

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR
FUNGOS ISOLADOS DE POÇOS E BORRA DE PETRÓLEO**

Josimas Alves de Santana

Recife – 2003

Josimar Alves de Santana

**POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR
FUNGOS ISOLADOS DE POÇOS E BORRA DE PETRÓLEO**

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

**Área de concentração: Microbiologia
Aplicada.
Orientador: Prof^a. Dra. Janete Magali de
Araújo**

Recife - 2003

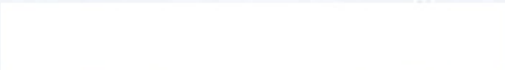
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *JOSIMAR ALVES DE SANTANA* AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 26 DE FEVEREIRO DE 2003 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:


Dra. ALDA DE ANDRADE CHIAPPETA
Departamento de Antibióticos/UFPE


Dra. ESTER RIBEIRO GOUVEIA
Pesquisadora DCR/CNPq


Dra. ELZA ÁUREA DE LUNA ALVES DE LIMA
Departamento de Micologia/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR:

Prof. Geraldo Jose Marques Pereira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE POS-GRADUAÇÃO

Prof. Paulo Roberto Freire da Cunha

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Profª Dra. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Profª Kesia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena

DIRETOR DO CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Profª Dra. Ana Maria dos Santos Cabral

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Profª. Dra. Leonor Costa Maia

**COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DOS
PRODUTOS BIOATIVOS**

Prof Dra. Alda Andrade Chiappeta

**VICE-COORDENADOR DO CUSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA
DOS PRODUTOS BIOATIVOS**

Profª Dra. Juliana Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

”E aprendi que se depende sempre
de tanta, muita diferente gente.
Toda pessoa, sempre, é as marcas
das lições diárias de outras tantas pessoas.”

Gonzaga Jr.

Dedico

A minha mãe Emília, o exemplo, e às
minhas filhas Joyce e Juliane, promessa e
esperança de futuro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tudo permitiu.

A prof^a. Dra Janete Magali de Araujo pela maneira que conduziu a orientação.

Aos microrganismos, "**Les *petites bete***" causa e solução de muitos males que afligem a humanidade.

A minha irmã, Zezita, pelo apoio em todos os sentidos.

Aos colegas e amigos mestrando do Pos-Biotec, Ana Rosa, Andrea, Daniela, Lina, Betânia, Tereza, Socorro pela cumplicidade em dividir, trabalho, angustia, alegrias e vitórias no decorrer do curso. E especialmente a leda: a amiga de longas datas.

Ao amigo José Américo: cúmplice e companheiro de todas as horas.

Aos professores e funcionários do Departamento de Antibióticos, em particular Dra. Maria do Carmo (Nena) e Dra. Maria de Fátima Queiroz, mais que professoras, instrumentos de Deus.

Aos técnicos, bolsistas, estagiários e em especial a Luciane Pinto (Lu), Mestranda em Genética, com os quais tive o prazer de conviver, aprender e trocar experiências.

Ao Dr. José Raimundo Filho e José Anacleto, Técnicos do Instituto Tecnológico de Pernambuco – ITEP – pela presteza em realizar as análises cromatográficas.

A Esposa, companheira, Rosangela, pela dedicação, paciência e valiosa contribuição.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Petróleo: Poluição Ambiental	3
2.2 Biorremediação	4
2.2.1 Formas de biorremediação	7
2.3 Microrganismos degradadores de petróleo	8
2.4 Seleção de microrganismos degradadores	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Meios de cultura utilizados	11
3.1.1 Caldo Sabouraud-Dextrose	11
3.1.2 Sabouraud-Dextrose-Agar	11
3.1.3 Bushnell-Haas (B-H)	11
3.2 Soluções e Hidrocarbonetos	12
3.2.1 Solução de Indicador redox	12
3.2.3 Óleo diesel	12
3.4 Ensaio primário de biodegradação	14
3.4.1 Inóculo	14
3.4.2 Ensaio em placas multi-poços	14
3.5 Ensaio secundário de biodegradação	15
3.6 Ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos	15
3.7 Análise Instrumental	16
3.7.1 Cromatografia	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Ensaio primário de biodegradação	18
4.2 Ensaio secundário de biodegradação	19

4.3	Ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos	22
4.4	Análise Cromatográfica em fase gasosa - CG	26
5.	CONCLUSÕES	33
6.	PERSPECTIVAS	34
7.	REFERÊNCIAS	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Pagina
FIGURA 3.1	Esquema/protocolo para o ensaio de biodegradação em placas multi-poços	15
FIGURA 3.2	Esquema/potocolo para ensaio primário de biorremediação	16
FIGURA 4.1	Percentuais dos fungos degradares de Hidrocarbonetos com crescimento em meio sólido (Sabouroud-Agar), usando como fonte de Carbono óleo diesel e indicador redoxi DCPIP, como acceptor de eletrons.	18
FIGURA 4.2	Percentuais dos fungos degradares de Hidrocarbonetos com crescimento em meio sólido (Sabouroud-Agar), em 30 dias, usando como fonte de Carbono óleo diesel volatilizado, em placa de Petri.	19
FIGURA 4.3	Colônias das linhagens DAUFPE – 706 (esquerda) e DAUFPE – 717 (direita) com 30 dias de cultivo em meio mineral - BH - Agar, usando como fonte de carbono óleo diesel volatilizado, em estufa DBO.	20
FIGURA 4.4	Aspecto macroscópico do ensaio de biodegradação da linhagem DAUFPE –706 (direita), após 20 dias de cultivo em meio mineral (B-H), com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm. (À esquerda a amostra controle, sem o inoculo).	22
FIGURA 4.5	Aspecto macroscópico do ensaio de biodegradação da linhagem DAUFPE – 736, após 20 dias de cultivo em meio mineral (B-H), com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm. (Em duplicata).	23
FIGURA4.6	Aspecto microscópico ótico, com aumento de 40X, do ensaio de biodegradação da linhagem DAUFPE – 738, após 20 dias de cultivo em meio mineral (B-H), com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm. A = micela formada pelo óleo cru em meio aquoso (B-H); B = Hifas permeando as fases hidrófila e hidrófoba.	24
Figura 4.7	Aspecto microscópico ótico, com aumento de 40X, do ensaio de biodegradação da linhagem DAUFPE – 738, após 20 dias de cultivo em meio mineral (B-H), com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm. A = micela formada pelo óleo cru em meio aquoso (B-H); B = Hifas permeando as fases hidrófila e hidrófoba.	25

FIGURA 4.8	Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 709 (II), DAUFPE – 736 (II) e DAUFPE – 738 (IV) comparados ao controle abiótico (I).	28
FIGURA 4.9	Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 700 (I), DAUFPE – 706 (II) e DAUFPE – 735 (III), comparados ao controle abiótico (IV).	29
FIGURA 4.10	Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 727 (II), DAUFPE – 739 (II) e DAUFPE – 722 (III) comparados ao controle abiótico (IV).	30
FIGURA 4.11	Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 5,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 736 (I), DAUFPE – 709 (II) e DAUFPE – 706 (III) comparados ao controle abiótico (IV).	31
FIGURA 4. 12	Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 10,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 706 (I), DAUFPE – 709 (II) e DAUFPE – 736 (III) comparados ao controle abiótico (I).	32

LISTA DE TABELAS

TABELA		PAGINA
TABELA 2.1	Composição do petróleo bruto segundo Sugiura et al (1997).	4
TABELA 2.2	Tecnologias de biorremediação (Herson & Baker, 1994).	8
TABELA 3.1	Fungos utilizados.	13
TABELA 4.1	Resultado da Seleção Primária - Oxidação de Hidrocarbonetos e da Seleção Secundária - Diâmetro da Colônia das Linhagens de Fungos Estudadas.	21

RESUMO

A biorremediação constitui uma emergente e promissora opção tecnológica para o tratamento de áreas contaminadas. Atualmente, em decorrência dos grandes acidentes marítimos, que vem ocasionando poluição ambiental por petróleo, vários estudos mostram o grande potencial dos microrganismos para melhorar a qualidade do meio ambiente através da biorremediação. Com vistas a esta aplicação, foram utilizados 21 fungos isolados da borra e 9 isolados de poços de petróleo do Canto do Amaro – Bacia Petrolífera Potiguar, explorada pela Petrobras, situada a 3,5km da capital do Estado do Rio Grande do Norte - para testar a capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo. Todos os fungos foram submetidos a uma seleção primária, através do método de Hanson (1993) o qual usa 2,6 – Diclorofenol - Indolfenol (DCPIP), como aceptor de elétrons, para mostrar através de mudança de cor (de Azul para Incolor) do indicador a evidente oxidação microbiana de hidrocarbonetos. Neste ensaio primário, dos 30 fungos utilizados, 37% (11) da borra e 30% (9) de poços, mostraram-se capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo, enquanto 23% (7) demonstraram capacidade e o restante 10% (3) não demonstraram capacidade de usar os hidrocarbonetos do petróleo como fonte de Carbono. A seleção secundária, cultivo em meio mineral sólido, mostrou que 57% (17) dos fungos quando cultivados em meio sólido com papel filtro na tampa, impregnado com óleo diesel, exibiram colônias com 9 cm de diâmetro após 30 dias de cultivo enquanto 33% (10) apresentaram colônias variando de 2 a 5cm e, em apenas 10% (3) não foi observado crescimento. Dos 17 fungos selecionados como os melhores nas seleções primária e secundária, 9 linhagens foram testados em meio mineral (Bushnell-Haas) com 1% de petróleo bruto e submetido a fermentação sob agitação durante 20 dias. Este primeiro resultado, obtido para fermentação em meio líquido, mostra que as linhagens DAUFPE-709, DAUFPE-738, DAUFPE-736 e DAUFPE-706 apresentaram degradação quase que total do petróleo bruto, comprovado através da cromatografia gasosa, em comparação com o controle. A linhagem DAUFPE-739 que no ensaio secundário apresentou colônia com 2cm de diâmetro, comprovou sua baixa eficiência em degradar o petróleo bruto. Fermentações com concentrações de 5% e 10% do petróleo bruto para estas linhagens, mostraram, através dos perfis cromatográficos, que as linhagens DAUFPE-706, DAUFPE-709 e DAUFPE-736 apresentaram maior Capacidade em degradar hidrocarbonetos do petróleo, nas condições testadas. Podemos

Santana, J. A. Potencial de degradação hidrocarbonetos por fungos isolados poços e borra de petróleo
aferir que estas linhagens apresentam um grande potencial para degradar
petróleo bruto, se mostrando promissoras para a utilização no processo de
biorremediação.

Palavras - Chave

1. Biodegradação 2. Fungos 3. Biotecnologia

ABSTRACT

Bioremediation constitutes in a emerging and promising technological option for the treatment of contaminated sites. Currently, as a result of large marine accidents, that have been causing environmental pollution due to oil spill, several studies show the potential of microorganism to improve the quality of the environmental through bioremediation. Seeking such an application 21 isolated fungi from residuum and 9 from wells of Canto do Amaro – Oil Potiguar Basin, operated by Petrobras, located 3.5 km from the state capital of Rio Grande do Norte. Were used to test the degradability of hydrocarbons. All the fungi underwent a primary screen, using 2, 6-Diclorophenol indophenol (DCPIP), as electrons acceptor, to show that the color changing (blue to colorless) indicates the microbial oxidation of hydrocarbons. In the primary essay, from the 30 studied fungi, 37% (11) came from residuum and 30% (9) came from wells showed it selves high efficient in crude-oil degradation, while the others 23% (7) and 10% (3) did not show crude-oil degradation capacity. The secondary selection, culturing in solid mineral growth medium, showed that 57% (17) of the fungi when cultivated in solid medium with a filter paper impregnated with diesel at the top, resulted a 9cm diameter colony after 30 days of cultivation, while 33% (10) resulted colonies varying from 2 to 5 cm, and in only 10% (3) no growth was observed. Nine strains were tested in mineral medium (Bushnell-Haas) containing 1% of crude oil, and submitted to fermentation under stirring for 20 days. The first result showed that the strains DAUFPE-709, DAUFPE-738, DAUFPE-736 and DAUFPE-706 showed almost total degradation of the crude oil, observed by gas chromatography in comparison to the control. The strain DAUFPE-739 showed a 2cm colony at the secondary essay, proved its low efficiency in degrading the crude oil. The fermentations at 5% and 10% concentration of crude oil by these strains shoed through chromatographic profiles that the strains DAUFPE-706, DAUFPE-709 and DAUFPE-736 presented a superior degradation of hydrocarbons in these tested conditions. We can conclude that these strains show a good potential for degrading crude oil, showing to be very promising for use in the bioremediation process.

