

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**BIORREMEDIAÇÃO DE BORRA OLEOSA PROVENIENTE DE
INDÚSTRIA PETROQUÍMICA EM MICROCOSMOS**

TESE DE DOUTORADO

Vanessa Sacramento Cerqueira

Orientador: Dr^a. Fátima Menezes Bento

Porto Alegre, RS, Brasil.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**BIORREMEDIAÇÃO DE BORRA OLEOSA PROVENIENTE DE
INDÚSTRIA PETROQUÍMICA EM MICROCOSMOS**

Vanessa Sacramento Cerqueira
Engenheira de Alimentos – FURG
Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG

Orientador: Fátima Menezes Bento

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na área de concentração
Microbiologia do Ambiente

Porto Alegre, RS, Brasil
Junho, 2011.

“Eu pedi força ... e Deus me deu dificuldades para me fazer forte.

Eu pedi sabedoria ... e Deus me deu problemas para resolver.

Eu pedi prosperidade ... e Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar.

Eu pedi coragem ... e Deus me deu perigo para superar.

Eu pedi amor ... e Deus me deu pessoas com problemas para ajudar.

Eu pedi favores ... e Deus me deu oportunidades.

Eu não recebi nada do que pedi ... mas eu recebi tudo o que precisava”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Fátima Menezes Bento, pelo exemplo profissional e pessoal, pelo incentivo e confiança. A você minha eterna amizade e admiração.

Ao Prof. Flávio Camargo, pelos ensinamentos e experiência docente durante o doutorado.

Ao meu bolsista Emanuel Hollenbach, pela grande contribuição ao trabalho, pela amizade, compreensão e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao responsável pelo Sicecors Sr. Nestor, pela disponibilidade de coleta de amostras e pelas informações sempre que precisei.

À Prof. Maria do Carmo Peralba, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

À técnica Simone Barrionuevo, pelo auxílio e ensinamentos transmitidos. Ao pessoal do lab de química ambiental, também agradeço.

À Prof. Marilene Vainstein pela oportunidade de trabalhar na identificação molecular.

À Franciele Maboni pelos grandes ensinamentos na área molecular e amizade.

Ao Prof. Marino Tedesco, pelos ensinamentos na área de fertilidade de solos.

Ao meu pai João e minha mãe Nilza, pelo carinho, amor, apoio e zelo em todos os momentos da minha vida. Amo vocês!

Ao meu irmão Vinícius, pela enorme compreensão, amizade, incentivo, zelo e apoio sempre.

Ao meu noivo Renato, pela incondicionável dedicação em me ajudar seeempre, pelo companheirismo, compreensão, amor, amizade, incentivo e paciência.

Aos colegas e amigos do Lab de Biorremediação, pelos momentos de alegria e descontração e experiências compartilhadas.

Ao pessoal todo do prédio do lab, pelos favores prestados e pelos momentos agradáveis compartilhados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pelos ensinamentos adquiridos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

BIORREMEDIAÇÃO DE BORRA OLEOSA PROVENIENTE DE INDÚSTRIA PETROQUÍMICA EM MICROCOSMOS¹

Autor: Vanessa Sacramento Cerqueira

Orientador: Prof^a. Dr^a. Fátima Menezes Bento

RESUMO

As refinarias e indústrias petroquímicas geram inevitavelmente consideráveis volumes de borra oleosa durante o seu processamento. Devido à composição complexa de hidrocarbonetos, este resíduo deve ser considerado com potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico. Tecnologias de biorremediação para o tratamento deste importante contaminante ambiental mostram-se promissoras e atrativas do ponto de vista político, econômico e social. Em vista disto, o presente trabalho teve por objetivo isolar, identificar e selecionar bactérias com potencial de biodegradação de borra oleosa e avaliar sua capacidade de biodegradação de resíduos petroquímicos presentes em solos com e sem histórico de contaminação. Foi estudada a eficiência de biorremediação em solos impactados contendo diferentes níveis de contaminação e mantidos em sistema aberto e fechado. Foram isoladas 45 bactérias, sendo 21 provenientes de solo de *Landfarming*, 11 de efluentes petroquímicos e 13 diretamente da borra oleosa. Destas, cinco bactérias, identificadas com base no seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA como *Stenotrophomonas acidaminiphila* BB5, *Bacillus megaterium* BB6, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* BS20 foram selecionadas e utilizadas na formulação do consórcio microbiano. Estudos conduzidos em meio mineral durante 40 dias, mostraram que o consórcio mostrou excelente capacidade de degradação da borra oleosa, reduzindo 90,7% da fração alifática e 51,8% da fração aromática. Dentre os solos analisados, o *Landfarming* mostrou maior potencialidade no tratamento de borra oleosa, alcançando máximos de 74,9% na bioestimulação e 74,3%, na bioaumentação, após 90 dias de processo. A avaliação com solos contaminados com 6% de borra oleosa, monitorados durante 120 dias em sistema fechado exibiram taxas promissoras de biodegradação com as estratégias de bioestimulação (84,1%) e bioaumentação (81,3%). O consórcio mostrou capacidade de biorremediação de borra oleosa em meio líquido e em solos. Os resultados indicaram o potencial de aplicação do consórcio bacteriano no sistema de tratamento de efluentes com intuito de reduzir a carga poluidora enviada às células de *Landfarming*, contribuindo assim, na redução de passivos ambientais e no aumento de rendimentos dos processos industriais.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (196p.) Junho, 2011.

BIOREMEDIATION OF OILY SLUDGE FROM PETROCHEMICAL INDUSTRY IN MICROCOSMS¹

Author: Vanessa Sacramento Cerqueira

Advisor: Prof. Dr. Fátima Menezes Bento

ABSTRACT

Refineries and petrochemical industries inevitably generate considerable volumes of oily sludge during processing. Due to the complex composition of hydrocarbons, this sludge must be considered as a residue toxic, mutagenic and carcinogenic. Bioremediation technologies for the treatment of this important environmental contaminant show to be promising and politically, economically and socially attractive. The goal of this study was to isolate, identify and select bacteria with potential for biodegradation of oily sludge and evaluate its ability for biodegradation of petrochemical residues in soils with and without a historic contamination. We studied the efficiency of bioremediation in impacted soils containing different levels of contamination with an open and closed systems. Forty-five bacteria strains were isolated, 21 from soil *Landfarming*, 11 from petrochemical effluent and 13 directly from the oily sludge. Of these, five bacteria, identified based on partial sequencing of the 16S rRNA gene as *Stenotrophomonas acidaminiphila* BB5, *Bacillus megaterium* BB6, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* BS20 were selected and used in the microbial consortium formulation. Evaluation in mineral medium for 40 days with consortium selected showed degradation of oily sludge, reducing 90.7% and 51.8% aliphatic and aromatic fraction, respectively. Among the examined soils, the *Landfarming* showed greater potential in the treatment of oily sludge, reaching maximum of 74.9% and 74.3% in biostimulation and bioaugmentation respectively, after 90 days of the process. The evaluation of contaminated soils with 6% of oily sludge, monitored for 120 days in a closed system, exhibited promising rates of biodegradation with biostimulation (84.1%) and bioaugmentation (81.3%) strategies. The consortium selected was effective on bioremediation of oily sludge in a liquid medium and soil. The results indicated the potential of the bacterial consortium in the wastewater treatment system in order to reduce the pollutant load sent to the *Landfarming area*, thus, reducing environmental passives and increased efficiency from industrial processes.

¹Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (196p.) June, 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 O petróleo e o setor petroquímico	7
2.2 Gerenciamento de resíduos da indústria química do petróleo: exemplo Pólo Petroquímico/RS.....	8
2.3 Borra oleosa	10
2.4 Biorremediação: alternativa para o tratamento de resíduos oleosos.....	12
2.4.1 <i>Landfarming</i>	17
2.5 Degradação microbiana de hidrocarbonetos.....	24
2.5.1 Interações solo - hidrocarboneto	25
2.5.2 Interações microrganismo - hidrocarboneto.....	26
2.5.3 Microrganismos envolvidos	28
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO II- BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO	
RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Coleta das amostras	41
2.2 Caracterização das amostras	42
2.3 Isolamento de microrganismos	42
2.4 Avaliação preliminar da capacidade degradativa	43
2.4.1 Preparo do pré-inóculo bacteriano.....	43
2.4.2 Avaliação da capacidade degradativa utilizando indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).....	44

2.5 Avaliação da produção de biomassa celular, biossurfactantes e detecção de enzimas	45
2.5.1 Determinação da biomassa bacteriana	45
2.5.2 Avaliação da produção de biossurfactantes	46
2.5.3 Atividades enzimáticas	47
2.5.4 Determinação do ph e condutividade	49
2.6 Avaliação da tolerância dos microrganismos selecionados em diferentes concentrações de borra oleosa.....	49
2.7 Identificação dos isolados bacterianos.....	49
2.8 Análise estatística.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1 Isolamento bacteriano.....	51
3.2 Seleção preliminar de degradadores de hidrocarbonetos	52
3.3 Avaliação do crescimento celular, produção de biossurfactantes e detecção de enzimas	60
3.4 Produção de biossurfactantes e detecção de enzimas	62
3.5 Avaliação da capacidade degradativa em diferentes concentrações de borra oleosa.....	70
3.6 Efeito da adição de glicerol como co-substrato no crescimento e produção de biossurfactantes em meio de cultivo contendo borra oleosa	71
4. CONCLUSÕES	78
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CAPÍTULO III- BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA PETROQUÍMICA POR CULTURAS PURAS E MISTAS	
RESUMO	86
1. INTRODUÇÃO.....	87
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1 Coleta das amostras.....	89
2.2 Isolamento bacteriano.....	89
2.3 Identificação bacteriana	90
2.4 Preparo do inóculo.....	90
2.5 Biodegradação de borra oleosa em meio líquido	90
2.6 Análises	91
2.6.1 Avaliação do crescimento bacteriano	91

2.6.2 Medida da atividade microbiana	92
2.6.3 Avaliação da produção de biossurfactantes	92
2.6.4 Avaliação do ph.....	93
2.6.5 Avaliação da biodegradação	93
2.7 Análise estatística	94
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
3.1 Identificação bacteriana	95
3.2 Crescimento microbiano	97
3.3 Medida da atividade microbiana (CO ₂) e medida de ph	99
3.4 Produção de biossurfactantes.....	103
3.5 Degradação da borra oleosa.....	106
4 . CONCLUSÃO	113
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
CAPITULO IV- POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA EM SOLOS ATRAVÉS DE ATENUAÇÃO NATURAL, BIOESTIMULAÇÃO E BIOAUMENTAÇÃO	
RESUMO	120
1. INTRODUÇÃO.....	121
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	123
2.1 Coleta das amostras	123
2.2 Experimentos de biorremediação.....	124
2.3 Preparo do consórcio microbiano.....	125
2.4 Montagem dos experimentos.....	125
2.5 Análises no solo.....	126
2.5.1 Contagem de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e heterotróficos totais.....	126
2.5.2 Atividade respiratória.....	127
2.5.3 Análises de Hidrocarbonetos totais de petróleo.....	128
2.5.4 Análise estatística	128
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	129
3.1 Avaliação do crescimento microbiano	129
3.2 Atividade microbiana.....	133
3.3 Degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo	138

4. CONCLUSÃO	143
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
CAPÍTULO V- COMPARAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS IMPACTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BORRA OLEOSA E SOB DIFERENTES SISTEMAS	
RESUMO	149
1. INTRODUÇÃO	150
2. MATERIAL E MÉTODOS	152
2.1 Coleta das amostras	152
2.2 Experimentos de Biorremediação	152
2.3 Preparo do inóculo bacteriano	153
2.4 Montagem dos experimentos	153
2.5 Análises no solo	154
2.5.1 Contagem de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e heterotróficos totais	154
2.5.2 Atividade respiratória	155
2.5.3 Análises de Hidrocarbonetos totais de petróleo	156
2.5.4 Análise estatística	156
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	156
3.1 Avaliação do crescimento microbiano	156
3.2 Atividade respiratória microbiana	160
3.3 Degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo	165
3.4 Comportamento da atividade microbiana x taxas de degradação	169
4. CONCLUSÃO	173
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	174
CAPÍTULO VI- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	
DISCUSSÃO GERAL	178
CONCLUSÕES GERAIS	185
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	187
ANEXOS	188
Vita	196

