

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

DÉBORA DE SOUZA PEREIRA SILVA

**DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO MICROBIANO MISTO
ISOLADO DE AMBIENTE POLUÍDO**

**RECIFE
2012**

DÉBORA DE SOUZA PEREIRA SILVA

**DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO MICROBIANO MISTO
ISOLADO DE AMBIENTE POLUÍDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa.

Co-orientadora:

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão

**RECIFE
2012**

Silva, Débora de Souza Pereira

Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído/ Débora de Souza Pereira Silva. – Recife: O Autor, 2012.

98 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria de Fátima Vieira de Queiroz Souza

Coorientadora: Norma Buarque de Gusmão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia Industrial, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Biorremediação 2. Poluição ambiental 3. Suape (PE: microrregião) I. Souza, Maria de Fátima Vieira de Queiroz II. Gusmão, Norma Buarque III. Título

620 112 23

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-073

DÉBORA DE SOUZA PEREIRA SILVA

**DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO MICROBIANO MISTO
ISOLADO DE AMBIENTE POLUÍDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa.
UFPE

Prof^a Dr^a Clarissa Daisy da Costa Albuquerque
UNICAP

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
UNICAP

Recife, 25 de Janeiro de 2012.

Dedico este trabalho aos estudiosos
da ciência.

AGRADECIMENTOS

Muitos contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho científico, diretamente ou indiretamente, aos quais sou grata. Porém, gostaria de enfatizar o meu reconhecimento à algumas pessoas e instituições.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica, em especial à equipe do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial (PPGBI) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob a coordenação da professora doutora Ester Ribeiro Gouveia, a qual tenho grande admiração pela sua determinação, coragem e força.

Agradeço a primeira turma do PPGBI pelo companheirismo demonstrado por Luana, Maria Carolina, Gabriel, José Bruno, Ludhimilla, Clarissa, Ingrid, Luciana e Alexandre.

Agradeço ao apoio a pesquisa fornecido pelo Departamento de Antibióticos, pertencente ao Centro de Ciências Biológicas da UFPE, que proveu a estrutura física; a FACEPE, FINEP e CNPQ pelo suporte financeiro e a Petrobras, ANP, CT-Petro e Suape por todo incentivo ao desenvolvimento desse estudo.

Agradeço ao Laboratório de Química de Interfaces do Departamento de Engenharia de Minas da UFPE, sob responsabilidade do coordenador professor doutor Carlos Adolpho Magalhães Baltar e em especial ao técnico Marcelo por todo auxílio prestado.

Agradeço a atenção, instruções e sugestões fornecidas pela banca examinadora da dissertação, composta por Clarissa Daisy da Costa Albuquerque e Carlos Alberto Alves da Silva e a co-orientadora Norma Buarque de Gusmao a quem tenho grande apreço.

Agradeço a Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas (RECUPETRO) e todos os que são e os que já foram

participantes do projeto de Biorremediação de Ambiente Poluído por Petróleo ou seus Derivados (BAPPD), a saber Anna Luiza de Sousa Villela, Carla do Couto Soares Maciel, Cynthia Silva de Souza, Breno José Marques de Melo, Erik Jonne Vieira de Melo e Persio Alexandre da Silva pelos conhecimentos práticos e teóricos, paciência e carinho dedicados a mim; Geórgia Gomes da Cruz, Jacilene Marques Maciel e Raul Felipe Neves Cavalcanti pela troca de experiência, cumplicidade e afeto; Maria Carolina e Andreia Maria por me incentivar e acompanhar no início da minha trajetória nesta área de pesquisa; Darne Germano de Almeida, Chardson Henrique da Silva Galdino, Wialla Karmen Teixeira de Farias e Edja Lillian Pacheco da Luz pelos preciosos momentos de alegria compartilhados; Bárbara Regina Trindade Santos e Patrícia Nazaré Ferreira dos Santos pela confiança e por suas sinceras amizades; Davi de Lima Cavalcanti pela oportunidade de fazer parte da minha vida, amor e apoio e à coordenadora professora doutora Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa por ter me recebido e orientado na pesquisa e pelas instruções de vida e demonstrações de afeto.

Agradeço as minhas amigas Tatianna, Rafaela e Marcelle, devido a renúncia e compreensão pelas muitas horas de atenção e carinho que não pude lhes dedicar, para poder desenvolver este trabalho científico.

Agradeço a toda minha família, especialmente a minha mãe, Maria de Souza Pereira, por todo amor, esforço, dedicação, compreensão, amparo e incentivo.

Meu agradecimento especial a Deus por ter me permitido vivenciar todos os momentos até aqui, pelos ensinamentos e pelo amor.

Muito obrigada !!

“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.”

Art. 225 CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, 1988.

RESUMO

Este trabalho objetiva o estudo da degradação de óleo diesel por micro-organismos isolados de amostras poluídas por petroderivados. As culturas foram selecionadas para formar um consórcio, e foram submetidas a ensaios em frascos de acordo com um planejamento fatorial completo 2^3 , a fim de determinar a temperatura (25, 30 ou 35°C), concentração de inóculo (1, 2 ou 3 blocos com 0,8 mm de diâmetro) e relação C:N (10:1, 50:1 ou 90:1) mais favoráveis à biodegradação, a serem utilizados no experimento conduzido em batelada em biorreator. Os micro-organismos com maior potencialidade para degradar óleo diesel e sem desenvolver atividade antagônica foram identificados como *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800, *Serratia marcescens* UFPEDA 839, *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 e *Candida ernobii* UFPEDA 862, os quais formaram um consórcio microbiano misto, envolvendo bactérias e leveduras. Constatou-se, no planejamento fatorial, que o aumento da relação C:N favoreceu a biodegradação da fonte oleosa enquanto que o aumento da temperatura influenciou de forma desfavorável no referido processo, para uma significância estatística de 95%. Durante o processo em biorreator, foi verificado os seguintes resultados: aumento gradual de biomassa, redução (acima de 69 %) de todos os n-alcenos pertencentes à faixa de C_9 a C_{21} , diminuição da tensão superficial (redução de 23,2%), e diminuição da toxicidade de sementes de hortaliças (germinação acima de 65%). Portanto, o consórcio microbiano misto selecionado apresenta potencialidade para degradar constituintes majoritários do óleo Diesel, podendo ser utilizado em processos de biorremediação de locais poluídos por esse combustível e a manutenção de condições apropriadas conduz a transformação dessa fonte oleosa em compostos menos tóxicos.

Palavras-chave: Poluição Ambiental. Biorremediação. Fitotoxicidade.

ABSTRACT

This work aims to study the degradation of diesel fuel by microorganisms isolated from samples polluted by petroderivados. The cultures were selected to form a consortium, and were submitted to assays in flasks according to a complete factorial design 2^3 in order to determine the temperature (25, 30 or 35°C), the inoculum concentration (1, 2 or 3 blocks with 0.8 mm diameter) and the C:N ratio (10:1, 50:1 or 90:1) conditions more favorable to biodegradation, to be used in the experiment conducted batch bioreactor. The microorganisms with the greatest potentiality to degrade diesel oil, without developing antagonistic activity, were identified as *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800, *Serratia marcescens* UFPEDA 839, *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 and *Candida ernobii* UFPEDA 862, which formed a mixed microbial consortium involving bacteria and yeasts. It was found in the factorial design, that increasing the C:N ratio favors the biodegradation of the source oil while increasing the temperature unfavorably influenced in that case for a 95% statistical significance. During the process in a bioreactor, it was found the following results: gradual increase of biomass reduction (greater than 69%) of all n-alkanes belonging to C₉ to C₂₁ range, reduction of surface tension (23.2% reduction), and decreased toxicity of vegetable seeds (above 65% germination). Therefore, the selected mixed microbial consortium has the potential to degrade the major constituents of diesel oil can be used in bioremediation processes of contaminated sites by the fuel and maintenance of appropriate conditions leads to transformation of the source oily compounds less toxic.

Key-words: Environmental pollution. Bioremediation. Phytotoxicity.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Óleo Diesel.....	17
3.2 Bioprospecção de Micro-organismos.....	18
3.3 Biodegradação de Hidrocarbonetos do Petróleo.....	19
3.4 Fatores que Afetam a Biodegradabilidade de Hidrocarbonetos.....	22
3.4.1 Disponibilidade do hidrocarboneto.....	22
3.4.2 Nutrientes.....	23
3.4.3 pH.....	23
3.4.4 Oxigênio.....	24
3.4.5 Temperatura.....	24
3.5 Processo de Biorremediação.....	25
3.5.1 Bioaumento.....	26
3.5.2 Bioestímulo.....	26
3.5.3 Biorreatores.....	27
3.6 Testes de Toxicidade.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Amostra de Óleo Diesel.....	30
4.2 Meio mineral.....	30
4.3 Isolamento de Micro-organismos.....	31
4.4 Seleção dos Micro-organismos mais Promissores.....	33
4.5 Identificação dos Micro-organismos Selecionados.....	34
4.6 Manutenção das Culturas.....	34
4.7 Seleção do Consórcio.....	34
4.8 Ensaios de Aclimação.....	35
4.9 Ensaios de Bioestímulo com as Culturas Selecionadas.....	35
4.10 Planejamento Experimental em Frascos.....	36
4.11 Experimento em Biorreator.....	40

4.12 Análise Estatística.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Caracterização da Fonte Oleosa.....	44
5.2 Seleção de Micro-organismos.....	46
5.3 Avaliação do Teste de Antagonismo Microbiano.....	48
5.4 Teste de Bioestímulo com os Micro-organismos em Cultura Pura.....	48
5.5 Degradação de óleo Diesel pelo Consórcio Microbiano Misto em Diferentes Condições Físico-químicas e Nutricionais.....	49
5.5.1 Percentagem de degradação de hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel pelo consórcio nas diferentes condições de ensaio.....	50
5.5.2 Perfil de biomassa e de pH nas diferentes condições de ensaio.	53
5.6 Experimento em Biorreator com o Consórcio.....	54
5.6.1 Perfil de biomassa.....	55
5.6.2 Perfil de tensão superficial.....	55
5.6.3 Avaliação do teste de emulsificação.....	56
5.6.4 Degradação do óleo diesel por consórcio em biorreator.....	57
5.6.5 Teste de fitotoxicidade com o material residual da biodegradação....	59
6 CONCLUSÕES.....	61
7 REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A – CÓPIA DO TRABALHO ENVIADO PARA O PERIÓDICO INTRNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION.....	87
ANEXO B – CÓPIA DO RECEBIMENTO DO TRABALHO PELO PERIÓDICO INTRNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Reações de degradação de n-alcanos.....	20
Figura 4.1 Estrutura química da molécula de 2,6 diclorofenol-indofenol na sua forma oxidada (a) e reduzida (b).....	33
Figura 4.2 Esquema do conjunto de fermentação BioFlo 110, da New Brunswick Company FS-5: 1-banho-maria para resfriamento do biorreator; 2-bombas peristálticas; 3 e 4-garrafas de adição de ácido e base para controle do pH; 5-cuba do biorreator; 6-motor de agitação; 7-condensador; 8-exaustor; 9-frasco de amostragem; 10-seringa; 11-manta de aquecimento; 12-unidades de controle.....	40
Figura 4.3 Tensiômetro digital Sigma 70.....	42
Figura 5.1 Perfil cromatográfico da amostra de óleo diesel quanto aos hidrocarbonetos totais.....	46
Figura 5.2 Porcentagem de bactérias e leveduras que reduziram o indicador DCPIP após 16, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.....	47
Figura 5.3 Percentual de deradação de hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel por: a) UFPEDA 800 <i>Staphylococcus saprophyticus</i> b) UFPEDA 839 <i>Serratia marcescens</i> c) UFPEDA 845 <i>Rhodotorula aurantiaca</i> e d) UFPEDA 862 <i>Candida ernobii</i> , obtidos em ensaios de bioestímulo em frascos com 10% (v/v) de óleo diesel e relações de C:N de 50:1, 100:1 e 150:1.....	49
Figura 5.4 Percentual de degradação de alcanos do oleo diesel, obtidos nos ensaios do planejamento experimental.....	50
Figura 5.5 Diagrama de Pareto, com nível de significância de 95% ($p=0,05$), para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes: (1) inóculo, (2) relação C:N e (3) temperatura.....	52
Figura 5.6 – Perfil de: a) pH e de b) biomassa, obtidos nos ensaios do planejamento fatorial com o consórcio microbiano.....	54
Figura 5.7 Perfil de biomassa obtida durante o experimento em biorreator, com o consórcio misto submetido à 10% (v/v) de óleo diesel.....	55
Figura 5.8 Perfil de tensão superficial obtida durante o ensaio em biorreator, com o consórcio misto submetido à 10% (v/v) de óleo diesel.....	56
Figura 5.9 Percentuais de degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel, após sete dias de ensaio de degradação com o consórcio microbiano misto em: a) biorreator e b) frasco (equivalente ao ensaio 4 do planejamento experimental)....	58
Figura 5.10 Teste de toxicidade com a) sementes de feijão - controle com água; b) sementes de feijão - material bioprocessado; c) sementes de alface - controle com água; d) sementes de alface - material bioprocessado.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Composição do meio mineral Büshnell-Haas (BH).....	31
Tabela 4.2 Composição dos meios de cultura Tryptic-Soy-Agar (TSA) e Sabouraud.....	32
Tabela 4.3 Codificação dos micro-organismos e seu respectivo grupo na coleção UFPEDA.....	32
Tabela 4.4 Composição do meio de cultura Agar Nutriente.....	35
Tabela 4.5 Composição dos ensaios de aclimação.....	35
Tabela 4.6 Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2 ³	36
Tabela 4.7 Concentrações dos componentes do meio de Bushnell Haas para as relações C:N de 10:1, C:N de 50:1 e C:N de 90:1.....	37
Tabela 4.8 Condições de funcionamento do sistema CG-EM para o óleo diesel..	39
Tabela 4.9 Carcterísticas do biorreator New Brunswick Company FS-5.....	40
Tabela 4.10 Condições para o experimento em biorreator.....	41
Tabela 5.1 Especificações da amostra de óleo diesel.....	44
Tabela 5.2 Hidrocarbonetos encontrados na amosta de óleo diesel e suas respectivas concentrações.....	45
Tabela 5.3 Identificação dos micro-organismos selecionados pelo teste de oxirredução e material de origem, coletado na Lagoa da Barra – Suape – PE.....	47
Tabela 5.4 Percentual de degradação de alcanos do oleo diesel, obtidos nos ensaios do planejamento experimental.....	51
Tabela 5.5 Índice de germinação obtidos a partir de percentagens da germinação e crescimento da raiz de sementes de alface e feijão após a exposição ao óleo diesel processados em biorreator pelo consórcio.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
Color.	- Colorido
coord.	- Coordenador
DVD	- <i>Digital Video Disc</i>
ed.	- Edição
Ed.	- Editor
f.	- Folha
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
il.	- Ilustrador
ISBN	- <i>International Standard Book Number</i>
P&b	- Preto e branco
p.	- Página
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco do Paraná
IBICT	- Instituto Brasileiro de Informações Científicas e Tecnológicas
trad.	- Tradutor

1. INTRODUÇÃO

O Terminal Portuário de Suape, em Pernambuco, é um dos mais importantes do continente Sul-américa e a movimentação de derivados de petróleo cria uma situação de risco, envolvendo a possibilidade de causar poluição nas áreas adjacentes de grande potencial turístico, ecológico e histórico. Além disso, atualmente, está sendo implantada a Refinaria “Abreu e Lima” que processará petróleo pesado, visando obter principalmente o óleo Diesel. Isto torna o estudo de medidas de atenuação de impactos ambientais extremamente importante (SOUZA, 2009).

A necessidade de remediar áreas poluídas tem conduzido ao desenvolvimento de novas tecnologias que visam a detoxificação dos contaminantes, não somente através de métodos químicos ou físicos, mas também por técnicas biológicas. A estratégia de biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos, que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando, assim, contaminantes em substâncias inertes (JACQUES, 2010; SOARES et al., 2011).

Para a utilização nos processos de degradação de poluentes, faz-se necessário o conhecimento das espécies microbianas envolvidas, bem como os fatores físicos e químicos do poluente e do ambiente (composição química, estado físico, concentração, toxicidade, temperatura, potencial redox, umidade, nutrientes, pH, salinidade e teor de matéria orgânica) e fatores biológicos (quantidades e tipos de micro-organismos degradadores, adaptação e técnica de inoculação). Essas respostas podem ser obtidas mediante estudo detalhado das várias características envolvidas no processo (SILVA, 2004; SANTOS et al., 2007).

Sabe-se que não existe uma única espécie microbiana com capacidade metabólica de degradar todos os constituintes dos derivados de petróleo, como o óleo diesel. A biodegradação do óleo requer a ação de consórcios microbianos por ser, bioquimicamente, extremamente complexa. De uma maneira geral, existe a ocorrência da co-metabolização em que existem micro-organismos que se encarregam do ataque inicial aos constituintes da fonte oleosa, produzindo

compostos intermediários que são, subsequentemente, assimilados por outras espécies microbianas. Na literatura há registros de trabalhos focalizando a biodegradação de óleo diesel por consórcios microbianos mistos (ROCHA 2001; GHAZALI, 2004; DIAS, 2007).

A biorremediação pode ser desenvolvida “*in-situ*” ou “*ex-situ*”. Uma das técnicas que pode ser aplicada em ambas as condições, é a bioestimulação, que consiste na adição de nutrientes para acelerar o processo de degradação. Dentre as tecnologias “*ex-situ*” comumente empregadas, o uso de biorreatores apresenta como principal vantagem o maior controle das condições físico-químicas (pH, temperatura, aeração, etc.), a fim de melhorar a atividade dos micro-organismos (D’EZIEL et al., 1999; TRINDADE, 2002; D’ANNIBALE, 2006).

A presente pesquisa visa estudar a degradação do óleo diesel por micro-organismos em consórcio, isolados a partir de um ambiente poluído por petroderivados, localizado próximo ao Complexo Industrial em Porto de Suape, em diferentes condições de temperatura, quantidade de inóculo e de nitrogênio. Essa investigação é importante não apenas sob o ponto de vista técnico-científico, uma vez que gera produtos para uso em processos de biorremediação, mas também sob o ponto de vista sócio-econômico já que visa minimizar impactos ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a degradação do óleo diesel por micro-organismos consorciados isolados de ambiente poluído por petroderivados.

2.2 Especificos

- Selecionar micro-organismos com maior potencialidade em degradar o óleo diesel;
- Realizar teste de antagonismo entre os micro-organismos selecionados para a formação de consórcio;
- Determinar condições físico-químicas e nutricionais mais favoráveis à degradação do óleo diesel pelo consórcio;
- Realizar ensaio de biodegradação do óleo em biorreator com o meio de cultivo e as condições selecionadas;
- Avaliar a produção de tensoativos e emulsificantes e a toxicidade do óleo diesel bioprocessado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleo Diesel

A indústria do petróleo apresenta fundamental importância para a industrialização e o desenvolvimento econômico experimentados pelo Brasil. O setor petrolífero ainda constitui a principal fonte energética mundial, sendo matéria-prima para a manufatura de vários bens de consumo como, por exemplo, a parafina, gás natural, GLP, produtos asfálticos, nafta petroquímica, solventes, óleos lubrificante e combustíveis tais como a gasolina, o querosene e o óleo diesel. Toda essa demanda exige grande estruturação da cadeia produtiva desse setor, desde novas descobertas de campos de petróleo, passando pela formação de vários pólos petroquímicos, ao aumento das redes de distribuição, a ponta dessa cadeia (FATORELLI, 2005, MARIANO, 2006).

A partir da destilação da fração média do petróleo é obtido o óleo diesel, constituído basicamente por hidrocarbonetos que na sua grande maioria são alcanos de cadeia normal e, em menor proporção, ramificados e cíclicos. Enxofre, nitrogênio e oxigênio também são encontrados no óleo diesel porém em baixas concentrações (GALLEGO, 2001; ADAM, 2002; MARIANO, 2006; ARRUDA, 2011). Segundo Sepic et al. (1996) a fração alifática do óleo diesel compreende: nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, nonadecano, eicosano, heneicosano, docosano, tricosano, tetracosano, pentacosano, hexacosano e heptacosano (SANTO, 2002).

O óleo diesel é o principal petroderivado comercializado no mercado brasileiro, utilizado no transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas (PETROBRAS, 2012).

A obtenção, o armazenamento, o transporte e o uso do petróleo e de seus derivados fizeram com que os hidrocarbonetos de petróleo sejam considerados os contaminantes principais do meio ambiente (MEDAURA e ÉRCOLI 2008; PASSOS, et al. 2009; TYAGI, 2011).

3.2 Bioprospecção de Micro-organismos

Há um interesse particular em encontrar micro-organismos com elevado potencial degradante que são nativos do local contaminado devido a apresentarem maior adaptabilidade ao meio, serem mais resistentes às variações de condições ambientais locais, menos suscetíveis a variações genéticas causadas por stress no meio, a exploração do potencial regional, entre outros (VANESSA et al., 2011).

A bioprospecção de micro-organismos é uns dos focos principais da era biotecnológica e vem auxiliando positivamente nos programas relacionados à gestão de áreas contaminadas (BRITO, 2010).

A melhor abordagem para a seleção de micro-organismos competentes deve basear-se no conhecimento prévio das comunidades microbianas. Na literatura científica algumas bactérias e fungos são citados como capazes de proliferar em um local poluído com compostos recalcitrantes, como os hidrocarbonetos do petróleo, havendo uma maior probabilidade de que possuam um sistema que lhe permita metabolizar esses contaminantes, sendo os gêneros de bactérias mais comuns: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* e *Vibrio* (LEAHY e COWELL, 1990; CRAPEZ et al. 2002; SHINODA et al., 2004; DE CARVALHO et al. 2005; SHIM et al., 2005; JACQUES et al. 2007; MANDRI e LIN 2007; FARHADIAN et al. 2008; HARITASH e KAUSHIK 2009; SEO et al. 2009). E entre os fungos, os gêneros: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Trichosporon*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Phanerochaete* (BARTHA e ATLAS, 1977; WALKER et al., 1978; ATLAS, 1984; SONG et al., 1986; ROSENBERG, 1991; ENGLERT e KENZIE, 1993; IJAH, 1998; SANTOS e LINARDI, 2004; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; RODRIGUES, 2007).