Keywords

1. Biodegradation 2. Fungi 3. Biotechnology

1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento tecnológico de combustível e óleo lubrificante um número relevante de derivados de petróleo apresenta considerável importância em todas as áreas de atividade do homem. Em decorrência desta ampla utilização, o assim chamado "ouro negro", ocupa grandes áreas para estocagem e armazenamento, uma vez que nem sempre a região produtora é a mais consumidora. Levando em consideração este deslocamento, aumentaram a ocorrência de desastres, ocasionando vários problemas de ordem ecológica, poluindo vastas áreas por derramamento de petróleo, seja na rota de transporte por oleodutos ou petroleiros.

Os vazamentos nos sistemas de armazenamento ou transporte de petroderivados para outros navios, apesar da segurança operacional promove freqüentes acidentes, o que torna os ambientes marinhos e litorâneos vulneráveis a poluição por estes produtos (EZRA *et al.* 2000).

A tecnologia da biorremediação tem mostrado eficácia e praticidade para a limpeza de ambientes contaminados, e vem se destacando como uma excelente opção para restauração de áreas poluídas por hidrocarbonetos do petróleo, como apresentados por JORGENSEN *et al.*, (2000), BARATHI &VASUDEVAN (2001) e D'EL ARCO & FRANCA (1999).

A atividade microbiana sobre resíduos poluentes, embora, seja fato conhecido há mais de um século, somente nos últimos 40 anos a biorremediação vem se destacando como um processo efetivo de grande aplicação para melhorar a qualidade de áreas impactadas (BACKER. & HERSON; 1994).

O isolamento de microrganismos nativos e a adaptação dos mesmos ao poluente se têm mostrado uma técnica bastante promissora para o sucesso da biorremediação (JUHASZ & NAIDU, 2000; D'EL ARCO & FRANCA, 1999).

Para demonstrar que uma determinada biorremediação apresenta-se viável, segundo Atlas, 1995, é necessário verificar, inicialmente sob condições de laboratório, a ocorrência das taxas de biodegradação de hidrocarbonetos e posteriormente realizar experimento "*in situ*" para verificar a eficácia daquela microbiota.

Estudos de biorremediação envolvendo fungos têm apresentado resultados bastante eficazes no tratamento de resíduos de difícil degradação por bactérias, pois não necessitam da elaboração de um grande número de enzimas como no caso das bactérias (BENTO & GRAYLARDE 2001).

O objetivo do presente trabalho foi selecionar fungos que apresentassem alta atividade em degradar o petróleo bruto, usando, o mesmo, como fonte de carbono, considerando vários fungos isolados de borra e de poços de petróleo oriundos do Canto do Amaro – bacia petrolífera Potiguar, explorada pela Petrobras, situada a 3,5km da capital do Estado do Rio Grande do Norte.

2. REVISAO DA BIBLIOGRAFIA

2.1 Petróleo: poluição ambiental

O petróleo é uma fonte de energia indispensável para a vida do homem, entretanto, as atividades petrolíferas, decorrentes de falhas nos processos de extração, produção, transporte e armazenamento deste produto e de seus derivados, têm contribuído para a contaminação de lençóis freáticos, solos, ambientes estuarinos e marinhos, constituindo atualmente uma das grandes preocupações dos órgãos governamentais e da sociedade (ALEXANDER, 1999).

Aproximadamente 3,5 milhões de toneladas de petróleo são transportados por ano. Esse deslocamento das regiões de maior produção para aquelas de maior consumo tem ocasionado incidentes que vêm provocando grandes impactos ambientais (ROSEMBERG, 1996).

O petróleo e seus derivados passaram a ocupar uma posição de destaque em todos os ramos da atividade humana com ampla aplicação nas diversas áreas da indústria, sendo conhecidos na década de 70 como "ouro negro". Atualmente, ainda mobiliza grande parte da sociedade no processo de extração, refino e estocagem em áreas distintas do planeta, possibilitando a ocorrência de acidentes e contaminações ao meio ambiente (COLOMBO *et al*, 1996; BALBA *et al*, 1998).

O petróleo contém centenas de compostos que, de acordo com sua solubilidade em solvente orgânico, estão agrupados em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. A fração saturada inclui alcanos de cadeia reta e ramificada, além dos cicloalcanos; a fração aromática contém os hidrocarbonetos monoaromáticos (Benzeno, Tolueno, Xileno, etc.), e poliaromáticos (naftaleno, Benzo-pireno) além de naftenos aromáticos. As frações de resina e de asfalto, constituem moléculas polares que contém Nitrogênio, Enxofre e Oxigênio, sendo sólidos amorfos dispersos no óleo (SUGIURA *et al*, 1997).

Estas frações de hidrocarbonetos apresentam diferentes graus de sensibilidade à biodegradabilidade, sendo as frações mais susceptíveis as dos n-alcanos e dos hidrocarbonetos com 1 a 3 anéis aromáticos (BLACKBURNS & HAFKER, 1993; (SUGIURA *et al*, 1997). Enquanto os hidrocarbonetos policíclos aromáticos (PAH), constituídos por anéis benzênicos lineares ou aglomerados, são compostos químicos recalcitrantes, isto é, persistentes e de difícil biodegradação, apresentam baixa solubilidade em água e tendem a se

aderir às partículas na superfície do meio ambiente. Além de sua persistência no solo eles são potencialmente, carcinogênicos (MULLER *et al*, 1996).

A composição do óleo bruto difere, dependendo de sua origem geológica, e, ainda assim, podem ocorrer variações dentro de diferentes zonas da mesma formação geológica. Na **TABELA 2.1** pode ser observada a composição relativa do óleo bruto, segundo SUGIURA *et al* (1997).

TABELA 2.1: Composição do petróleo bruto segundo SUGIURA *et al* (1997)

FRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	CONTEÚDO RELATIVO (%P.P)
ASFALTENOS	14,5 ±0,1
SATURADOS	64,1 ±5,4
AROMATICOS	10,9 ±2,8
RESINAS	2,5 ±0,1

Em geral as primeiras providências para atenuarem o efeito ambiental do derramamento de petróleo é a coleta física do material por meio de adsorventes e escumadeiras superficiais. No entanto alternativas como, por exemplo, o uso de dispersantes, a queima do óleo *in situ* ou a aplicação de agentes que catalisem a foto-oxidação, entretanto, para grandes derramamentos não surtirá efeito, além de causar problemas para a fauna e flora daquele ecossistema.

A biorremediação é uma estratégia mais emergente e menos agressiva, pois, não agride o ambiente, desta forma é a mais adequada para a manutenção do equilíbrio ecológico (ROSATO, 1997). Segundo PRINCE (1993) existe várias patentes sobre o processo de biorremediação e 40 patentes de companhias que oferecem produtos (consórcios microbianos) e serviços sobre o assunto.

2.2 Biorremediação

A agressão ao meio ambiente remonta há décadas. Um dos primeiro a relatar a importância da aplicabilidade dos microrganismos na degradação dos hidrocarbonetos foi Zobell (ROSATO, 1997), que em 1946 enfatizou que esta degradação dependia da natureza química dos compostos do petróleo e das condições ambientais.

A utilização de microrganismos ou de processos microbianos na desintoxicação de áreas contaminadas ou no tratamento de resíduos, em geral, constitui uma importante tecnologia que trará uma contribuição efetiva na limpeza dos diversos ecossistemas (HANSON *et al*, 1993; ATLAS, 1995; YATEEM *et al*, 1998, D'EL ARCO & FRANCA, 1999; HERSON *et al*, 1999; JORGENSEN *et al*, 2000; BARATHI & VASUDEVAN, 2001).

Esta tecnologia é de baixo custo e de grande aceitabilidade pela comunidade científica e pela sociedade. Segundo PRINCE & SAMBASIVAM (1993) os benefícios e as vantagens oferecidas pela biorremediação são:

- Baixo custo energético das transformações bioquímicas.
- Possibilidade de tratamento no local.
- Redução dos custos no transporte.
- Permanente eliminação de resíduos, com conseqüente redução de possíveis riscos ambientais.
- Redução de riscos de contaminação em outras áreas.
- Boa aceitação pela opinião publica.

O processo de biorremediação, segundo ATLAS (1995) pode ter duas abordagens: a primeira utiliza a capacidade metabólica da população microbiana indígena *in situ* contaminando os fatores que limitam a velocidade de degradação de hidrocarbonetos, através da adição de nutrientes. A segunda estratégia é inocular a área contaminada com uma população, ou consorcio microbiano externo, cuja atividade degradadora de hidrocarbonetos já é conhecida. Apesar da discussão e censura por órgãos ambientais, em relação á aplicação de microrganismos no sentido de aumentar a degradação de hidrocarbonetos no solo, várias companhias atuam no mercado ativo de inóculo microbiano (BARTHA, 1986).

A presença do inoculante degradador de hidrocarboneto, segundo VECCHIOLI *et al* (1990) aparentemente não afeta a habilidade da microbiota indígena que consegue sobreviver e competir durante o processo de degradação. Estes autores observaram um aumento de 22%, na biorremediação de hidrocarbonetos em relação ao solo não inoculado, mas com a microbiota indígena ativa.

A aceleração do processo de degradação de hidrocarboneto por inoculante é uma técnica de biorremediação conhecida como bioaumento que pode restaurar os ecossistemas sem agredir o meio ambiente (YATEEM *et al*, 1998; D'EL ARCO & FRANCA, 1999; BARATHI & VASUDEVAN, 2001).

O sucesso da biorremediação *in situ*, segundo ATLAS (1995) surgiu após o derramamento de 11 milhões de galões de petróleo do Exxon Valdez em 1989 no Prince William Sound, atingindo 1750 Km da costa do Golfo do Alaska. As praias de Snug Harbor e Passage Cave foram selecionadas para a biorremediação, utilizando a estratégia do bioestímulo, através da aplicação de fertilizantes - Nitrogênio, e Fósforo - que podem estimular a flora microbiana nativa a metabolizar os hidrocarbonetos e assim promover a limpeza ambiental (WOLF *et al*, 1994). O resultado, segundo os referidos autores, foi que após três a quatro semanas era possível observar o contraste da área tratada que se mostrava recuperada quando comparada com a área controle, ainda enegrecida. Ainda os ensaios químicos mostraram que 70% dos alcanos tinham sido degradados.

Entre as frações do petróleo, n-alcanos com cadeias de comprimento intermediárias (C₁₉ - C₂₀) são os substratos que degradam rapidamente, enquanto os n-alcanos de cadeia curta são os mais tóxicos (KLUG & MARKOVERTZ, 1971; SINGER & FINNERTHI, 1998). Os alcanos de longas cadeias (C₂₀ e C₄₀) são hidrófobos sólidos, difíceis de serem degradados por sua baixa solubilidade em água (BARTHA, 1986).

Uma vez estabelecido o microrganismo - microbiota indígena ou inóculo de consorcio microbiano - as condições ambientais podem ser controladas ou alteradas para estimular o crescimento microbiano. Os fatores ambientais como temperatura, nutrientes inorgânicos, aceptores de elétrons (Oxigênio, Nitrato, Sulfato) e pH podem ser modificados para estimular o ambiente para a biorremediação (HERSON & BAKER, 1994).

Para que a eficiência da tecnologia da biorremediação seja demonstrada, é importante que a habilidade degradadora do microrganismo seja evidenciada sob condições controladas. A adaptação da cultura microbiana ao poluente, o suprimento de Oxigênio e nutrientes inorgânicos que viabilizem o metabolismo primário do microrganismo, tem se mostrado eficiente, favorecendo o bioaumento

da cultura usada na biorremediação (OBUEKWE & AL-ZARBAN, 1998; JORGENSEN *et al*, 1999; D'EL ARCO & FRANÇA, 1999; ALDRETT *et al* 1999; YANG *et al*, 1999; PUUSTINEN & SUORTTI, 2000; OUDOT, 2000; LI *et al*, 2000).