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II- BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO

Tabela 1: Identificação das bactérias isoladas de borra oleosa (BB), solo *Landfarming* (BS) e efluente orgânico (BE).....57

Tabela 2: Hidrofobicidade celular em relação à querosene e octano através do método da medida da aderência microbiana a hidrocarbonetos (BATH) e através do método de Agregação Salina (SAT) e medida da atividade emulsificante (AE) na ausência (ac) e presença (pc) de células aos 14 dias de experimento e valores de mínima tensão superficial (TS) durante os 14 dias.64

Tabela 3: Resultados de pH, condutividade elétrica, atividades da catecol 1,2 dioxigenase (C12DO), catecol 2,3 dioxigenase (C2,3DO), protococatecol (P34DO) e alcanos hidroxilase (AlcH) após 14 dias de cultivo dos isolados em meio mineral contendo 1% de borra oleosa. nd: não detectado. C.(Bo)= Controle borra.....68

Tabela 4: Avaliação da tolerância dos microrganismos selecionados em diferentes concentrações de borra oleosa ao longo de 14 dias de processo.71

Tabela 5: Resultados de tensão superficial (TS) mínima durante 14 dias e atividade emulsificante (AE) aos 14 dias de cultivo em meio mineral mínimo. G+B= cultivo em glicerol e borra oleosa. G= cultivo em glicerol75

CAPÍTULO III- BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA PETROQUÍMICA POR CULTURAS PURAS E MISTAS

Tabela 1: Identificação de bactérias isoladas de solo *Landfarming* e borra oleosa petroquímica.95

Tabela 2: Produção acumulada de gás carbônico e medida do pH para os diferentes isolados e consórcio microbiano aos 40 dias de cultivo.....102

Tabela 3: Valores de Tensão superficial (TS), atividade emulsificante na ausência (AEac) e presença (AEpc) de células bacterianas obtidos em 40 dias de cultivo.104

Tabela 4: Degradação da fração alifática e aromática da borra oleosa para os diferentes isolados e consórcio microbiano.106

CAPÍTULO IV- POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA EM SOLOS ATRAVÉS DE ATENUAÇÃO NATURAL, BIOESTIMULAÇÃO E BIOAUMENTAÇÃO

Tabela 1: Análises químicas dos solos *Landfarming* e Nativo e da borra oleosa.124

Tabela 2: Percentual de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) ao final de 90 dias de experimento em solo *Landfarming* e solo Nativo.138

CAPÍTULO V- COMPARAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS IMPACTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BORRA OLEOSA E SOB DIFERENTES SISTEMAS

Tabela 1: Produção acumulada de C-CO₂ em solos contaminados com 1,5 e 6,0% em sistema fechado (F).....162

Tabela 2: Degradação de TPH (%) obtido nos diferentes tratamentos aplicados aos solos contaminados com 1,5 e 6,0% em sistema aberto (A) e fechado (F).166

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1:** Compostos orgânicos representativos encontrados na borra oleosa.....11
- Figura 2:** Células de *Landfarming*. (a) Recente aplicação de borra oleosa; (b) após 2 semanas de realização de revolvimento do solo (c) Sob aplicação de gradagem.18
- Figura 3:** Tensão superficial, tensão interfacial e solubilização em função da concentração de surfactante.24
- Figura 4:** Comportamento da matéria orgânica no solo26
- Figura 5:** Formas de incorporação do poluente mediado por surfactantes.28
- Figura 6:** Degradação de alcanos. 1- n-alcanos monoxigenases. 2- álcool desidrogenase. 3- aldeído desidrogenase.....30
- Figura 7:** Degradação de hidrocarbonetos aromáticos31

CAPÍTULO II- BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO

- Figura 1:** Porcentagem de bactérias degradadoras de diferentes fontes de carbono nas concentrações de 1% e 3% utilizando o indicador TTC em diferentes condições de preparo de inóculo. A: sem e B: com etapa prévia de esgotamento das reservas. 1: isolados do solo *Landfarming*, 2: isolados do efluente, 3: isolados da borra oleosa. ■ 18-48h. ■ 72-96h. ■ 120-144h. Diesel A.: diesel aditivado.53
- Figura 2:** Curvas de crescimento bacteriano de 20 isolados cultivados em borra oleosa. (a) Isolados da borra oleosa + *P. nitroreducens*, ◆*C. testosteroni*, ■ *O. haemophilum*, ● *S. acidaminiphila* BB5, ▲ *B. megaterium* BB6, ▼ *B. cibi*, ► *B. thuringiensis* BB8, ⊕ *B. subtilis*, ○ *C. normanense*, △ *S. saprophyticus*, ▷ *S. acidaminiphila* BB12. (b) Isolados do solo e efluente + *B. cereus* BE2, ◆ *S. multivorum*, ■ *S. maltophilia* BE11, ● *B. cereus* BS5, ▲ *S. maltophilia* BS10, ▼ *P. aeruginosa*, ► *B. megaterium* BS18, ⊕ *B. cereus* BS20, ○ *B. thuringiensis* BS21. Controles: Borra 0,002 mg.mL⁻¹.61
- Figura 3:** Curvas de crescimento bacteriano de 20 isolados. Isolados da borra oleosa (a) cultivo em glicerol e borra oleosa, (b) cultivo em glicerol. *P. nitroreducens*, ◆*C. testosteroni*, ■ *O. haemophilum*, ● *S. acidaminiphila* BB5, ▲ *B. megaterium* BB6, ▼ *B. cibi*, ► *B. thuringiensis* BB8, ⊕ *B. subtilis*, ○ *C. normanense*, △ *S. saprophyticus*, ▷ *S. acidaminiphila* BB12. Isolados do solo e efluente (c) cultivo em glicerol e borra oleosa, (d) cultivo em glicerol. + *B. cereus* BE2, ◆ *S. multivorum*, ■ *S. maltophilia* BE11, ● *B. cereus* BS5, ▲ *S. maltophilia* BS10, ▼ *P. aeruginosa*, ► *B. megaterium* BS18, ⊕ *B. cereus* BS20, ○ *B. thuringiensis* BS21. Controles: glicerol: 0,001 mg.mL⁻¹ e glicerol e borra oleosa: 0,002 mg.mL⁻¹73

CAPÍTULO III- BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA PETROQUÍMICA POR CULTURAS PURAS E MISTAS

Figura 1: Estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais ao longo de 40 dias de experimento. (a) Bactérias isoladas da borra oleosa + BB5, ◆ BB6 ■ BB7. (b) Bactérias isoladas do solo *Landfarming* e Consórcio bacteriano + BS11, ◆ BS20, ■ Consórcio bacteriano.....98

Figura 2: (a) Produção de CO₂ (mg) e (b) Produção acumulada de CO₂ (mg) durante 40 dias de cultivo. + Controle, ◆ *S.acidaminiphila* BB5, ■ *B. megaterium* BB6, ● *B. cibi*, △ *P. aeruginosa*, ○ *B. cereus*, □ Consórcio bacteriano. 100

Figura 3: Perfil cromatográfico da fração saturada da borra oleosa no tempo inicial de processo para o ensaio com o consórcio microbiano. 107

Figura 4: Perfil cromatográfico da degradação da fração saturada da borra oleosa no tempo final de processo para o ensaio com o consórcio microbiano. 107

Figura 5: Perfil cromatográfico da fração aromática da borra oleosa no tempo inicial de processo para o ensaio com o consórcio microbiano. 108

Figura 6: Perfil cromatográfico da degradação da fração aromática da borra oleosa no tempo final de processo para o ensaio com o consórcio microbiano. 108

CAPITULO IV- POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA EM SOLOS ATRAVÉS DE ATENUAÇÃO NATURAL, BIOESTIMULAÇÃO E BIOAUMENTAÇÃO

Figura 1: Estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais (log NMP/g de solo) presentes nos solos contaminados com borra oleosa ao longo de 90 dias de experimento. (a) solo *Landfarming*. (b) solo Nativo. + Controle, ◆ Atenuação Natural, ■ Bioestimulação BEN+P+, ● Bioaumentação BAN+P+, △ Bioestimulação BEN-P-, ○ Bioaumentação BAN-P-. 130

Figura 2: Estimativa do número de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (log NMP/g de solo) presentes nos solos contaminados com borra oleosa ao longo de 90 dias de experimento. (a) solo *Landfarming*. (b) solo Nativo. + Controle, ◆ Atenuação Natural, ■ Bioestimulação BEN+P+, ● Bioaumentação BAN+P+, △ Bioestimulação BEN-P-, ○ Bioaumentação BAN-P-. 131

Figura 3: Produção diária de C-CO₂ (mg/Kg de solo) ao longo de 90 dias para os ensaios realizados com: (a) solo *Landfarming*. (b) solo Nativo. + Controle, ◆ Atenuação Natural, ■ Bioestimulação BEN+P+, ● Bioaumentação BAN+P+, △ Bioestimulação BEN-P-, ○ Bioaumentação BAN-P-. 134

Figura 4: Produção acumulada de C-CO₂ (mg/Kg de solo) ao longo de 90 dias para os ensaios realizados com: (a) solo *Landfarming*. (b) solo Nativo. + Controle, ◆ Atenuação Natural, ■ Bioestimulação BEN+P+, ● Bioaumentação BAN+P+, △ Bioestimulação BEN-P-, ○ Bioaumentação BAN-P-. 135

Figura 5: Valores de degradação das frações GRO (C6-C10) e DRO (C10-C28) nos diferentes tratamentos nos solos *Landfarming* e Nativo. As letras L e N na frente da

sigla do tratamento indicam solo *Landfarming* e solo Nativo, respectivamente. ■ GRO, ▨DRO..... 139

CAPÍTULO V- COMPARAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS IMPACTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BORRA OLEOSA E SOB DIFERENTES SISTEMAS

Figura 1: Estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais (log NMP/g de solo) ao longo de 90 dias em solos contaminados com (a) 1,5% e (b) 6% em sistema aberto. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaugmentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaugmentação BA(N-P-). 157

Figura 2: Estimativa do número de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (NMP/g de solo) ao longo de 90 dias em solos contaminados com (a) 1,5% e (b) 6% em sistema aberto. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaugmentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaugmentação BA(N-P-). 157

Figura 3: Estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais (log NMP/g de solo) ao longo de 90 dias em solos contaminados com (a) 1,5% e (b) 6% em sistema fechado. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaugmentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaugmentação BA(N-P-). 158

Figura 4: Estimativa do número de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (log NMP/g de solo) ao longo de 90 dias em solos contaminados com (a) 1,5% e (b) 6% em sistema fechado. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaugmentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaugmentação BA(N-P-). 158

Figura 5: Produção diária de C-CO₂ (mg/Kg de solo) ao longo de 90 dias para os ensaios em sistema fechado contaminados com (a) 1,5% (b) 6,0% . + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaugmentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaugmentação BE(N-P-). 161

Figura 6: Produção acumulada de C-CO₂ (mg/Kg de solo) ao longo de 90 dias para os ensaios em sistema fechado contaminados com (a) 1,5% (b) 6,0% . + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaugmentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaugmentação BE(N-P-). 161

LISTA DE ABREVIATURAS

AN	Atenuação Natural
ANP	Agência Nacional do Petróleo
AEac	Atividade emulsificante na ausência de células
AEpc	Atividade emulsificante na presença de células
BATH	Medida da aderência bacteriana a hidrocarbonetos
BB	Bactérias isoladas de borra oleosa
BE	Bactérias isoladas de efluente
BEN-P-	Bioestimulação usando nutrientes em menor quantidade
BAN-P-	Bioaumentação usando nutrientes em menor quantidade
BEN+P+	Bioestimulação usando nutrientes em maior quantidade
BAN+P+	Bioaumentação usando nutrientes em maior quantidade
BS	Bactérias isoladas do solo
C12DO	Catecol 1,2 dioxigenase
C23DO	Catecol 2,3 dioxigenase
DH	Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos
DO	Densidade ótica
HMW	Compostos de alto peso molecular
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HT	Microrganismos heterotróficos totais
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LMW	Compostos de baixo peso molecular
NBR	Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)
NMP	Número mais provável
NOS	Compostos nitrogênio oxigênio e enxofre

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDRB	Ágar batata dextrose rosa bengala
P34DO	Protocatecol 3,4 dioxigenase
RBSCN	Ágar amido-caseína-nitrato rosa bengala
SAT	Teste de agregação salina
SICECORS	Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos
SITEL	Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos
TPH	Hidrocarbonetos totais de petróleo
TPH-GRO	Hidrocarbonetos na faixa da gasolina
TPH-DRO	Hidrocarbonetos na faixa do óleo diesel
TS	Tensão superficial
TSB	Tryptic Soybean Broth / Caldo triptona de soja
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colônias
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
VTD's	Valos de Tratamento e Disposição

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional acelerado e as novas necessidades tecnológicas remetem a humanidade ao desafio de promover crescimento econômico e social com **sustentabilidade ambiental**. A expansão urbana, a instalação de grandes indústrias, o desmatamento, o aumento nos níveis de emissão de gases nocivos ao meio ambiente e o aumento da **dependência** do modelo da matriz energética por **petróleo** são, em grande parte, fatos já vivenciados pelas nações mais desenvolvidas, mas uma realidade atual para os países em desenvolvimento como o Brasil, a China e a Índia. Como consequência, estes países são mais visados pelos organismos internacionais que demandam um nível crescente de exigências no atendimento das políticas ambientais internacionais e no cumprimento das metas de **preservação ambiental**.