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; SANTOS, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; MACIEL et al., 2010). Já as bactérias possuem algumas características que propiciam sua adaptação a várias condições ambientais, como seu crescimento rápido, versatilidade metabólica e plasticidade genética (ROSATO, 1998; MARTINS 2004; OLIVEIRA et al, 2008).

O consórcio microbiano, constituídos de bactérias e fungos, é a melhor representação de um ambiente real, do que quando isolados (LEDIN, 2000; NYER et al., 2002; RAHMAN et al., 2002). Os micro-organismos quando em conjunto apresentam maior assimilação de misturas complexas de hidrocarbonetos, como as presentes no petróleo e derivados. Isso ocorre pela ampliação de mecanismos enzimáticos específicos necessários na degradação desses compostos, bem como pela complementaridade metabólica, já que o cometabólito transformado por uma determinada espécie pode resultar em uma substância útil para outra (ALEXANDER, 1999; RICHARD e VOGEL, 1999; BOONCHAN et al., 2000; VAN HAMME et al. 2003, TIBURTIUS et al. 2004; KOHLMEIER et el., 2005; UYTTEBROEK et al., 2007; WICK et al., 2007).

3.3 Biodegradação de Hidrocarbonetos do Petróleo

A biodegradação se dá através da transformação dos poluentes, que geralmente são utilizados como fonte de carbono, pelos micro-organismos que os metabolizam para obtenção de energia e de novas células. Para micro-organismos degradarem completamente o petróleo ou seus derivados, centenas de diferentes compostos têm que ser metabolizados (DÍAZ 2004, JACQUES et al. 2007; MANDRI e LIN 2007, PEDROTI, 2007; SEO et al. 2009).

Os hidrocarbonetos alifáticos representam, para os micro-organismos, uma fonte de substrato em potencial. Os alcanos de cadeia normal são degradados primariamente por oxidação do grupo metil terminal, seguido de uma clivagem da molécula na região entre o segundo e o terceiro carbono da cadeia (β -clivagem). A reação inicial na degradação do grupo metil envolve a adição direta do oxigênio ao carbono terminal do hidrocarboneto. Esta reação é mediada por oxigenases. A adição do oxigênio ao carbono primário promove a formação de um álcool primário, que é oxidado a aldeído e finalmente transformado em ácido graxo. Um fragmento

longo de dois carbonos terminais é clivado produzindo o acetil CoA, que entra na via metabólica do ciclo de Krebs (Figura 3.1). Uma repetição seqüencial destas reações resulta na completa oxidação da molécula de hidrocarboneto. O principal fator que varia nesse processo configurando um tempo maior é a capacidade dos micro-organismos de degradar cadeias carbonicas de tamanhos diferentes (BAKER e HERSON, 1994).

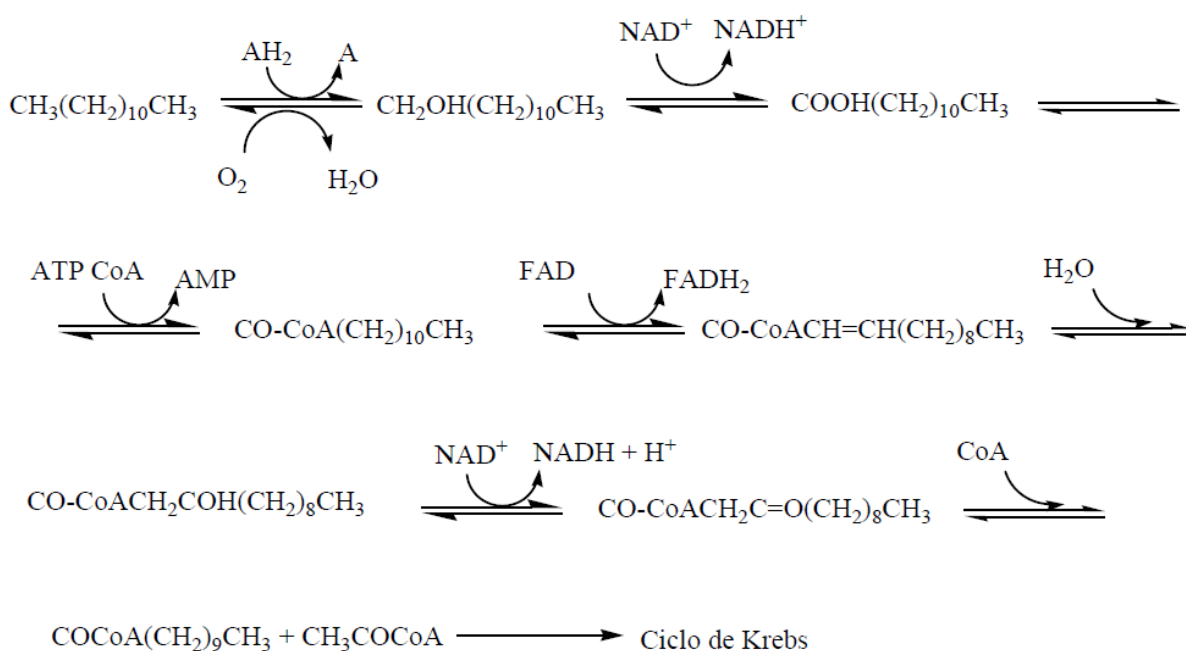


FIGURA 3.1 - Reações de degradação de n-alcanos (fonte: BAKER e HERSON, 1994).

Alexander (1994) e Ururahy (1998) sugerem que existem três mecanismos através dos quais se explica a assimilação de hidrocarbonetos por via microbiana. Estes mecanismos informam como o hidrocarboneto é transferido do ambiente à superfície da célula, e depois é transportado através da membrana para regiões intracelulares por ação enzimática. Tais mecanismos são:

a) Utilização do composto orgânico apenas na fase aquosa

O micro-organismo é capaz de utilizar apenas as moléculas que estão dissolvidas na fase aquosa. Estes micro-organismos são comumente encontrados associados a substratos de baixa solubilidade. O crescimento microbiano

(decorrente da degradação do poluente) está condicionado à disponibilidade do composto orgânico a estes microrganismos, presumivelmente não produtores de biossurfactantes. Para que haja uma degradação efetiva, é necessário que a taxa de dissolução espontânea seja maior que a taxa de biodegradação. Quando ocorre um aumento significativo de biomassa, a demanda biológica de carbono excede a taxa de dissolução espontânea da substância e a atividade microbiana ficará limitada a esta taxa de dissolução.

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

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

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

Em muitos casos é evidenciada a produção de substâncias que são capazes de aumentar a taxa de consumo de substrato oleoso. Nestes casos, a taxa de biodegradação aumenta concomitantemente com a biomassa e não há dependência direta da taxa de dissolução espontânea da fase não-aquosa. Estas substâncias são chamadas de biossurfactantes, ou bioemulsificantes, e sua produção aumenta o coeficiente de partição da substância para a fase aquosa, potencializando a taxa de biodegradação. Os surfactantes de um modo geral são moléculas anfifílicas, que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Em baixas concentrações, os surfactantes são solúveis em água e a proporção em que se aumenta a concentração, os surfactantes se agregam em micelas.

O substrato hidrofóbico não-solúvel fica presumivelmente incorporado no interior da micela aparentando estar dissolvido na fase aquosa. Este fenômeno é conhecido como “pseudossolubilização”, uma vez que a gotícula oleosa está retida na região interna da micela e não está dissolvida na fase aquosa.

3.4 Fatores que Afetam a Biodegradabilidade de Hidrocarbonetos

Inúmeros artigos de revisão científica analisam vários fatores que influenciam a taxa de biodegradação de compostos do petróleo (ZOBELL, 1946; ATLAS, 1981; FOGHT, 1987; ATLAS, 1984; LEAHY, 1990; ATLAS 1992; SEABRA, 2001; RIZZO et al. 2006; PEDROTI, 2007; ZAHED et al., 2010).

A eficiência de cada processo de degradação depende dos fatores que influenciam a atividade e o crescimento microbiano. Esses fatores podem ser biológicos como a biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas ou fatores ambientais (abióticos) que abrangem pH, temperatura, umidade, atividade de água, oxigênio dissolvido, equilíbrio de nutrientes, fontes de carbono e energia, disponibilidade de receptores de elétrons e a presença de co-metabólitos (DESAI e BANAT, 1997; BOOPATHY, 2000; MANIASSO, 2001; RON e ROSENBERG 2001; NITSCHKE e PASTORE 2002; COLLA e COSTA 2003; VAN HAMME et al. 2003; GENTRY et al., 2004; JACQUES et al., 2007; YAKUBU, 2007; MELO e AZEVEDO, 2008; SEO et al., 2009).

3.4.1 Disponibilidade do hidrocarboneto

A disponibilidade insuficiente dos hidrocarbonetos para os micro-organismos, devido à baixa solubilidade em água, tem sido abordada como um passo limitante na biodegradação.

O aumento da preocupação ambiental leva à procura de biossurfactantes como alternativa aos surfactantes sintéticos existentes. Além disso, outras propriedades destes biocompostos, como baixa toxidez, biodegradabilidade e propriedades biológicas, os colocam como alternativas promissoras (KOSARIC, 1992; CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; BARROS et al., 2008).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, produzidos por micro-organismos, que contêm partes hidrofílicas e hidrofóbicas e atuam em interfaces as quais possuem polaridades diferentes, tais como água-óleo, óleo-água, ar-água, entre outras (SINGH and CAMEOTRA, 2004; MARTINS, 2008). O uso de biossurfactantes para aumento da biodisponibilidade e consequente aumento da taxa de biodegradação, tem sido bem estudado (RAHMAN et al., 2002; RON e

ROSENBERG, 2002; VASILEVA-TONKOVA e GESHEVA, 2004; BAEK et al., 2007; DAS e MUKHERJEE, 2007; MARIANO et al., 2007; YAKUBU, 2007; BORDOLOI e KONWAR, 2009; CAMEOTRA e SINGH, 2009; SEO et al., 2009).

A redução da tensão superficial é frequentemente utilizada como um critério primário para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam necessariamente a habilidade de reduzir a tensão superficial (YOUSSEF et al. 2004; SILVA et al., 2010).

3.4.2 Nutrientes

Embora seja largamente conhecido que a maioria dos constituintes do petróleo são biodegradáveis, a taxa natural de degradação pode ser extremamente lenta. Isto é bem exemplificado pelas reservas de petróleo que existem há milhões de anos sem substancial biodegradação, devido às limitações de nutrientes. Alguns destes nutrientes limitantes incluem nitrogênio, fósforo e elementos traços (COONEY, 1984; CHOI, 2002; SILVA, 2004; KIM, 2005; NIKOLOPOULOU e KALOGERAKIS, 2009).

O nitrogênio é um constituinte essencial às células, uma vez que é necessário à formação de aminoácidos e ácidos nucleicos. Seu teor na célula pode atingir até 15% em massa seca, sendo o nutriente mais abundante na célula após o carbono. Normalmente é utilizado na forma de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e nitrato de potássio (KNO_3) (BETANCUR-GALVIS et al., 2006).

No entanto, a aplicação de uma quantidade excessiva de nutrientes sobre as necessidades metabólicas de micróbios podem resultar em custos extras e inibição da atividade de biodegradação (CHAILLAN, 2006).

3.4.3 pH

O pH afeta diretamente a atividade metabólica dos micro-organismos através dos efeitos dos íons hidrogênio na permeabilidade celular e na atividade enzimática e também, indiretamente, influenciando na disponibilidade de macro e micronutrientes. Para a maioria dos micro-organismos envolvidos no processo de biodegradação do petróleo, a faixa de pH mais favorável para o seu crescimento se situa entre 6.0 e 8.0 com um valor ótimo em torno de 7.0 (PEREIRA Jr., 2009). Balba

et al. (1998) e Vidali (2001), também sugerem que o valor do pH do meio reacional deva ser mantido próximo da neutralidade, no qual há o predomínio tanto de bactérias quanto de fungos.

3.4.4 Oxigênio

Segundo Díaz (2004) e Grishenkov (2000), a biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo pode ocorrer sob condições aeróbicas e anaeróbicas, entretanto, sob condições anaeróbicas, a taxa e a extensão de biodegradação de hidrocarbonetos é menor e a variedade de substâncias degradadas é tipicamente mais estreita.

O suprimento de oxigênio pode estimular a oxidação microbiana e hidrólise de compostos de hidrocarbonetos. As evidências na melhoria da biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo por aeração ou suprimento de oxigênio tem sido observado por um número de pesquisadores (ATLAS, 1991; FRITSCH, 2000; PERESSUTTI e ALVAREZ, 2003).

3.4.5 Temperatura

A temperatura influencia a taxa de metabolismo de hidrocarbonetos e a composição da comunidade microbiana, afetando a fisiologia e a diversidade. Também pode influenciar indiretamente na biodegradação de um componente, ou mistura, pela mudança de suas propriedades físicas, composição química ou toxicidade (ATLAS, 1981; MELO e AZEVEDO, 2009).

A biodegradação dos hidrocarbonetos pode ocorrer numa faixa de temperatura relativamente grande de 0°C a 70°C (SORKHOH et al., 1993). Bartha (1984) e Coney (1984), sugerem que maiores taxas de degradação geralmente ocorrem na faixa de 30-40°C em ambientes de solo, 20-30°C em alguns ambientes de água doce e 15-20°C em ambientes marinhos.

Porém a faixa de temperatura ideal para a maioria dos micro-organismos metabolizarem os contaminantes com eficiência ótima está entre 25°C e 30°C, na qual se encontra a temperatura média da maior parte dos solos do Brasil contendo áreas degradadas por contaminação de hidrocarbonetos do petróleo (TATE, 1995). Analogamente, estudos realizados pela EPA (1995) constataam que a atividade

microbiana é bastante comprometida em temperaturas abaixo de 10 °C e acima de 45 °C.

3.5 Processo de Biorremediação

Além do correto manejo, os resíduos gerados pelas atividades antropogênicas devem ser tratados e dispostos adequadamente. Quando isso não acontece é necessário então reparar os danos ambientais com rapidez de modo adequado e integral, com a prerrogativa de compatibilizar técnicas eficientes e economicamente viáveis (SILVEIRA e SPAREMBERGER, 2004).

Dentre os tratamentos para remoção de contaminantes os processos biológicos têm se destacado, por serem fundamentados em métodos naturais e relativamente simples e adequados para manutenção do equilíbrio ecológico, além de serem rentáveis e eficientes, podendo, ainda, estarem associados a métodos de tratamento físicos ou químicos sendo, por isso, de grande importância ambiental, econômica e social (BOOPATHY, 2000; DÍAZ, 2004; BORÉM e SANTOS, 2004; MOLINABARAHONA et al., 2004; BENTO et al., 2005; CERQUEIRA e COSTA, 2006; MATHEW et al., 2006; PIRÔLLO, 2006; MANDRI e LIN, 2007; YAKUBU, 2007; TYAGI, 2011).

A estratégia de biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos (geralmente bactérias e fungos), que possuam a capacidade de eliminação rápida de poluentes, para reduzir sua concentração a níveis aceitáveis, transformá-los em compostos de baixa toxicidade, ou mesmo mineralizá-los (TORSVIK et al., 1990; ATLAS, 1995; PELCZAR, Jr, et al., 1997; DUA et al., 2002; RAHMAN et al., 2002; BENTO et al., 2003; COLLA e COSTA, 2003; BORÉM e SANTOS, 2004; NAKAGAWA e ANDRÉA, 2006; OKOH e TREJO-HERNANDEZ, 2006; MANDRI e LIN, 2007; YAKUBU 2007; GOUDA et al., 2008; WANG et al., 2011).

A aplicação biotecnológica deste processo teve início em 1988, quando cientistas começaram a utilizar micro-organismos para limpar poluentes e lixo tóxicos (TORTORA, et al., 2005). A partir daí vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de decompor os diversos tipos de poluentes, incluindo pesquisas no campo

de petróleo, com estudos mostrando a degradação biológica de vários compostos, tais como óleo diesel (BENTO et al., 2005; MEDINA-BELLVER, 2005; DELILLE et al., 2007; SANSCARTIER et al., 2009; CERQUEIRA et al. 2012).

Mesmo fundamentada apenas no processo de biodegradação, a biorremediação possui variação quanto ao tipo de tratamento, estes podem ser “*in-situ*” (ou no seu lugar de origem) e “*ex-situ*” (ou fora do lugar de origem) e podem envolver os diversos tipos de procedimentos (MENEGETTI, 2007).

Na tecnologia “*ex-situ*” o material contaminado é retirado do local de origem e encaminhado para outro adequado, esta técnica é necessária para evitar o alastramento do contaminante e no tratamento de resíduos, casos em que outras técnicas provavelmente não trariam resultados satisfatórios (URURAHY et al., 1998; ALEXANDER, 1999; DOELMAN e BREEDVELK, 1999; WOO e PARK, 1999; NANO et al., 2003; VAN HAMME et al., 2003; JACQUES et al., 2007; SANTOS et al., 2007).

As técnicas de biorremediação “*ex-situ*” produzem um resultado mais rápido, pois são mais fáceis de serem controladas e apresentam uma maior versatilidade para o tratamento de vários tipos de contaminantes (ABBAS, 2003; MARIANO et al., 2007).

3.5.1 Bioaumento

A técnica de bioaugmentação consiste na adição de culturas microbianas com comprovada atividade degradadora sobre os poluentes a um local, garantindo que o consórcio adequado de microrganismos estará presente em tipo, número e compatibilidade suficientes, a fim de metabolizar o poluente de forma eficaz. Esta técnica pode ser utilizada tanto “*in-situ*” quanto “*ex-situ*”, (JORGENSEN et al., 2000, JACQUES et al., 2007, MARIANO et al., 2007, YAKUBU, 2007, FOGHT, 2008).

3.5.2 Bioestímulo

Outro método que pode ser realizado tanto “*in-situ*” quanto “*ex-situ*” é a bioestimulação. Entretanto, este só é eficaz quando há populações microbianas degradadoras no substrato (YAKUBU, 2007). A técnica é realizada estimulando-se a microbiota indígena, otimizando suas condições de crescimento por meio da adição

de nutrientes orgânicos e inorgânicos, regulação de pH, temperatura e aeração (JORGENSEN et al., 2000; RAMSAY et al., 2000; EBUEHI et al. 2005; JACQUES et al., 2007; MANDRI e LIN, 2007; MARIANO et al., 2007; YAKUBU, 2007; FOGHT, 2008).

3.5.3 Biorreatores

Entre as técnicas mais utilizadas nos processos “*ex-situ*” encontram-se os biorreatores (GAYLARDE et al, 2005). De acordo com Boopathy (2000), “o termo biorreator refere-se a qualquer recipiente (ou reator) onde a degradação biológica do contaminante está isolada e controlada”.

O uso de biorreatores proporciona menores tempos de tratamento, pois a principal vantagem da biorremediação em reatores é a de promover um maior contato dos micro-organismos com os poluentes, nutrientes e o oxigênio (SANTO, 2002).

Outra vantagem da biorremediação em reatores, está no fato de que estes podem assumir várias configurações, viabilizando um controle rigoroso dos fatores abióticos e, possivelmente, a otimização do fenômeno da biodegradação. Cabe ressaltar que a construção e a operação de reatores geram custos consideráveis, entretanto, tende a ser compensado pela redução de tempo do processo e pela diminuição de mão-de-obra requerida (INFANTE e GONZÁLES, 1995).

A forma mais utilizada de condução de bioprocessos em biorreator é a batelada simples, na qual o processo é transcorrido sem adições nem retiradas de meio reacional durante o seu curso. Outra forma de condução é por batelada alimentada na qual um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular são adicionados ao biorreator, intermitentemente ou continuamente, sem que ocorra retirada de material durante a operação. A flexibilidade de operação oferecida por esta forma de condução é adequada a bioprocessos em que o crescimento celular e/ou formação de produtos são significativamente sensíveis à concentração do substrato limitante. A condução contínua é outra modalidade de se operar biorreatores, onde tanto a alimentação de meio nutriente, quanto a retirada de produto são realizadas de forma contínua, possibilitando se operar o sistema por extensos períodos de tempo.

Pode-se encontrar uma grande variedade de configurações de biorreatores, dentre elas:

- ▶ agitados mecanicamente: são os mais estudados e utilizados industrialmente, apresentando versatilidade e bons resultados para uma grande gama de bioprocessos.
- ▶ agitados pneumaticamente: a potência necessária para se atingir o grau de mistura desejável no sistema reacional é suprida pela energia cinética do líquido, através de sua circulação pelo movimento das bolhas gasosas. Possibilitam a operação contínua de bioprocessos com altas densidades celulares.
- ▶ biorreatores a membrana: possibilita o confinamento de células ou enzimas dentro do biorreator a membrana microporosa. É particularmente atraente em sistemas bifásicos, pois muitas dificuldades associadas com emulsificação e separação de fases podem ser evitadas.
- ▶ biorreatores com células/enzimas imobilizadas: esses sistemas vêm sendo utilizados industrialmente, em países avançados, com sucesso na produção de etanol, acrilamida, alanina e dos ácidos orgânicos aspártico, málico e fumárico.

A escolha de uma dessas formas de condução e configuração está ligada à cinética do processo, mas também aos aspectos técnicos e econômicos do bioprocessamento em desenvolvimento (PEREIRA Jr. et al, 2008).

3.6 Testes de Toxicidade

Devido às características de determinados contaminantes, inclusive sua concentração, às vezes a degradação não acontece por completo, gerando produtos recalcitrantes, que podem apresentar um nível de toxicidade mais elevada que o próprio contaminante original. Desta forma, substâncias reconhecidamente tóxicas como hidrocarbonetos do petróleo, por exemplo, que frequentemente são encontradas causando contaminação nos diversos ambientes, devem ser avaliadas quanto à sua ecotoxicidade (MARQUES, Jr., 2002; PEDROZO et al., 2002; HAMDÍ et al 2007; LIU et al., 2010).