A avaliação da biorremediação *in situ* é difícil, em decorrência da distribuição de óleo no meio ambiente. ATLAS (1991) relata que as proporções dos hidrocarbonetos, pristano (um terpenoide insaturado com C₁₉) ou o Fitano (um diterpenoide saturado com C₂₀) podem ser usadas como padrões, para determinar o grau de mineralização na mistura do petróleo, uma vez que a velocidade de biodegradação destes é menor que a dos n-alcanos. Neste padrão admite-se que o pristano e o fitano permanecem não degradados enquanto determina-se a concentração de n-alcanos na mistura do petróleo. ATLAS (1991; 1995) enfatiza que se pristano ou fitano não forem degradados possa-se recorrer a Hopano (um terpeno policíclico saturado com C₂₀), como um padrão alternativo, uma vez que, também, é um hidrocarboneto de difícil degradação.

As pesquisas a respeito da biorremediação de óleo bruto estão avançadas e consolidadas, entretanto o mesmo não pode ser dito sobre a biorremediação de derivados do petróleo como querosene (SUGIURA *et al*, 1997, NOCENTINI *et al*, 1997; NOCENTINI *et al*, 1998, apud NOCENTINI *et al*, 2000). Contudo, nos últimos anos, a aplicação da biorremediação em áreas contaminadas por derivados destilados do petróleo tem tido atenção especial (WANG & BARTHA, 1994, APUD NAWOONG *et al*, 2001), provavelmente por este tipo de poluente ser mais comum nos dias atuais.

2.2.1 Formas de biorremediação

Embora a biorremediação seja vista como uma nova tecnologia, este processo vem sendo utilizado há mais de 100 anos no tratamento e na transformação de produtos residuais. O tratamento de efluente industrial através de lodo ativado e sistema de coluna fixa é um processo que utiliza população microbiana aclimatada (ECKENFELDER, 1989).

Diferente do tratamento de resíduos municipais, que apresentam uma mistura homogênea, e uniforme, a biorremediação ocorre em ambiente heterogêneo como solo em que o contaminante pode estar associado á partículas do solo ou

dissolvido na interface líquido – solo – ar, tornando o processo muito complexo. A tecnologia da biorremediação classificada como *ex-situ* é a modalidade que envolve remoção do material contaminado para outra área, enquanto que na técnica *in-situ*, o tratamento do material contaminado é realizado no próprio local (TABELA 2.2) (HERSON & BAKER, 1994). Ressaltando que toda tecnologia de biorremediação depende da capacidade metabólica e fisiológica da flora microbiana atuante naquele local e das condições ambientais favoráveis para ocorrer à degradação (HEAD & SWANNELL, 1999).

Portanto, todas as técnicas de biorremediação têm de vencer uma etapa importante e difícil, que é a escolha da estratégia que melhor convém e a escolha do(s) microrganismo(s) que apresente melhor adaptação ao projeto de biorremediação (BARDI *et al*, 2000).

TABELA 2.2 Tecnologias de biorremediação (HERSON & BAKER, 1994).

TÉCNICA	MODALIDADE	DESCRIÇÃO
LANDFARMING'S	ex-situ	Sistemas de tratamento da fase sólida, para solo contaminado.
BIORREATORES	ex-situ	A biodegradação ocorre em contêiner, longe do sitio de contaminação.
BIOAUMENTO	ex-situ	Uso de culturas microbianas a um meio contaminado, para potencializar a biorremediação, e/ ou auxilio de biorreatores
COMPOSTAGEM	ex-situ	Processo aeróbio, no qual se adiciona um agente de entumescimento, em reator de aeração contínua, em pilhas estáticas ou aeradas.
BIOESTÍMULO	in-situ/ex-situ	Uso de culturas microbianas a um meio contaminado para potencializar a biorremediacao em geral com auxílio de biorreatores.
BIOVENTILAÇÃO	in-situ	O Oxigenio seco e utilizado com o objetivo de estimular e acelerar a atividade microbiana
BIOFILTROS	ex-situ	O uso de colunas microbianas para tratar a emissão de ar;

2.3 Microrganismos Degradores do Petróleo

Em ambiente aquático e terrestre os microrganismos - bactérias, fungos e leveduras- são os principais agentes com metabólica degradadora de hidrocarbonetos do petróleo (ALEXANDER *et al*,1982; HEAD & SWANNELL, 1999). Segundo HANSON *et al*, (1993) bactérias e leveduras parecem ser dominantes na

degradação em ecossistemas aquáticos enquanto fungos e bactérias são os principais degradadores em ambiente de solo.

Apesar da ampla atividade metabólica dos microrganismos, a degradação completa de hidrocarbonetos do petróleo não ocorre pela ação de uma única espécie microbiana, como enfatiza BALBA *et al* (1998).

Os gêneros de bactérias comumente, reconhecidos como responsáveis pela degradação de óleo, são: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* e , *Bacillus*. Entre os fungos destacam-se *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Sporobolomyces* (ATLAS & BARTHA, 1982; SARKHOH *et al.*, 1990).

As populações microbianas capazes de degradar hidrocarbonetos, normalmente, constituem menos de 1% da microbiota presente num certo ambiente, no entanto quando exposta ao óleo poluente, a população de tais microrganismos aumenta, em geral, para 10% (ATLAS, 1995).

Os diferentes resultados da ação microbiana sobre os hidrocarbonetos do petróleo, nas diversas partes do mundo, se devem as diferentes temperaturas, aos diferentes tipos de solo, da concentração, do tipo de hidrocarbonetos bem como da disponibilidade de Oxigênio (NOCENTINE *et al*, 2000).

Varias bactérias e fungos são responsáveis por bons resultados obtidos pela biorremediação em várias partes do mundo. VASUDEVAN E REJARAN (2001) relatam que o sucesso conseguido na biorremediação do solo contaminado por petróleo, resultou da alta concentração da população microbiana em consorcio. A biorremediação de grande área costeira, apos a guerra do Golfo, no Kuwait, foi conseguida com sucesso utilizando microbiota nativa, envolvendo fungos e bactérias (YATEEM *et al*, 1998). Microrganismos nativos adaptados ao óleo demonstraram eficiência durante compostagem de resíduos de óleo, derramados em solos próximos aos tanques de estocagem na região de Forte Riley, no Estado do Kansas (SCHONBERNER, 1998).

Culturas dos basideomicetos *Phenerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Coriolus versicolor*, que provocam a podridão branca na madeira, mostraram excelente atividade metabólica na limpeza de áreas contaminadas num incidente com derramamento de petróleo no Golfo Pérsico. BALBA *et al* (1998) relatam que estes basideomicetos em diferentes concentrações de nutrientes apresentaram resultados que os apontam como bastante promissores para a biorremediação, pois, demonstraram ser capazes de degradar compostos que não estão no espectro de degradação das bactérias. Os fungos responsáveis pela podridão branca são capazes de degradar eficientemente a lignina através da ação das enzimas fenol oxidase, lignina peroxidase, manganês peroxidase e laccase, potentes enzimas extracelulares, e responsáveis pela ação degradadora dos fungos da podridão branca (LI *et al*, 2001).

2.4 Seleção de microrganismos degradadores

O passo inicial e um dos mais importantes para se propor a biorremediação, é a escolha de microrganismos. BENTO & GAYLARDE (2001) advertem para o fato de que o isolamento de determinado grupo microbiano de um poluente não consolida sua capacidade de degradação do referido poluente. É necessário, então, que se verifique se os mesmos são capazes de crescer naquele ambiente e não, simplesmente, sobreviver em presença do contaminante. Para se demonstrar que uma biorremediação é potencialmente viável, é importante se verificar a ocorrência de taxas de biodegradação de hidrocarbonetos, inicialmente em laboratório, embora se saiba da necessidade de experimentos posteriores *in situ* (ATLAS, 1995). Como esses microrganismos, degradadores, são responsáveis pelo mais importante processo de despoluição ambiental, a biodegradação, nos últimos anos muita atenção tem sido dada ao seu estudo (COLOMBO *et al*, 1996).

Para a seleção de microrganismos capazes de degradar resíduos poluentes, principalmente óleo cru, seus derivados e outras substâncias recalcitrantes, foram desenvolvidos, ao longo dos anos, vários métodos, que se relacionam ao potencial degradador microbiano. Estes, tornaram-se ferramentas fundamentais a qualquer proposta de biorremediação eficaz (HANSON *et al*, 1993). Dentre esses métodos, podemos citar os que envolvem operações rotineiras em microbiologia, como cultivo em meio sólido ou meio líquido (VECCHIOLL *et al*, 1990, VENKATESHWAREN *et*

al, 1991), os que utilizam a medida de turbidez (HEITKAMP *et al*, 1988), os que se baseiam no consumo de oxigênio (SONG *et al*, 1990), métodos que usam probabilidade (MILLS *et al*, 1998), os que envolvem conhecimentos de genética molecular (OLSON, 1991), além de outros. No entanto, o screening proposto por HANSON *et al* (1993), utilizando um Indicador redox como aceptor de elétrons o 2,6 Diclorofenol Indofenol (DCPIP), oferece, ao contrario dos demais, um ensaio rápido e simples para se medir o potencial degradador de hidrocarbonetos do petróleo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura utilizados

Foram utilizados meios de cultura para a reativação e crescimento dos microrganismos, meio de manutenção e meio mineral, cujas composições estão descritas a seguir.

3.1.1 Caldo Sabouraud-Dextrose

Peptona	10g
D(+)Glicose	40g
Agua destilada	1000mL
pH	5,5

3.1.2 Sabouraud-Dextrose-Agar

Peptona	10g
D(+)Glicose	40g
ágar	15g
Agua destilada	1000mL
pH	5,5

3.1.3. Bushnell-Haas (B-H)

MgSO ₄ 7H ₂ O (Sulfato de Magnésio Hepta - Hidratado)	0,4g
CaCl ₂ (Cloreto de Cálcio)	0,15g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato dii – ácido de Potássio)	6g
K ₂ HPO ₄ (Fosfato mono – ácido de Potássio)	6g
NH ₄ NO ₃ (Nitrito de Amônio)	6g
FeCl ₃ (Cloreto de Ferro III)	0,05g
Água destilada	1000mL
pH	7,2

Todos os componentes dos meios de cultura, medidos em balança analítica, suspensos em 1000mL de água destilada fria e levados ao forno de microondas até a ebulição. Depois de restabelecida a temperatura ambiente o pH foi ajustado e em seguida, autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

3.2 Soluções e Hidrocarbonetos

3.2.2 Solução do Indicador Redox

Foram pesados 0,1mg do aceptor de elétrons 2,6 Di - Clorofenol Indofenol (DCPIP), e dissolvidos em 100mL de água destilada estéril. Desta solução foi utilizados 3uL, para cada reação.

3.2.3 Petróleo bruto

O óleo bruto utilizado nos experimentos foi coletado do 0050 AP-18, região do Alto da Pedra, no Canto do Amaro (RN). Foram testadas as concentrações de 1 %, 5% e 10% do petróleo bruto.

3.2.3 Óleo diesel

O óleo Diesel, utilizado no screening primário, bem como nos experimentos de biodegradação em frascos agitados, foi obtido em um revendedor de combustíveis.

3.3 Microrganismos

Neste trabalho foram utilizados 30 fungos dos quais 09 foram isolados de poços de petróleo e 21 isolados da borra procedentes do Canto do Amaro – Bacia Petrolífera Potiguar, situada a 3,5Km da capital do estado do Rio Grande do Norte, Natal (**TABELA 3.1**). Todos os fungos encontram-se preservados em Sabouraud-Dextrose-Agar sob óleo mineral na Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE).

TABELA 3.1 Relação dos fungos utilizados.