Dentro do cenário industrial brasileiro, **a indústria petroquímica** ocupa posição de destaque visto sua importância para o desenvolvimento sócio-econômico do país. A indústria petroquímica brasileira ganha destaque e cresce a cada dia, impulsionada principalmente pelos **avanços tecnológicos** que permitiram não somente a descoberta da maior reserva de petróleo brasileiro, o pré-sal, mas da tecnologia para sua exploração. Como consequência desta **crescente demanda** por produtos derivados do petróleo tem ocorrido o aumento da capacidade de produção em refinarias, unidades produtoras de gás natural e indústrias petroquímicas, alcançando produção nacional de 109,8 milhões/m³ (ANP, 2010).

Entretanto, apesar de todos os benefícios provindos do avanço da produção petrolífera, o aumento de **riscos de contaminação** em ambientes aquáticos e terrestres provenientes de derrames acidentais durante a exploração, processamento e transporte devem ser considerados. Neste sentido, uma questão de

extrema preocupação ambiental dentro da cadeia produtiva do petróleo está relacionada aos **resíduos gerados** durante as etapas de refino e processamento de petroquímicos. Nestes processos há a geração anual de grandes volumes de resíduos sólidos, líquidos e gasosos. Dentre estes, o resíduo sólido denominado **borra oleosa** recebe especial atenção visto que é classificado, de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR10004 (ABNT), como resíduo perigoso pertencente à classe I. A borra oleosa se caracteriza como uma emulsão formada de água, sedimentos e hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, resinas e asfaltenos. Muitos destes apresentam propriedades toxicológicas, mutagênicas e carcinogênicas, sendo assim classificados como poluentes ambientais prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). Segundo Gafarov et al. (2006) para uma indústria petroquímica que processa 200-500 barris de óleo diariamente há uma produção anual aproximada de 10.000m³ de borra oleosa.

O tratamento de resíduos gerados nas indústrias petroquímicas, como é o caso da borra oleosa, faz parte do projeto técnico que é apresentado ao órgão ambiental responsável para a concessão da Licença de Instalação- LI. O início da atividade somente é permitido após a vistoria para a constatação da execução do projeto técnico e assim da concessão, pelo órgão ambiental, da **Licença de Operação- LO**. Dentre os tratamentos existentes, podem-se citar métodos físicos, químicos e biológicos. Entretanto, a criação de leis que regulamentam o gerenciamento ambiental industrial tem motivado o desenvolvimento e favorecido a utilização de **tecnologias mais limpas**. Neste contexto, o processo de **Landfarming** é o mais comumente utilizado em refinarias e indústrias petroquímicas brasileiras para o tratamento dos seus resíduos sólidos.

O *Landfarming* consiste em um método de **biorremediação** baseado na aplicação e incorporação do contaminante na camada superficial do solo. Através de

operações de aragem e gradagem, os contaminantes são homogeneizados ao solo e os microrganismos presentes no solo são estimulados a degradar os contaminantes visando transformar o contaminante em substâncias inertes como material orgânico estabilizado, água e CO₂. A escolha do sistema *Landfarming* deve-se à simplicidade de operação e à possibilidade de alta taxa de aplicação dos resíduos ao solo. Entretanto, deve-se considerar que embora as empresas adotem todas as medidas de segurança cabíveis, ainda assim, este processo oferece risco ao meio ambiente.

O *Landfarming* é classificado como um processo de biorremediação *ex-situ*, ou seja, requer o transporte do resíduo até a unidade de tratamento. Em vista disto, acidentes durante o transporte podem ocorrer causando o derramamento e/ou vazamentos de borra oleosa acarretando em contaminação do ambiente, o que traria como consequência a ocorrência de graves problemas de saúde à população. Além disto, o *Landfarming* é um biorreator do tipo aberto e opera em condições adversas, estando ele exposto a variações climáticas e a todos os tipos de intempéries, fatores estes que afetam diretamente a atividade microbiana e características do resíduo. Condições desfavoráveis de temperatura, umidade, aeração, nutrientes e pH podem retardam ou inibir o crescimento e o metabolismo da microbiota local resultando na redução da eficiência do processo de **biodegradação** e por consequência a permanência desse resíduo por longo período de tempo em exposição à ambiente aberto. Em trabalhos anteriores (Mielniczuk, 1991), foi observada reduzida eficiência do processo de degradação de borra oleosa em solos, mostrando menos de 6% de mineralização em 6 meses de processo. Entre os vários prováveis fatores responsáveis por sua reduzida taxa de degradação no solo, pode-se destacar como os mais importantes a baixa biodisponibilidade destes compostos, a baixa seletividade dos microrganismos aos compostos, variações das condições ambientais e limitação de nutrientes à biota degradadora.

Considerando o longo tempo de exposição em condições naturais de resíduos como a borra oleosa, a baixa taxa de remoção de contaminantes em condições ambientais extremas e limitações do método justificam o estudo de processos mais eficientes na degradação e mineralização desses compostos químicos. Atualmente, a questão ambiental contribui para uma **competitividade diferencial** no mercado, visto que existe uma tendência de fixação dos conceitos de sustentabilidade dentro da premissa de que os melhores produtos ou melhores processos produtivos são aqueles que permitam contribuir com a **minimização de impactos ao meio ambiente**. Dentro deste contexto atual, a busca por alternativas que visem aumentar a eficiência do processo de biorremediação de borra oleosa, hoje, considerada um resíduo de grande preocupação por parte da indústria e sociedade, faz-se importante visando reduzir o tempo de processo minimizando impactos ambientais, econômicos e sociais. Dentre as alternativas para aumentar a eficiência do processo de biorremediação de borra oleosa propôs-se a aplicação de um consórcio bacteriano previamente selecionado como potenciais degradadores de hidrocarbonetos (**bioaugmentação**) e a adição de nutrientes (**bioestimulação**), em especial nitrogênio e fósforo, em solos com o intuito de estimular o crescimento e metabolismo da microbiota local.

O objetivo geral do trabalho foi isolar, identificar e selecionar microrganismos com capacidade de degradação da borra oleosa para a formulação de um consórcio bacteriano e avaliar a eficiência da aplicação deste consórcio bacteriano (bioaugmentação) e de nutrientes (bioestimulação) na biorremediação de solos contaminados com borra oleosa petroquímica. Os objetivos específicos foram: a) avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes e a atividade enzimática pelos isolados selecionados; b) avaliar a capacidade do consórcio bacteriano na biodegradação de borra oleosa em meio líquido; c) avaliar a biorremediação de borra

oleosa em solos com e sem histórico de contaminação e d) avaliar a eficiência da biorremediação em solos *Landfarming* adicionados de 1,5% e 6% de borra oleosa em sistema aberto e fechado.

CAPÍTULO I-

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Petróleo e o Setor Petroquímico

No século XX, o petróleo se tornou a principal fonte de energia do mundo, e a indústria petroquímica passou a transformá-lo em milhares de bens de consumo, o que tornou a indústria do petróleo uma das mais importantes e influentes da atualidade. A partir do petróleo bruto obtêm-se produtos como gás liquefeito de petróleo (GLP), gasolina, querosene, óleo combustível de aviação, asfalto, gasóleo, lubrificantes, matérias primas petroquímicas, borrachas, plásticos, tecidos sintéticos, tintas, entre outros. O petróleo é ainda responsável por aproximadamente 34% da energia elétrica utilizada no Brasil e por aproximadamente 40% de toda a energia consumida no mundo (Souza, 2004).

O petróleo é um combustível fóssil, composto basicamente por hidrocarbonetos (97%) e elementos como nitrogênio, enxofre e oxigênio. Os hidrocarbonetos do petróleo são compostos químicos constituídos apenas por átomos de carbono e de hidrogênio, podendo ser divididos em hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos, alcinos, alcadienos), hidrocarbonetos cíclicos (cicloalcanos ou ciclanos, cicloalcenos ou ciclenos), hidrocarbonetos aromáticos (mono e poli aromáticos), asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetanos e ésteres) e compostos polares que incluem as resinas (piridina, quinolinas, carbazóleo, amidas, tiofeno, entre outros) (Seabra et al., 2008).

A cadeia produtiva do petróleo inicia com a produção da matéria prima, o petróleo, que é enviado para as refinarias, basicamente para a produção de combustíveis e lubrificantes, produtos especiais (solventes, parafinas, entre outros) e matérias primas petroquímicas.

O setor petroquímico brasileiro é, via de regra, organizado em produtores de primeira, segunda e terceira geração. Os produtores de primeira geração do Brasil fracionam a nafta, seu principal insumo, em petroquímicos básicos, que incluem: principalmente eteno, propeno e butadieno; e aromáticos, tais como benzeno, tolueno e xilenos. Os produtores de segunda geração são empresas que a partir dos petroquímicos básicos produzem produtos intermediários como polietileno, poliestireno e PVC, polipropileno e acrilonitrila, caprolactama e polibutadieno. Os produtores de terceira geração, denominados transformadores, compram os petroquímicos intermediários e os transformam em produtos finais, incluindo: plásticos, fibras acrílicas e embalagens descartáveis (Martinkoski, 2007).

No Brasil, a maior parte do setor petroquímico está organizada em três grandes pólos petroquímicos: em São Paulo (Santo André), Bahia (Camaçari) e Rio Grande do Sul (Triunfo). Estes pólos estão localizados normalmente próximos a uma refinaria, que lhes fornece a matéria prima básica (a nafta), e possuem uma grande empresa de primeira geração, chamada central petroquímica ou central de matérias primas do pólo, em torno da qual se encontram as empresas de segunda geração e, embora com menos frequência, também as de terceira geração (Souza, 2004).

2.2 Gerenciamento de resíduos da indústria química do petróleo: exemplo Pólo Petroquímico/RS

O Pólo Petroquímico de Triunfo está localizado na cidade de Triunfo, Rio Grande do Sul, e é atualmente formado por empresas de primeira e segunda geração. Dentre os principais sistemas de controle ambiental integrados dentro do complexo petroquímico de Triunfo, destacam-se os sistemas centralizados de tratamento de efluentes líquidos (SITEL - Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos) e de resíduos sólidos (SICECORS - Sistema Centralizado de Controle de Resíduos

Sólidos), atualmente controlados e operados pela Companhia Riograndense de Saneamento (Corsan), e que atendem a todas as empresas do Pólo.