Testes ecotoxicológicos são metodologias que permitem avaliar a toxicidade de substâncias sobre um ambiente através da exposição de organismos vivos.

Segundo Wang e 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.

As sementes são muitas vezes sensíveis a substâncias tóxicas e podem ser utilizadas como bioindicadores. Muitos estudos têm demonstrado a eficiência de espécies como pepino, feijão, repolho, tomate, espinafre, couve, agrião, alface e soja em testes de toxicidade (OECD, 1984; TIQUIA et al., 1996; GUNDERSSON et al., 1997; HELFRICH et al., 1998;). 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 (MARANHO, 2006).

Estes estudos fornecem uma melhor visão sobre avaliação ecológica e podem apoiar decisões de alterações para uma bem sucedida biorremediação (RODRIGUES, 2003; HANKARD et al. 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra de Óleo Diesel

O óleo diesel utilizado nos ensaios foi coletado de um tanque do Terminal de Armazenagem Conjunta de Suape – PE e cedido pela Unidade de Negócios e Transportes Aquaviários de Suape (UNTA/NE – SUAPE) da Petrobrás Transporte (TRANSPETRO / SUAPE).

A determinação das características físico-químicas do óleo foi realizada no laboratório da Transpetro/Suape de acordo com os padrões especificados pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), e constou das seguintes análises: destilação (método ASTM D86), massa específica a 20/4°C (método ASTM D1298 / NBR 7148) e ponto de fulgor (método ASTM D56).

A análise elementar do óleo, referente ao percentual de carbono, nitrogênio e hidrogênio, foi realizada pela Rede de Análise do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES) da Petrobras com o uso do equipamento Perkin Elmer.

A análise química da amostra, referente à determinação dos hidrocarbonetos totais foi realizada pela Empresa Analytical Solutions, de acordo com o método EPA 8015C da USEPA SW-846, utilizando-se cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC).

O óleo foi acondicionado em recipiente hermético e armazenado, até seu uso, sob refrigeração a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

4.2 Meio mineral

Procurou-se trabalhar com um meio capaz de suprir as necessidades nutricionais básicas dos micro-organismos, isento de fonte carbono. Desta forma, o óleo diesel foi empregado, em todos os experimentos, como única fonte de carbono e de energia disponível. Com esse objetivo e com citações da literatura (PRINCE & SAMBASIVAM, 1993), selecionou-se o meio mineral Büshnell-Haas (BH), descrito

na Tabela 4.1, cuja composição possibilita o estudo da utilização de hidrocarbonetos por micro-organismos.

TABELA 4.1 - Composição do meio mineral Büshnell-Haas (BH).

Componente	Concentração
K ₂ HPO ₄	1,00g/L
KH ₂ PO ₄	1,00g/L
NH ₄ NO ₃	1,00g/L
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,20g/L
FeCl ₃ (2H ₂ O)	0,05g/L
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0,02g/L
pH 7 ± 0,2	

Fonte: ATLAS (1995)

4.3 Isolamento de Micro-organismos

As culturas microbianas foram isoladas de amostras (água da lagoa da Barra, solo da margem da lagoa, folhas, bagacilho e esponja de poliuretano) coletadas na Lagoa da Barra, situada no Complexo Industrial Portuário de Suape - Pernambuco.

No momento da coleta, o local já havia sido submetido à um tratamento de despoluição por remoção mecânica e físico-química, através de esponja de poliuretano e bagacilho, os quais se encontravam depositados às margens da lagoa, impregnados com petroderivados.

O isolamento foi realizado aplicando-se a técnica do enriquecimento seletivo em meio BH, tendo como única fonte de carbono o óleo diesel. As colônias isoladas foram purificadas por repiques sucessivos em placas de Petri, contendo o meio para crescimento bacteriano Tryptic-Soy-Agar (TSA®) ou o meio para o crescimento fúngico Sabouraud, cujos constituintes estão descritos na tabela 4.2.

TABELA 4.2 - Composição dos meios de cultura Tryptic-Soy-Agar (TSA) e Sabouraud.

TSA		Sabouraud	
Componente	Concentração (g/L)	Componente	Concentração (g/L)
Trypticase	5,00	Peptona	10
Peptona	5,00	Glicose	40
NaCl	5,00	Ágar	15
Agar	15,00		
pH 7,3 ± 0,2		pH 5,6 ± 0,2	

Fonte: ATLAS (1995)

As culturas purificadas foram mantidas sob refrigeração de $8\pm 1^{\circ}\text{C}$ para a realização dos ensaios previstos nas etapas subsequentes. Cada isolado foi transferido para frascos contendo o meio específico, recoberto com óleo mineral esterilizado e depositado na Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEA), sob o determinado código, conforme está mostrado na tabela 4.3.

TABELA 4.3 - Codificação dos micro-organismos e seu respectivo grupo na coleção UFPEA.

Grupo	Numeração (UFPEA)
Bactérias	800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839
Leveduras	844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866

4.4 Seleção dos Micro-organismos mais Promissores

A potencialidade de degradação do óleo diesel por bactérias e fungos foi avaliada segundo a metodologia de Hanson et al. (1993). A técnica consiste na utilização do indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP) em meio mineral BH com um derivado de petróleo em uma micro placa. O princípio deste teste é que quando ocorre a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos para os aceptores, como o oxigênio (aeróbicos), nitrato e sulfato (anaeróbicos). Ao adicionar um aceitor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado - $C_{12}H_7NCl_2O_2$) para incolor (forma reduzida - $C_{12}H_9NCl_2O_2$), como pode ser visto no esquema da figura 4.1.

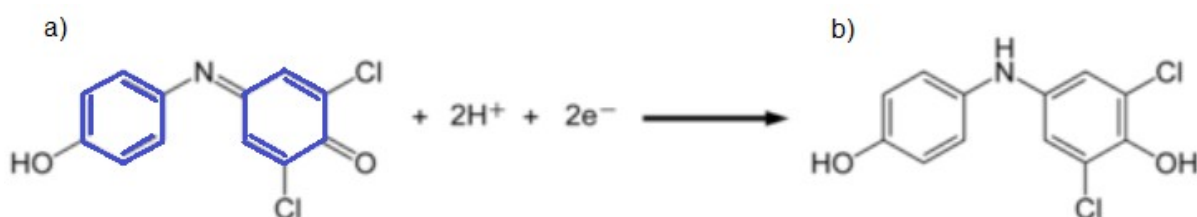


FIGURA 4.1 - Estrutura química da molécula de 2,6 diclorofenol-indofenol na sua forma oxidada (a) e reduzida (b).

Para a realização do teste, 25 μ L de suspensão microbiana, padronizada em 10^8 UFC/mL, foi adicionada a cada poço das placas multipoços, contendo 250 μ L de meio BH, 10 μ L da fonte de carbono (óleo diesel) e 5 μ L do indicador redox DCPIP. Poços abióticos, contendo 25 μ L de água estéril, substituindo a suspensão microbiana, foram usados como controle negativo e o poço controle positivo diferia do poço teste apenas por uma solução de glicose a 10 % que foi utilizada no lugar da fonte oleosa. As placas com bactéria foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e as com fungos a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.5 Identificação dos Micro-organismos Seleccionados

As culturas bacterianas seleccionadas foram identificadas à nível de espécie, pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, através da determinação do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos em cromatografia gasosa, usando o cromatógrafo gasoso 5890 (Hewlett-Packard, série II, serial 3223^a42710), equipado com um detector de ionização de chama (FID), através do Sherlock® Microbial Identification System (MIS), desenvolvido pela Microbial Identification Inc (MIDI).

As culturas de leveduras foram identificadas a nível de espécie pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, levando-se em consideração as características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas, aplicando-se o método clássico baseado em Barnett et al.(1990); Lodder, (1970) e Kreger-Van Rij, (1984).

4.6 Manutenção das Culturas

Os micro-organismos foram, periodicamente, semeados em placas de Petri contendo o meio sólido apropriado para bactéria ou para fungo, sendo as colônias repicadas com o auxílio de “swabs”, de forma a cobrir toda a superfície do meio gelosado de maneira uniforme com colônias confluentes em forma de tapete. Posteriormente foram utilizados blocos de gelose com 8 mm de diâmetro, retirados com o auxílio de um furador, das culturas crescidas para constituírem os inóculos.

A manutenção das linhagens já aclimatadas foi realizada em placas contendo além do meio de cultura apropriado, o óleo diesel.

4.7 Seleção do Consórcio

Para a formação do consórcio foi realizado o teste de antibiose, utilizando placas de Petri contendo o meio Agar Nutriente (AN), descrito na tabela 4.4, no qual foram semeadas em forma de tapete, com o auxílio de “swab”, as culturas microbianas seleccionadas. Posteriormente, três blocos de gelose de cada cultura, contendo as espécies microbianas pertencentes ao consórcio, crescidas no meio de

cultura apropriado, por 48 horas, foram transferidos, com o auxílio de uma alça de platina, para as placas em posições equidistantes. O material foi incubado a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Considerou-se como inibição qualquer halo produzido, independente do seu diâmetro.

TABELA 4.4: Composição do meio de cultura Agar Nutriente.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3
Peptona	5
Ágar	15
pH $6,8 \pm 0,2$	

Fonte: ATLAS (1995)

4.8 Ensaios de Aclimação

O consórcio selecionado foi submetido a ensaios de adaptação à concentrações crescentes da fonte oleosa, sendo as transferências realizadas a cada 48 horas. Para a realização desses ensaios foram utilizados frascos de Erlenmeyers (500 mL), contendo 100 mL de volume total, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, de acordo com o descrito na tabela 4.5.

TABELA 4.5 - Composição dos ensaios de aclimação.

Óleo (%)	Meio BH (mL)	Inóculo
1	99	1 bloco / micro-organismo
4	96	1 bloco / micro-organismo aclimatado a 1%
7	93	1 bloco / micro-organismo aclimatado a 4%
10	90	1 bloco / micro-organismo aclimatado a 7%

4.9 Ensaios de Bioestímulo com as Culturas Selecionadas

Esses ensaios foram efetuados com cada um dos micro-organismos selecionados pela técnica de oxi-redução, descrita anteriormente, para a escolha

dos melhores níveis da relação de C:N a serem usados no planejamento fatorial em consórcio.

Os ensaios de bioestímulo foram realizados em frascos de Erlenmeyers (250 mL), contendo 20% do material bioprocessado durante a aclimação, 70% do meio mineral de Bushnell Haas (BH) nas relações de C:N de 50:1, 100:1 e 150:1 e 10% do óleo diesel, com um volume total de 50 mL, garantindo, assim, a mesma relação de aeração do ensaio de aclimação (1:5 v/v). O experimento foi realizado nas mesmas condições de agitação e temperatura vistos na etapa de aclimação.

Ao final do ensaio, foi realizada a análise cromatográfica, como descrito no item 4.11 a seguir.

4.10 Planejamento Experimental em Frascos

Os experimentos obdeceram a um planejamento fatorial completo 2^3 , com três réplicas no ponto central, onde foram avaliadas as variáveis: quantidade de inóculo, relação C:N e temperatura. A matriz do planejamento está descrito na tabela 4.6. Os níveis do ponto central das variáveis foram escolhidos através de ensaios preliminares com as culturas isoladas, como descrito na seção 4.9.

TABELA 4.6 - Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 .

Ensaio	Fatores		
	Inóculo (bloco/espécie)	Relação de C:N	Temperatura (°C)
1	1 (-)	10:1 (-)	25 (-)
2	3 (+)	10:1 (-)	25 (-)
3	1 (-)	90:1 (+)	25 (-)
4	3 (+)	90:1 (+)	25 (-)
5	1 (-)	10:1 (-)	35 (+)
6	3 (+)	10:1 (-)	35 (+)
7	1 (-)	90:1 (+)	35 (+)
8	3 (+)	90:1 (+)	35 (+)
9	2 (0)	50:1 (0)	30 (0)
10	2 (0)	50:1 (0)	30 (0)
11	2 (0)	50:1 (0)	30 (0)

Para efeito de cálculo da relação C:N, considerou-se a massa total de carbono presente na referida amostra e a massa de nitrogênio contido no meio de cultura na forma de nitrato de amônio. Para calcular a massa de NH_4NO_3 a ser utilizada na composição do meio de cultivo, utilizou-se as equações 4.1 e 4.2:

$$mN = \frac{mC_{\text{óleo}} \cdot mN_{C/N}}{mC_{C/N}} \quad (4.1)$$

$$m\text{NH}_4\text{NO}_3 = \frac{mN \cdot MM \text{NH}_4\text{NO}_3}{MM \text{N}} \quad (4.2)$$

Onde:

mN = massa de nitrogênio desejada

$mC_{\text{óleo}}$ = massa de carbono na amostra oleosa

$mN_{C/N}$ = proporção de nitrogênio desejada na relação C:N

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

$m\text{NH}_4\text{NO}_3$ = massa de nitrato de amônio para compor o meio de cultivo;

$MM \text{NH}_4\text{NO}_3$ = massa molar do nitrato de amônio (80g/mol)

$MM \text{N}$ = massa molar do nitrogênio (28g/mol)

Baseando-se nas equações 4.1 e 4.2, têm-se para as relações de C:N 10:1, 50:1 e 90:1 os seguintes valores das massas de NH_4NO_3 para compor 1000 mL do meio de cultura Bushnell Haas, conforme está mostrado na tabela 4.7.

TABELA 4.7 - Concentrações dos componentes do meio de Bushnell Haas para as relações C: N de 10:1, C: N de 50:1 e C:N de 90:1.

Componentes	Concentração (g/L)		
	10:1	50:1	90:1
KH_2PO_4	1,00	1,00	1,00
K_2HPO_4	1,00	1,00	1,00
NH_4NO_3	24,54	4,91	2,73
MgSO_4	0,20	0,20	0,20
FeCl_3	0,05	0,05	0,05
CaCl_2	0,02	0,02	0,02
pH = 7 ± 0,2			

Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyers contendo 20% de suspensão de micro-organismos aclimatados, 70 % do meio mineral de Bushnell Haas e 10 % do óleo diesel, os quais ficaram sob agitação de 150 rpm durante sete dias.

Ao final dos seis dias, foi realizada a análise cromatográfica da fração oleosa. A análise cromatográfica foi realizada através do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM), modelo ShimadzuTM 17A/QP 5050A, onde a variável resposta foi expressa em termos de percentual de degradação dos hidrocarbonetos que compõem a fonte oleosa, através dos programas “GCMS Real Time Analysis” e “GCMS Postrun Analysis”. O cálculo de degradação foi realizado de acordo com a equação 4.3:

$$D = 100 - [(A_{t_f} / A_{t_o}) . 100] \quad (4.3)$$

Onde:

D = percentual de degradação de constituintes do óleo

A t_f = área total final dos constituintes de interesse do óleo

A t_o = área total inicial dos constituintes de interesse do óleo

Esta técnica foi realizada no Laboratório de Processos Fermentativos do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Antes de injetar as amostras no cromatógrafo, as mesmas foram submetidas a extração líquido-líquido, em funil de separação, com o solvente diclorometano (CH_2Cl_2) para extração dos hidrocarbonetos da fase oleosa. Primeiramente, adicionou-se ao funil a amostra e metade do seu volume do solvente. O sistema foi agitado por dois minutos, abrindo a válvula periodicamente para liberação de gás, e em seguida, mantido em repouso para a separação das fases. Após a primeira extração do óleo, a operação foi repetida por mais duas vezes com a outra fase da amostra. Ao final da operação foi adicionado sulfato de sódio anidro à fase oleosa para a retirada de qualquer resquício de água, e, em seguida, a amostra oleosa foi filtrada em papel de filtro faixa branca, para a retirada de resíduos. O óleo extraído foi mantido em frasco âmbar, a temperatura de $8 \pm 1^\circ\text{C}$, até ser injetado no cromatógrafo.

As condições operacionais empregadas na cromatografia em fase gasosa estão discriminadas na Tabela 4.8.

TABELA 4.8: Condições de funcionamento do sistema CG-EM para o óleo diesel.

Parâmetros	Descrição / Valores
Temperatura inicial de injeção (°C)	290
Temperatura da interface (°C)	280
Modo de controle	Split
Pressão de entrada (Kpa)	45,4
Fluxo da coluna (mL/min)	1,0
Velocidade linear (cm/seg)	35,2
Fluxo total (mL/min)	102,1
Gás de arraste	Hélio
Volume injetado (µL)	1
Parâmetros da coluna	Descrição / Valores
Nome	VB-5
Número de série	03025-025B
Espessura (mm)	0,25
Comprimento (m)	30,0
Diâmetro interno (mm)	0,25

A intervalos de 24h, foi retirado 1 frasco de cada composição de meio BH para as determinações de pH (em potenciômetro digital DIGIMED® modelo DM-21) e da concentração microbiana. Para avaliar o crescimento microbiano foram realizadas quantificações de peso seco da biomassa. Inicialmente, foi colocada a membrana filtrante (porosidade de 0,22µm para bactérias ou 0,45µm para fungos) em placa de Petri e realizada a pesagem inicial, após a filtração com uma alíquota de 20 mL do material bioprocessado, a membrana foi posta na estufa de secagem por 24 h a 80°C e, pesada até peso constante. O valor quantitativo da biomassa foi calculado pela diferença entre o peso final e o inicial, para a alíquota utilizada e posteriormente o valor obtido foi transformado para g/L.

4.11 Experimento em Biorreator

Foi utilizado um biorreator de bancada, modelo BioFlo 110, da New Brunswick Company FS-5 semelhante ao mostrado na figura 4.2, dotado dos controles de: pH, temperatura, aeração e agitação.

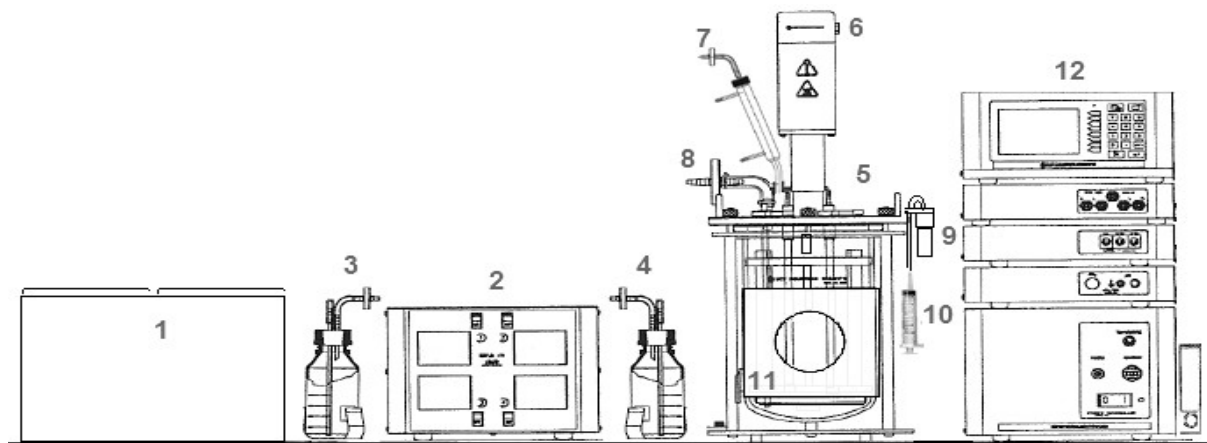


FIGURA 4.2 - Esquema do conjunto de fermentação BioFlo 110, da New Brunswick Company FS-5: 1-banho-maria para resfriamento do biorreator; 2-bombas peristálticas; 3 e 4-garrafas de adição de ácido e base para controle do pH; 5-cuba do biorreator; 6-motor de agitação; 7-condensador; 8-exaustor; 9-frasco de amostragem; 10-seringa; 11-manta de aquecimento; 12-unidades de controle.

Na tabela 4.9 estão listadas as características do biorreator New Brunswick Company FS-5.

TABELA 4.9 - Características do biorreator New Brunswick Company FS-5.

Parâmetros	Valores e faixa de operação
Capacidade nominal	7,5 L
Volume útil	1,5 L – 5,6 L
Vazão de ar máxima	11.000 cm ³ /min
Altura do vaso	49,5 cm
Diâmetro do vaso	29 cm
Peso do vaso	18 kg
Temperatura máxima	70 °C
Velocidade de agitação	50 – 1200 rpm (fermentação) 30 – 300 rpm (cultura de células)

Na tabela 4.10 estão descritos os parâmetros fixados no experimento em biorreator. A quantidade de inóculo, a temperatura e a relação de C:N para o ensaio em biorreator foram fixados a partir do melhor resultado obtido no planejamento fatorial em frasco.

TABELA 4.10 - Condições para o experimento em biorreator.

Parâmetros	Valores
Taxa específica de aeração	1 v.v.m.
Volume da fonte oleosa	300 mL
Meio mineral	2700 mL
pH	7,0
Volume da amostra	50 mL
Intervalo de amostragem	24 h
Velocidade de agitação	150 rpm

Com o intuito de se retirar amostras representativas do meio reacional, cinco minutos antes da retirada de cada amostra, a agitação foi elevada para 300 rpm, visando, assim, reduzir a heterogeneidade do meio.

Foram realizadas amostragens para a quantificação de biomassa (procedimento descrito no item 4.10), aferição da tensão superficial, verificação da produção de emulsificante e, ao final do processo, para a realização da análise cromatográfica e do teste de toxicidade. Os procedimentos empregados para a análise cromatográfica (CG-EM) foram os mesmos apresentados na seção de cromatografia gasosa da fração oleosa (item 3.11).

A atividade emulsificante foi estimada pelo método de Cooper e Goldenberger (1987). Amostras de 1 mL foram filtradas para retirada de células, o filtrado foi adicionado a 1 mL de óleo diesel em tubos de ensaio, agitados com um misturador vórtice por 2 minutos e deixados em repouso por 24 h. O índice de emulsificação (E_{24}) foi definido como a altura da camada emulsionada (mm) dividido pela altura total da coluna de líquido (mm) e multiplicado por 100, segundo a metodologia preconizada por Paraszkievicz et al. (2002).