Nº na Coleção DAUFPE	Linhagens	Fonte de isolamento
700	PA	AP-29
701	PA1	AP-29
702	PA2	AP-29
703	PB	AP-29
704	PB1	AP-29
706	M2	AP-29
707	29	AP-29
708	III	AP-29
709	M1	AP-29
714	B1	B
715	B2	B
716	B3	B
717	C1	B
718	C2	B
721	D3	B
722	E1	B
724	E3	B
727	F3	B
728	G1	B
730	H1	B
731	H2	B
732	H4	B
734	11	B
735	12	B
736	J1	B
737	J3	B
738	J4	B
739	L1	B
740	L2	B
741	E4	B

AP = Poço; B = Borra

3.4 Ensaio primário de biodegradação

È um ensaio rápido e prático. Durante a oxidação dos Hidrocarbonetois pelos microrganismos, os elétrons são transferidos para aceptores de elétron, como Oxigênio (O_2), Nitratos (NO_3^-), Sulfatos ($SO_4^{=}$) (HUTCHINS *et al.* 1991, BELLER *et al.*, 1992). Neste, ensaio especificamente, segundo Hanson *et al* (1993), indicador redox DCPIP permite acompanhar por mudança de coloração de azul para incolor, a oxidação dos hidrocarboneto pelos microrganismos.

A seleção primaria foi realizada segundo a metodologia desenvolvida por Hanson *et al* (1993), onde os microrganismos degradadores de hidrocarboneto foram selecionados, utilizando o acceptor de elétrons 2,6 di - Clorofenol Indolfenol (DCPIP) como indicador redox, sendo positivo o ensaio, caso ocorra e descoloração em 12Horas.

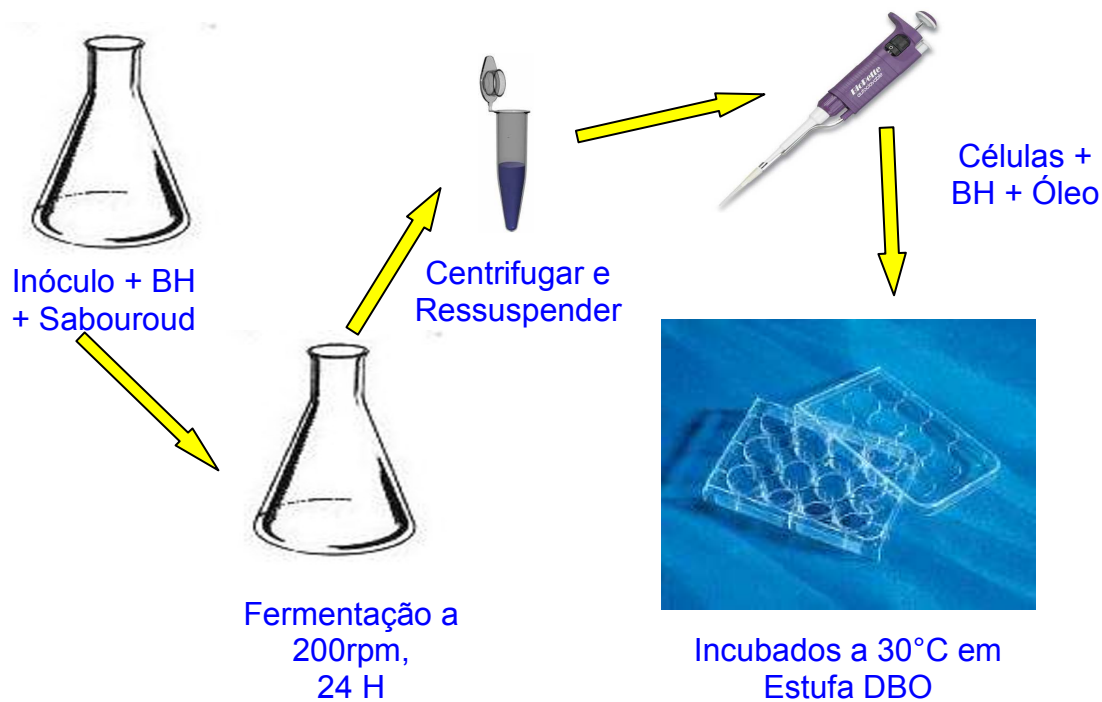
3.4.1 Inóculo

Os fungos foram cultivados em Erlenmeyer de 500mL, contendo 10mL de meio Sabouraud-liquido sob agitação, em mesa agitadora, a 200rpm e temperatura de 30° C por 24horas. Do fermentado foi retirado 1mL, transferido para tubos de Eppendorff, de pesos conhecidos, e centrifugado a 10.000rpm por 20min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado duas vezes com 1ml de água estéril. Os tubos, contendo a massa celular, foram novamente pesados e foi adicionado um volume de água para uma concentração celular de 200µg/L.

3.4.2 Ensaio em placas multi-poços

O ensaio de biodegradação foi realizado em duplicata, utilizando placas multi-poços, regente DCPIP (como acceptor de elétrons), óleo diesel (como fonte de Carbono), Meio mineral BH e biomassa (inoculo), como descrito acima. Em cada poço foram colocados 300µL de meio mineral, 10µL de óleo diesel, 3µL de Indicador DCPIP e 50µL da suspensão inoculo (**Figura - 3.1**). A placa multi-poços foi incubada em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), a 30°C e observada a mudança de coloração após 12, 16, 18 e 24 Horas.

FIGURA – 3.1 Esquema/protocolo para o ensaio primário de biodegradação,



3.5 Ensaio secundário de biodegradação

Este ensaio, proposto por ABU-RUWAIDA *et al* (1994), utiliza meio mineral solido (B-H – Agar), em placas de Petri, cuja tampa foi forrada com papel de filtro antes da esterilização. Após esterilização, foi adicionado 20mL de meio B-H - Agar, deixado solidificar e esfriar completamente. E em seguida utilizando Swab estéril, o centro da placa foi inoculado com cada linhagem a ser testada, a partir de culturas em tubo inclinado, sobre Sabouroud – Dextrose sólido. Antes de levar para a estufa a 30°C, em ambiente estéril, foram colocados 0,5mL de óleo diesel no papel de filtro no interior da tampa, em cada uma delas, com o objetivo de ser utilizado pelos microrganismos como fonte de Carbono, por a volatilização, à temperatura de cultivo. Após 30 dias de cultivo, mediu-se o diâmetro da colônia.

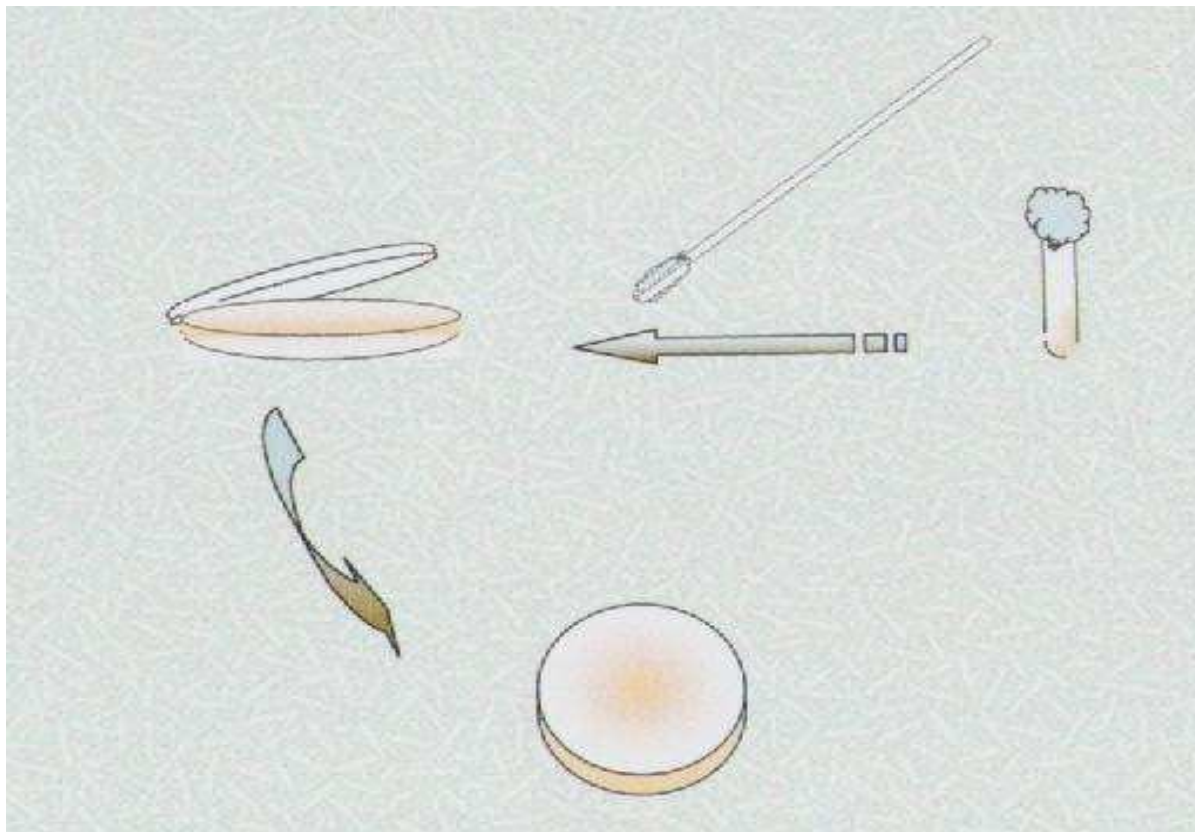


FIGURA – 3.2 Esquema/protocolo para o ensaio secundário de biodegradação.

3.6 Ensaio de biodegradação de Hidrocarbonetos.

Neste ensaio foi determinada a capacidade de degradação de petróleo bruto, pelos fungos selecionados, em meio líquido. Frascos Erlenmeyers de 500mL, contendo 100mL de meio Mineral B-H e 1g de petróleo bruto, foram inoculados com 5mL de uma suspensão de esporos contendo, entre 10^7 e 10^8 UFC's e um ensaio controle - ensaio abiótico - foi realizado nas mesmas condições. A suspensão foi preparada a partir de culturas com oito dias de cultivo em Sabouroud-Dextrose-Agar. A contagem foi realizada em Câmara de Newbauer. Os fungos foram cultivados à temperatura de 30°C, por 20 dias sob, agitação de 200rpm.

3.7 Análise Instrumental

Após o período de fermentação, cada Erlenmeyer foi tratado com 20mL de n-Heptano, e agitado vigorosamente por 5 minutos. As células foram separadas do resto do líquido por filtração e o líquido da parte oleosa, por funil de Bromo (**FIGURA 3.3**). A fase oleosa, foi recolhida e enviada para análise em Cromatógrafo de fase gasosa.

3.7.1 Cromatografia

A cromatografia gasosa foi realizada em Cromatógrafo da marca Varian, modelo Star 3400 CX, com detector de ionização de chama de Hidrogênio, injetor split/splitless e integrador processador CG 300. O aparelho permite um estudo comparativo qualitativo, entre a amostra teste e controle.

A análise foi realizada no laboratório de Combustíveis do Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco (ITEP).



FIGURA – 3.3, Separação da fase oleosa, remanescente para análise cromatográfica, pós a fermentação, em frascos agitados.

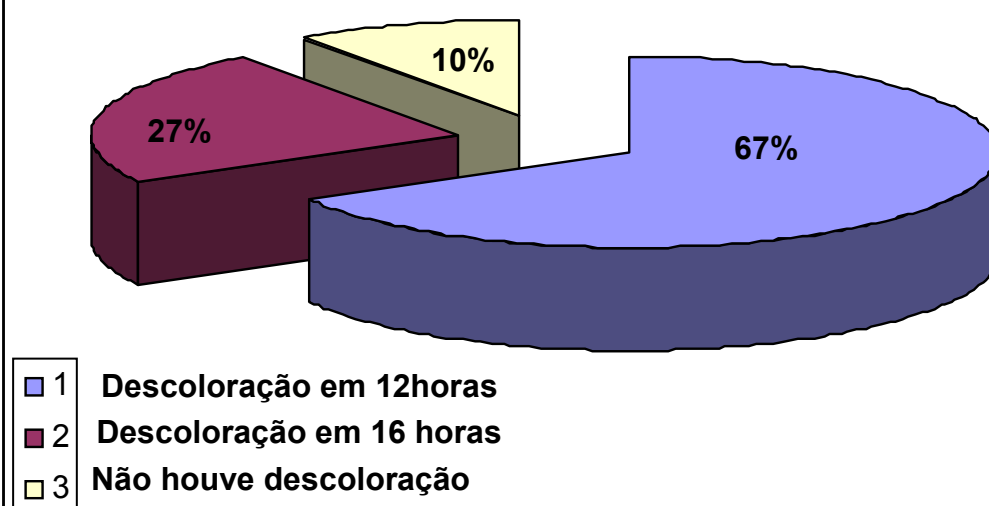
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio primário de biodegradação

Os resultados apresentados na Figura 4.1 mostram que dos 30 fungos testados, 67%(20) demonstraram habilidade para utilizar os hidrocarbonetos do óleo diesel como fonte de carbono, descolorindo o indicador redox DCPIP apos 12 horas de cultivo, enquanto que para 23% (7), a descoloração parcial foi observada com 16 horas. Apenas três linhagens (10%) mostraram-se negativas para o ensaio. Estes resultados apontam para 67% das linhagens isoladas e testadas, como potenciais degradadoras de petróleo.