O SITEL é o sistema de tratamento dos efluentes líquidos resultantes das atividades operacionais das indústrias do Pólo Petroquímico. Estes efluentes constituem duas correntes: orgânica e inorgânica. Os orgânicos exigem um tratamento mais complexo através de processos físico-químico e biológico (tratamento biológico por aeração prolongada). O inorgânico é uma corrente menos complexa e necessita apenas de um polimento final. Os efluentes são pré-tratados pelas empresas do Pólo Petroquímico, visando atender aos padrões de emissão estabelecidos pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler /RS (Fepam), para posterior envio ao SITEL para o tratamento completo.

O SICECORS é o sistema que recebe os resíduos sólidos, comuns e industriais, provenientes das indústrias localizadas no Pólo Petroquímico. O sistema dispõe de um serviço de coleta, dentro das áreas industriais, conforme suas características e pontos pré-determinados. Os resíduos são classificados como Resíduo Sólido Comum (passíveis de decomposição biológica, como limpeza de áreas de escritório, sanitários, refeitórios, entre outros), Resíduo Sólido Industrial (provenientes do processo industrial, não biodegradáveis, não perigosos, insolúveis em água, como por exemplo lamas de catalisadores) e Resíduo Sólido Industrial Especial (provenientes do processo produtivo, apresentando periculosidade efetiva ou potencial à saúde humana e ao meio ambiente, como por exemplo borra oleosa, materiais contaminados com óleo, entre outros). O SICECORS recebe, dispõe e/ou trata os resíduos fazendo uso de unidades de processo como: Valos de Tratamento e Disposição (VTD's), que são destinados aos resíduos sólidos industriais e resíduos sólidos industriais especiais; *Landfarming* e *Landspreading* destinados à disposição de resíduos orgânicos biodegradáveis, principalmente borras oleosas; Aterro Sanitário

destinado aos resíduos sólidos comuns; Pátio de Tambores destinado à armazenagem provisória de embalagens e tambores (<http://www.corsan.com.br>).

2.3 Borra oleosa

As refinarias de petróleo e indústrias petroquímicas geram grande quantidade de resíduos, sendo estes de natureza sólida, líquida e gasosa. Entre os resíduos sólidos gerados, especial atenção é dada a borra oleosa, material classificado, segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR 10004, de Classe I ou Resíduos perigosos, que são aqueles não reutilizáveis nem recicláveis, podendo apresentar características de inflamabilidade, corrosividade, toxicidade ou patogenicidade (Rizzo et al., 2006; Kriipsalu et al., 2008).

A composição deste resíduo sólido é variável devido à grande diversidade na qualidade dos óleos crus, diferenças nos processos usados para a separação óleo-água, vazamentos durante os processos industriais e mistura com borras oleosas já existentes. Usualmente, a borra oleosa contém água, sólidos grosseiros, óleos, gorduras, compostos orgânicos, elementos químicos e metais. Entre os compostos orgânicos presentes, os mais comuns são compostos saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos.

Os hidrocarbonetos saturados incluem alcanos normais e ramificados com estrutura de C_nH_{2n+2} (alifáticos) e alcanos cíclicos com estruturas de C_nH_{2n} (alícíclicos), com faixa em comprimento de cadeia de 1 a 40 carbonos. Os compostos saturados são usualmente os constituintes mais abundantes em óleos crus.

Os hidrocarbonetos aromáticos incluem aromáticos monocíclicos, tais como o benzeno, tolueno e xilenos, e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tais como naftaleno, antraceno e fenantreno.

As resinas e asfaltenos compreendem a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e com alta condensação de anéis aromáticos. Normalmente contém átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio. As resinas incluem compostos polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio (como exemplo piridinas e tiofenos). Eles são geralmente referenciados de compostos NOS. Na fração asfaltenos, metais como níquel, vanádio e ferro encontram-se também associados.

A estrutura de alguns destes compostos está ilustrada na Figura 1 (Zhu et al., 2001).

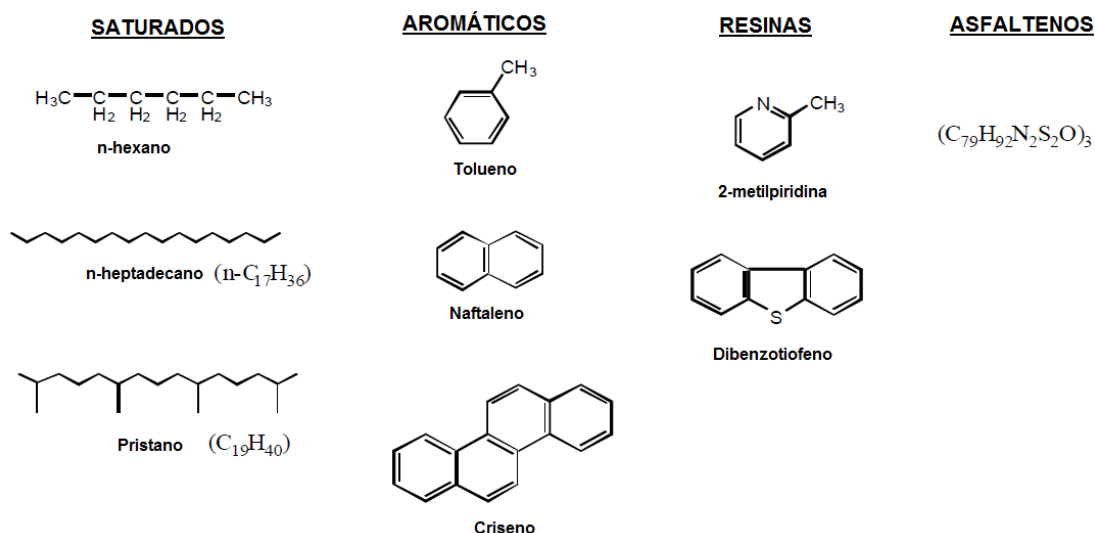


Figura 1: Compostos orgânicos representativos encontrados na borra oleosa.

Dentre os compostos orgânicos presentes na borra oleosa, os de maior preocupação são os HPAs, os quais contribuem significativamente para as propriedades toxicológicas do resíduo, apresentando, muitos destes, potencial mutagênico e carcinogênico (Rizzo et al., 2006, Kriipsalu et al., 2008).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados.

Dependendo do número de anéis presentes, os HPAs são classificados em duas categorias: HPAs de Baixo Peso Molecular (LMW, contendo três anéis ou menos) e alto peso molecular (HMW, contendo quatro ou mais anéis) (Jacques et al., 2007, Chauhan et al., 2008). Devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Dentre estes, 16 HPAs são listados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como poluentes prioritários para a biorremediação devido aos seus efeitos adversos à saúde e ao ambiente. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)pireleno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3- c,d)pireno, naftaleno e pireno (Jacques et al., 2007a). A Agência Internacional de pesquisa em câncer (IARC) tem identificado 15 HPAs incluindo 6 dos 16 HPAs regulados pela USEPA como potenciais carcinogênicos (Chauhan et al., 2008).

2.4 Biorremediação: alternativa para o tratamento de resíduos oleosos

A borra oleosa, em muitos casos, é tratada usando processos físicos, químicos e biológicos. No entanto, muitos destes são processos onerosos ou resultam na incompleta descontaminação. Em contrapartida, os processos biológicos (biorremediação) se mostram entre os métodos mais promissores para o tratamento de uma grande variedade de contaminantes orgânicos, particularmente os hidrocarbonetos de petróleo (Liu et al., 2009). O processo de biorremediação consiste na utilização das atividades biológicas para a mitigação ou completa eliminação dos efeitos nocivos causados pelos poluentes ambientais em um dado local (De Lorenzo, 2008).

Inúmeros estudos têm sido realizados na biorremediação de solos contaminados com compostos derivados do petróleo, mas poucos são os estudos de biorremediação de borra oleosa. No processo de biorremediação, os microrganismos nativos do local contaminado usam os compostos presentes no petróleo como fonte primária de energia, assim biodegradando os compostos durante o processo. Os processos pelos quais os microrganismos realizam a quebra dos hidrocarbonetos são: fermentação, respiração aeróbica e respiração anaeróbica. Durante a fermentação, o carbono (fonte de energia) é quebrado por uma série de reações mediadas por enzimas que não envolvem uma cadeia de transporte de elétrons. Na fermentação, os compostos orgânicos podem agir como doadores e aceptores de elétrons. Durante a respiração aeróbica, os microrganismos usam o oxigênio disponível e o carbono é quebrado por uma série de reações mediadas por enzimas, na qual o oxigênio serve comoceptor de elétrons. Condições anaeróbicas suportam a atividade microbiana sem a presença de oxigênio, onde o carbono é quebrado por uma série de reações mediadas por enzimas nos quais nitratos, sulfatos, dióxido de carbono, e outros compostos servem como aceptores de elétrons (Khan et al., 2004).

A biorremediação pode ser usada para descontaminação de solo e água e é classificada, quanto ao local de aplicação, em duas grandes categorias: *in situ* e *ex situ*. No caso das medidas *in situ*, o tratamento do solo contaminado ou da água subterrânea é feito no próprio local. As medidas *ex situ* consistem em remover o solo contaminado ou extrair a água subterrânea por bomba para aplicar o tratamento em outro local (Boopathy, 2000).

Dentro da categoria de medidas *in situ* podem ser citados os seguintes processos de biorremediação:

- **Atenuação Natural/ Biorremediação Passiva**: é um processo no qual o contaminante permanece no local contaminado e, através de processos naturais como biodegradação, volatilização, diluição e sorção ocorre a descontaminação do ambiente. Por depender exclusivamente destes processos naturais, a biorremediação passiva pode ser muito lenta (Rizzo et al., 2006). A USEPA reconhece a atenuação natural como um método viável de biorremediação para solos e sua seleção é freqüentemente baseada em sua capacidade em alcançar os objetivos em tempo razoável e não apresentar danos à saúde humana e ao ambiente. Este processo apresenta como vantagens ser uma técnica relativamente simples comparada a outras tecnologias de remediação. No entanto, este processo requer mais tempo para alcançar níveis de descontaminação do que outros métodos de biorremediação; requer um programa de monitoramento a longo prazo, o que acarreta diretamente em custos de processo; se o processo durar muito tempo, a pluma de contaminação pode migrar, e torna-se difícil predizer a performance do processo. Para o processo de atenuação natural ser aplicado, o solo contaminado deve estar localizado em áreas com baixo risco à saúde humana e ao ambiente, e localizado a uma distância adequada de receptores potenciais (Khan et al., 2004).

- **Bioventilação**: É um processo baseado na injeção de ar na zona insaturada do solo, fornecendo oxigênio para o processo de degradação aeróbia. Geralmente a injeção é feita com baixas taxas de oxigênio, mas de forma a maximizar a biodegradação e minimizar ou eliminar a liberação de contaminantes voláteis para a atmosfera (Rizzo et al., 2006).

- **Biosparging**: é uma tecnologia semelhante à bioventilação, porém o ar é introduzido na zona saturada, isto é, no lençol freático. A proposta é não somente suprir as necessidades de oxigênio, mas, também, transferir os poluentes voláteis para a zona insaturada na qual se encontram os microrganismos capazes de degradá-los. Este processo pode ser usado em diferentes tipos de compostos de petróleo. Entretanto, apresenta menor eficiência em produtos mais pesados como óleos lubrificantes uma vez que requerem maior tempo de tratamento. Este método é freqüentemente aplicado para compostos mais leves.

Dentro da categoria de medidas *ex situ* podem ser citados os seguintes processos de biorremediação:

- **Biopilhas**: este tratamento envolve o empilhamento de solos contaminados e estimulação da atividade microbiana através de aeração e adição de minerais, nutrientes e umidade. Calor e pH podem ser controlados para aumentar a biodegradação. As áreas de tratamento são geralmente protegidas com um material impermeável para reduzir a quantidade de lixiviados no solo não contaminado. As pilhas, as quais têm sistema de injeção de ar, tem altura geralmente de 1 a 3 m e podem ser cobertas para prevenir perdas por evaporação e volatilização (Khan et al., 2004).