A tensão superficial do meio bioprocessado durante o experimento em biorreator foi aferida através do tensiômetro digital Sigma 70 (modelo LB 500, marca KSV) localizado no Laboratório de Química de Interfaces do Departamento de Engenharia de Minas da Universidade Federal de Pernambuco, mostrado na figura 4.3, e programa Device Server Software (versão 1) Surface Tension Measurement.



FIGURA 4.3 – Tensiômetro digital Sigma 70.

O efeito da toxicidade do material residual, proveniente do processo de biodegradação do óleo diesel em biorreator, foi avaliado utilizando sementes da espécie *Phaseolus vulgaris* L. (feijão) e *Lactuca sativa* (alface), segundo a metodologia de Tiquia e Hodgkiss (1996).

As sementes, inicialmente, passaram por um processo de desinfecção passando um minuto em água destilada e, em seguida, o mesmo tempo em hipoclorito de sódio, a 1%, e novamente lavadas em água destilada esterilizada. Placas de Petri foram utilizadas, contendo papel de filtro impregnado com 10 mL do material biodegradado livre de células e dez sementes em cada placa, distribuídas de forma equidistantes. Paralelamente, foi realizado o controle com água destilada esterilizada e outro controle com o óleo diesel a 10%. Todos os testes foram

realizados em triplicata, sob a temperatura de 25°C. Após seis dias de incubação a germinação das sementes, alongamento radicular e o índice de germinação foram determinados de acordo com as equações 4.4, 4.5 e 4.6:

(4.4)

$$\text{Percentual de germinação (\% G)} = \frac{\text{Média de sementes testes germinadas}}{\text{Média de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

(4.5)

$$\text{Crescimento da raiz (\% CR)} = \frac{\text{Média do crescimento das raízes das sementes}}{\text{Média do crescimento das raízes no controle}} \times 100$$

(4.6)

$$\text{Índice de germinação (IG)} = \frac{(\% \text{ Germinação da semente}) \times (\% \text{ Crescimento da raiz})}{100}$$

O comprimento da raiz primária de cinco milímetro foi utilizada como definição operacional de germinação (USEPA, 1982).

4.12 Análise Estatística

O efeito dos fatores sobre a variável resposta (degradação de n-alcanos do óleo diesel), nos diferentes níveis utilizados no planejamento experimental, foi analisado pelo software Statistica 7.0.

Dentre as várias formas de análise estatística disponibilizada pelo software Statistica 7.0, encontram-se o Diagrama de Pareto o qual é bastante utilizado e elucidativo (TRINDADE, 2002). O Diagrama de Pareto representa os efeitos de cada variável testada na eficiência de biodegradação. Efeitos foram considerados estatisticamente significantes para um nível de 95% de confiabilidade ($p = 0,05$), o qual é representado por uma linha tracejada no gráfico. A influência das variáveis sobre a eficiência da biodegradação e das interações entre as variáveis, são significativos estatisticamente no processo quanto mais à direita da linha pontilhada eles estiverem.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Fonte Oleosa

A tabela 5.1. mostra os resultados obtidos nas análises físico-químicas da amostra de óleo diesel, sendo os valores obtidos típicos, encontrando-se dentro das especificações da Agência Nacional de Petróleo (ANP).

TABELA 5.1 - Especificações da amostra de óleo diesel.

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

* reprodutibilidade $\pm 0,3$ para cada elemento ** abaixo do limite de detecção do aparelho

A análise química da amostra está apresentada na tabela 5.2 e na figura 5.1. A análise preliminar dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) produziu um perfil de hidrocarbonetos variando de nC₉ para nC₃₆, com predominância de n-alcanos variando de nC₁₁ para NC₁₇. O óleo diesel apresenta, como pode ser visualizado na tabela 5.2, cerca de 82,81 ppm de n-alcanos, representando a maior parte dos hidrocarbonetos que constituem o óleo.

TABELA 5.2 - Hidrocarbonetos encontrados na amostra de óleo diesel e suas respectivas concentrações.

FRAÇÃO DE ALCANO	CONCENTRAÇÃO (ppm)
<i>n</i> C11	24,21
<i>n</i> C12	20,08
<i>n</i> C13	16,01
<i>n</i> C14	11,71
<i>n</i> C15	06,53
<i>n</i> C16	03,33
<i>n</i> C17	00,74
Pristano	00,43
<i>n</i> C18	00,16
Fitano	00,09
<i>n</i> C19	00,03
<i>n</i> C20 - <i>n</i> C36	N.D.*
Limite de detecção	200,0
Total	83,33
Total de <i>n</i> -alcanos	82,81
Hidrocarbonetos Totais do Petróleo	86,74
Parâmetros geoquímicos	
pri/phy	05,00
pri/ <i>n</i> C17	00,60
phy/ <i>n</i> C18	00,60

*não detectado pelo aparelho (valor abaixo do limite de detecção)

Alcanos ramificados, como pristano e fitano foram detectados em níveis residuais. De acordo com De Jong et al. (1997), hidrocarbonetos acíclicos são mais suscetíveis a biodegradação do que os cíclicos, e os alcanos de cadeia linear são geralmente mais biodegradáveis do que os alcanos ramificados.

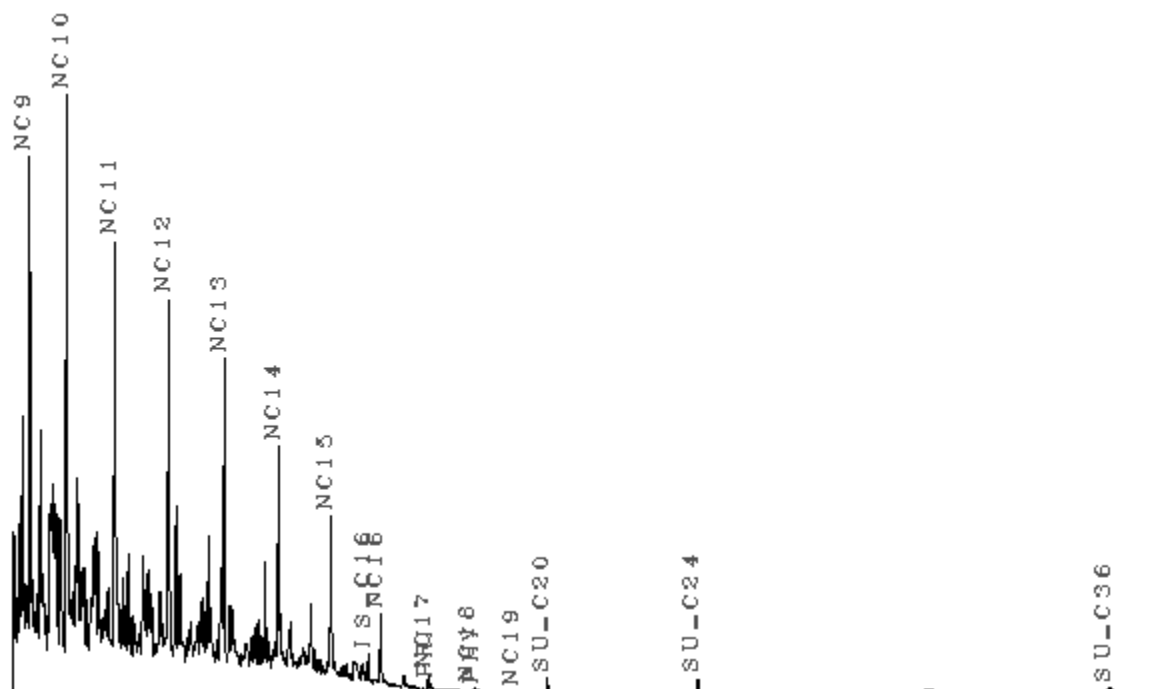


FIGURA 5.1 - Perfil cromatográfico da amostra de óleo diesel quanto aos hidrocarbonetos totais.

A análise elementar do óleo diesel apresentou os seguintes resultados: 85,9% (m/m) de carbono; 13,1% (m/m) de hidrogênio e <0,3% (m/m) de nitrogênio, demonstrando, assim, um conteúdo muito baixos de nitrogênio e, por isso é necessária a suplementação de fonte de nitrogênio para a eficácia do processo de biodegradação de hidrocarbonetos (Yu et al., 2005).

5.2 Seleção de Micro-organismos

Dentre os 86 micro-organismos testados pela técnica do indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol em placas multipoços, verificou-se que quatro micro-organismos (duas bactérias e duas leveduras) apresentaram os melhores resultados, os quais puderam promover a completa redução do indicador, em até 24 horas, como mostrado na figura 5.2, sendo esses micro-organismos, portanto, os selecionados para a realização do teste de antagonismo. Os poços do controle abiótico, se mantiveram sem alteração.

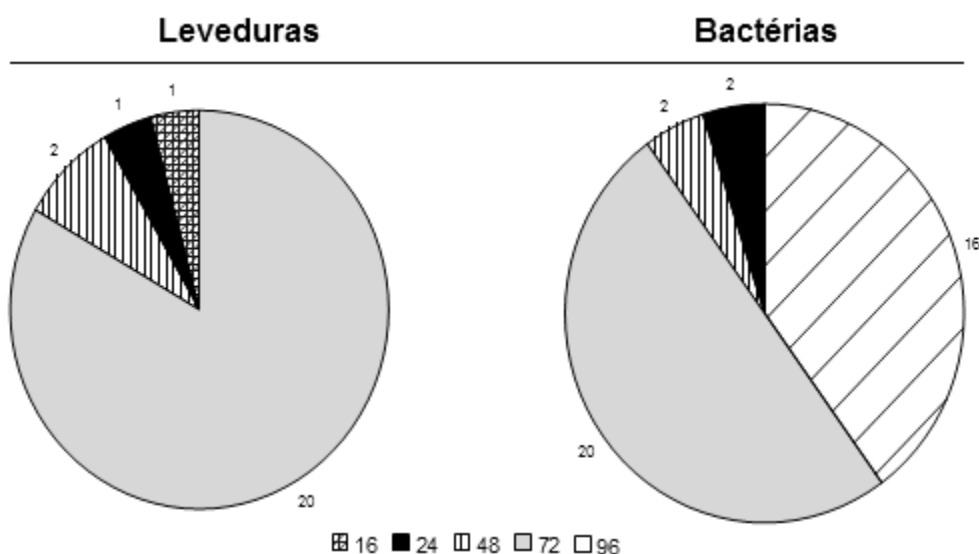


FIGURA 5.2 - Porcentagem de bactérias e leveduras que reduziram o indicador DCPIP após 16, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

A identificação dos isolados selecionados e os respectivos tempos de redução do indicador DCPIP e o material de onde foram isolados estão apresentados na tabela 5.3.

TABELA 5.3 – Identificação dos micro-organismos selecionados pelo teste de oxirredução e material de origem, coletado na Lagoa da Barra – Suape - PE.

Micro-organismo (UFPEDA)	Identificação	Tempo de redução do DCPIP (h)	Material de origem
Bactérias	800 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	24	Água da lagoa
	839 <i>Serratia marcescens</i>	24	Solo da margem
Leveduras	845 <i>Rhodotorula aurantiaca</i>	16	Esponja de polietileno
	862 <i>Candida ernobii</i>	24	Bagacilho

Mariano (2006), realizando o teste do indicador DCPIP com micro-organismos nativos de solos e águas subterrâneas contaminadas com petroderivados, observou

que todas as culturas apresentaram potencialidade semelhante para degradar o óleo diesel comercial a partir de 48 horas de cultivo.

Luz (2011), avaliando a capacidade de micro-organismos autóctones coletados em uma área impactada por óleo diesel em Porto Velho - RO, verificou, através da técnica de oxi-redução com DCPIP, a completa descoloração do meio de cultivo a partir de 96 horas de cultivo.

De acordo com Colla et al (2008), locais impactados com poluentes constituem uma boa fonte de obtenção de micro-organismos para estudos de biorremediação desses mesmos poluentes, uma vez que o local contaminado atua como um meio de cultivo seletivo para esses micro-organismos, sendo que os que permanecem nestes locais tornam-se adaptados.

5.3 Avaliação do Teste de Antagonismo Microbiano

Para investigar a interação entre os quatro micro-organismos selecionados, Após 48 horas de incubação a 32°C, não foi observada a formação de halos de inibição do crescimento microbiano. Portanto, através do teste de antibiose foi verificado que as culturas *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800, *Serratia marcescens* UFPEDA 839, *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 e *Candida ernobii* UFPEDA 862 não apresentam atividade antagônica entre elas, sendo assim os quatro micro-organismos escolhidos para a formação do consórcio microbiano misto.

5.4 Teste de Bioestímulo com os Micro-organismos em Cultura Pura

A diminuição da relação C:N de 150:1 para 100:1 ou 50:1, gerado através da adição extra de nitrato de amônio ao meio de cultura BH, proporcionou uma maior degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel por todas as quatro espécies microbianas selecionadas, como pode ser observado na figura 5.3. Esses resultados contribuíram para a delimitação dos níveis da relação C:N no planejamento experimental.

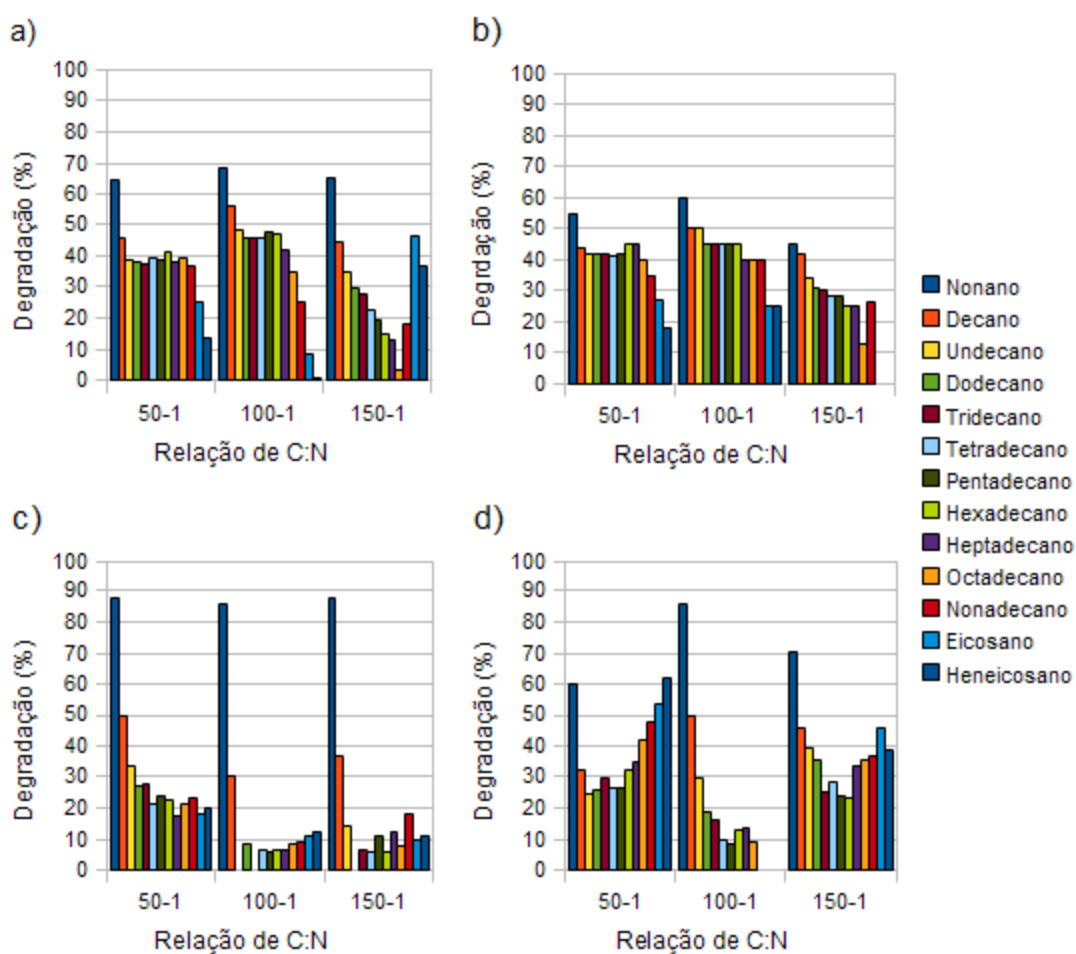


FIGURA 5.3 – Percentual de deradação de hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel por: a) UFPEDA 800 *Staphylococcus saprophyticus* b) UFPEDA 839 *Serratia marcescens* c) UFPEDA 845 *Rhodotorula aurantiaca* e d) UFPEDA 862 *Candida ernobii*, obtidos em ensaios de bioestímulo em frascos com 10% (v/v) de óleo diesel e relações de C:N de 50:1, 100:1 e 150:1.

De acordo com Millioli e colaboradores (2008), o nitrogênio pode ser utilizado para o crescimento celular (NH_4 ou NH_3) sendo facilmente assimilado pelo metabolismo microbiano, estimulando a biodegradação dos contaminantes.

5.5 Degradação de óleo Diesel pelo Consórcio Microbiano Misto em Diferentes Condições Físico-químicas e Nutricionais

As concentrações microbianas iniciais médias, correspondentes a um bloco de gelose, foram os seguintes: *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800 ($0,0097 \pm 0,0008$ g/L), *Serratia marcescens* UFPEDA 839 ($0,0087 \pm 0,0007$ g/L),

Rhodotorula aurantiaca UFPEDA 845 ($0,0070 \pm 0,0003$ g/L) e *Candida ernobii* UFPEDA 862 ($0,0077 \pm 0,0007$ g/L).

Os resultados obtidos nos ensaios de biodegradação em frascos do planejamento fatorial 2^3 , estão descritos a seguir.

5.5.1 Percentagem de degradação de hidrocarbonetos alifáticos do óleo diesel pelo consórcio nas diferentes condições de ensaio

Todos os hidrocarbonetos alifáticos investigados usando o sistema GC-MS foram degradados parcialmente durante os ensaios. As condições utilizadas no ensaio 4 (3 blocos de gelose de inóculo, relação C:N 90:1 e temperatura de 25°C) foram as mais favoráveis. Os compostos nonano e decano foram os mais degradados, apresentando pouca variação no percentual de degradação entre os ensaios, já os hidrocarbonetos: undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, nonadecano, heicosano e heneicosano apresentaram maior percentuais de degradação, em torno de 60%, nos ensaios 2, 3 e 4, como pode ser observado na figura 5.4.

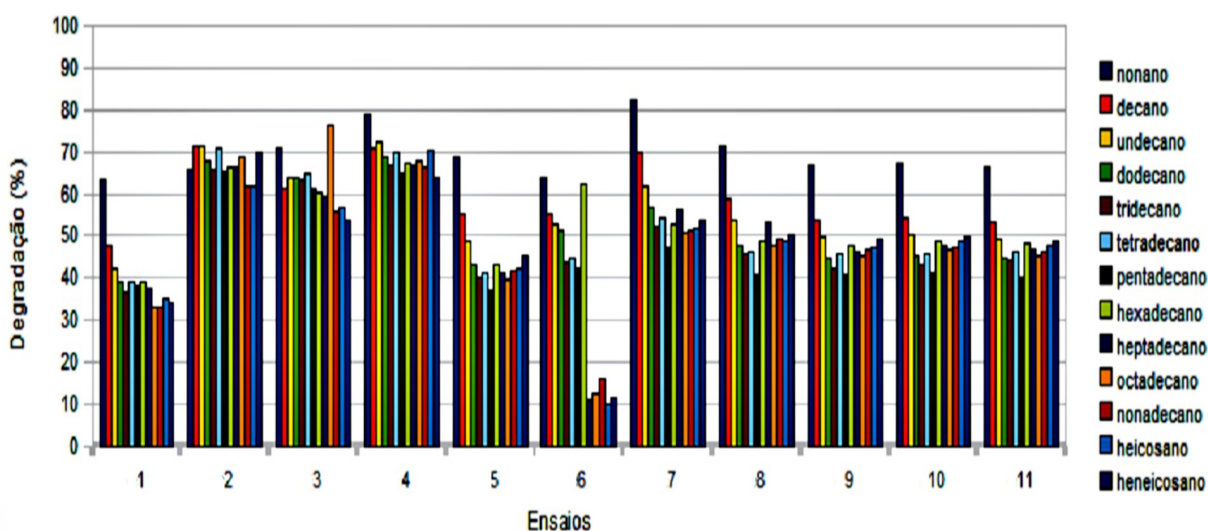


FIGURA 5.4 – Percentual de degradação de alcanos do óleo diesel, obtidos nos ensaios do planejamento experimental.

Miranda (2007), utilizando leveduras para degradar n-alcanos de um meio de Bushnell Haas contendo 12% de óleo diesel após 15 dias com 12% de óleo diesel obtiveram, após 15 dias, os seguintes resultados: para *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 os percentuais de degradação para o decano, nonano e dodecane foram 93,0%, 38,4% e 22,9%, respectivamente, enquanto que para *Candida ernobii* UFPEDA 862 degradou completamente o octadecano, e parcialmente decano (60,8%) e nonano (21,4%).

A tabela 5.4 mostra as variáveis, os níveis utilizados, a matriz codificada do planejamento completo 2^3 empregado e os resultados dos percentuais de degradação total de n-alcanos do óleo diesel, obtidos por análise cromatográfica em cada ensaio. Verifica-se nessa tabela que o maior percentual de degradação do óleo diesel foi obtido quando a quantidade de inóculo e a relação C:N estão em maior proporção no meio e a temperatura em seu menor nível. As condições do ensaio 4 promoveram a maior percentagem de biodegradação total de n-alcanos, que são os constituintes majoritários no óleo diesel.

TABELA 5.4 - Variáveis e níveis utilizados para o planejamento fatorial completo 2^3 e os percentuais de biodegradação total de n-alcanos do óleo diesel obtidos.

