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química*, Rio de Janeiro, Brasil, 127p.
- Ururahy, A. F. P. Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo. Tese de doutorado em Ciências. Escola de Química, UFRJ. Rio de Janeiro. 1998.
- Uyttebroek M.; Spoden A.; Ortega-Calvo J.; Wouters K.; Wattiau P.; Bastiaens L.; Springael D. 2007. Differential responses of eubacterial, Mycobacterium, and Sphingomonas communities in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil to artificially induced changes in PAH profile. *Journal of environmental quality* 2007;36(5):1403-11
- Vieira, F. C. S. 2004. Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea). Dissertação de mestrado em Engenharia ambiental. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFSC. Santa Catarina.
- Walter, M. V.; Crawford, R. L. Overview: Biotransformation and Biodegradation. In: HURST, C.J. et al. *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology; cap.76, p.707-708, 1997.
- Wang, W.; Keturi, P. H. Comparative Seed Germination Tests Using Ten Plant Species for Toxicity Assessment of a Metal Engraving Effluent Sample. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 52, p. 369-376. 1990.
- Wick, L. Y.; Remer, R.; Würz B.; Reichenbach, J.; Braun, S.; Schäfer, F. and Harms H. Effect of Fungal Hyphae on the Access of Bacteria to Phenanthrene in Soil. *Environmental Science Technology*, v. 41 (2), p. 500–505. 2007.
- Yu, S. H.; Ke, L.; Wong, Y. S.; Tam, N. F. Y. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Bacterial Consortium Enriched from Mangrove Sediments. *Environmental International*, v. 31, p. 149-154. 2005.
- Zagato, P. A; Bertoletti, E. *Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações*. São Carlos, SP. RIMA, pp 96, 2006.
- Zhang, Y.; Maier, W. J. & Miller, R. M. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. *Environmental Science and Technology*, v. 31, p. 2211-2217, 1997.