- **Biorreatores**: este tratamento requer a excavação do solo contaminado. O solo excavado é misturado com água e aditivos. Neste sistema, o microrganismo selecionado para a degradação do contaminante é também adicionado. O solo excavado é tratado em biorreatores controlados onde é misturado para manter os sólidos suspensos e os microrganismos em contato com os contaminantes. Nestes

reatores, a biodegradação ocorre a uma taxa rápida, com tempos de tratamento variando de menos de 1 mês a mais do que 6 meses (Khan et al., 2004). Vários tipos de biorreatores vêm sendo testados para diferentes aplicações. Para tratamento de solos contaminados, sem prévia remoção das frações mais finas do solo, é recomendado o uso de biorreatores horizontais (reatores de fase sólida: tambor rotativo ou tambor fixo). O procedimento de lavagem de alguns solos contaminados, por sua vez, produz uma suspensão altamente contaminada contendo frações finas do solo. Os biorreatores verticais (reatores de fase semi-sólida ou reatores de lama) já são mais adequados ao tratamento destas suspensões (Rizzo et al., 2006).

- **Fitorremediação**: A fitorremediação é uma técnica emergente, que utiliza plantas para remediar o solo contaminado por metais pesados, compostos orgânicos e radionuclídeos. Este processo pode ocorrer através da remoção do poluente pela própria planta ou pela degradação do poluente pelos microrganismos que colonizam as suas raízes ou que estão em uma porção do solo bem próxima destas (Trapp & Karlson, 2001, Khan et al., 2004). A fitorremediação se mostra bastante atraente no que tange a recuperação de metais nobres com a utilização de plantas hiperacumuladoras. Estas plantas possuem capacidade de reter metais numa concentração até 100 vezes maior quando comparadas a outros vegetais. O tipo de poluente, a concentração e a presença de toxinas no solo ou na água devem estar dentro dos limites de tolerância da planta. Assim é fundamental conhecer o metabolismo do sistema vegetal a ser empregado e os fatores determinantes da técnica para posterior avaliação de sua eficiência (Oliveira et al., 2007).

- **Landfarming**: é uma tecnologia normalmente utilizada para o tratamento de resíduos industriais perigosos. A eficiência do processo depende principalmente da capacidade da microbiota local para degradar ou imobilizar os vários componentes dos

resíduos. É um sistema que consiste na disposição de resíduos na camada superficial do solo (contido em células impermeabilizadas) e posterior mistura destes. Periodicamente, o solo é revolvido e arado com o objetivo de fornecer o oxigênio necessário à atividade microbiana. Visando a manutenção da atividade microbiana, ainda podem ser corrigido o pH, a umidade e as concentrações de nutrientes (Coneglian et al., 2006, Rizzo et al., 2006).

2.4.1 Landfarming

O processo de *Landfarming* tem sido praticado no mundo inteiro há mais de 100 anos e há mais de 25 anos pela indústria do petróleo.

A exemplo do Pólo Petroquímico de Triunfo, a borra oleosa obtida no tratamento de efluentes é encaminhada para o tratamento biológico em células de *Landfarming* com intuito de tratamento final do contaminante. A técnica de *Landfarming* consiste em um método de biorremediação onde os microrganismos heterotróficos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os contaminantes presentes, desejando-se que ocorra a transformação do contaminante em substâncias inertes como o material orgânico estabilizado, água e CO₂. Esta estimulação ocorre através do manejo do solo, com o revolvimento do solo por operações de aração e gradagem (visando a aerar e homogeneizar as camadas com diferentes concentrações de contaminantes), além da adição de corretivos, fertilizantes e, se necessário, de água através de irrigação. As refinarias e indústrias petroquímicas de vários de países, inclusive do Brasil, utilizam o *Landfarming* para o tratamento dos seus resíduos sólidos. A escolha deste sistema deve-se à simplicidade de operação e à possibilidade de alta taxa de aplicação dos resíduos ao solo.

A Figura 2 mostra células de *Landfarming* com recente aplicação de borra oleosa (a), após duas semanas da realização de revolvimento do solo (b) e (c) em processo de aragem e gradagem do solo.

(a)



(b)



(c)



Figura 2: Células de *Landfarming*. (a) Recente aplicação de borra oleosa; (b) após 2 semanas de realização de revolvimento do solo (c) Sob aplicação de gradagem.

Foto: Vanessa Cerqueira, 2008.

Dentre os fatores que podem limitar a aplicabilidade ou eficiência do processo de *Landfarming* incluem-se: necessidade de grandes espaços; dificuldade de controle da umidade do solo em função das chuvas nos sistemas sem cobertura, interferindo no tempo de tratamento; volatilização dos contaminantes para a atmosfera e geração de poeira, principalmente durante a aragem e outras operações de manejo.

A efetividade do *Landfarming* é influenciada por diversos parâmetros os quais são agrupados em três categorias: características do solo, características dos constituintes do contaminante e condições climáticas. Dentre as características do solo tem-se: densidade da população microbiana presente, pH do solo, conteúdo de umidade, temperatura do solo, concentração de nutrientes e textura. Em relação às características dos constituintes pode-se citar: volatilidade, estrutura química e concentração e toxicidade. Em relação às condições ambientais tem-se: temperatura ambiente, chuvas e ventos (EPA, 2004, Seabra, 2008).

Têm sido citadas algumas faixas dentro do parâmetro características do solo que são considerados geralmente como ideais para a efetividade do processo de *Landfarming* (EPA, 1994). Dentre elas tem-se:

- pH do solo: ideal entre 6 e 8;
- População de bactérias heterotróficas totais: maior que 1000 UFC/ mL;
- Capacidade de campo do solo: entre 40 e 80%;
- Temperatura do solo: entre 10 e 45 °C;
- Taxa de C:N:P: entre 100:10:1 e 100:1:0,5.

O estabelecimento das condições ambientais adequadas é fundamental para que o processo de biorremediação ocorra de forma eficaz, visto que estas podem afetar o processo de biodegradação em dois níveis: influenciando o crescimento e a atividade microbiana e também as propriedades físicas e químicas dos poluentes (Rizzo et al., 2006).

Caso as condições sejam desfavoráveis, o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos envolvidos no processo serão severamente afetados e, conseqüentemente, a biodegradação dos compostos poluentes ficará comprometida.

Deve-se considerar que o sucesso do processo depende da otimização de várias condições físicas, químicas e biológicas no ambiente contaminado. O requisito mais importante é a presença de microrganismos com apropriada capacidade de metabolizar o contaminante. Havendo microrganismos degradadores, então taxas ótimas de crescimento e biodegradação de hidrocarbonetos podem ser obtidas assegurando concentrações adequadas de nutrientes, oxigênio e pH.

Visando aumentar a eficiência do processo de biorremediação, duas principais estratégias têm sido propostas: bioestimulação e bioaumentação.

Bioestimulação: a técnica de bioestimulação é uma das mais utilizadas em processos de recuperação de áreas impactadas e consiste na correção das condições nutricionais, para aumentar a atividade da população existente nas áreas contaminadas. A adição de nitrogênio e fósforo para aumentar os níveis de nutrientes tem sido amplamente estudada. O nitrogênio é primariamente utilizado para o crescimento celular (NH_4^+ e NO_3^-) ou como acceptor alternativo de elétrons (NO_3^-). As principais formas de disponibilização de nitrogênio são as adições de uréia ou de cloreto de amônio (NH_4Cl) ou de nitrato de amônio (NH_4NO_3). Essas formas são assimiladas pelo metabolismo microbiano. O fósforo, também importante para o crescimento dos microrganismos, é o segundo nutriente mais comumente utilizado em processos de biorremediação. Este nutriente pode ser acrescentado nas formas de fosfato de potássio, fosfato de sódio ou ácido orto-fosfórico e por sais de polifosfato (Chagas-Spinelli, 2007).

- **Bioaumentação**: consiste na introdução de microrganismos específicos com potencial capacidade de degradação do contaminante alvo visando aumentar a taxa de mineralização. O conceito de bioaumentação leva a uma intensa pesquisa em busca de microrganismos capazes de degradar uma grande variedade de compostos,

aumentando o campo de potencial aplicação (Trigo et al., 2009). As opções mais comumente usadas para a bioaugmentação são: adição de uma cultura pura bacteriana pré-adaptada; adição de um consórcio pré-adaptado; introdução de bactéria geneticamente engenheirada; e adição de genes de biodegradação relevantes em um vetor a ser transferido por conjugação em microrganismos endógenos.

A seleção de microrganismos deve ser baseada no potencial metabólico do microrganismo e também na característica essencial que capacita as células a serem funcionalmente ativas e persistentes em condições ambientais desejáveis. No caso de locais co-contaminados, por exemplo, com alta concentração de metais e poluentes orgânicos, a capacidade da população microbiana de degradar os compostos pode ser inibida. As estratégias propostas, em tais casos, têm envolvido o uso de sistemas multi-componentes tais como consórcios microbianos, os quais são melhores representantes de um ambiente real do que modelos baseados em sistemas de componentes simples (Tyagi et al., 2011). Em geral, consórcios microbianos são mais eficientes na redução de hidrocarbonetos de locais contaminados do que microrganismos individuais, principalmente devido à maior presença de diferentes atividades enzimáticas e promoção sinérgica de HPAs, aumentando a capacidade de biodegradação. É importante estabelecer avaliações laboratoriais prévias como a caracterização de consórcio microbiano para determinar sua capacidade de remoção do poluente, aumentando a eficiência do processo de biorremediação (Molina et al., 2009).

Deve-se considerar que as características físicas e químicas e a área superficial do contaminante também são de extrema importância e determinantes para o sucesso do processo. A eficácia dos processos de biorremediação pode ser limitada por fatores como a baixa disponibilidade dos contaminantes, sendo limitada pela sorção (adsorção e dessorção) desses compostos pelos componentes do solo

resultando em uma redução da quantidade de hidrocarbonetos susceptíveis ao ataque microbiano. Além disso, a não emulsificação adequada dos hidrocarbonetos resulta em pequenas áreas superficiais para o contato com as células microbianas. Neste caso, a aplicação de surfactantes é vantajoso, visto que promove o aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos, sendo outra alternativa para o aumento da eficiência do processo de biorremediação.

- **Biossurfactantes:** são compostos biológicos anfipáticos produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular por bactérias, leveduras e fungos filamentosos a partir de várias substâncias incluindo açúcares, óleos e resíduos (Rahman & Gapke, 2008).

Devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras. Estes se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas, água/sólido (Champion et al., 1995).

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, solubilização, de-emulsificação, detergência, capacidade espumante, lubrificação e dispersão de fases (Mayer & Soberon-Chaves, 2000). Aplicações de crescente interesse incluem biorremediação e dispersão em derrames de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e recuperação terciária de petróleo (Nitschke & Pastore, 2002).

Os biossurfactantes podem ser agrupados em duas categorias: moléculas de baixo peso molecular, os quais são mais efetivos na diminuição da tensão superficial e interfacial (geralmente glicolipídios e lipopeptídios) e moléculas de alto

peso molecular, os quais são efetivos estabilizadores de emulsões óleo em água (proteínas, polissacarídeos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas anfipáticas) (Van Hamme et al., 2006, Rahman & Gapke, 2008).

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e/ou sua origem microbiana (Desai & Banat, 1997). Os principais tipos de biossurfactantes são: glicolipídios (compostos formados por um carboidrato e um lipídio, sendo a ligação feita por meio de um grupamento éter ou éster), lipopeptídios e lipoproteínas (lipídio agregado a um polipeptídio), fosfolipídios (compostos formados entre grupos alquil sobre um lipídio e um fosfato), surfactantes poliméricos (formados por unidades de sacarídeos e resíduos de ácidos graxos, porém, poliméricos por natureza), surfactantes particulados (vesículas e células microbianas com atividade surfactante) (Nitschke & Pastore, 2002; Ron & Rosenberg, 2002).