Variáveis		(-1)	(0)	(+1)
1 - Inóculo		1 bloco	2 blocos	3 blocos
2 - Relação C:N		10:1	50:1	90:1
3 - Temperatura		25°C	30°C	35°C
Ensaio	Variável 1	Variável 2	Variável 3	Degradação total de n-alcanos (%)
01	-	-	-	38,47
02	+	-	-	61,12
03	-	+	-	62,23
04	+	+	-	68,12
05	-	-	+	43,36
06	+	-	+	26,94
07	-	+	+	55,12
08	+	+	+	49,26
09	0	0	0	42,35
10	0	0	0	47,53
11	0	0	0	43,02

A figura 5.5 apresenta o diagrama de Pareto para a variável resposta degradação total de n-alcanos do planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes 1) o inóculo 2) relação C:N e 3) temperatura. Pode-se notar que a relação C:N foi a variável independente que mais favoreceu o aumento da eficiência da degradação do óleo diesel pelo consórcio, exercendo um efeito positivo estatisticamente significativo sobre a referida variável resposta. Por outro lado, a temperatura exerceu um efeito negativo significativo, do ponto de vista estatístico sobre o aumento da biodegradação. Os demais fatores e interações não apresentaram efeitos com significância estatística para um nível de confiança de 95% ($p=0,05$).

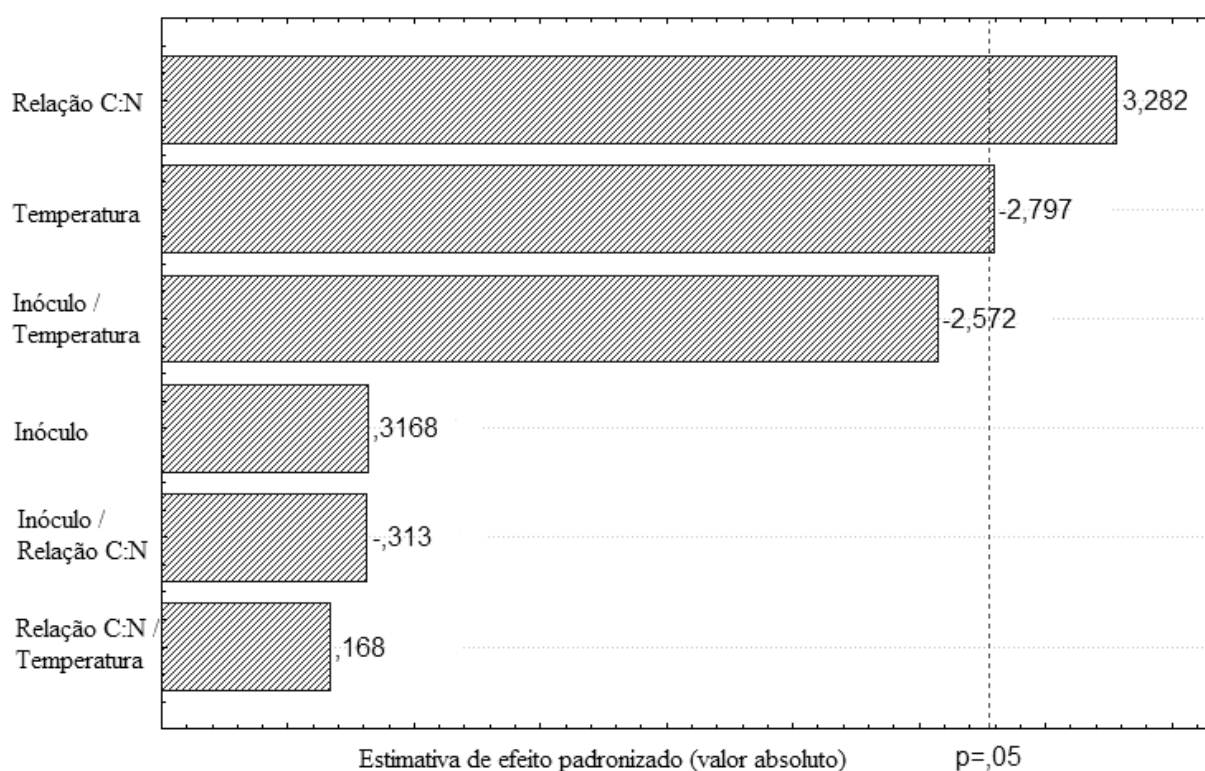


FIGURA 5.5 - Diagrama de Pareto, com nível de significância de 95% ($p=0,05$), para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes: (1) inóculo, (2) relação C:N e (3) temperatura.

Alguns estudos realizados revelam que a correção da quantidade de nitrogênio pode não apresentar efeitos favoráveis na biorremediação ou, até mesmo, representar um fator inibitório quando se adiciona uma quantidade excessiva

(WALWOTH et al., 1997; SEKLEMOVA et al., 2001). A relação C:N de 10:1 é utilizada, mas sob certas condições, o carbono do petróleo não é completamente assimilado e transformado em biomassa pois alguns constituintes são recalcitrantes ou são metabolizados por longos períodos de tempo e nesse caso pode haver efeitos prejudiciais aos micro-organismos, porque esta relação nutricional está acima das quantidades requeridas pelos mesmos. Trindade (2002) utilizando micro-organismos isolados de solo contaminado com óleo obteve efeito inibitório do nitrogênio quando utilizou a relação C:N de 10:1. Kwapisz (2008) em estudos obtidos em meio de cultura contendo NH_4NO_3 mostrou que os íons de amônio podem causar a supressão de captação de íons nitrato.

Para um determinado aumento ou decréscimo de temperatura a magnitude da resposta quanto à biodegradação varia com o ambiente e com o tipo de poluente, o que é refletido na fisiologia dos micro-organismos envolvidos. Alguns autores sugerem que a temperatura ideal para a biodegradação de hidrocarbonetos está na faixa entre 15°C e 40°C (GOMES, 2004; LEAHY and COLWELL, 1990). Song et al. (1990) realizaram um estudo sistematizado, a nível laboratorial, focalizando a degradação microbiana em solos contaminados com óleo diesel, “*bunker*”, gasolina, querosene de aviação e óleo para fornalha nas temperaturas de 17°C, 27°C e 37°C, e concluíram que na temperatura de 27°C, todos os petroderivados testados foram completamente degradados.

O processo de biodegradação pode ser acelerado pela utilização da técnica de bioaugmentação, que consiste no aumento do número de micro-organismos capazes de degradar rapidamente os poluentes (COSTA, 2007; FENIMAN et al., 2006;). Trindade (2002) utilizando consórcio, verificou que a adição do inóculo de 10^8 UFC/g de solo aumentou em 13% a eficiência de biodegradação do óleo em relação ao inóculo de 10^6 UFC/g.

5.5.2 Perfil de biomassa e de pH nas diferentes condições de ensaio

Durante o experimento o pH se manteve na faixa neutra a levemente ácida de 7,0 a 5,7, como pode ser visto na figura 5.5. De acordo com Kumar (2005) a acidez do meio é causada pela formação de subprodutos ácidos da degradação do petroderivado.

Em diferentes condições físico-químicas e nutricionais, o consórcio apresentou perfis semelhantes de crescimento microbiano na maioria dos ensaios, exibindo um rápido crescimento inicial, o que demonstra que o consórcio estava bem aclimatado, seguido de decréscimo de biomassa e, posteriormente, nova ascensão, como pode ser visualizado na figura 5.5. As condições do ensaio 2 (3 blocos de inóculo por micro-organismo, relação de C:N de 10:1 e temperatura de 25°C) foram as mais propícias ao crescimento de biomassa do consórcio, sendo neste ensaio obtido a maior quantificação celular (1,87 g/L). O ensaio 1 (1 blocos de inóculo por micro-organismo, relação de C:N de 10:1 e temperatura de 25°C) apresentou condições desfavoráveis ao crescimento microbiano do consórcio a partir do segundo dia de experimento, o que pode ser observado através do decréscimo de biomassa e posterior estabilização do crescimento até final do ensaio. Os ensaios 9, 10 e 11, que formam o ponto central, apresentaram perfis semelhantes de biomassa e de pH como pode ser visto na figura 5.6.

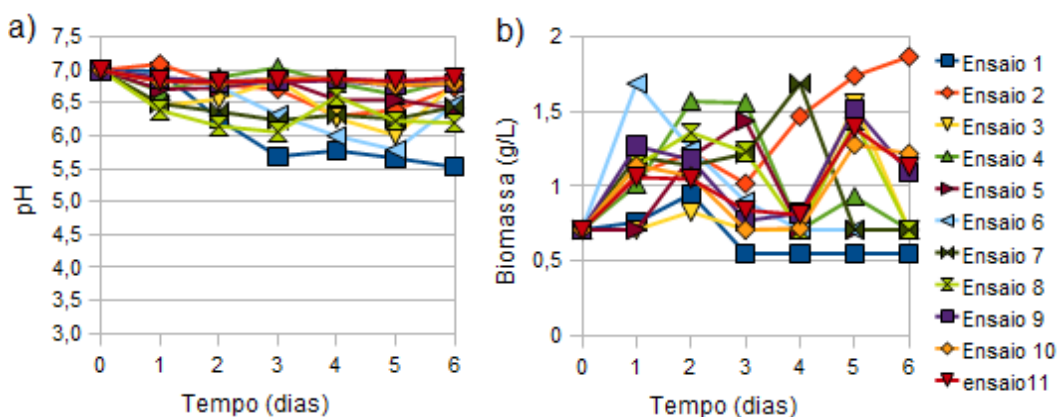


FIGURA 5.6 – Perfil de: a) pH e de b) biomassa, obtidos nos ensaios do planejamento fatorial com o consórcio microbiano.

5.6 Experimento em Biorreator com o Consórcio

A partir dos resultados do planejamento fatorial completo 2^3 , em frascos foram empregadas as seguintes condições em biorreator: menor temperatura (25°C) e as

maiores quantidades de inóculo (3 blocos por micro-organismo) e de relação C:N (90:1).

5.6.1 Perfil de biomassa

A biomassa do consórcio apresentou um crescimento sempre ascendente até o último dia de experimento, como pode ser visto na figura 5.7. Este resultado demonstra que as condições selecionadas através do planejamento experimental em frascos e controladas em biorreator, foram favoráveis biodegradação de 10% (v/v) do óleo diesel pelo consórcio microbiano misto.

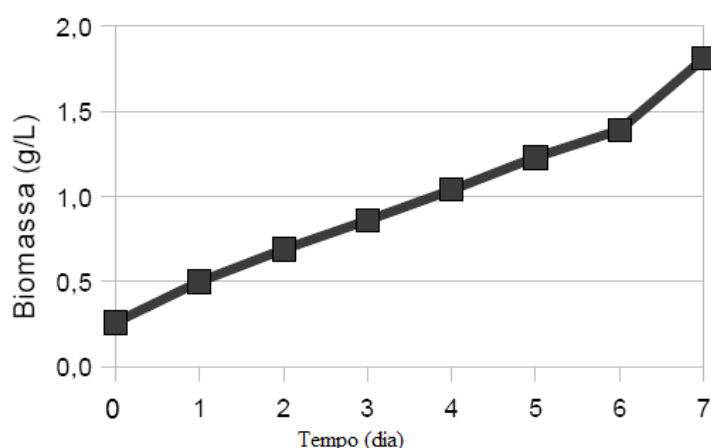


FIGURA 5.7 – Perfil de biomassa obtida durante o experimento em biorreator, com o consórcio misto submetido à 10% (v/v) de óleo diesel.

Segundo Rao et al. (2005) a biomassa microbiana obtida em bioprocessos fermentativos promove a biorremediação de compostos recalcitrantes, o que pode ser considerado um indicador direto da modificação do poluente original, quando o micro-organismo é previamente cultivado com o poluente como exclusiva fonte de carbono.

5.6.2 Perfil de tensão superficial

Durante o processo em biorreator, a tensão superficial do meio bioprocessado contendo o óleo diesel sofreu diminuição de 43,6 mN/m para 33,5 mN/m, como pode ser visualizado na figura 5.8, sendo o percentual de redução obtido de 23,17 %.

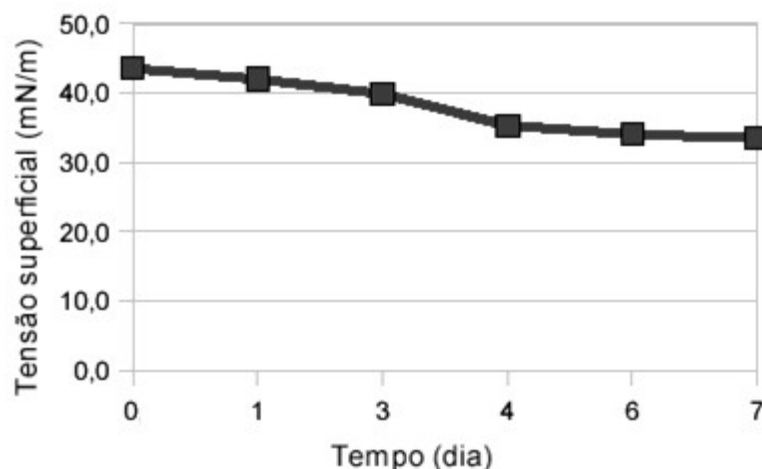


FIGURA 5.8 – Perfil de tensão superficial obtida durante o ensaio em biorreator, com o consórcio misto submetido à 10% (v/v) de óleo diesel.

A atividade biossurfactante pode ser medida pelas mudanças nas tensões, superficial e interfacial, e a emulsificação/estabilização da emulsão. Os micro-organismos que são promissores para a produção de biossurfactantes são aqueles que reduzem a tensão superficial cerca de 35 % (DESAI e BANAT, 1997).

Bento et al (2005) trabalhando com degradação de óleo diesel em temperatura de 30°C por sete dias e utilizando um consórcio bacteriano com *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter junii* e *Pseudomonas sp.* isolado de solo, obtiveram uma redução na tensão superficial para valores de 41 mN m⁻¹.

5.6.3 Avaliação do teste de emulsificação

O teste com o material resultante do processo de biodegradação em bioreator, livre de células, não apresentou emulsificação significativa, indicando que não ocorreu atividade emulsificante extracelular após os sete dias de experimento em biorreator.

Na literatura, há relatos demonstrando que a atividade emulsificante depende da afinidade do biossurfactante com o substrato testado. A maioria dos biossurfactantes é geralmente produzida quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento. Porém algumas espécies podem apresentar pequena

produção durante a fase exponencial de crescimento (RON; ROSENBERG, 2001; URUM; PEKDEMIR, 2004; THANOMSUB et al., 2007).

Plaza et al. (2006) realizaram estudos com bactérias, isoladas de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, focalizando a produção de biossurfactante/bioemulsificantes em cultura líquida, e constataram que embora a redução da tensão superficial tenha sido uma boa medida da produção de biossurfactante, ela não apresentou correlação com a atividade de emulsificação.

5.6.4 Degradação do óleo diesel por consórcio em biorreator

Dentre os hidrocarbonetos investigados no óleo diesel, 13 n-alcenos, abrangendo a faixa de C_9 a C_{21} , foram evidenciados com maior precisão pela metodologia utilizada no sistema CG-EM. O consórcio em estudo apresentou maiores percentuais de degradação, em ordem decrescente, para: nonano (C_9H_{20} -100%), decano ($C_{10}H_{22}$ -91%), heneicosano ($C_{21}H_{44}$ -72%), undecano ($C_{11}H_{24}$ -68%), heicosano ($C_{20}H_{42}$ -67%), nonadecano ($C_{19}H_{40}$ -56%), dodecano ($C_{12}H_{26}$ -47%), octadecano ($C_{18}H_{38}$ -41%), tridecano ($C_{13}H_{28}$ -32%), heptadecano ($C_{17}H_{36}$ -30%), hexadecano ($C_{16}H_{34}$ -27%), tetradecano ($C_{14}H_{30}$ -25%) e pentadecano ($C_{15}H_{32}$ -21%) como pode ser visto na figura 5.9.

A comparação dos percentuais de degradação obtidos através de análises cromatográficas para o ensaio em frasco que obteve maior percentual de biodegradação do óleo diesel no planejamento fatorial (ensaio 4) e para o ensaio em biorreator realizado nas mesmas condições, estão apresentados na figura 5.9, onde fica evidenciando a ocorrência do melhoramento da biodegradação o biorreator, devido ao maior controle das condições de pH e aeração durante o processo.

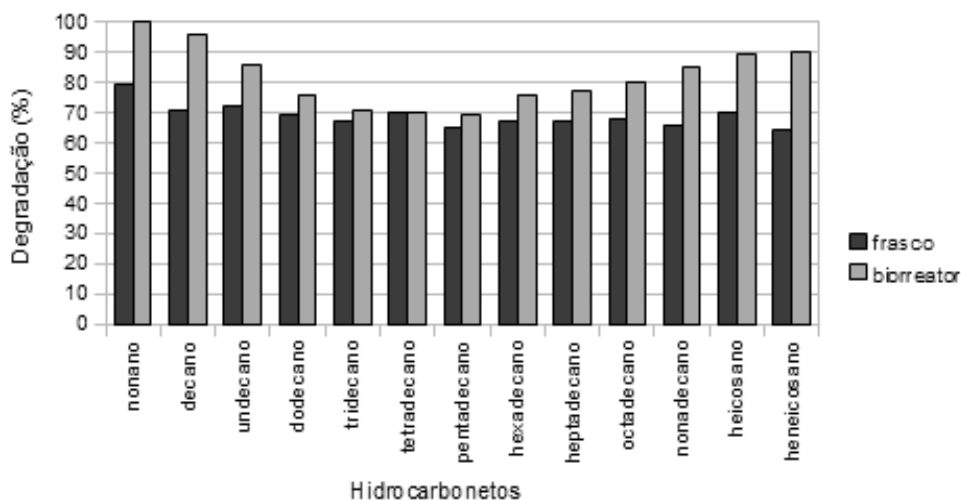


FIGURA 5.9 - Percentuais de degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel, após sete dias de ensaio de degradação com o consórcio microbiano misto em: a) biorreator e b) frasco (equivalente ao ensaio 4 do planejamento experimental).

Arruda (2011), utilizando um consórcio fúngico para a degradação do óleo diesel a 7% em frascos, verificou que o maior percentual de degradação foi obtido para o nonano, sendo este de 72,44 %. Richard & Vogel (1999), utilizando um consórcio bacteriano para degradação de óleo diesel, constataram que 90% dos hidrocarbonetos do óleo diesel foram degradados após 50 dias de experimento.

Li et al. (2009) utilizando consórcios microbianos formado por cinco fungos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella* sp., *Alternaria alternate*, *Penicillium chrysogenum*, e *Aspergillus niger*; e três bactérias: *Bacillus* sp., *Zoogloea* sp., e *Flavobacterium*, todos nativos de solo contaminado por petroderivados, obtiveram taxa de degradação de hidrocarbonetos de 41,3%, durante a incubação por 64 dias.

Santos (2002) realizando ensaio abiótico, a fim de avaliar as perdas dos constituintes voláteis do óleo diesel por evaporação, utilizando condições experimentais semelhantes, obteve cromatogramas cujos perfis mostraram-se inalterados ao longo de todo o processo e tendo a evaporação, praticamente, não exercendo nenhuma influência na concentração dos componentes do óleo. A contribuição quase não perceptível das perdas evaporativas, sugere que a perda, da maior parte dos compostos voláteis do petroderivado, tenha ocorrido durante a própria atividade de transporte e/ou nos tanques de armazenamento onde o

combustível foi coletado. Portanto, fica justificado a não realização do ensaio abiótico nesse experimento.

5.6.5 Teste de fitotoxicidade com o material residual da biodegradação

Segundo Ogbo (2009) o óleo diesel é fitotóxico para as plantas em concentrações relativamente baixas. No presente estudo, a toxicidade do meio contendo 10% de óleo diesel bioprocessado em biorreator, após sete dias, sobre sementes de feijão e de alface foi reduzida, pelo consórcio microbiano misto, como pode ser visualizado na figura 5.10. O controle com 10% de óleo diesel não apresentou germinação, como era previsto.

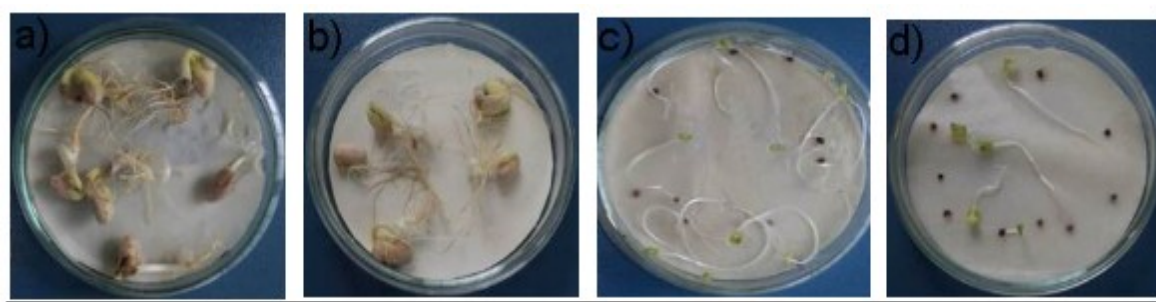


FIGURA 5.10 – Teste de toxicidade com a) sementes de feijão - controle com água; b) sementes de feijão - material bioprocessado; c) sementes de alface - controle com água; d) sementes de alface - material bioprocessado.

Os índices de germinação para as sementes de alface e feijão, obtidos através do percentual de germinação e de crescimento radicular, estão apresentados na tabela 5.5.

TABELA 5.5 - Índice de germinação obtidos a partir de percentagens da germinação e crescimento da raiz de sementes de alface e feijão após a exposição ao óleo diesel processados em biorreator pelo consórcio.