Resultados similares foram observados com duas linhagens bactérias (A_3 e A_5) isoladas de amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos do petróleo, obtidos por HANSON, *et al* (1993), nos quais observaram descoloração do indicador redox DCPIP após 12 horas de ensaio.

Figura 4.1 - Percentuais dos fungos degradares de Hidrocarbonetos com crescimento em meio sólido (Sabouroud-Agar), usando como fonte de Carbono óleo diesel e indicador redoxi DCPIP, como acceptor de eletrons.



4.2 Ensaio secundário de biodegradação

Neste experimento a fonte de carbono - óleo diesel - foi volatilizada (**item 3.5**) e os resultados experimentais podem ser observados na **Figura 4.2**, onde se observa a variação no diâmetro da colônia. Dos 30 fungos testados, 57% (17) apresentaram colônias com diâmetro de 9cm, tomando toda a superfície da placa de Petri (**Figura 4.3**), enquanto 37% (10) mostraram colônias com diâmetro variando de 2cm a 5cm. Em apenas 10% (3), não foi observado crescimento nas condições do experimento.

Figura. 4.2-Percentuais dos fungos degradadores de Hidrocarbonetos com crescimento em meio sólido (Sabouroud-Agar), em 30 dias, usando como fonte de Carbono óleo diesel volatilizado, em placa de Petri.

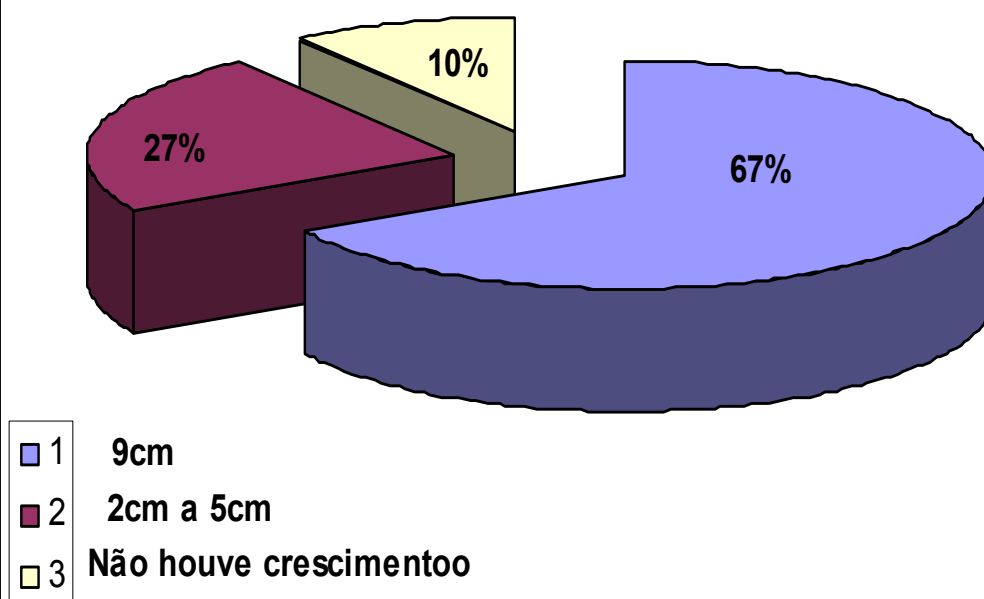




FIGURA 4.3 Colônias das linhagens DAUFPE – 706 (esquerda) e DAUFPE – 717 (direita) com 30 dias de cultivo em meio mineral - BH - Agar, usando como fonte de carbono óleo diesel volatizado, em estufa DBO.

Os resultados apresentados na **Tabela - 4.1** mostram que, apenas três linhagens (DAUFPE-715, DAUFPE-728 e DAUFPE-732) não tiveram crescimento satisfatório no ensaio primário, confirmado no ensaio secundário, com menor diâmetro de crescimento. Os resultados sugerem que a combinação dos dois ensaios se mostrou satisfatória para avaliar o potencial de microrganismos (fungos) como degradadores de hidrocarbonetos do petróleo.

Tabela - 4.1 Resultado Ensaio Primário - Oxidação de Hidrocarbonetos e do Ensaio Secundário - Diâmetro da Colônia das Linhagens estudadas.

Identificação das Colônias DAUFPE(*)	Linhagens	Descoloração com DCPIP	Diâmetro das colônias
700	PA	++	9,0
701	PA1	++	9,0
702	PA2	++	9,0
703	PB	++	9,0
704	PB1	++	9,0
706	M2	++	9,0
707	29	++	9,0
708	111	++	9,0
709	M1	++	9,0
714	B1	++	9,0
715	B2	-	2,0
716	B3	+	3,0
717	C1	++	9,0
718	C2	++	9,0
721	D3	++	9,0
722	E1	++	4,0
724	E3	++	5,0
727	F3	++	9,0
728	G1	-	2,0
730	H1	+	-
731	H2	+	-
732	H4	-	-
734	M	+	4,0
735	I2	++	9,0
736	J1	++	9,0
737	J3	+	3,0
738	J4	++	9,0
739	L1	+	2,0
740	L2	++	4,0
741	E4	+	3,0

(++) = Descoloração com 12 horas.

(+) = Descoloração parcial com 16 horas.

(-) = Não houve descoloração.

(*) Os números são códigos internos da coleção de cultura DAUFPE

4.2.1 Ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos.

Neste ensaio, nove linhagens de fungos - **DAUFPE - 700 (PA1)**, **DAUFPE - 706 (M2)**, **DAUFPE - 709 (M1)**, **DAUFPE - 722 (E1)**, **DAUFPE - 727 (F3)**, **DAUFPE - 735 (L2)**, **DAUFPE - 736 (J1)**, **DAUFPE - 738 (J4)**, **DAUFPE - 739 (L1)** - que apresentaram os melhores resultados na seleção primária e secundária foram testados em meio mineral líquido – BH - tendo como única fonte de carbono, petróleo bruto na concentração de 1,0 g/100mL. O experimento de fermentação em frascos agitados foi acompanhado através do aspecto macroscópico (**FIGURAS - 4.4, 4.5,**) e da microscopia ótica (**FIGURAS 4.6 e 4.7**) após 20 dias de cultivo.



FIGURA – 4. 4 Aspecto macroscópico do ensaio de biodegradação da linhagem **DAUFPE –706** (direita), após 20 dias de cultivo em meio mineral (B-H), com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm. (À esquerda a amostra controle, sem o inoculo).



FIGURA – 4. 5 Aspecto macroscópico do ensaio de biodegradação da linhagem DAUFPE – 736, após 20 dias de cultivo em meio mineral (B-H), com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm. (Em duplicata)

Na microscopia ótica (**FIGURAS – 4.6 e 4.7**) pode ser observada a formação de agrupamentos esféricos denominados micelas características das interações entre regiões hidrofílicas e hidrofóbicas formando uma bicamada na água em moléculas anfipáticas (PELCZAR et al, 1997). Estas micelas (**A**), observadas nestas figuras são de tamanhos variados e a parte oleosa na região interna é circundada pela fase aquosa com hifas (**B**) que permeiam ambas as fases.



FIGURA – 4. 6 Aspecto microscópico ótico, com aumento de 40X, do ensaio de biodegradação da linhagem DAUFPE – 738, após 20 dias de cultivo em meio mineral (B-H), com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm. A = micela formada pelo óleo cru em meio aquoso (B-H); B = Hifas permeando as fases hidrófila e hidrófoba.

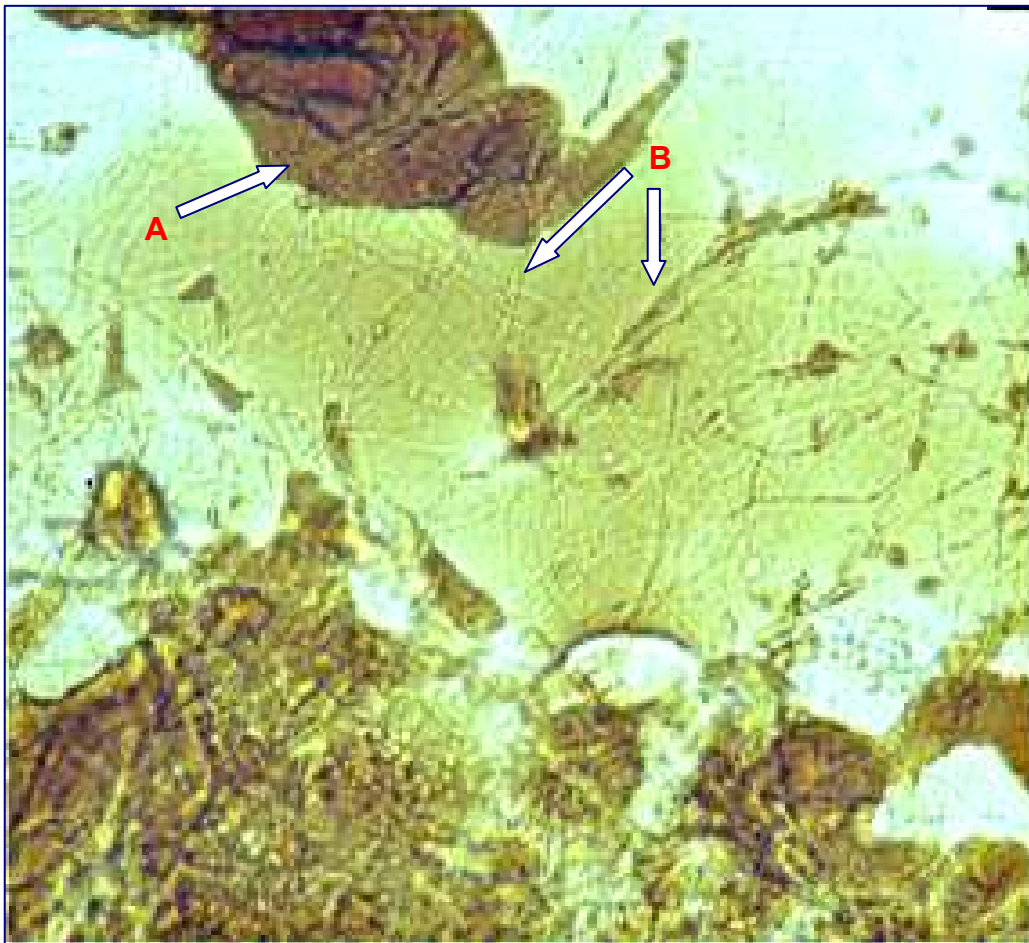


FIGURA – 4. 7 Aspecto microscópico ótico, com aumento de 40X, do ensaio de biodegradação da linhagem DAUFPE – 738, após 20 dias de cultivo em meio mineral (B-H), com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm. A = micela formada pelo óleo cru em meio aquoso (B-H); B = Hifas permeando as fases hidrófila e hidrófoba.