A efetividade e eficiência são características essenciais para avaliar a capacidade de um surfactante. A efetividade de um surfactante é determinada pela sua habilidade em baixar a tensão superficial, que é definida como a força por unidade de comprimento que duas camadas superficiais exercem uma sobre a outra devendo os surfactantes efetivos atingir valores menores que 30 mN/m e 1 mN/m de tensão superficial e tensão interfacial, respectivamente (Gouveia et al., 2003, Mulligan, 2005). Para avaliar a eficiência de um surfactante, um dos índices mais utilizados é a concentração micelar crítica (CMC) que varia de 1 a 200 mg.L⁻¹, e que se caracteriza como sendo a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a mais baixa tensão superficial ou interfacial (Mulligan et al., 2001). A Figura 3 mostra como outros parâmetros variam em função da concentração de surfactante.

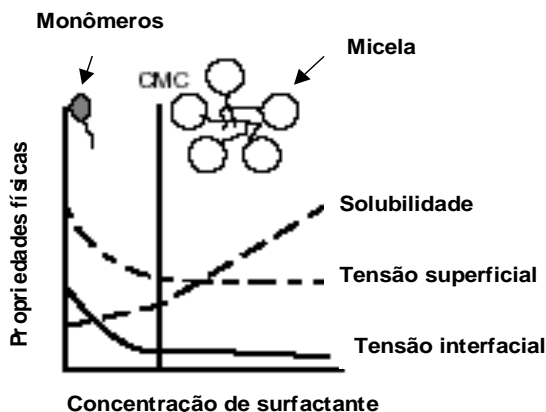


Figura 3: Tensão superficial, tensão interfacial e solubilização em função da concentração de surfactante.

Fonte: Mulligan et al., 2001.

As moléculas de surfactante na solução aquosa, após uma certa concentração (CMC) passam a se agregar sob a forma de micelas, as quais são responsáveis pela solubilização de gorduras. A principal razão que leva os monômeros de surfactante a se associarem sobre a forma de micelas é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e a água (Mulligan et al., 2001).

Aparentemente, a combinação de bioaumentação, bioestimulação e presença de biosurfactantes, dependendo das características do local contaminado, pode ser uma estratégia promissora para acelerar a biorremediação (Tyagi et al., 2011).

2.5 Degradação microbiana de hidrocarbonetos

A taxa e a extensão da biodegradação de compostos orgânicos no solo, principalmente para compostos hidrofóbicos, são afetadas pelas complexas interações entre as moléculas dos contaminantes, as partículas do solo, da água intersticial e dos microrganismos degradadores dos contaminantes (Seabra et al., 2008).

2.5.1 Interações solo - hidrocarboneto

As interações solo-contaminante podem afetar a degradação microbiana. O solo é composto de componentes inorgânicos e orgânicos separados por poros contendo ar ou água. As interações entre hidrocarbonetos e as superfícies minerais (argila, silte e areia) são somente significantes quando o conteúdo de matéria orgânica é menor que 0,1%. Assim, a matéria orgânica é muito importante no destino e modo de ação dos contaminantes orgânicos, incluindo hidrocarbonetos no solo (Stroud et al., 2007).

A matéria orgânica do solo é considerada heterogênea e consiste de componentes “hard” e “soft”, conforme mostrado na Figura 4, que exibem comportamentos de sorção diferentes para compostos orgânicos. Os componentes mais acessíveis são denominados matéria orgânica tipo borracha (“soft” ou “rubbery”) e os componentes menos acessíveis são denominados rígidos ou vítreos (“hard” ou “glassy”) que exibem comportamentos de sorção diferentes. O poluente orgânico pode ser sorvido superficialmente pela matéria orgânica aderida à fração mineral ou à fração orgânica solúvel. Em uma segunda etapa, o poluente orgânico pode difundir para dentro dos mesoporos e microporos e interagir com a matéria orgânica “rubbery” ou “soft” (microporos mais acessíveis) ou “glassy” e “hard” (microporos menos acessíveis) (D’Agostinho & Flues, 2006).

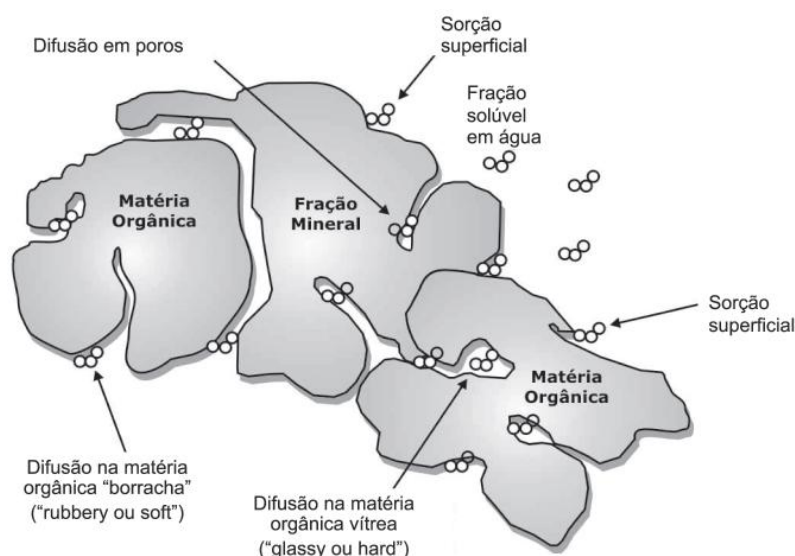


Figura 4: Comportamento da matéria orgânica no solo

Fonte: D'Agostinho & Flues, 2006.

2.5.2 Interações microrganismo - hidrocarboneto

Interações hidrofóbicas têm papel na aderência de microrganismos em uma variedade de superfícies. Em particular, a natureza hidrofóbica da superfície bacteriana tem sido citada como um fator no crescimento de células nos substratos hidrofóbicos insolúveis em água. Neste caso, o contato da célula com os compostos hidrofóbicos é requerido devido a primeira etapa na degradação de hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos corresponder à introdução de oxigênio molecular na molécula pelas oxigenases associadas à célula. O consumo e a utilização de substratos insolúveis em água requerem adaptações fisiológicas específicas, e vários microrganismos tem desenvolvido diferentes estratégias de interação com estes compostos hidrofóbicos. Dois tipos gerais de interações microrganismos-hidrocarboneto, dependendo do estado e tamanho das gotas de óleo relativas ao tamanho das células, tem sido postulado: adesão específica de células a grandes gotas de óleo e pseudosolubilização envolvendo a assimilação celular de pequenas

gotas de hidrocarbonetos emulsificados. A maioria dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos produzem biossurfactantes, os quais facilitam o crescimento dos microrganismos nos hidrocarbonetos pelo aumento da hidrofobicidade da superfície celular e/ou pela transferência de alceno incluindo emulsificação/ solubilização do substrato (Coimbra et al., 2009).

A degradação de hidrocarbonetos mediada pela atuação dos biossurfactantes pode ocorrer de três maneiras, conforme ilustrado na Figura 5.

- A. A bactéria é capaz de consumir o poluente do centro micelar pela fusão com a membrana celular.
- B. O uso microbiano ocorre somente dos poluentes dissolvidos na fase aquosa. O papel dos surfactantes é por meio disso aumentar a transferência de massa.
- C. A adição de surfactantes muda a hidrofobicidade celular, facilitando o contato direto entre as células e os poluentes, os quais ocorrem em forma cristalina ou em gotas. Em solos contaminados, os agentes de superfície ativa podem capacitar os microrganismos a se adsorverem às partículas de solo ocupadas pelos poluentes (Schippers et al., 2000).

Estudos têm relacionado o aumento da solubilidade aparente com o aumento na taxa de dissolução do hidrocarboneto na fase aquosa após a adição de surfactante. No entanto, a dissolução acelerada de HPA causada pela adição de surfactante pode resultar no aumento da biodegradação somente se os HPAs solubilizados estão biodisponíveis, como mostrado pelos estudos com surfactantes hidrofílicos onde a liberação de HPA das micelas de surfactantes foi necessária para a degradação da HPA.

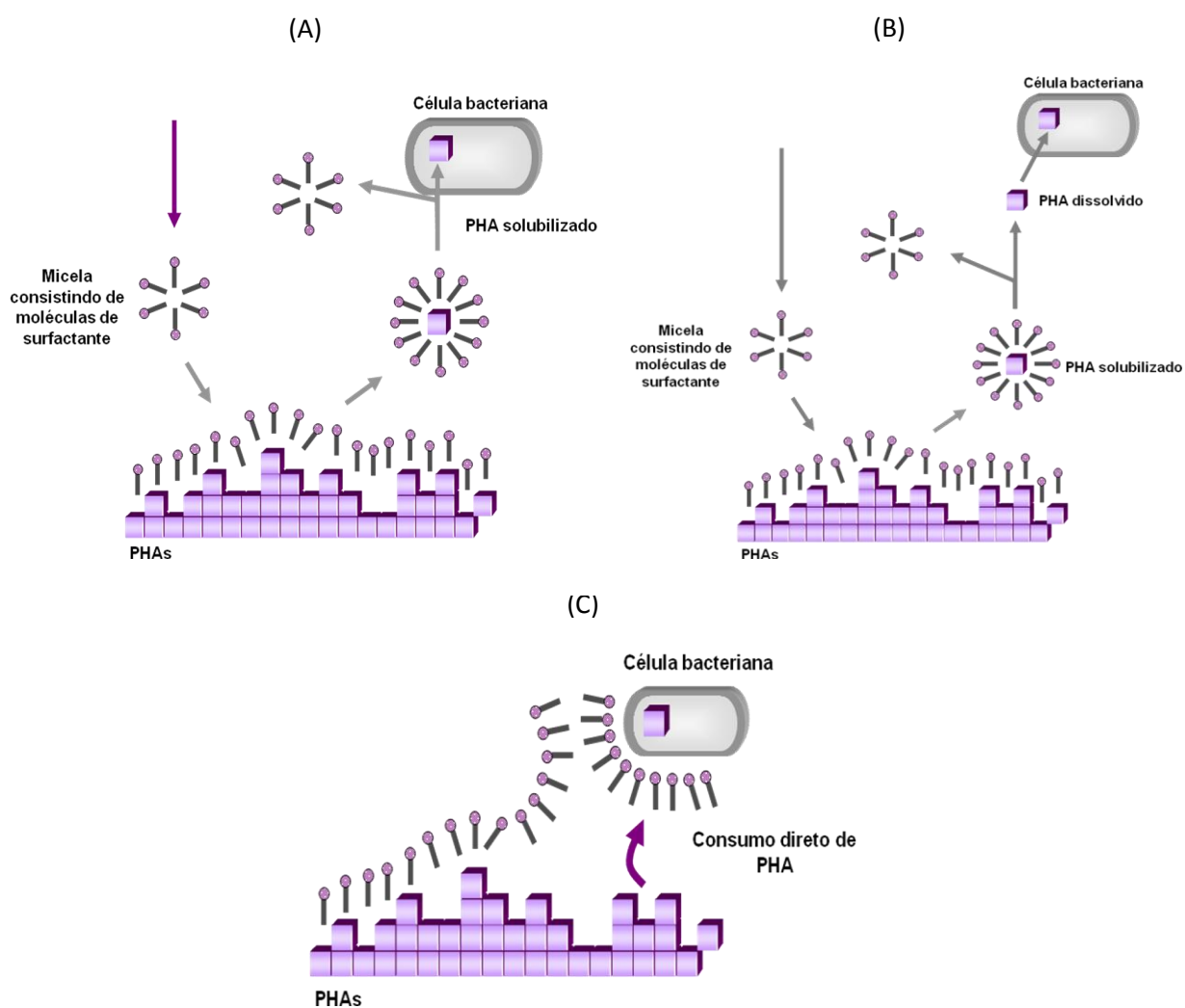


Figura 5: Formas de incorporação do poluente mediado por surfactantes.

Fonte: Adaptado de Schippers et al., 2000 e Makkar & Rockne, 2003.

2.5.3 Microrganismos envolvidos

Nas últimas décadas, tem sido identificados e caracterizados diferentes espécies de bactérias e fungos filamentosos capazes de mineralizar ou degradar parcialmente hidrocarbonetos para a formação de produtos menos perigosos. Os gêneros mais comumente conhecidos como degradadores de óleos inclui principalmente *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*,

Mycobacterium, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* e *Sporobolomyces* (Balba et al., 1998, Bento et al., 2005). Estudos têm comprovado que a degradação completa de hidrocarbonetos envolve o uso de consórcios microbianos, incluindo formas eucarióticas e procarióticas, e não somente uma única espécie (Rizzo et al., 2006).