Semente	Germinação (%)	Crescimento radicular (%)	Índice de germinação
Alface	65	41	26
Feijão	70	54	38

Arruda (2011), visando a degradação de óleo diesel a 7%, por um consórcio fúngico, obteve para o teste de toxicidade com sementes de pepino caipira (*Cucumis sativus*) um índice de germinação inferior a 25, após 17 dias de experimento em frasco. Melo (2011), trabalhando com um consórcio microbiano misto para degradação de petróleo em biorreator, obteve um índice de germinação de sementes de pepino de 67,90 após 10 dias de ensaio. Segundo o referido autor, a inibição da germinação de sementes e a redução do crescimento vegetal são indicadores da toxicidade dos hidrocarbonetos do petróleo.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Dentre os 86 micro-organismos testados, as espécies microbianas: *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800, *Serratia marcescens* UFPEDA 839, *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 e *Candida ernobii* UFPEDA 862 foram as selecionadas para compor um consórcio misto, por apresentar maior potencial para degradar o óleo diesel e nenhuma atividade antagônica entre elas.
- ✓ Os fatores que influenciaram significativamente na degradação do óleo diesel pelo consórcio foram a relação C:N e a temperatura. O aumento da relação C: N favoreceu o processo de biodegradação enquanto que o acréscimo da temperatura afetou de forma desfavorável no referido processo.
- ✓ O experimento realizado em biorreator, com 10% (v/v) de óleo diesel, permitiu a ocorrência da biodegradação em níveis superiores a 69% de n-alcanos majoritários dessa fonte oleosa, pertencentes à faixa de C₉ a C₂₁.
- ✓ A diminuição da tensão superficial do meio bioprocessado em biorreator sugere a produção de biossurfactantes, embora nenhuma atividade emulsificante tenha sido constatada.
- ✓ Após sete dias de ensaio em biorreator, o material degradado não apresentou compostos tóxicos em concentrações suficientes para impedir a germinação e o desenvolvimento radicular de sementes das espécies *Phaseolus vulgaris* L. (feijão) e *Lactuca sativa* (alface), demonstrando a ocorrência de desintoxicação parcial do óleo diesel pela ação do consórcio misto.
- ✓ Portanto, o consórcio microbiano misto selecionado apresenta potencialidade para degradar constituintes majoritários do óleo diesel podendo ser utilizado em processos de biorremediação de locais poluídos por esse combustível e a manutenção de condições apropriadas conduz a transformação dessa fonte oleosa em compostos menos tóxicos.

7. REFERÊNCIAS

ADAM, G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 363-370, jan. 2002.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. 2ed. New York: Academic Press, 1994. 302p.

ALEXANDER, M. Effect of chemical structures on biodegradation. In: **Biodegradation and Bioremediation**. 2. ed. New York: Academic Press, cap 11, p.177-194, 1999.

ARRUDA, F. V. F. **Degradação de óleo diesel por *Aspergillus tereus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune***. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. 56p. 2011.

ATLAS, R. M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. **Microbial Reviews**, v. 45, p. 180-209, 1981.

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

ATLAS, R. M. Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Spill. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 52, p. 149-156. 1991.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. **Advances in Microbial Ecology**, vol. 12, p. 287–338, 1992.

ATLAS, R. M. **Handbook of media for environmental microbiology**. New York: CRC Press, v. 81, p. 489-491, 1995.

AZEVEDO, L. M. L. **Potencial de degradação do petróleo por fungos isolados de manguezal impactado**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. 55 p. 2010.

BAEK, K. H.; YOON, B.D; KIM, B. H.; CHO, D. H.; LEE, I. S.; OH, H. M.; KIM, H. S. Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude OH-contaminated soil with different treatments. **Journal Microbiol Biotechnol**, v. 17, p. 67–73, 2002.

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

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

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, 1998.

BANAT, I. M.; BANAT, R. S.; MAKKAR S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, p. 495–508, 2000.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast characteristics and identification**. 2° ed. Cambridge: University Press, Cambridge. 1200 p., 1990.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(4): 979-985, 2008.

BARTHA R.; ATLAS, R. M. R. **Transport and Transformations of Petroleum: Biological Processes**. In: D. BOESCH; N. RABALAIS, Editors, Long-term Effects of

Petroleum on the Marine Environment, Elsevier Applied Science, London, p. 287–341, 1987.

BARTHA, R.; BOSSERT, I. **The treatment and disposal of petroleum wastes**, in Petroleum Microbiology, R. M. Atlas, p. 553–578, 1984.

BAUER A. W., KIRBY W. M., SHERRIS J. C., TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45(4), p. 493-496. 1966.

BENTO F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 1049-1055, 2005.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34, p. 65-68, 2003.

BETANCUR-GALVIS, L. A.; BERNAL, D. A.; RAMOSVALDIVIA, A. C.; DENDOOVEN, L. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated salinealkaline soils of the former Lake Texcoco. **Chemosphere**. v. 62, p.1749-1760, 2006.

BOONCHAN S.; BRITZ M. L.; STANLEY G. A. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 66, N. 3, p. 1007-1019, 2000.

BOOPATHY R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**. v.74, p. 63, 2000.

BORDOLOI, N. K.; KONWAR, B. K. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. **Journal Hazard Mater.** v.170, p. 495–505, 2009.

BORÉM, A., SANTOS, F. R. **Biorremediação**. In: BORÉM, A.; SANTOS, F. R. (Eds) *Biotecnologia Simplificada*. Universidade Federal de Viçosa/MG, p. 179-187, 2004.

BRITO, G. C. B.; SOUZA, D. B.; VASCONCELOS, F. C. W.; BRAGA, L. C. A importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. v.3, n.3, p. 291-310, 2010.

CAMEOTRA S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004.

CAMEOTRA, S.S. & SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories**. v.8, p.16. 2009

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

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R.; BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal Microbiol Biotechnol**. v. 28, n. 3, p. 1203-1222, 2012.

CHAILLAN, F.; CHAINEAU, C. H.; POINT, V.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. **Environmental Pollution**. vol. 144, no. 1, pp. 255–265, 2006.

CHOI, S. C.; KWON, K. K.; SOHN, J. H.; KIM, S. J. Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil biodegradation in sand seashore mesocosms. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. vol. 12, no. 3, p. 431–436, 2002.

COLLA, L.M.; COSTA J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, v.13, p. 85-103, 2003.

COLLA L. M.; MUCCILLO-BAISCH A. L.; COSTA J. A. V. Spirulina platensis effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in Rabbits Fed with a hypercholesterolemic diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.51, n°2, p.405-11, 2008.

COONEY, J. J. **The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems**. In Petroleum Microbiology. ATLAS, R. M. ed. Macmillan, New York, p.400-433, 1984.

COSTA, A. F. S. et al. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciências & Tecnologia**. Ano 1, n. 1, julho-dezembro, 2007.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S. & PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v.30, p.179, 2002.

D'ANNIBALE, A.; ROSETTO, F.; LEONARDI, V.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI M. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. **Appl Environ Microbiol**. v. 72, n°1, p.28–36, 2006.

DAS, K., MUKHERJEE, A. K. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. **Journal of Applied Microbiology**. v.102, p.195–203, 2007.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; PARRENO-MARCHANTE B.; NEUMANN, G.; DA FONSECA, M. M. R.; HEIPIEPER, H. J. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on n-alkanes, alcohols and terpenes. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.67, p.383–388, 2005.

DE JONGE, H., FREIJER, J. I., VERSTRATEN, J. M., WESTERVELD, J., VAN DER WIELEN, F. W. M. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. **Environmental Science and Technology** v.31, p.771-775, 1997.

DELILLE, D.; PELLETIER, E.; COULON, F. The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated subAntarctic soil. **Cold Regions Science and Technology**. v.48, p.74–83, 2007.

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.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMER, O.A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochim Biophys Acta** v.1440, n° 244–252, 1999.

DIAS, F. G. **Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo**. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos, UNICAMP, 2007.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International Microbiology**. v.7, p.173-180, 2004.

DOELMAN, P; BREEDVELK, G. **In situ versus on site practices**. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). Bioremediation of contaminated soils. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p.539-558, 1999.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.59, p.143-152, 2002.

EBUEHI, O. A. T.; ABIBO, I. B.; SHEKWOLO, P. D.; SIGISMUND, K. I.; ADOKI, A.; OKORO, I. C. Remediation of Crude Oil Contaminated Soil by Enhanced Natural Attenuation Technique. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v.9, n°1, p.103-106, 2005.

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.

ENGLERT, C. J. & KENZIE, E. J. **Bioremediation of petroleum products in soil**, in: Princ. Prac. Pet. Contam. Soils. API, v.40, p.111-129, 1993.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank**. Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-95-007), 1995. Disponível em: <http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>. Acesso em 07 mar. 2008.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FARHADIAN, M.; VACHELARD, C.; DUCHEZ, D.; LARROCHE, C. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. **Bioresource Technology**. 99:5296–5308, 2008.

FATORELLI, L. **Proposta de avaliação de risco ecológico para contaminações de petróleo e derivados – estudo de caso**. Dissertação - Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. 102p. 2005.

FENIMAN, D. P. G.; et al. **Biodegradação Ambiental: Petróleo e Pesticidas**. Disponível em: <http://www.herbario.com.br/bot/toxicologia/biodegre.htm>. Acesso em: 14 set, 2006.

FINOTTI, A. R.; CAICEDO, N.L.; RODRIGUEZ M.T.R. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados do petróleo: toxicidade e a legislação brasileira. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**/Associação Brasileira de Recursos Hídricos, ABRH, vol. 6, nº 2, p. 29-46, 2001.

FOGHT, J. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. **Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology**. v.15, p.93-120, 2008.

FOGHT, J. M.; WESTLAKE, D. W. S. **Biodegradation of hydrocarbons in freshwater**, in: Oil in Freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology, J. H. Vandermeulen and S. R. Hrudey, Eds., p. 217–230, Pergamon Press, New York, NY, USA, 1987.

FRIELO, D. A.; MYLROIE, J. R.; CHAKRABARTY, A. M. Use of genetically engineered multi-plasmid microorganisms for rapid degradation of fuel hydrocarbons. **Applied Science Publishers**, London, United Kingdom.v. 48, p. 233-242, 2001.

FRITSCH, W.; HOFRICHTER, M. **Aerobic degradation by microorganisms**, in: Environmental Processes- Soil Decontamination, J. Klein, Ed., p. 146–155, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v.12, p.325-335, 2001.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação – Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.34, p.36-43, janeiro-junho, 2005.

GENTRY, T. J.; RENSING, C.; PEPPER, I. L. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v.34, p.447–494, 2004.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B. ; BASRI, M. Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Faculty of Science and Environmental Studies, Universiti Putra, Malaysia, 2004.

GOMES, E. B. **Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário e Suape-PE**. Dissertação - Programa de Biotecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco. 109 p. 2004.

GOUDA, M. K.; OMAR, S. H.; AOUAD, L. M. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.24, p.1703-1711, 2008.

GRISHCHENKOV, V.G.; TOWNSEND, R.T.; MCDONALD, T.J.; AUTENRIETH, J.S.; BORONIN, A.M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic

bacteria under aerobic and anaerobic conditions. **Process Biochemistry**. v.35, p.889-896, 2000.

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.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry**. v.39, p.1926–1935, 2007.

HANKARD, P. K.; SVENDSEN, C.; WRIGHT, J.; WIENBERG, C.; FISHWICK, S. K.; SPURGEON, D. J.; WEEKS, J. M. Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis. **Science of the Total Environment**. v. 330, p. 9–20, 2004.

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

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal Hazard Mater**. v.169, p.1–15, 2009.

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.

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

INFANTE, A.; O.; GONZÁLEZ, E.J. **Caracterización limnológica de los embalses El Cují y El Andino, Venezuela**. Proyecto Multinacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Technical Report. Organización de los Estados Americanos, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 1995.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO; F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**. v.37, nº4, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.280-287, 2010.

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN J.; SUORTTI A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environmental Pollution**. v.107, p.245-254, 2000.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”**. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.

KIM, S. J.; CHOI, D. H.; SIM, D. S.; OH, Y. S. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. **Chemosphere**. vol. 59, nº 6, p. 845–852, 2005.

KOHLMEIER S.; SMITS T. H. M.; FORD R. M.; KEEL C.; HARMS H. AND WICK L. Y. Taking the Fungal Highway: Mobilization of Pollutant-Degrading Bacteria by Fungi. **Environmental Science Technology**. v. 39, p. 4640–4646, 2005.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1731-1737, 1992.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3° ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1082 p., 1984.

KUMAR, A.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. **Biochemical Engineering Journal**. v. 22, n° 2, p. 151-159, 2005.

KWAPISZ E., WSZELAKA J. , MARCHUT O., BIELECKI S. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.61 p.214–222, 2008.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environmental. **Microbial Reviews**. p. 305-315. 1990.

LEDIN, M. Accumulation of metals by microorganisms processes and importance for soil systems. **Earth-Science Reviews**. v.51, n°1–31, 2000.

LI, X. J.; LIN, X.; LI, P. J; LIU, W.; WANG, L.; CHUKWUKA, K. S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. **Journal Hazard Mater**. v.172, p.601–605, 2009.

LIU, Y. J.; ZHANG, A. N.; WANG, X. C. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp XA05 and *Sphingomonas* sp FG03. **Biochemical Engineering Journal**. v.44, p.187–192, 2009.

LODDER, J. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1970.

LUZ, C. C. et al. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em porto velho – RO, Amazônia. **Química Nova**. v. XY, p. 1-5, 2011.

MACIEL, C. C. S.; SOUZA, M. A.; GUSMÃO, N. B.; TAKAKI, G. M. C. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**. v.6, n°1, p.23-27, 2007.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**. v.24, n°1, p.87-93, 2001.

MARANHO, L.T., GALVÃO, F., PREUSSLER, K.H., MUNIZ, G.I.B., KUNIYOSHI, Y.S. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasilica**. v.20, n°3, p.615-624, 2006.

MARQUES JR, A.N.; MORAES, R.B.C. & MAURAT,C.M. Biologia Marinha. Rio de Janeiro. 311-334. In: PEREIRA, R.C.; GOMES,A.S. (org). **Interciência**. p.382, 2002.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 162p. 2006.

MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F. & BONOTTO, D.M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.346-353, 2007.

MARTINS, B.A.D. **Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil. 86p, 2004.

MARTINS, V. G.; Kalil, S. J.; Costa, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, Vol. 31, No. 8, 1942-1947, 2008.

MATHEW, M. et al. Bioremediation of 6% [w/w] diesel-contaminated Mainland soil in Singapore; comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Engineering Life Science**, v. 6, n. 1, p. 63-67, 2006.

MEDAURA, M. C.; ÉRCOLI, E. C. Bioconversion of petroleum hydrocarbons in soil using filter cake. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 427-432, 2008.

MEDINA-BELLVER, J. I.; MARÍN, P.; DELGADO, A.; et al. Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill. **Environmental Microbiology**. vol. 7, nº 6, p. 773–779, 2005.

MELO, I. S.; AZEVEDO J. L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. 2008.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Derivados**. In: Microbiologia Ambiental. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Meio Ambiente, cap. 24, p. 547-570, 2009.

MENEGHETTI, L. R. R. **Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, UPF, 2007.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. **Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfatantes**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Série Tecnologia Ambiental, 50. 95p. 2008.

MIRANDA, R. C.; SOUZA, C. S.; GOMES, E. B. G.; LOVAGLIO, R. B.; LOPES, C. E.; SOUSA, M. F. V. Q. Biodegradação de óleo diesel por leveduras isoladas da vizinhança do Porto de Suape, no estado de Pernambuco – Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol.50, no.1, pp.147-152, 2007.

MOLINA-BARAHONA, L. et al. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**. v. 27, p. 65-175, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. **Xenobióticos do solo**. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Cap. 6. p.263-311, 2006.

MULLIGAN, C.N. Environmental Applications For Biosurfactants. **Envinmental Pollution**. v.133, p.183-198, 2005.

NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M. M. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 30, p. 575-582, 2006.

NANO, G.; BORRONI, A.; ROTA, R. Combined slurry and solid phase bioremediations of diesel contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**. v.B100, p.79-94, 2003.

NIKOLOPOULOU, M.; KALOGERAKIS, N. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology's**. v.84, p.802–807, 2009.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**. v.25, nº5, p.772-776, 2002.

NYER, E. K.; PAYNE, F.; SUTHERSAN, S. Environment vs. Bacteria or let's play 'name that bacteria'. **Ground Water Monit Remediat**. v. 23, p.36–45, 2002.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline for testing of chemicals**. nº207, 1984

OGBO, E. M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. **African Journal of Biotechnology** v. 8, nº2, p. 250-253, 2009.

OH, Y. S.; CHOI, W. Y.; LEE, Y. H.; CHOI, S. C.; KIM, S. J. Biological treatment of oil contaminated sand: comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flame ionization detector and respirometric analysis. **Biotechnology Letter**. v. 22, n. 595-598, 2000.

OKOH, A. I.; TREJO-HERNANDEZ, M. R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. **African Journal of Biotechnol.** v.5, nº 2520–2525, 2006.

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, p. 133-148, 2006.

OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A.; LEITE, S. G. F. **Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte**. Série Tecnologia Ambiental. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/cetem_sta_45.pdf>. Acessado em 31/01/09.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do Sul do Brasil. **Química Nova**. vol.XY, p.1-5. 2009.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo. 120p. 2007.

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, J. R.; JOSEPH, M.; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v. 2, 2ª.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil. 1997.

PEREIRA Jr., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos. Séries em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 1 ed, v. 1, 62p., 2008.

PEREIRA Jr., N.; GOMES E. B.; SORIANO, A. U. **Biodegradação de hidrocarbonetos**. Rio de Janeiro: Séries em Biotecnologia, 1 ed, v. 3, 2009.

PERESSUTTI, S. R.; et al. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2003.

PETROBRAS, Disponível no site: <http://www.petrobras.com.br/pt/produtos/para-voce/nas-ruas/#oleo-diesel>, acesso em: 17/01/2012. 2012.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista. 61p. 2006.

PLAZA, G. A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and

bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering**. v.50, p.71-77, 2006.

PREFEITURA DO IPOJUCA. **Ipojuca**. Disponível em: <<http://gwmroot.gt.com.br/ipojuca/contentler.asp?contentId=2425>>. Acesso em: 02/01/2012.

PRINCE, M., SAMBASIVAM, Y. Bioremediation of petroleum wastes from refining of lubricant oils. **Environmental Progress**. v.12, p. 5-11, 1993.

RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY P.; BANAT, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**. v.85, p.257–261, 2002.

RAIMUNDO, R. S. E RIZZO, A. C. L. **Utilização de biorreatores no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. X Jorn. de Inic. Cient. do CETEM/MCT, 2002.

RAO, K. R.; RASHMI, K.; LATHA, J. N. L.; MOHAN, P. M. Bioremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waste. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 4, pp 139-143, 2005.

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.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores**. Serie tecnologia Ambiental. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

ROCHA, F. J. M.; HERNÁNDEZ-RODRÍ, V.; LAMELA, M.T. **Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium**. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, México, 2001.

RODRIGUES, M. T. T. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**. v.41, n.3, p.2-3, 2003.

RODRIGUES, K.A.; SAMPAIO, G.M.M.; ZAIAT, M.; SANTAELLA, S. T. Influência da glicose sobre o consumo de fenol por *Aspergillus niger* an 400 em reatores em batelada. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v.12, n.2, p.222-228, 2007.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**. v.3, n°4, p. 229-236, 2001.

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.

SANSCARTIER, D.; ZEEB, B.; KOCH, I. Bioremediation of dieselcontaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. **Cold Regions Science and Technology**. v.55, p.167–173, 2009.

SANTO, L. S. E. **Percolação e biodegradabilidade de óleo diesel por amostra de areia da praia de Suape-PE**. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco. 85p. 2002.

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.

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

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, p.41-60, 2001.

SEKLEMOVA, E., PAVLOVA, A., KOVACHEVA, K. Biostimulation based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. **Biodegradation**. v. 12, p. 311–316, 2001.

SEO, J.; KEYN, Y.; LI, Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.6, p.278-309, 2009.

SEPIC, E.; TRIER, C.; LESKOVESIC, H. **Biodegradation studies of selected hydrocarbons from diesel oil**. *Analyt.* v.121, p 1451-1456, 1996.

SHIM, H. et al. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**. v. 16, n. 4, p. 319-327, 2005.

SHINODA, Y. et al. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p.1385-1392, 2004.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S.; Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnol**, 22: 142-146, 2004.

SILVA, E. P. **Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guamaré-RN**. Dissertação - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, UFRN. 119p. 2004.

SILVA, T. A. L.; LUNA, J. M.; FILHO, M. A. M.; TAMBOURGI, E. B.; TAKAKI, G. M. C. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.

SILVEIRA, A. C.; SPAREMBERGER, R. F. L. **A relação homem e meio ambiente e a reparação do dano ambiental: reflexões sobre a crise ambiental e a teoria do risco na sociedade**. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul UCS, 2004.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.2, p.341-350, 2011.

SORKHOH, N. A. et al. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait. **Environmental Pollution**. v. 65, n. 1, p. 1-17, 1993.

SONG, H. G.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Applied Environmental Microbiology**. v. 56, p. 652-656, 1990.

SOUZA, F. A. S. D. **Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação de Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco. 175p. 2009.

TATE, R.L. **Soil Microbiology**. New York, John Wiley, p.107, 1995

THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P. PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by

Pseudomonas aeruginosa B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, 98: 1149-1153, 2007.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**. v.27, n°3, p.441-446. 2004.

TIQUIA, S. M.; N. F.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**; v.93, n°3, p. 249-256.1996.

TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 127p. 2002.

TRINDADE, P. V. O.; et al. **Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil**. In: 9th International Petroleum Environmental Conference, New Mexico, USA, 2002.

TORSVIK, V.; SALTE, K.; SORHEIM, R. & GOKSOYR, J. Comparison of Phenotypic Diversity and DNA Heterogeneity in a Population of Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, n°3, p.776-78, 1990.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

TYAGI, M. M.; MANUELA, R. F.; CARLA, C. C. R. C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**. v.22, p.231–241. 2011.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of crude contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 276, p. 456–464, 2004.

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. 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**. v.36, n°5, p:1403-11, 2007.