4.3. Análise Cromatografia em fase Gasosa - CG

Os perfis cromatográficos dos ensaios das fermentações em meio mineral B - H com 1% de petróleo bruto podem ser observados nas **FIGURAS 4.8, 4.9 e 4.10**. Estes resultados mostram a habilidade das 9 linhagens de fungos em degradar os hidrocarbonetos do petróleo bruto, nas condições da fermentação

A análise dos cromatogramas (**FIGURA 4.8**) mostram um decréscimo nos perfis dos picos, indicativos da ocorrência de biodegradação dos hidrocarbonetos nas linhagens **DAUFPE - 706, DAUFPE - 736 e DAUFPE - 738**, as quais se destacaram como as melhores, em comparação com as demais (**FIGURAS 4.9 e 4.10**)

Nas **FIGURAS 4.9 e 4.10** podem ser observados os cromatogramas das fermentações das outras 6 nos quais aparecem pequenos picos. É importante salientar que o perfil cromatográfico apresentado na Figura 4.9 mostra que apenas o cromatograma da fermentação da linhagem DAUFPE - 739 ainda apresenta picos, embora menor que o controle abiótico. Vale ressaltar que esta linhagem, nos ensaios primário e secundário, apresentou fraca habilidade degradadora. O cultivo desta linhagem em meio sólido mineral B - H apresentou colônias com um diâmetro de apenas 2,0 cm. Logo este resultado confirma os resultados obtidos naqueles ensaios, onde esta linhagem apresentou baixa atividade degradadora.

A biodegradação total de hidrocarbonetos utilizando população indígena em meio mineral BH mais 0,25% de HT, foi realizado por CAPELLI *et al.* (2001) e dão apoio aos nossos resultados. Foi observado uma diminuição de hidrocarbonetos aromáticos atingindo 70% de diminuição após 18 dias de cultivo, enquanto, na fração de resinas, o grau de degradação atingiu 80% após 45 dias de fermentação. Em nosso trabalho ainda não foi possível saber quais hidrocarbonetos degradados, mas pelos perfis dos cromatogramas, em apenas 20 dias, todas as frações foram degradadas.

Três das linhagens que se destacaram no ensaio de degradação com 1% de petróleo bruto (DAUFPE 706, DAUFE 709 e DAUFPE 736) foram utilizadas na fermentação utilizando o mesmo tipo de meio mineral (B-H) e 5% e 10% de petróleo bruto.

Os resultados obtidos através da análise cromatográfica, com inoculo em meio mineral B-H e 5% de petróleo e mantidos os 20 dias de cultivo, as linhagens mostraram resultados semelhantes aos observados no experimento com 1% de petróleo bruto, como mostra os perfis da cromatografia gasosa (**FIGURA 4.11**).

O experimento com inoculo em meio mineral B-H e 10% de petróleo e mantidos os 20 dias de cultivo (tempo selecionado para todos os experimentos de biodegradação), apresentado na **FIGURA 4.12**, das mesmas linhagens do experimento anterior, mostra que, nesta concentração, ocorre degradação parcial dos hidrocarbonetos. Este comportamento pode estar relacionado com o tempo de cultivo, seria necessário aumentar o tempo de fermentação e observar se, ainda haveria atividade degradadora de hidrocarbonetos por estas linhagens.

Estes resultados demonstram que os microrganismos estudados, selecionados de poços e borra de petróleo, são potencialmente promissores para a biorremediação de área impactadas por petróleo.

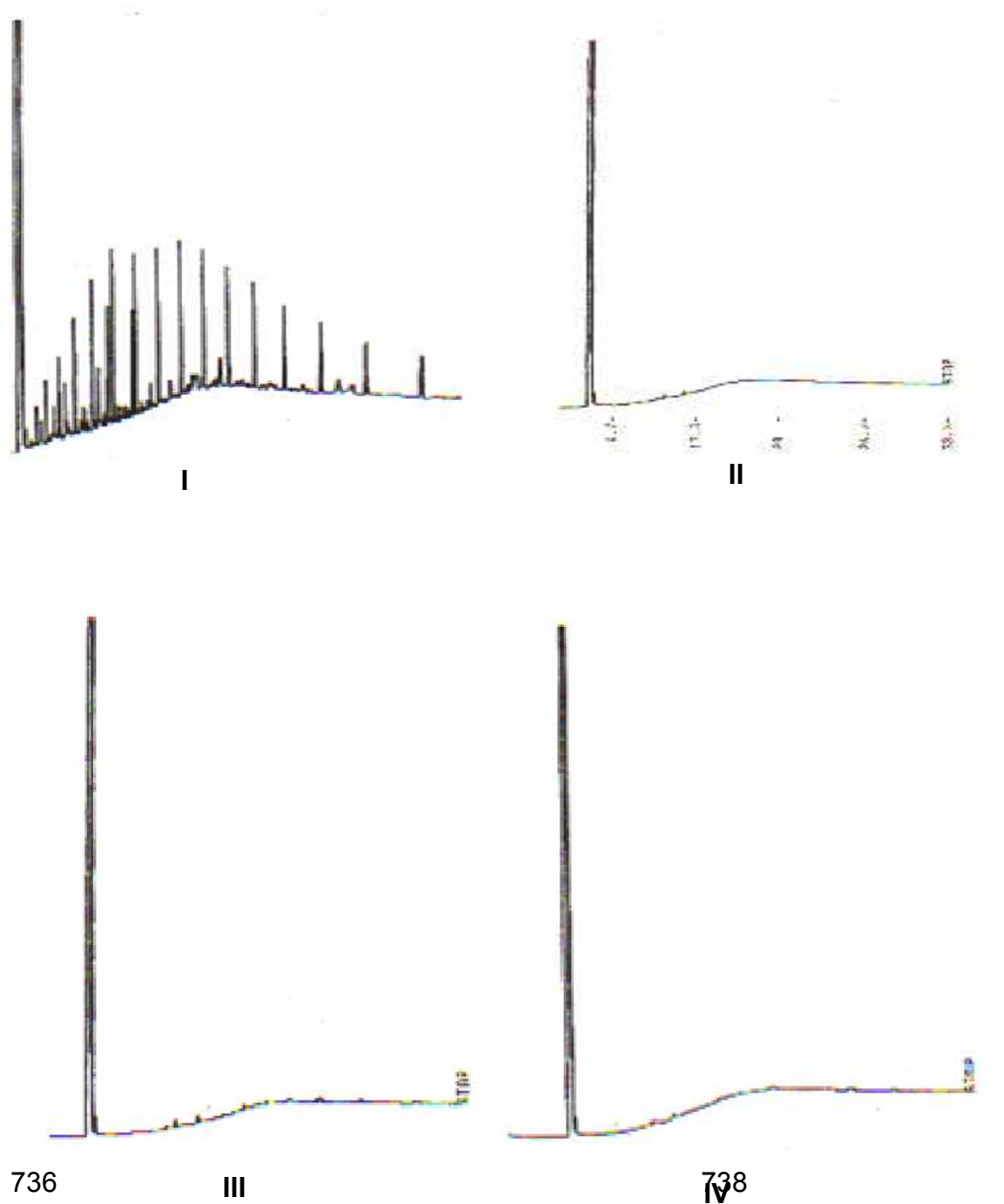


FIGURA – 4. 8 Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 709 (II), DAUFPE – 736 (II) e DAUFPE – 738 (IV) comparados ao controle abiótico (I).

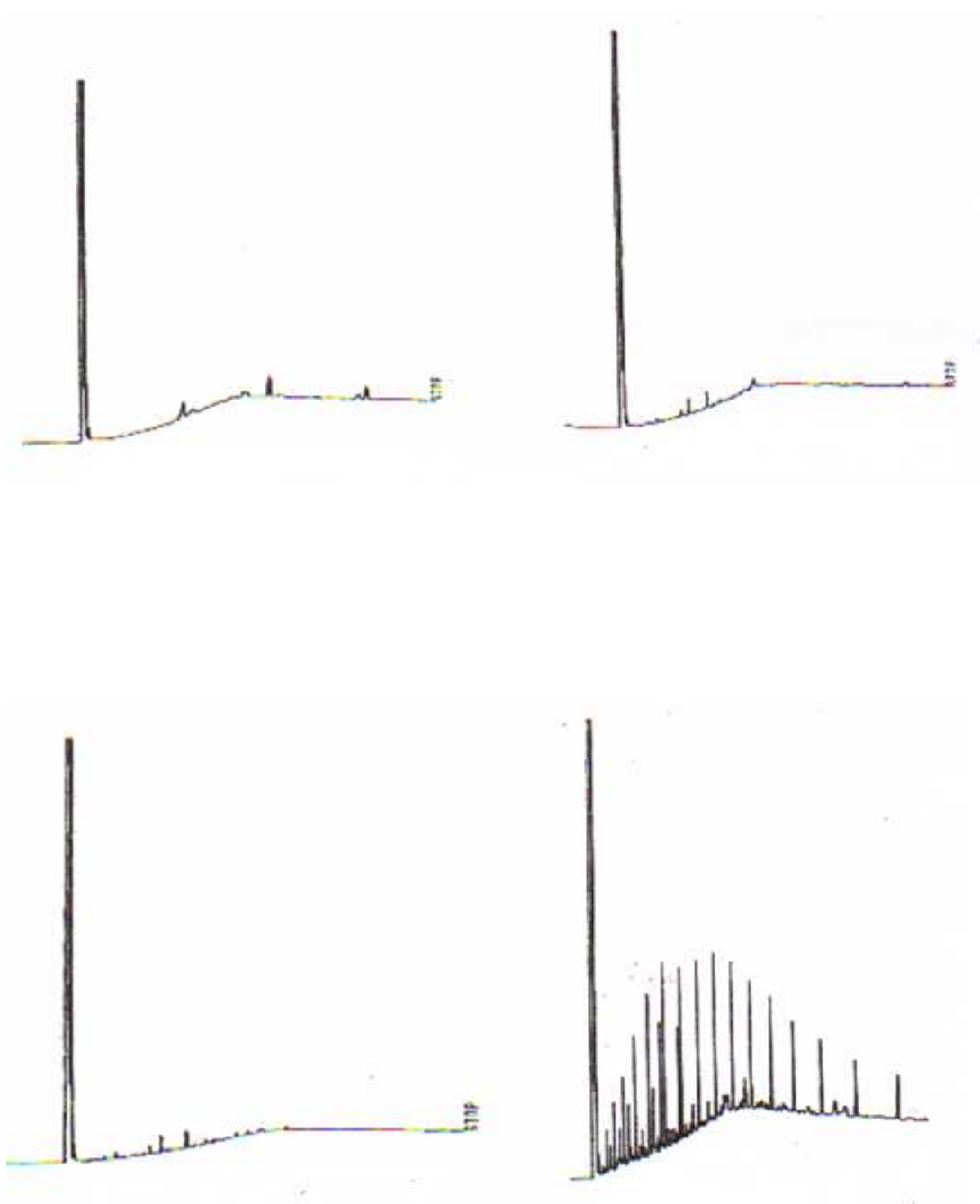


FIGURA – 4. 9 Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 700 (I), DAUFPE – 706 (II) e DAUFPE – 735 (III), comparados ao controle abiótico (IV).