Em relação à via metabólica, as etapas iniciais na biodegradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos envolvem a oxidação do substrato pelas oxigenases, para a qual o oxigênio molecular é requerido.

Conforme demonstrado na Figura 6, os alcanos podem ser oxidados de forma terminal ou subterminal. A maior parte dos microrganismos oxidam os hidrocarbonetos através das enzimas monooxigenases (adição de um átomo de oxigênio à molécula) convertendo os hidrocarbonetos alifáticos em álcoois correspondentes. Entretanto, nos mecanismos de degradação envolvendo dioxigenases, os alcanos são convertidos em hidroperóxidos e subsequentemente reduzidos a alcoóis correspondentes. Através da via de oxidação terminal, normalmente, o álcool produzido é inicialmente oxidado a aldeído e depois a ácido graxo correspondente, por intermédio de enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, respectivamente. Os ácidos graxos entram então na via metabólica da β -oxidação, formando dois compostos de carbono e acetilcoenzima A, com liberação de CO_2 . Os álcoois subterminais são oxidados a cetonas, posteriormente a ésteres e estes, são hidrolisados gerando um ácido e um álcool. Após, os ácidos podem ser metabolizados em vias celulares (ciclo de Krebs) (Fritsche & Hofrichter, 2000).

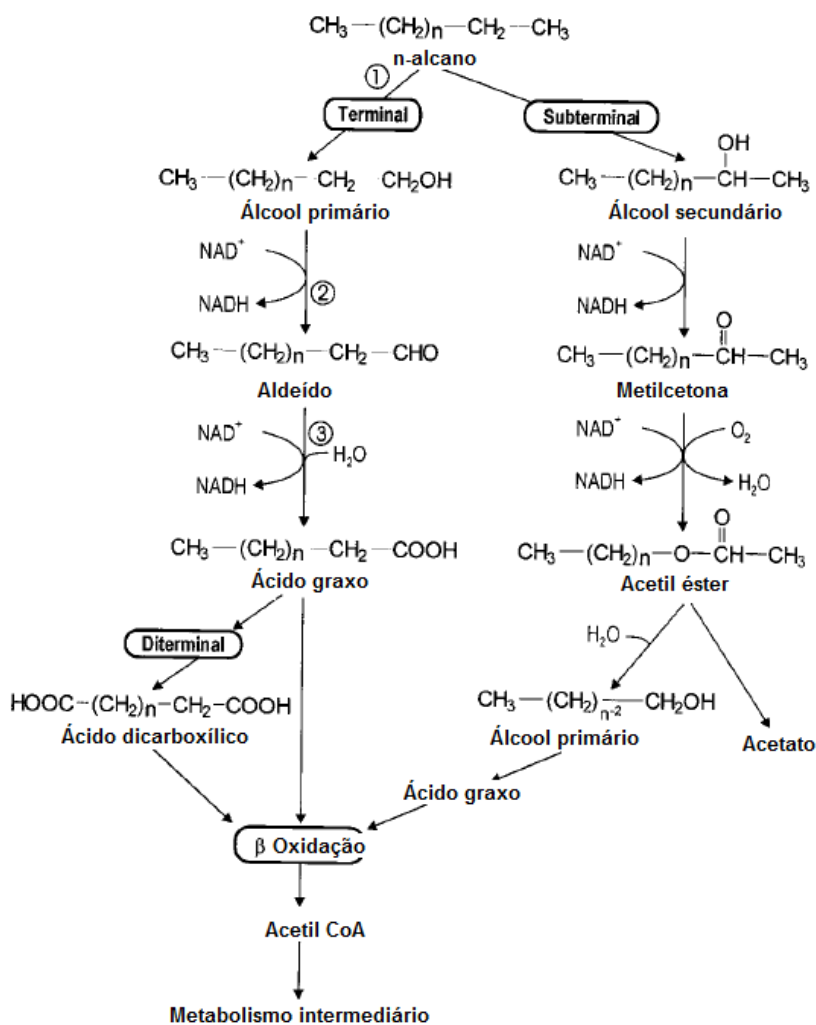
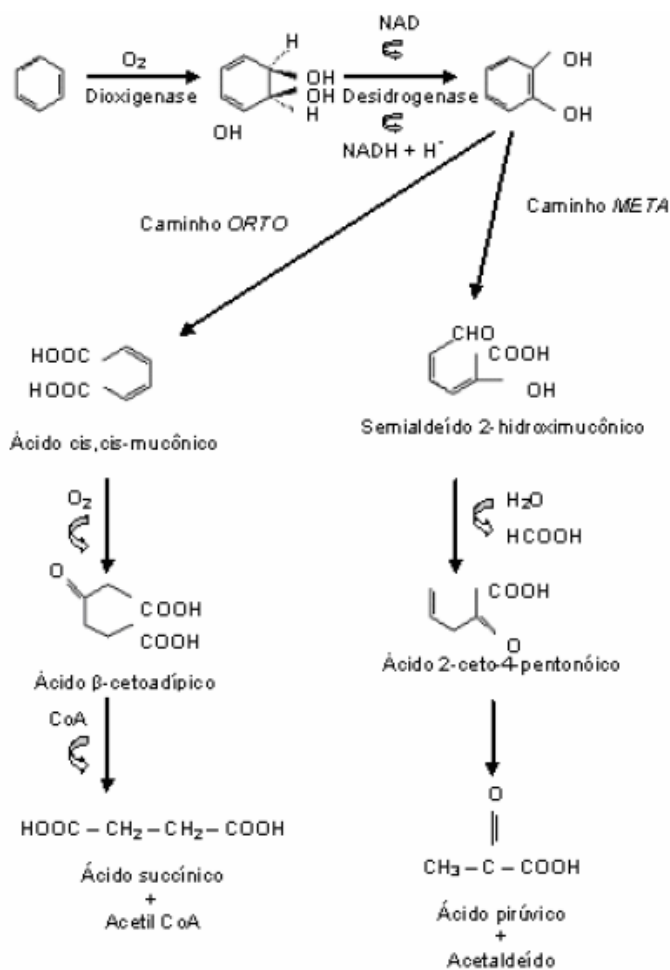


Figura 6: Degradação de alcanos. 1- n-alcanos monoxigenases. 2- álcool desidrogenase. 3- aldeído desidrogenase

Fonte: Fritsche & Hofrichter, 2000.

Em relação à degradação de hidrocarbonetos aromáticos (Figura 7), a principal estratégia dos microrganismos é usar uma variedade de enzimas que convertem a molécula com o anel fechado em um dos intermediários centrais da via de degradação, que pode ser o catecol, o protocatecol ou o gentisato.

Metabolismo em bactérias



Metabolismo em fungos

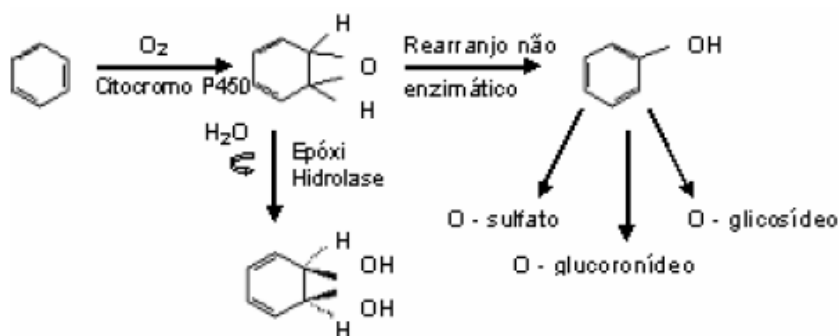


Figura 7: Degradação de hidrocarbonetos aromáticos

Fonte: Chagas-Spinelli, 2007.

Diferentes mecanismos de formação de catecol existem em procariotos e eucariotos. Organismos eucariotos produzem catecóis de compostos aromáticos pela inserção de um átomo de oxigênio molecular pelas monoxigenases formando epóxidos. Adição subsequente de água levando a trans dihidrodíóis é seguida por desidrogenação. Diferentemente, os procariotos introduzem uma molécula de oxigênio por uma desidrogenase formando um cis-dihidrodiol o qual é então sujeito a desidrogenação (Bosma et al., 2001, Rizzo et al., 2006).

As enzimas que atuam na formação dos intermediários centrais, catecol, gentisato e protocatecol, são denominadas de periféricas, cuja função é reconhecer as moléculas dos HAPs e convertê-las a estes intermediários centrais. A conversão destes intermediários nos demais compostos é realizada pelas enzimas denominadas enzimas de fissão, que converterão os intermediários centrais em compostos que possam ser utilizados nas vias comuns de geração de carbono e energia da bactéria.

Em eucariotos e procariotos, catecol e vários catecóis substituídos são abertos por dioxigenases, sendo as enzimas que atuam nesta etapa de enzimas de fissão. Estas podem ser divididas em dois grupos, conforme o local da clivagem no intermediário central: enzimas intradiol, as quais abrem o anel aromático por via orto e as enzimas extradiol, as quais fazem a abertura do anel aromático por via meta (Bosma et al., 2001, Jacques et al., 2007b).

A clivagem orto da catecol pela atividade da catecol 1,2 dioxigenase rende ácido cis, cis mucônico. A quebra posterior via muconolactona e 3-oxoadipato enolactona leva a 3 oxoadipato o qual entra no metabolismo central como succinato e acetilCoA. A clivagem meta da catecol pela catecol 2,3 dioxigenase rende 2-hidroxi-mucônico semialdeído, o qual depois da descarboxilação a 2-oxo-penta-4-enoato é clivado em piruvato e acetaldeído (Lal et al., 1959, Fritsche & Hofrichter, 2000, Bosma et al., 2001, Jacques et al., 2007b).

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALBA, M.T., AL-AWADHI, N., AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, 32, 155-164, 1998.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, 96, 1049-1055, 2005.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, 74, 63-67, 2000.
- BOSMA, T.N.P., HARMS, H., ZEHNDER, A.J.B. Biodegradation of xenobiotics in environment and technosphere. **The handbook of Environmental Chemistry**, 2, K, Biodegradation and persistence, 2001.
- CHAGAS-SPINELLI, A.C.O. Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel. **Tese de Doutorado em Geociências**. Universidade Federal de Pernambuco, 2007.
- CHAMPION, J.T., GILKEY, J.C., LAMPARSKI, H., RETTERER, J., MILLER, R.M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, 170, 569-574, 1995.
- CHAUHAN, A., RAHMAN, F., OAKESHOTT, J.G., JAIN, R.K. Bacterial Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, 48, 1, 95–113, 2008.
- COIMBRA, C.D., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SARUBBO, L.A. Studies of the Cell Surface Properties of *Candida* Species and Relation to the Production of Biosurfactants for Environmental Applications. **Current Microbiology**, 58, 245-251, 2009.
- CONEGLIAN, C.M.R, SIVIERO, A.R., POLETTI, E.C.C., VENDEMIATI, J.A.S., DRAGONI, G.S., RIBEIRO, M.S., ANGELIS, D.F., FURLAN, L.T., GONÇALVES, R.A. Avaliação da biodegradação no solo de resíduos gerados em refinaria de petróleo. **Holos Environment**, 6, 2, 2006.
- D'AGOSTINHO, A., FLUES, M. Determinação do coeficiente de distribuição (kd) de benzo(a)pireno em solo por Isotermas de sorção. **Química Nova**, 29, 4, 657-661, 2006.
- DE LORENZO, V. Systems biology approaches to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, 19, 579-589, 2008.
- DESAI, J.D., BANAT, I.M. Microbial Production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61, 1, 47-64, 1997.

FRITSCH, W., HOFRICHTER, M. Environmental Process II-6: **Aerobic degradation by microorganisms**. In: Rehm, H.J., Reed, G., Puhler, A., Stadler, A. Biotecnology, 11b. Wiley-VCH, Weinheim, 145-167, 2000.