VAN HAMME J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.67, p.503–549, 2003.

VANESSA S. C.; EMANUEL B. H.; FRANCIELE M.; FLAVIO A. O. C.; MARIA DO CARMO R. P.; FATIMA M. B. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 28, n. 3, p. 1203-1222, 2011.

VASILEVA-TONKOVA E.; GESHEVA, V. Potential for biodegradation of hydrocarbons by microorganisms isolated from Antarctic soils. **Z Naturforsch.** v.59, p.140–145, 2004.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**. v.73, p.1163-1172, 2001.

WALWORTH, J. L.; WOOLARD, C. R.; BRADDOCK, J. F.; REYNOLDS, C. M. Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of

fertilizer nitrogen: An approach to determining optimum levels. **Journal of Soil Contamination**. v. 6, n°5, p. 465-480, 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.

WANG, Q.; ZHANG, S.; LI, Y.; KLASSEN, W. Potential Approaches to Improving Biodegradation of Hydrocarbons for Bioremediation of Crude Oil Pollution. **Journal of Environmental Protection**. v.2, p.47-55, 2011.

WICK, L. Y.; REMER, R.; WÜRZ B.; REICHENBACH, J.; BRAUN, S.; SCHÄFER, F.; HARMS H. Effect of Fungal Hyphae on the Access of Bacteria to Phenanthrene in Soil. **Environmental Science Technology**. v. 41 n°2, p. 500–505. 2007.

WOO, S. H.; PARK, J. M. Evaluation of drum bioreactor performance used for decontamination of soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.74, p.937-944. 1999.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**. v.6, n°24, p. 2735-2739, 2007.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MC INERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. **Journal of Microbiological Methods**. v. 56, p. 339–347, 2004.

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. **Environment International**. v.31, p.149-154, 2005.

ZAHEDA, M. A.; AZIZA, H. A.; MOHAJERIA, L.; MOHAJERIA, S.; KUTTYB, S. R. M.; ISA, M. H. Application of statistical experimental methodology to optimize bioremediation of n-alkanes in aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, Volume 184, Issues 1–3, 15 December 2010, Pages 350–356.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**. vol. 10, p. 1–49, 1946.

ANEXO A – CÓPIA DO TRABALHO ENVIADO PARA O PERIÓDICO INTRNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION

TITLE: Diesel oil degradation by mixed microbial consortium isolated from a polluted environment

Débora de Souza Pereira Silva^{*1}; Erik Jonne Vieira de Melo¹; Patrícia Nazaré Ferreira dos Santos¹; Norma Buarque de Gusmão¹; Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa¹.

¹ Laboratory of Fermentative Processes, Department of Antibiotics, Biological Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, N°. 1235, Prof. Moraes Rego Avenue, Cidade Universitária, Pernambuco, Brazil

* Corresponding author. Laboratory of Fermentative Processes, Department of Antibiotics, Biological Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, No. 1235, Prof. Moraes Rego Avenue, Cidade Universitária, Pernambuco, Brazil. Tel./Fax: 55 (81) 2126-8346
E-mail address: cyberdebora@yahoo.com.br

Abstract

Cultures were selected to form a consortium, and were submitted to assays in flasks according to a complete factorial design 2³ in order to determine temperature, inoculum concentration and C:N ratio conditions more favorable to biodegradation, which were used later in the experiment conducted in a bioreactor. The micro-organisms with the greatest potentiality to degrade diesel oil, without developing antagonistic activity, were identified as *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800, *Serratia marcescens* UFPEDA 839, *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 and *Candida ernobii* UFPEDA 862, which formed a mixed microbial consortium, consisting of bacteria and yeasts. The C:N ratio and temperature were the factors that displayed significant effect on the bioprocess. The increased C:N ratio and the amount of inoculum yielded a positive effect while the increase of the temperature caused a negative effect on biodegradation. In the seven-day trial in a bioreactor was verified a increase of biomass, decrease in surface tension, reduction of all n-alkanes belonging to the range of C9 to C21 and decreased toxicity for vegetable seeds. The tested mixed microbial consortium present high ability to degrade diesel oil constituents and the maintenance of appropriate conditions leads to transformation of this oily source into less toxic compounds.

Keywords: Environmental pollution; Bioprospecting; Biostimulation; Bioreactor; Phytotoxicity.

1. Introduction

The need to remedy polluted areas has led to the development of new technologies aimed at contaminants detoxification, not only through physical or chemical methods but also by biological techniques. Bioremediation is a set of technologies for the treatment of contaminated sites by using biological systems to catalyze the destruction or the transformation of various pollutants into less harmful forms (Atlas and Unterman, 1999; Gouda et al., 2008).

It is known that there is no single microbial species with metabolic capacity to degrade all constituents of petrol-derivatives such as diesel oil, which requires therefore the action of microbial consortia since the biodegradation is biochemically very complex. Generally, there is the occurrence of co-metabolism in that some micro-organisms carry out the initial attack on the oil constituents, thus producing intermediate compounds that are subsequently assimilated by other microbial species (Ghazali et al., 2004).

Bioremediation can be developed in situ or ex situ (D'Annibale et al., 2006). One technique that can be applied in both conditions is biostimulation, which consists of adding nutrients to accelerate the degradation process (Baker and Herson, 1999). Among the technologies ex-situ the use of bioreactors shows as main advantage a greater control of physico-chemical conditions (pH, temperature, aeration, etc.) in order to enhance the micro-organisms activity (D'eziel et al., 1999).

Petrol-derivatives such as diesel oil are a complex mixture of hydrocarbons and their biodegradability depends on their bioavailability, which is directly related to composition, chain length, ramification and steric and electronic effects. As a rule, n-alkanes are more degradable than branched

alkanes; polycyclic aromatics hydrocarbons are less degradable than monocyclic aromatics (Alexander, 1994). Diesel oil is a medium distillate of petroleum containing: n-alkanes, branched alkanes, olefins and small concentrations of aromatic polycyclic compounds (Baker and Herson, 1999).

The Suape port terminal in the State of Pernambuco in Brazil is used by important distributors of Diesel oil. The study of the biodegradation of fuels oil by native microorganisms is of extreme ecological importance, as the nearby beaches are subject to contamination by pollutants coming from the port complex.

This work aims to study diesel oil degradation by micro-organisms in consortium, isolated from an environment polluted by petrol-derivatives located near the Port of Suape Industrial Complex, under different conditions of temperature, amount of inoculum and nitrogen aiming at application in the process of bioremediation of contaminated areas.

2. Materials and Methods

2.1 Characterization of the oily sample - The diesel oil sample used in this work were harvested from the tanks of the Suape Terminal, Pernambuco, Brazil, with the consent of the Brazilian Oil Company (Petrobras S.A.). Elemental analysis of carbon, hydrogen and nitrogen were performed carried out in the Petrobras oil company laboratories. Hydrocarbons identification was performed in a gas chromatograph utilizing a GC 5890 (Hewlett-Packard, series II) equipped with a flame ionization detector.

2.2 Microbial consortium selection - Eighty-six micro-organisms were isolated from samples polluted by petrol-derivatives which were collected from the Lagoa da Barra located near the Port of Suape Industrial Complex – Pernambuco, Brazil. The isolation was carried out after culturing in enriching medium utilizing the pour plate technique in solid Bushnell Haas mineral medium (Atlas 1995). Bacterial and fungal colonies were transferred to Tryptic Soy Agar and Sabouraud complex media, respectively. All strains of fungi and bacteria belongs to Culture Collection of the Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco. Initially, the micro-organisms were selected by the method of Hanson et al. (1993) to evaluate their potential for biodegradation of diesel oil. This method consists of incorporating in to the medium an electron acceptor such as 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP) to test the ability of the micro-organism to utilize the hydrocarbon substrate by observing the colour change of DCPIP from blue (oxidized) to colourless (reduced). Each well in a microtitre plate was filled with 250µL Büshnell Haas (BH) medium, 10µL of diesel oil and 25µL of each microbial suspension standardized at 108UFCmL⁻¹. For the formation of the consortium an antagonism test was carried out with the pre-selected micro-organisms in the oxidation-reduction test, utilizing the method by Bauer et al. (1966).

2.3 Identification of selected micro-organisms - The bacterial strains were identified based on the profile of fatty acid methyl esters by gas chromatography utilizing a GC 5890 (Hewlett-Packard, series II) equipped with a flame ionization detector, employing the MIDI microbial identification system. The yeasts were identified by their macroscopic, microscopic and physiological characteristics as described by Lodder (1970), Kreger-Van Rij (1984) and Barnett et al. (1990).

2.4 Acclimatation - Before being used in the biodegradability tests, the selected strains were initially submitted to acclimatation in Erlenmeyer flasks (500 mL) with the Bushnell Haas medium containing increasing concentrations (1%, 4%, 7% and 10% v v⁻¹) of diesel oil and inoculated by micro-organisms seeded in blocks of agar (8mm of diameter). The transfers occurred every 48 hours and the flasks were stored at 30 ± 1°C under agitation of 150 rpm.

2.5 Biodegradation assays in flasks – A complete factorial design with 3 factors and 2 levels (2³) was utilized to evaluated: concentration of nitrogen in the medium, in the form of NH₄NO₃ in order to obtain C:N ratios of 10:1 and of 90:1, the amount of inoculum (1 and 3 blocks of agar by micro-organism) and temperature (25°C and 35°C) and as center point, whose levels were selected through preliminary tests with the isolates, the following conditions: C:N ratio of 50:1, inoculum of 2 blocks of agar by micro-organism and temperature of 30°C. The percentage of total degradation of n-alkanes (C₉ to C₂₁) was the response variable chosen and the data were analyzed by the software Statistic 7.0. The assays were performed in Erlenmeyer flasks (500 mL) containing micro-organisms acclimated, 70% of Bushnell Haas medium and 10% diesel oil which were submitted to the agitation at 150 rpm for six days. During the assays, the determinations of pH (digital potentiometer Digimed ® model DM-21) and biomass (dry weight method) were performed and in the end of the trials, the biodegradation of n- alkanes of diesel oil was evaluated by chromatographic and spectrometric analysis in GC-MS, (Shimadzu TM Model 17A/QP5050A), using a VB-5 chromatographic column (5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane) of size 30m x 0.25mm x 0.25 µm.

The temperature was programmed to vary linearly from 40°C to 270°C at the rate of 10°C min⁻¹ and maintained for 22 min. Helium was the carrier gas and the interface temperature was 280°C. Injection of samples and control into a GC-MS system was carried out in triplicate. The highest resolution chromatographic peaks were scanned to find their corresponding mass-fragmentation profile. Compounds were characterized based on similarities between their mass spectrum and those presented by Wiley™ Compounds Library. Control peak-areas were used as a point of reference for the remaining compounds (100%) in the untreated system. Sample peak-areas were reported as a percentage of control peak-areas.

2.6 Experiment in a bioreactor - For this trial was used a bioreactor, model BioFlo 110 New Brunswick Company FS-5 with the maintenance of controls: pH (7.0), ratio of aeration (v v⁻¹m⁻¹) and agitation (300 rpm). The amount of inoculum, temperature and ratio of C: N for this assay were fixed from the best result obtained in the factorial design in flasks. At intervals of 24 h samples were taken for quantification of biomass (dry weight) of the mixed consortium, measurement of surface tension (digital tensiometer Sigma 70 - 500 LB model, brand KSV), production of emulsifier (Cooper and Goldenberg, 1987), and at the end of seven days, the gas chromatography analysis and toxicity test with bean seeds *Phaseolus vulgaris* L. and lettuce *Lactuca sativa* (Tiquia et al., 1996) were performed.

3 .Results and Discussion

3.1 Characteristics of the diesel oil sample

The preliminary analysis of total petroleum hydrocarbons (TPH) produced a profile of hydrocarbons varying from nC9 to nC36, with predominance of n-alkanes ranging from nC11 to nC17. Branched alkanes such as pristane and phytane were detected in trace levels. According to De Jong et al. (1997), acyclic hydrocarbons are more susceptible to biodegradation than the cyclic ones, and the straight-chain alkanes are generally more biodegradable than the branched alkanes. The elemental analysis of the diesel oil showed the following results: 85.9% (ww-1) of carbon, 13.1% (ww-1) of hydrogen and < 0,3% (ww-1) of nitrogen, demonstrating thus a content very low of nitrogen and due to this it is necessary the supplementation of nitrogen source to the effectiveness of the biodegradation process of hydrocarbons (Yu et al., 2005).

3.2 Microbial consortium selection

Amongst eighty-six micro-organisms tested by the redox indicator technique 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) in microtitre plates, only the strains UFPEDA 800, UFPEDA 839, UFPEDA 845 and UFPEDA 862 displayed the lowest reduction times of the indicator, causing the discoloration culture medium at 24h, 24h, 16h and 24h, respectively. The other strains caused the culture medium to become colourless after periods of 48 h (8% and 5%), 72 h (83% and 50%) in the fungal and bacterial strains, respectively, and 96h (40%) only in the bacterial strains. Hanson et al. (1993), using a microtitre plate to test the potential of five isolated strains of bacteria to degrade crude oil, verified that two isolates were selected, as they caused a change in the colour of the culture medium containing the DCPIP indicator after 12 hours of incubation, whilst the other isolates responded less quickly to the biological oxidation, showing a change in the DCPIP indicator only after 24 hours of incubation at 35°C. The formation of growth inhibition halos were not observed among the four selected micro-organisms, which indicates that they showed no antagonistic activity and are therefore grouped to form the consortium.

3.3 Identification of micro-organisms from consortium

The four selected micro-organisms to form the consortium consisted of two bacteria and two yeasts and were identified as *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800, *Serratia marcescens* UFPEDA 839, *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 and *Candida ernobii* UFPEDA 862, which were isolated from water of the lagoon, soil, polyurethane sponge and bagasse of sugar-cane, respectively. The latter two materials were found on the margins of the lagoon impregnated by petrol-derivatives and it is believe that these absorbent materials were used to clean the pond. According to Colla et al (2008), sites impacted by pollutants are a good source for obtaining micro-organisms for bioremediation studies of these same pollutants, since the contaminated site acts as a growth medium selective for these micro-organisms, making them adapted to this condition. In the literature, there are several published studies that demonstrate the potential of these species of microorganisms to degrade hydrocarbons from diesel oil (Bidaud and Tran-Minh, 1998; Wongs et al., 2004; Miranda et al. 2007; Rajasekar et al., 2007).

3.4 Biodegradation assays in flasks

Table 1 shows the chosen variables, the levels utilized and the matrix of the assays employed in the factorial design with the respective percentages of n-alkanes total degradation in diesel oil. It is appears

that the best condition for the fuel biodegradation was obtained in the trial 4, in which were utilized the levels (+ + -). This means that the biodegradation increases when the amount of inoculum and C: N ratio are in greater proportion in the medium and the temperature at its lowest level. The average initial microbial concentrations were as follows: *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800 ($0,0097 \pm 0,0008$ gL⁻¹), *Serratia marcescens* UFPEDA 839 ($0,0087 \pm 0,0007$ gL⁻¹), *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 ($0,0070 \pm 0,0003$ gL⁻¹) and *Candida ernobii* UFPEDA 862 ($0,0077 \pm 0,0007$ gL⁻¹).

Table 1 Variables and levels used in the complete factorial design 2³ with the respective percentages of n-alkanes total degradation in diesel oil obtained in each essay in flasks.

Variables	(-)	(0)	(+)
1 - Inoculum (block of inoculum by micro-organism)	1	2	3
2 - C:N ratio	10:1	50:1	90:1
3 - Temperature (°C)	25	30	35

Essay	Variable 1	Variable 2	Variable 3	Degradation total of n-alkanes (per cent)
01	-	-	-	38,47
02	+	-	-	61,12
03	-	+	-	62,23
04	+	+	-	68,12
05	-	-	+	43,36
06	+	-	+	26,94
07	-	+	+	55,12
08	+	+	+	49,26
09	0	0	0	42,35
10	0	0	0	47,53
11	0	0	0	43,02

Among the hydrocarbons investigated in diesel oil, 13 n-alkanes within the range of C9 to C21, were evaluated more accurately by the methodology utilized in the GC-MS. All these n-alkanes were partially degraded in the factorial design, as can be seen in Figure 1. The conditions utilized in essay 4 (3 blocks of inoculum per micro-organism, C:N ratio of 90:1 and temperature at 25°C) were the most favorable because the degradation percentage of each n-alkane analysis was above 60%. The hydrocarbons nonane and decane were the most degraded in almost all tests but the n-alkanes: undecane, dodecane, tridecane, tetradecane, pentadecane, hexadecane, heptadecane, octadecane, nonadecane, heicosane and heneicosane showed the highest percentage of degradation in the trials 2, 3 and 4.

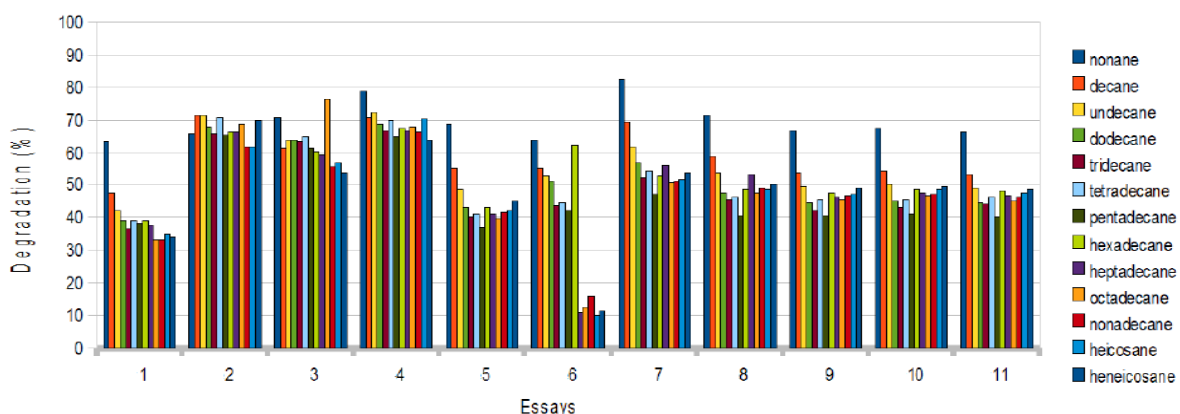


Figure 1 Degradation percentage of n-alkanes in diesel oil by mixed consortium from essays in flasks belonging to the factorial design 2³.

Among the various forms of analysis provided by the software Statistica 7.0, are the Pareto Diagram and Graphs Response Surface, which are the most used and enlightening. Figures 2 and 3 show the Pareto diagram and graphs response surface obtained by the factorial design 2³, representing the effects of each variable tested in the efficiency of biodegradation.

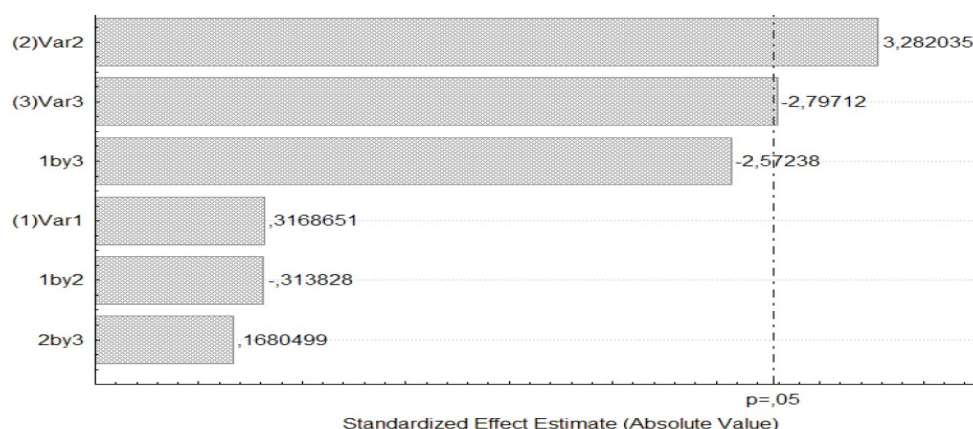


Figure 2 Pareto diagram, with a significance level of 95% ($p = 0.05$) for the factorial design 2^3 with the independent variables: (1) inoculum, (2) C:N ratio and (3) temperature

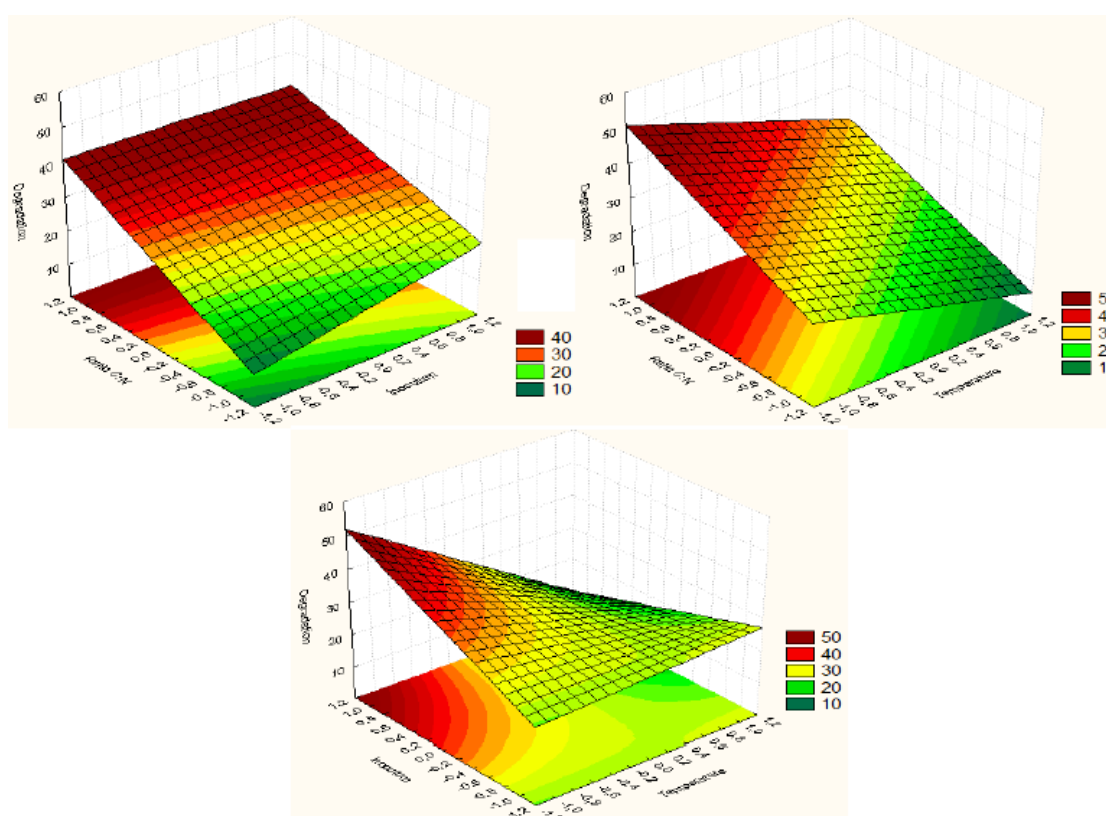


Figure 3 Graphs response surface showing the interactions between the variables: a) the C:N ratio / inoculum, b) C:N ratio / temperature and c) inoculum / temperature, obtained by the factorial design 2^3

Effects were considered statistically significant for a 95% level of confidence ($p = 0.05$), which is represented by the dashed line (Fig. 2). The C: N ratio was the independent variable that most influenced, statistically, the efficiency of diesel oil degradation by the consortium, and then the temperature, because this increase was damaging to biodegradation (negative effect), however the interaction between these two variables showed a positive effect, as shown in the Pareto diagram in the figure 2. Increasing the amount of inoculum as well as the C: N ratio caused a positive effect in the process of oil degradation by the consortium, although the interaction between these latter two variables was negative, as was also the interaction between inoculum and temperature. The effects of interactions between the variables were not statistically significant for a confidence level of 95% ($p = 0.05$).