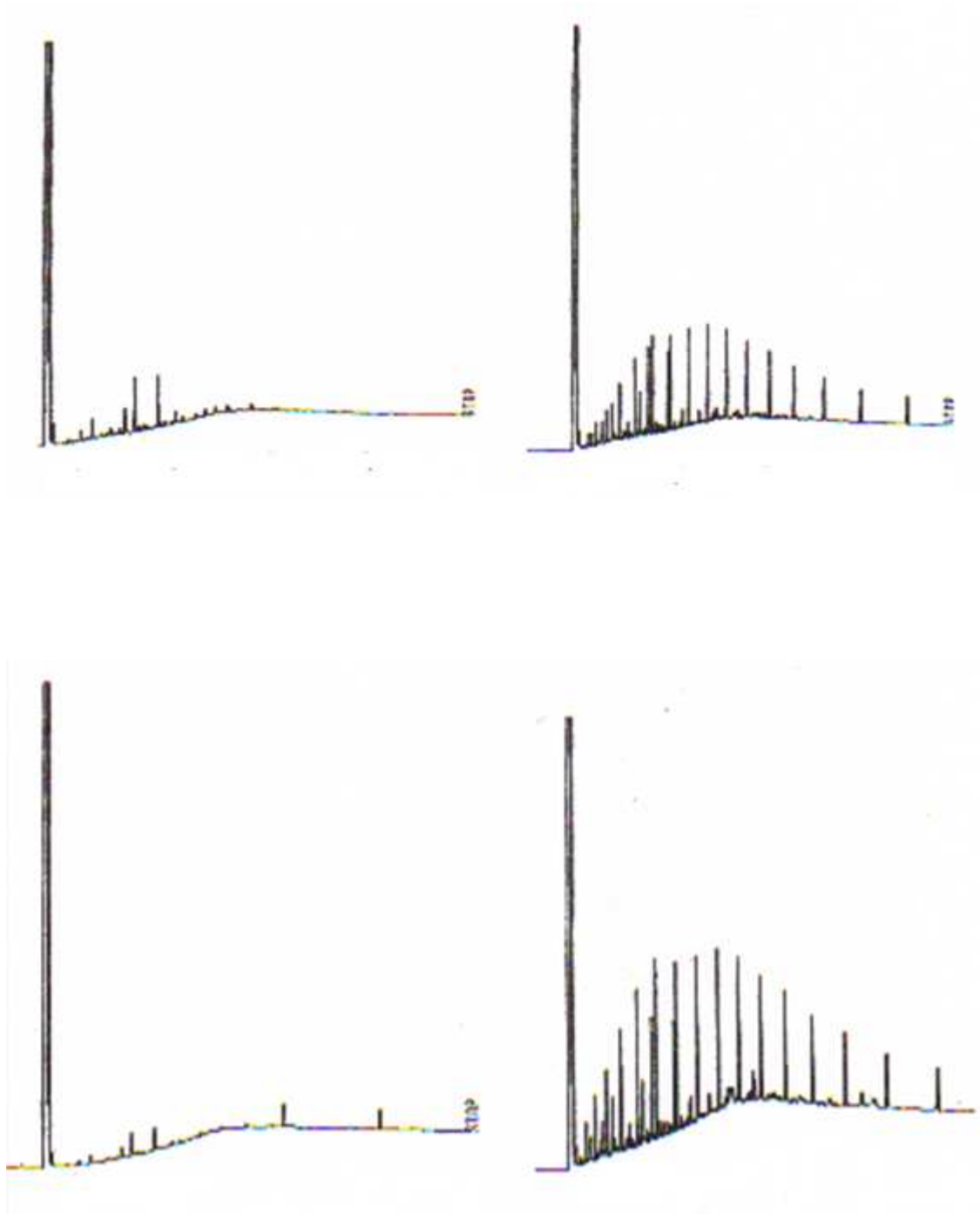


FIGURA – 4. 10 Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 1,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 727 (II), DAUFPE – 739 (II) e DAUFPE – 722 (III) comparados ao controle abiótico (IV).

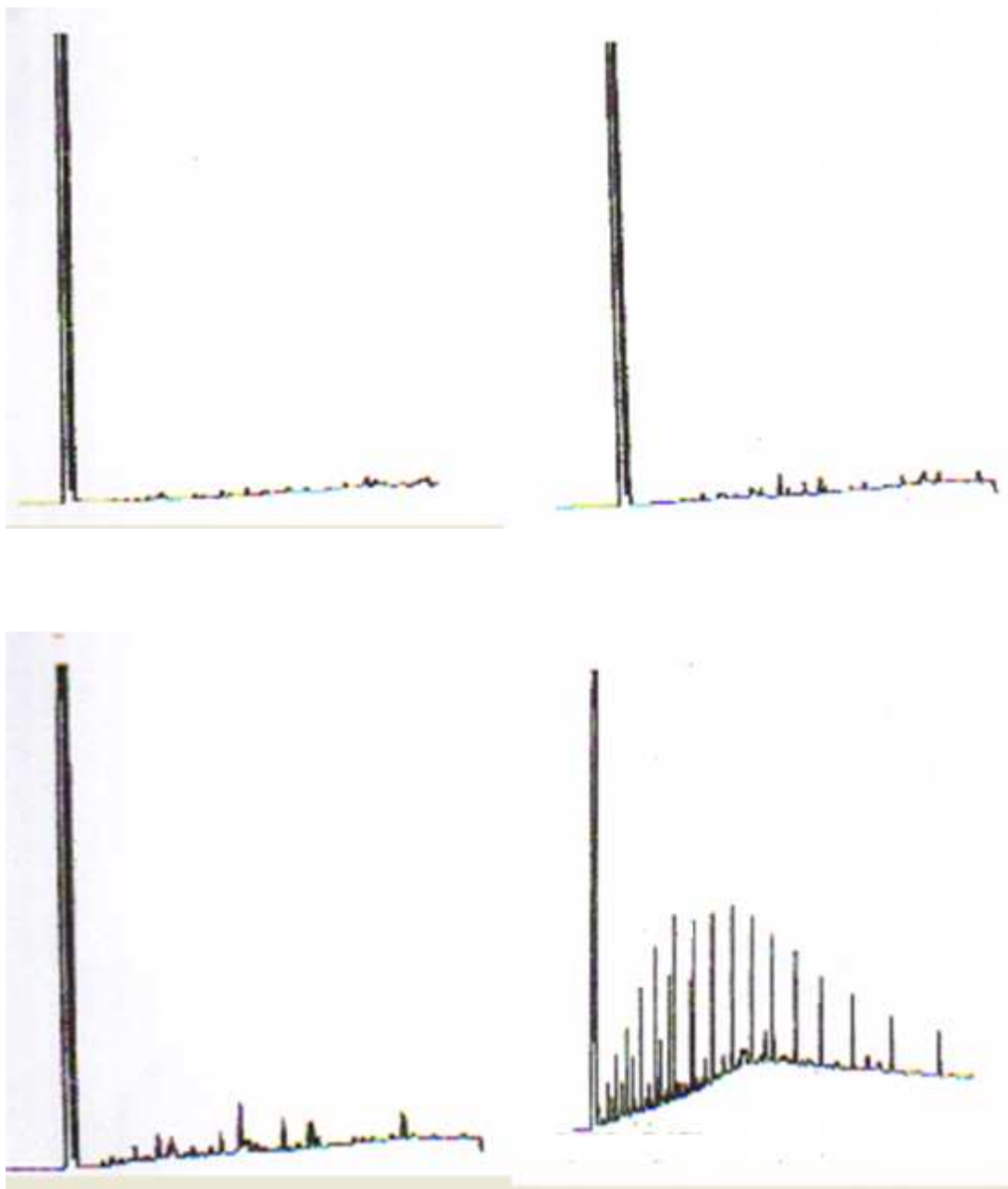


FIGURA – 4. 11 Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 5,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 736 (I), DAUFPE – 709 (II) e DAUFPE – 706 (III) comparados ao controle abiótico (IV).

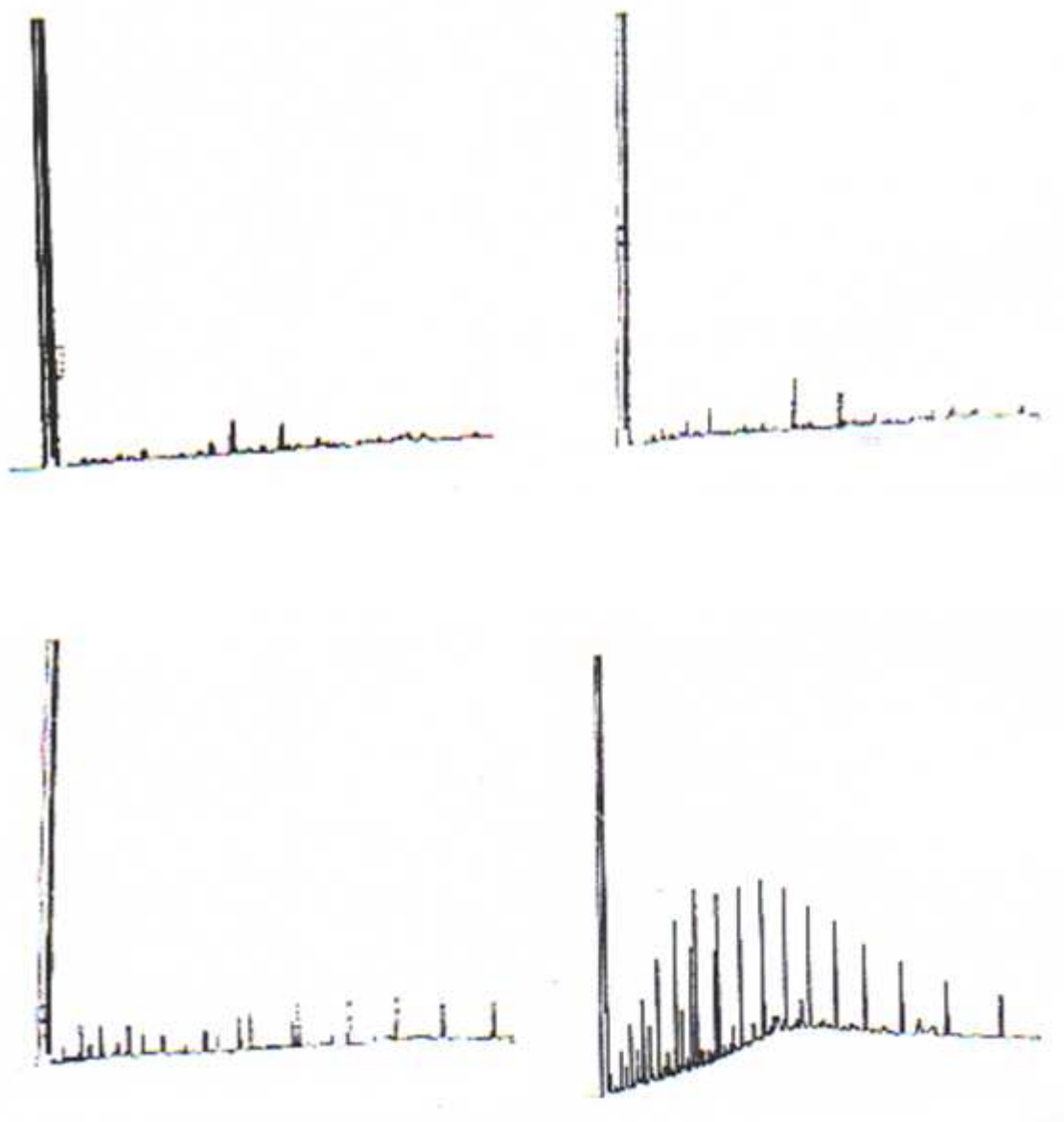


FIGURA – 4. 12 Perfil cromatográfico (C-G) do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em meio mineral (B_H) com 10,0% de petróleo bruto, à temperatura de 30°C e sob agitação de 200rpm, após 20 dias de cultivo. Linhagens DAUFPE – 706 (I), DAUFPE – 709 (II) e DAUFPE – 736 (III) comparados ao controle abiótico (I).

5. CONCLUSOES

1. Os ensaios primário e secundário constituem metodologias viáveis para a seleção de fungos com atividade degradadora de hidrocarbonetos.
2. Dos 30 fungos estudados, 17 foram selecionados através dos ensaios primário e secundário de degradação como sendo capazes de utilizar hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono.
3. A análises cromatográficas confirmaram os resultados do ensaios primário e secundário.
4. Os perfis dos cromatogramas gasosos das fermentações com 1 % de petróleo bruto mostraram que 8 linhagens de fungos, degradam quase que totalmente todas as frações de hidrocarbonetos deste óleo bruto.
5. Três linhagens de fungos, DAUFPE-706, DAUFPE-709 e DAUFPE-736, cultivadas durante 20 dias com 5% de petróleo bruto, degradam quase totalmente todo o petróleo bruto. Com concentração de petróleo a 10% estas linhagens, provavelmente, precisam de maior tempo de cultivo.

6. PERSPECTIVAS

Para dar continuidade a este trabalho, outros experimentos precisam ser realizados:

- Determinar a concentração de biomassa final após o período de fermentação - 20 dias.
- Testar outras concentrações de petróleo bruto bem como outras fontes de nitrogênio em fermentações controladas, avaliando o melhor tempo de degradação de hidrocarbonetos.
- Caracterizar qualitativamente os tipos de hidrocarbonetos degradados e não degradados.
- Realizar experimentos de biorremediação em reator e/ou através de compostagem, utilizando estes fungos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos do petróleo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABU-RUWAIDA, A. S., BANAT, I. M., HADITIRTO, S. SALEM, A., KADRI, M.; **Isolation of Biosurfactant-producing Bacteria Product Characterization, and Evaluation.** Acta Biotechnologica, 11940:315-324, 1991.