Examining the graphs response surface, can be noted that best results are located in the darker red region of the surface (Fig. 3). It can be observed that the increase in the amount of inoculum and C: N

ratio provided an increase in the rate of biodegradation of oil. On the other hand, the decrease in temperature allowed an increase in the efficiency of biodegradation, in other words, the temperature must be maintained at its lowest level (25 °C) to promote biodegradation of the oil by the mixed consortium.

Biostimulation is a technique that can be applied in situ or ex situ bioremediation which consists of the addition of nutrients to accelerate the degradation process. A few studies show that correction in the nitrogen concentration may not produce favorable effects on bioremediation or may even represent an inhibitory factor when an excessive amount is added (Seklemova et al. 2001; Walwoth et al., 1997). Trindade (2002) using micro-organisms isolated from soil contaminated by oil verified inhibitory effect caused by content of nitrogen when used the C:N ratio of 10:1. Kwapisz et al. (2008), in studies of liquid culture containing NH_4NO_3 , showed that ammonium ions can cause suppression in the uptake of nitrate ions.

For a given increase or decrease in temperature, the magnitude of the response on the biodegradation varies with the environment and the type of pollutant, which is reflected in the physiology of the micro-organisms involved. Some authors suggest that the optimal temperature for hydrocarbons biodegradation is in the range between 15°C and 40°C (Chandran, 2011; Leahy and Colwell, 1990; Cooney, 1984; Bartha and Bossert, 1984).

The biodegradation process can be accelerated through the utilization of the bioaugmentation technique, which consists in increasing the number of micro-organisms capable of quickly degrading pollutants and this is satisfactorily achieved in assays conducted in bioreactors (Baker and Herson 1999).

Figure 4 shows the biomass and pH profiles of the biodegradation essays in flasks that make up the factorial design 2^3 . In general, the pH values remained at the range neutral to slightly acidic, between 7.0 and 5.7. According to Kumar et al. (2005) the acidity can be caused by the formation of acid byproducts resulting from the degradation process of hydrocarbons by micro-organisms and also by their excretion. In the most of essays, the consortium showed similar growth profiles with rapid initial growth, demonstrating that the microbial consortium was well adapted, after the biomass decrease probably due to depletion of some nutrients and then again another increase in the microbial concentration. The conditions employed in the essay 2 (3 blocks of inoculum by micro-organism, ratio C:N of 10:1 and temperature at 25°C) were the most appropriate to the consortium growth, resulting in the highest cell quantification (1, 87 g L⁻¹).

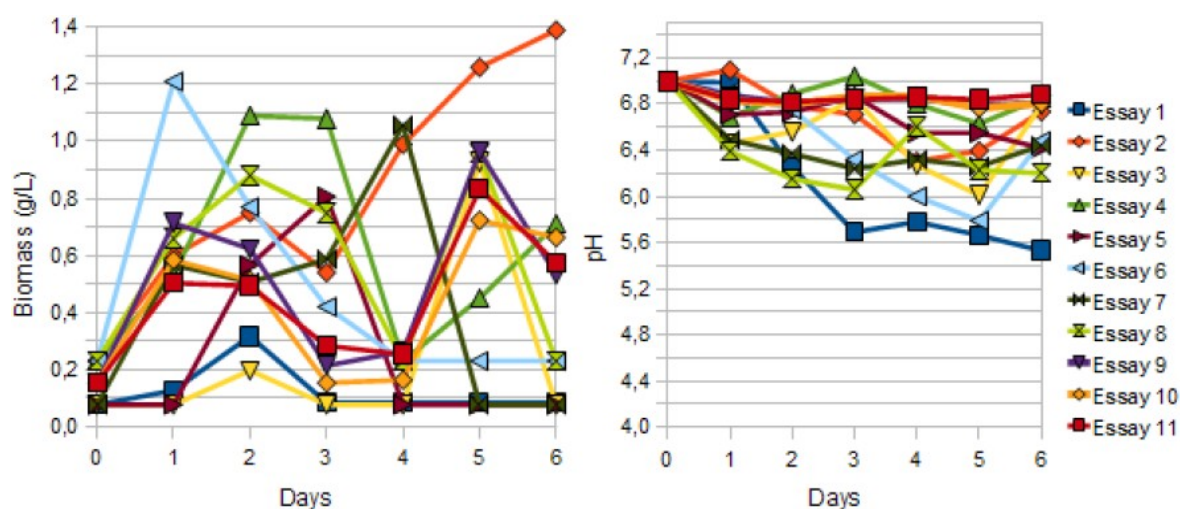


Figure 4 Biomass (a) and pH (b) profiles obtained of the essays in flasks, belonging to the factorial design 2^3 .

Although the essay 2 conditions were more favourable to microbial growth but the conditions of essay 4 were those employed in a bioreactor as promoted the highest percentage of total biodegradation of n-alkanes which are the majority constituents in the diesel oil.

3.5 Experiment in a bioreactor

In the assay conducted in a bioreactor the biomass of the consortium grew continuously until the last day of the experiment, as seen in figure 5. This result demonstrates that the conditions selected by the factorial design in flasks and the ones controlled in a bioreactor were favorable to biodegradation of 10% (v v⁻¹) of diesel oil by the mixed microbial consortium.

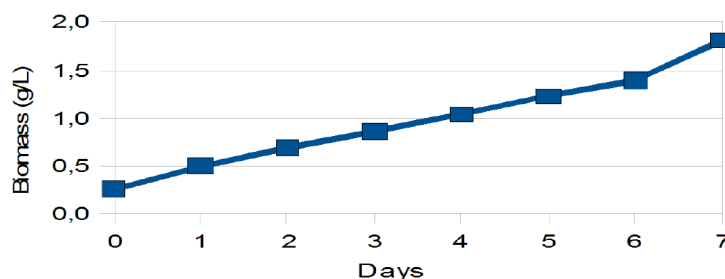


Figure 5 Biomass profile obtained during the experiment in a bioreactor with the mixed consortium submitted to 10% (v v-1) of diesel oil.

According to Rao et al. (2005) the microbial biomass cultured in bioreactor promotes the bioremediation of xenobiotics, which can be considered a direct indicator of the change of the original pollutant, when the micro-organism is cultured beforehand with the pollutant as unique carbon source. During the assay in a bioreactor, the surface tension of the medium in bioprocessing with diesel oil decreased from 43.6 mN m⁻¹ to 33.5 mN m⁻¹, as shown in Figure 6. Bio-surfactant activity can be measured by changes in tension, surface and interfacial and emulsification / stabilization of the emulsion. The microorganisms that are promising for the production of bio-surfactant are the ones that reduce surface tension to about 35 mN m⁻¹ (Desai and Banat, 1997).

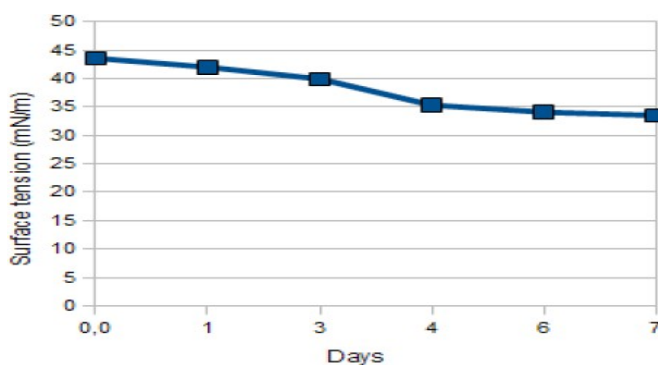


Figure 6 Surface tension profile obtained during the assay in a bioreactor with the mixed consortium submitted to 10% (v v-1) of diesel oil.

The material resulting from the biodegradation process in bioreactor showed no significant emulsification, indicating that no extracellular emulsifying activity occurred after the seven days of the experiment. In the literature, there are reports showing that the emulsifying activity depends on the affinity of the bio-surfactant with the substrate tested (Thanomsub et al. 2007; Urumea and Pekdemir, 2004). Plaza et al. (2006) conducted a study with sixteen species of bacteria isolated from soil contaminated with petroleum hydrocarbons for bio-surfactant / bio-emulsifiers production in liquid culture containing crude oil in thermophilic conditions, and it was found that although the surface tension reduction had been a good measure for bio-surfactant production, it was not correlated with the emulsification activity.

The consortium studied showed percentages of degradation higher in the experiment in bioreactor than the best result obtained in flasks (essay n° 4), as can be observed in figure 7, except only for tetradecane in which the percentages were similar (70%) in both culture conditions. It leads us to conclude that a greater control of the conditions in pH, agitation and aeration during the process in a bioreactor caused an increase in the biodegradation percentage and the mixed consortium completely degraded nonane, and partially of the following hydrocarbons: decane (96%), heneicosane (90%), heicosane (89%), undecane (86%), nonadecane (85%), octadecane (80%), heptadecane (77%), dodecane (76%), hexadecane (76%), tridecane (71%), tetradecane (70%) and pentadecane (69%).

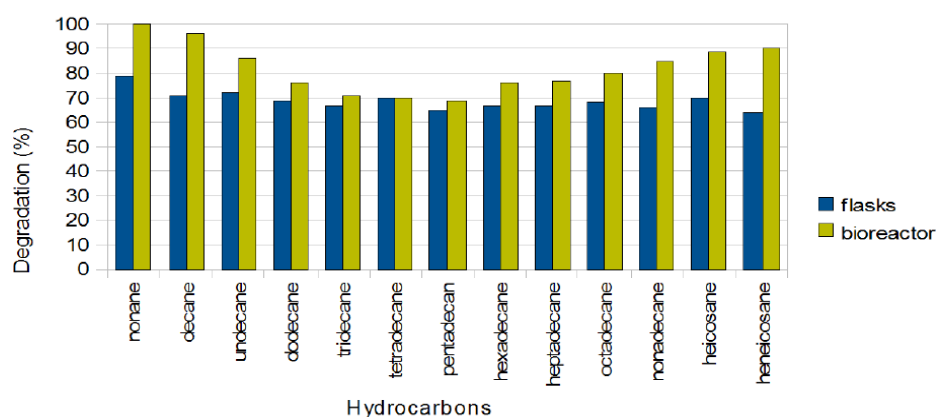


Figure 7 Degradation percentage of n-alkanes in diesel oil by mixed consortium after the bioreactor experiment and after the essay 4 in flasks

Compared with pure cultures, consortia made up of bacteria and fungi have been more effective in degrading hydrocarbons, due to a higher metabolic interaction (Boonchan et al., 2000; Kohlmeier et al., 2005; Wick et al., 2007). Li et al. (2009) using microbial consortia formed by five fungi: *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella* sp., *Alternaria alternate* (Fr.) Keissler, *Penicillium chrysogenum*, and *Aspergillus niger*; and three bacteria: *Bacillus* sp., *Zoogloea* sp., and *Flavobacterium*, all the microorganisms natives of contaminated soil, obtained hydrocarbon degradation rate of 41.3%, during incubation of 64 days. Richard and Vogel (1999), utilizing a bacterial consortium for the degradation of diesel oil, found that 90% of the hydrocarbons that make up the oil were degraded after 50 days of experiment.

According to Ogbo (2009) the diesel oil is phytotoxic to plants at relatively low concentrations. In the present study, the toxicity of a medium containing initially 10% (v v-1) of diesel oil, which was bioprocessed for seven days by mixed consortium in a bioreactor, was reduced in seeds of lettuce (*Lactuca sativa*) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.), as can be observed in table 2. Control plates containing 10% (v v-1) of diesel oil showed no germination in both tests, as was expected.

Table 2 Germination index obtained from the germination and root growth percentages of lettuce and bean seeds after exposure to diesel oil processed in bioreactor by consortium

Seeds	Root growth (%)	Germination (%)	Germination index
Lettuce	65	41	26
Bean	70	54	38

These results suggest that the compounds present in the biodegraded medium are potentially influent on roots development, therefore, in a medium with high concentration of phytotoxic substances, this development is slowed or even inhibited (Limbert and Betts, 1996). On the other hand, the decrease in water and oxygen absorption caused by seeds impermeability by oily source is one of the factors inhibiting of the germination (Guangjiu et al., 2007).

4. Conclusion

Amongst eighty-six micro-organisms tested only the microbial species *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 800, *Serratia marcescens* UFPEDA 839, *Rhodotorula aurantiaca* UFPEDA 845 and *Candida ernobii* UFPEDA 862 were selected to make up a mixed consortium as showed the greatest potential to degrade diesel oil and no antagonist activity. The factors that influenced significantly in the diesel oil degradation by the consortium were C:N ratio and temperature. The increased amount of inoculum and ratio C:N favored the degradation of diesel oil but the temperature increase negatively affected the biodegradation. The experiment carried out in a bioreactor allowed the degradation of n-alkanes, within the range of C9 to C21, to levels higher than 69%, from a concentration of 10% (v v-1) in diesel oil. The decrease in surface tension of the medium in bioprocessing suggests the bio-surfactant production, although no emulsifying activity has been shown. The material degraded by the mixed microbial consortium, after seven days in a bioreactor, produced no toxic compounds in concentrations sufficient to

prevent the germination and radicle elongation. This confirmed the occurrence of diesel oil partial detoxification by the action of the consortium, although the production of innocuous substances had not been achieved in the meantime. Thus, the mixed microbial consortium studied exhibits potentiality for utilization in bioremediation processes of environments polluted by diesel oil and the maintenance of appropriate conditions promote the transformation of the oily source into less toxic compounds.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Financier of Studies and Projects of Ministry of Science and Technology of Brazil for their support for the benefit of the present study.

References

- Alexander, M. Getting rid of wastes biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego, CA (United States), 302 p.
- Atlas, R.M. and R. Unterman, 1999. Bioremediation. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Demain, A.L. and J.E. Davies (Eds.). Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC., pp: 666-681.
- Atlas, R.M., 1995. Bioremediation. Chem. Eng. News, 73: 32-42.
- Baker K.H.; Herson D.S., 1999. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. Water Environment Research 71, 530-551.
- Barnett, J.A.; Payne, R. W.; Yarrow, D., 1990. Yeast characteristics and identification. 2° ed. Cambridge: University Press, Cambridge, 1200 p.
- Bartha, R.; Bossert, I., 1984. The treatment and disposal of petroleum wastes, in Petroleum Microbiology, R. M. Atlas, p. 553–578.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 45, 493-496.
- Bidaud, C.; Tran-Minh, C., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation in the soil of a former gasworks site: selection and study of PAHs-degrading microorganisms. Journal of Molecular Catalysis bi Enzymatic 5, 417-421.
- Boonchan, S.; Britz, M.L.; Stanley, G.A., 2000. Degradation and mineralisation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Applied and Environmental Microbiology 66, 10.
- Colla I.M.; Muccillo-Baisch, A.L.; Costa, J.A.V., 2008. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in Rabbits Fed with a hypercholesterolemic diet. Brazilian Archives of Biology and Technology 51, 405-411.
- Cooney, J. J., 1984. The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. In Petroleum Microbiology (R. M. Atlas, ed.) : 400-433. Macmillan, New York.
- Cooper D.G. and Goldenberg B.G., 1987. Surface –active gents from two *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology 53, 224-229.
- D'annibale, A.; Rosetto, F.; Leonardi, V.; Federici, F.; Petruccioli M., 2006. Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology 72, 28–36.

- Desai, J. D.; Banat, I. M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 47-64.
- De Jonge, H., Freijer, J.I., Verstraten, J.M., Westerveld, J., van der Wielen, F.W.M., 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environmental Science and Technology* 31, 771-775.
- Ghazali, F.M.; Rahman, R.N.Z.A.; Salleh, A.B.; Basri, M., 2004. Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 61-67.
- Gouda, M.K.; Omar, S.H.; Aouad, L.M., 2008. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1703-1711.
- Guangqiu, Q., Chongling, Y., Haoliang, L., 2007. Influence of heavy metals on the carbohydrate and phenolics in mangrove, *Aegiceras corniculatum* L., seedlings. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 440-444.
- Hanson, K.G.; Desai, J.D.; Desai, A.J., 1993. A Rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques* 7, 745-748.
- Kohlmeier, S.; Smits, T.H.M.; Ford, R.; Keel, C.; Harms, H.; Wick, L.Y., 2005. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant degrading bacteria by fungi. *Environmental Science and Technology* 39, 4640-4646.
- Kreger-van Rij, N.J.W., 1984. *The yeasts: a taxonomic study*, 3rd ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1082 p.
- Kumar, A.; Kumar, S.; Kumar, S., 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal* 22, 151-159.
- Kwapisz E.; Wszelaka J.; Marchut O.; Bielecki S., 2008. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7. *International Biodeterioration and Biodegradation* 61, 214-222.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305-315.
- Li J, Zhang L, Wu Y, Liu Y, Zhou P, Wen S, et al. 2009. A national survey of polychlorinated dioxins, furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) in human milk in China. *Chemosphere* 75, 1236-1242.
- Limbert, E.S., Betts, W.B., 1996. Influences of substrate chemistry and microbial metabolic diversity on the bioremediation of xenobiotic contamination. *Genetic Engineering and Biotechnologist* 16, 159-180.
- Lodder, J., 1970. General Classification of the yeasts. In: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 2nd edn. (Ed.): J. Lodder, pp. 1-33. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Miranda, R.C.; Souza, C.S.; Gomes, E.B.G.; Lovaglio, R.B.; Lopes, C.E.; Sousa, M.F.V.Q., 2007. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape port in the state of Pernambuco - Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50, 147-152.
- Ogbo, E.M., 2009. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology* 8, 250-253.
- Plaza, G.A.; Zjawiony, I.; Banat, I.M., 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 50, 71-77.

Rajasekar, A.; Babu, T.G.; Pandian, S.T.K.; Maruthamuthu, S.; Palaniswamy, N.; Rajendran, A., 2007. Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34, 589-598.

Rao, K.R.; Rashmi, K.; Latha, J.N.L.; Mohan, P.M., 2005. Bioremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waste. *Indian Journal of Biotechnology* 4, 139-143.

Richard, J.Y.; Vogel, T.M., 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration Biodegradation* 44, 93-100.

Seklemova, E.; Pavlova, A.; Kovacheva, K., 2001. Biostimulation based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation* 12, 311-316.

Thanomsub, B.; Pumeechockchai W.; Limtrakul, A.; Arunrattiyakorn, P.; Petchleelaha, W.; Nitoda, T.; Kanzaki, H., 2007. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. *Bioresource Technology* 98, 1149-1153.

Tiquia, S.M.; N.F.; Hodgkiss, I.J., 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution* 93, 249-256.

Trindade, P.V.O., 2002. Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. In: 9th International Petroleum Environmental Conference.

Urumea, K.; Pekdemir, T.; Copur, M., 2004. Surfactants treatment of crude contaminated soils. *Journal of Colloid and Interface Science* 276, 456-464.

Walworth, J.L.; Woolard, C.R.; Braddock, J.F.; Reynolds, C.M., 1997. Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: An approach to determining optimum levels. *Journal of Soil Contamination*, 6, 465-480.

Wick, L.Y.; Remer, R.; Würz, B.; Reichenbach, J.; Braun, S.; Schäfer, F.; Harms, H., 2007. Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. *Environmental Science and Technology* 41, 500-505.

Wongsa, P.; Tanaka, M.; Ueno A.; Hasanuzzaman M.; Yumoto I.; Okuyama, H., 2004. Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. *Current Microbiology* 49, 415-422.

Yu, S.H.; Ke, L.; Wong, Y.S.; Tam, N.F.Y., 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International* 31, 149-154.

**ANEXO B – CÓPIA DO RECEBIMENTO DO ENVIO DO TRABALHO PARA O
PERIÓDICO INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION**

Assunto: Submission Confirmation
De: IBB (eicibb@hotmail.com)
Para: cyberdebora@yahoo.com.br;
Data: Terça-feira, 17 de Janeiro de 2012 12:28

Dear Mrs. Débora de Souza Pereira Silva,

Your submission entitled "Diesel oil degradation by mixed microbial consortium isolated from a polluted environment" has been received by International Biodeterioration & Biodegradation

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ibb/>.

Your username is: Silva, D.S.P.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/ibb/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
International Biodeterioration & Biodegradation

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.