AL-AWADHI. N. BALBA, M. T. & AL-DAHER, R.: **Bioremediation of Oil-Contaminated Soil: Microbiological Methods for Feasibility Assessment and Field Evaluation.** Journal of Microbiological Methods, vol.32, pp.155-164,1998.

ALDRETT. A., BONNER, J. S., MILLS, M. A., AUTENRIETH, R. L & STEPHENS, F. L: **Microbial Degradation of Crude Oil in Marine Environments Tested in a Flask Experiment.** Environment International, 31. n° 11, 2840-2848, 1997.

ALEXANDER, S. K. SCHROEDER, S. J. & SCHWARZ, I. R.; **Spatial and Seasonal Distribution of Hydrocarbon-Utilizing Bacteria of Sediment from the Northwestern Gulf of Mexico,** Contribution March Science, 25:13-19, 1982.

ATLAS, R. M.; **Bioremediation of Petroleum Pollutants,** International Bioremediation & Biodegradation, pp.317-327, 1995.

ATLAS, R.M., BARTHA, R.; **Hydrocarbon Degradation and Oil Spill Bioremediation,** Advanced Microbiology Ecology 12: 287 – 338. 1992

ATLAS, R. M.; **Microbial Hydrocarbon Degradation: Bioremediation of a Oil Spills ,** Journal of Chemical Technology and Bacteriology, 52: 149-156, 1991.

BAKER, K., H. & HERSON D., S.; **Introduction and Overview of Bioremediation,** 375pp. Mc.Graw-Hill, NY. 1994

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N. & AL-DAHER, R.; **Bioremediation of Oil-Contaminated Desert Soil: The Kuwaiti Experience,** Environment *international*, vol.24, n.1/2, pp. 163-173, 1998.

BARATHI, S. & VASEUDEVAN, N., Utilization of Petroleum Hydrocarbons by Pseudomonas Fluorescence Isolated from a Petroleum-Contaminated Soil, Environment international, vol.26, n.5/6, pp.413-416, 2001.

BARDI, L., MATTEI, A., STEFFAN, S. & MARZONA, M.; Hydrocarbon Degradation by a Soil Microbial Population with B-Cyclodextrin as Surfactant to Enhance Bioavailability, Enzyme and Microbial Technology, 27: 709-713, 2000.

BARTHA, R.: Biotechnology of Petroleum pollutant Biodegradation, Microbiology Ecology, 12, pp. 155-172, 1986.

BEENS, J & BRINKIMAN, U. A.; The Role of Gas Chromatography in Compositional Analyses in the Petroleum Industry, Trends in analytical chemistry, vol.19, no.4, 2000.

BELLER, H. R., GRBIÉ-GALÉ. D., and REINHARD. M. Microbial Degradation of toluene under Sulfate-reducing Conditions and the Influence of Iron on the Process. Applied Environmental Microbiology. 58:786-793.1992.

BENTO. F. & GAYLARDE, C.; Microbial Contamination of Stored Diesel Oil in Brasil; Revista de Microbiologia, 27, pp. 192-196, 1996.

BENTO. F & GAYLARDE, C.; Biodeterioration of Stored Diesel Oil: Studies in Brazil, International Biodeterioration & Biodegradation, 47, pp. 107-112, 2001.

BLACKBURN, J. W. & HAKFER, W. R.; The Impact Biochemistry Bioavailability and Bioactivity on The Selection of Bioremediation Techniques, Trends in Biotechnology, 11: 328-333, 1993.

CAPELLI, S.M; BUSALMEN, J.P. & SANCHEZ, S R. Hydrocarbon bioremediation of a Mineral-base Contaminated Waste from Crude Oil Extraction by Indigenous Bacteria, International Biodeterioration & Biodegradation, 47: 233-238, 2001.

COLOMBO, J. C., CABELLO, M. & ARAMBARRI, A. M.: **Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons by Naturally Soil Micro flora and Pure Cultures of Imperfect and Lignolitic Fungi**; Environmental Pollution, 54 (3) 355-362, 1996.

D'EL ARCO, J P., FRANÇA, F.; **Biodegradation of Crude Oil in Sandy Sediment**, International Biodeterioration & Biodegradation, 44: 87-92, 1999.

ECKENFELDER, W. W., **In-Situ treatment of Contaminated Soil and Rock**. Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, PA. p. 39-48, 1989.

EZRA, S., FEINSTEIN, S., PELLY, I., BAUMAN, D. and MILOSLAVSKY, I.; **Weathering of fuel oil on the east Mediterranean coast, Ashdod, Israel**. Organization Geochemistry, 31, 1733 -1741, 2000.

HANSON. K. G., DESAI, J. D., DESAI. A. J.; **A Rapid and Simple Screening Technique For Potential Crude Oil Degrading Microorganisms**;: Biotechnology Technique Vol. 7, n° 10, pp. 745-748, Boroda, India, 1993.

HERSON, D. S. & BAKER, K.H.; **Introduction and Overview of Bioremediation**, 375pp. Mac.Graw-Hill, NY.,1994.

HEAD, I. M. & SWANNELL, R. P. J.; **Bioremediation of Petroleun Contaminants in Marine Habitats**, Current Opinion in Biotechnology, 10: 234-239, 1999.

HEITKAMP, M. A.; FREEMAN, J. P.& CERNIGLIA, C. E.; **Naphthalem Biodegradation in Environmental Microcosms: Estimates of Degradation Rates and Characterization of Metabolites**, Applied Environmental Science, 54: 1621-1614,1988.

HUTCHINS, S. R., SEWELL, G. W., KOVACS, D. A., AND. SMITH, G. A. 1991. **Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons by Aquifer Microorganisms Under Denitrifying Conditions**; Environmental Science Technology, 25:68-76.

JORGENSEN K S PUUSTINEN, J. & SUORTTI, A M. **Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Composting in Biopiles**, Environmental Pollution. 107, pp.245-254, 2000.

JUHASZ A L & NAIDU, R.; **Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review of the Microbial Degradation of Benzo(a)pyrene**; International Bioremediation & Biodegradation, 45: 57-88, 2000.

KLUG, M. J., MARKOVERTZ, A. J.: **Utilization of Aliphatic Hydrocarbons by Microorganisms**. Advanced Microbial Physiology. 5:1-43, 1971.

LI, G., HUANG, W., LERNER, D. N. & ZHANG, X.; **Enrichment of Degrading Microbes and Bioremediation of Petroleum Contaminants in Polluted Soil**. Elsevier Science, vol. 34, N° 15, pp. 3845-3853, 2000.

LI, K., NORANY, P. S., COLLINS, R., FILLIPS, R. S. & ERYCSON, K. L.; **Investigation of Role of 3-Hydroxyanthranilic Acid in the Degradation of Lignin by White-rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus***; Enzyme and Microbial Technology, 28: 301-307, 2001.

MARGESIN, R., ZIMMERBAUER, A. & SCHINNER, F.; **Monitoring of Bioremediation by Soil Biological Activities**; Chemosphere, 40 339-343, 2000.

MILLS, A. L., BREUIL, C. & COLWELL, R. R.; **Enumeration of Petroleum-Degrading Marine and Estuarine Microorganisms by the Most Probable Number Method**; Canadian Journal of Microbiology, 24: 552-557, 1998.

MUELLER, J.C., CERNIGLIA, C.E. & PRITCHARD, **Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**, In: Biotechnology Research Series, Bioremediation Principles and Applications, Organization by Crawford, R.L.; Crawford, D L, Cambridge University Press, 125-194, 1996.

NAMKOONG, W., HWANG, E., Y., PARK, J., S. & CHOI, J., Y.; **Bioremediation of Oil Diesel-Contaminated Soil with Composting**; Environmental Pollution, 119: 23-31,2001.

NOCENTINI M., PINELLI, D. & FAVA, F.; **Bioremediation of Soil Contaminated by Hydrocarbon Mixture: the Residual Concentration Problem**; Chemosphere, 41: 1115-1124,2000.

OBUEKWE, C. O. & AL-ZARBAN, S. S.; **Bioremediation of Crude Oil Pollution in The Kuwaiti Desert: The Role of Adherent Microorganisms**, Environment International, 24: 823-834, 1998.

OLSON, B. H, **Tracking an Using Genes in the Environment**, Environmental Science & Technology, 22.4, 1991.

OU DOT, J : **Biodegradabilite du Fuel de L'Erika** ; Life Science, 323: 945-950, 2000.

PELCZAR, M.J., CHAN, E.G., KRIEG, N.R., EDWARDS, D.D., **Microbiologia: Conceitos e Aplicacoes**, vol-1, Makron Books do Brasil Editora LTDA, 554 pp., 1996.

PRINCE M & SAMBASIVAM, Y.: **Bioremediation of Petroleum Wastes from Refining of Lubrificant Oils**; Environmental Progress, 12: 5-11.

RICHARD, J. Y. & VOGEL, T. M.; **Characterization of Oil Bacterial Consortium Capable of Degrading Diesel Fuel**; International Bioremediation & Biodegradation, 44: 93-100, 1999.

ROSATO.Y. B. ; **Biodegradação do Petróleo**, Microbiologia Ambiental; EMBRAPA, pp.307-334, 1997.

ROSEMBERG, E. RON, E., Z. **Bioremediation of Petroleum Contamination**, In: Biotechnology Research Series, Bioremediation Principles and Applications, Org. by Crawford, R.L.; Crawford, D.L, Cambridge University Press, 100-124, 1996.

SARKHOH, N., A., GHANNOUM, M. A., IBRAHIM, A., S., STRETTON, R., J., & RADWAN S., S.; **Crude Oil and Hydrocarbon Degrading strains of *Rhodococcus*: *Rhodococcus* Strains Isolated from Soil and Marine Environments in Kuwait**, Environmental. Pollutant, 65: 1-18, 1990.

SCHONBERNER, D.; **Reclaiming Contaminated Soils**, Military Bioremediation September, pp. 36-38, 1998.

SINGER, M. F., FINNERTY, W. R., **Microbial Metabolism of Straight Chain and Branched Alkanes**. In: ATLAS, R. M. (Ed.), Petroleum Microbiology, Macmillan, pp. i[=81-59, 1984.

SONG, H.G., WANG, X. & BARTHA, R. **Bioremediation potential of Terrestrial Fuel S pills**, Appl. Environmental Microbiological. , 56, pp.652-656, 1990.

SUGIURA, K, ISHIHARA, J. & HARAYAMA, S.; **Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil**, Environmental Set. Technology, 31: 45-51, 1997.

VASUDEVAM, N. & REJARAM, P.; **Bioremediation of Oil Sludge-Contaminated Soil**; Environmental international, 26: 409-411, 2001

VECHIOILLI, G. I., DEL PANNO, M. T. & PAINCEIRA, M. T.; **Use of Selected Autochthonous Soil Bacteria to Enhance Degradation of Hydrocarbons in Soil**; Environmental Pollution, 67: 249-258. 1990.

VENKATESWARAN, K., IWABUCHI, T., MATSUI, Y., TOKI, H., HAMADA, E. **Distribution and Biodegradation Potential of Oil-degrading Bacteria in North Eastern Japanese coax austral waters**, FEMS Microbiology Letters, 86, 2, pp. 113-121 1991.

WANG, X. & BARTHA, R.; **Effects of Bioremediation on Toxicity, Mutagenesis and Microbiota in Hydrocarbon Pollutant soils**, In: Wp'0ISE, D., L, TRANTOLO, D.J. (Eds.), Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils. Marcel Dekker, New York, pp. 175-197, 1994.

WOLFE, D. A., HAMMEDI, M. J., GALT, J. A., WATABAYASHI, G., SHORT, J., O'CLAIRE, C., RISE, S.; **The fate of the oil Spilled From the Exxon Valdez**; Environmental Science & Technology, 28: 561-567, 1994

YANG L LAI C T & SHIEH, W. K.; **Biodegradation of Dispersed Diesel Fuel under High Salinity Conditions**; Environment International, 34: n°13, 3303-3314, 2000.

YATEEM. A; BALBA, M.T. & AL-AWADHI, N.; **White Rot Fungi and Their role In Remediating Oil-Contaminated soil**; Environment international, vol.24, n.1/2, pp.181-187.1S98.

ZOBELL C. E; **Action of Microorganisms on Hydrocarbons**; Zeitung Fur Allegemeine Mikrobiologie, 10: 1-49, 1946.