GOUVEIA, E.R., LIMA, D.P.A., DUARTE, M.S., LIMA, G.M.S., ARAÚJO, J.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes – Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 30, 2003.

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

JACQUES, R.J.S., BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, UFSM, 29,1, 7 - 24, 2007b.

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

KRIIPSALU, M., MARQUES, M., MAASTIK, A. Characterization of oily sludge from a wastewater treatment plant flocculation–flotation unit in a petroleum refinery and its treatment implications. **J Mater Cycles Waste Manag**, 10,79-86, 2008.

LAL,R., LAL, S., DHANARAJ, P.S., SAXENA, D.M. **Manipulations of catabolic genes for the degradation and detoxification of xenobiotics**. In: Advances in Applied Microbiology. Neidleman, S.L., Neidleman, A. I. L., 1959.

LIU, W., LUO, Y.,TENG, Y., LI, Z., CHRISTIE, P. Prepared bed bioremediation of oily sludge in an oilfield in northern China. **Journal of Hazardous Materials**, 161,479-484, 2009.

MAKKAR, R.S., ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22, 10, 2280 - 2292, 2003.

MARTINKOSKI, D.C. Análise do desempenho ambiental e avaliação dos resultados econômicos em uma organização certificada com a ISSO 14001: estudo de caso realizado em indústria do Pólo Petroquímico do Sul. **Dissertação de Mestrado em Engenharia**. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2007.

MAYER, R.M., SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54, 625- 633, 2000.

MIELNICZUK, C. A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo. **Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

MOLINA, M.C., GONZÁLEZ, N., BAUTISTA, L.F., SANZ, R., SIMARRO, R., SÁNCHEZ, I., SANZ, J.L. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. **Biodegradation**, 20, 789-800, 2009.

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

MULLIGAN, C.C., YONG, R.N., GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, 60, 371-380, 2001.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25, 772-776, 2002.

OLIVEIRA, D.M., CARA, D.V.C., XAVIER, P.G., PAULA, M.S., SOBRAL, L.G.S., LIMA, R.B., LOUREIRO, A. Fitorremediação: O estado da arte. Série Tecnologia Ambiental, 39. Rio de Janeiro.CETEM/MCT, 49p., 2007.

RAHMAN, P.K.S.M., GAKPE, E. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants – Review. **Biotechnology**, 7, 2, 360-370, 2008.

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. **Série tecnologia Ambiental**. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

RON, E.Z., ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, 249-252, 2002.

SCHIPPERS, C., GEBNER, K., MULLER, T., SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. **Journal of Biotechnology**, 83, 189 - 198, 2000.

SEABRA, P.N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In MELO, I.S., GHINI, R., SILVA, C.M.S.S, VIEIRA, R.F., FAY, E.F., ABAKERLI, R.B. **Microbiologia Ambiental**. 2 ed. Ed. Embrapa, Rio de Janeiro/RJ, 2008, p. 548-570.

SOUZA, R.S. Fatores de formação e desenvolvimento das estratégias ambientais nas empresas. **Tese de Doutorado em Administração**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2004.

STROUD, J.L., PATON, G.I., SEMPLE, K.T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, 102, 1239-1253, 2007.

TRAPP, S., KARLSON, U. Aspects of Phytoremediation of Organic Pollutants. **Journal of Soils & Sediments**, 1, 2001.

TYAGI, M., FONSECA, M.M.R., CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and Biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, 22, 231–241, 2011.

TRIGO, A., VALENCIA, A., CASES, I. Systemic approaches to biodegradation. **FEMS Microbiol Rev**, 33, 98-108, 2009.

VAN HAMME, J.D, SINGH A., WARD ,O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 1. Physiological aspects. **Biotechnology Advances**, 24, 604-620, 2006.

ZHU, X., VENOSA, A.D., SUIDAN, M.T., LEE, K. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. **U.S. Environmental Protection Agency** Office of Research and Development National, 2001.

CAPÍTULO II-

BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO

BIOPROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO

RESUMO

A utilização de microrganismos com capacidade degradativa comprovada e produtores de biossurfactantes têm surgido como alternativa para o tratamento de forma sustentável de passivos ambientais. O presente trabalho teve por objetivo isolar bactérias da borra oleosa e de solo e efluente impactado com borra oleosa e selecioná-las quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo e produção de biossurfactante, bem como detectar a produção de enzimas, para uso futuro em processos de biorremediação de resíduos petroquímicos. Foram isoladas 45 bactérias de amostras ambientais contaminadas com resíduos petroquímicos, sendo 21 provenientes de solo de *Landfarming* contaminado com borra oleosa, 11 provenientes de efluentes de indústria petroquímica e 13 oriundas diretamente da borra oleosa. A capacidade de metabolização de diferentes compostos contendo hidrocarbonetos, a capacidade de crescimento e tolerância em borra oleosa contida em meio líquido, a produção de biossurfactantes e de enzimas envolvidas no processo degradativo foram avaliadas. Inicialmente foi feita uma pré-seleção através da análise da capacidade degradativa de hidrocarbonetos, onde se verificou que 22% dos isolados degradaram todas as fontes de carbono em tempos distintos e 36% utilizaram a borra oleosa como fonte de carbono em 18-48 h, sendo considerados os mais eficientes. Foram pré-selecionados 20 isolados, identificados com base no seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, os quais mostraram capacidade de crescimento em meio contendo 1% de borra oleosa como única fonte de carbono, tolerância em meio contendo até 30% de borra oleosa, capacidade de produção de biossurfactantes e expressão de enzimas envolvidas na degradação de compostos alifáticos e aromáticos. Cinco bactérias, identificadas como *Stenotrophomonas acidaminiphila* BB5, *Bacillus megaterium* BB6, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* BS20 mostraram-se promissoras para a utilização como inóculo em processos de biorremediação (bioaugmentação) de áreas contaminadas com resíduos petroquímicos visando aumentar a taxa de degradação, uma vez que apresentaram capacidade de utilizar a borra oleosa como única fonte de carbono e produzir biossurfactantes.

Palavras-chave: bactérias, biodegradação, biossurfactantes, borra oleosa, hidrocarbonetos.

1. INTRODUÇÃO

As refinarias de petróleo e indústrias petroquímicas geram, durante a exploração, produção e refino, um resíduo sólido com elevada carga orgânica, denominado borra oleosa. Entre as principais fontes geradoras deste resíduo podem-se citar fundo de tanques de armazenamento, separadores de óleo-água e limpeza de equipamentos de processamento. A borra oleosa se caracteriza como uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, asfaltenos e resinas, estando estes entre os mais comuns contaminantes ambientais (Cameotra & Singh, 2008, Dhote et al., 2010). A maioria dos componentes da borra oleosa são tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, sendo classificados como poluentes ambientais prioritários pela Agência de Proteção Ambiental (USEPA).

As indústrias do petróleo têm buscado alternativas para tratamento e/ou destinação final deste produto de forma ambiental e economicamente sustentável. As decisões técnicas e econômicas tomadas em relação aos resíduos sólidos perigosos estocados nas indústrias baseiam-se em informações preliminares, que levam em consideração principalmente os aspectos de saúde ocupacional, qualidade ambiental, exeqüibilidade da medida e custos envolvidos (Magalhães et al., 2006).

Dentre as técnicas de tratamento deste resíduo, os processos biológicos são os mais promissores, uma vez que são ambientalmente favoráveis por estimularem processos naturais. A biorremediação, definido como processo que utiliza microrganismos, plantas ou suas enzimas para transformar contaminantes em formas menos tóxicas, é um processo atrativo devido aos seus custos e benefícios de mineralização do poluente (Okoh & Trejo-Hernandez, 2006).

As pesquisas de biorremediação na área do petróleo foram intensificadas a partir da década de 90, sendo relatado na literatura estudos de degradação biológica

de diversos compostos como óleo diesel (Bento et al., 2005a, Delille et al., 2007, Sanscartier et al., 2009), gasolina (Solano-Serena et al., 1999, Chang et al., 2001, Oliveira et al., 2011), óleo cru (Rahman et al., 2002, Zhang et al., 2005) e recentemente de biodiesel (Júnior et al., 2009, Mariano et al., 2008, Owsianiak et al., 2009). Além destes, diversos trabalhos têm sido publicados de estudos de biodegradação de compostos específicos presentes no petróleo, como por exemplo antraceno, pireno, fenantreno, naftaleno, fenol, benzeno, xileno, tolueno (Schippers et al., 2000, Chang et al., 2001, Santos & Linardi, 2001, Prenafeta-Boldú et al., 2004, Jacques et al., 2005, Santos et al., 2008, Silva et al., 2009), entre outros. No entanto, poucos são os trabalhos de biorremediação de borra oleosa (Del Panno et al., 2005, Verma et al., 2006, Cameotra & Singh, 2008, Liu et al., 2009).

O sucesso do processo de biorremediação depende de diversos fatores, como tipo de solo, estrutura química do contaminante, disponibilização do contaminante, e condições que favorecem o desenvolvimento microbiano como aeração, umidade, temperatura e pH, presença de nutrientes, entre outros (Rizzo et al., 2006). No entanto, o componente chave na biorremediação é o microrganismo, o qual produz as enzimas envolvidas nas reações degradativas levando a eliminação ou detoxificação do poluente químico (Okoh & Trejo-Hernandez, 2006). Como alternativa para aumentar a eficiência do processo de degradação em ambientes contaminados tem sido proposta a estratégia de bioaugmentação, que consiste na adição de microrganismos e/ou enzimas no ambiente contaminado com o objetivo de aumentar a taxa degradativa. Para o sucesso desta técnica, uma etapa crucial é a de isolamento e seleção de um microrganismo ou um consórcio de microrganismos eficientes na degradação da molécula em estudo (Melo & Azevedo, 2008).

A estratégia de bioaugmentação pode ser realizada com a utilização de microrganismos endógenos e/ou exógenos. Em especial, a busca por microrganismos

nativos do ambiente contaminado com potencial degradador é de extremo interesse, visto suas vantagens frente aos microrganismos exógenos, tais como sua maior adaptabilidade ao meio, maior resistência às variações das condições ambientais locais, menor susceptibilidade a variações genéticas causados por condições de estresse do meio, exploração da potencialidade regional, entre outros.

Assim, o trabalho teve como objetivo isolar bactérias da borra oleosa e de solo e efluente impactado com borra oleosa e selecionar as bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo e produzir biossurfactantes, bem como detectar a produção de enzimas envolvidas na biodegradação, para uso futuro em processos de biorremediação de resíduos petroquímicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

As amostras de efluente orgânico e borra oleosa foram coletadas assepticamente nos separadores API pertencentes ao tratamento primário da unidade de tratamento de efluentes do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos do Pólo Petroquímico do Sul (SITEL/CORSAN) localizados na cidade de Triunfo/RS. As amostras de solo foram coletadas assepticamente, a uma profundidade de 30 cm, de células de *Landfarming* pertencentes à UNIB-RS/BRASKEM localizadas na unidade do Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos (SICECORS/CORSAN), na cidade de Triunfo/RS. A coleta de solo da célula *Landfarming* foi efetuada após duas semanas de tratamento.

Foram efetuadas coletas de 5 pontos aleatórios e distintos. As amostras foram transportadas até o laboratório e mantidas sob refrigeração (4°C) até o início do processo de isolamento. As amostras foram homogeneizadas e retiradas alíquotas para o isolamento de microrganismos.

2.2 Caracterização das amostras

As amostras de solo, efluente e borra oleosa foram caracterizadas por análises físico-químicas, realizadas pelo Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e por análises microbiológicas (Anexo A1).

A determinação da população microbiana foi realizada através da técnica de espalhamento em superfície em placas de petri contendo o respectivo meio de cultivo. A contagem total de bactérias foi realizada em meio Ágar nutriente (composição em g.L⁻¹: extrato de carne, 3,0; peptona, 5,0; ágar, 15,0) após 48 horas de incubação, fungos em meio PDRB (composição em g.L⁻¹: dextrose, 10,0; peptona, 5,0; KH₂PO₄, 1,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5; rosa bengala, 0,035; streptomicina, 0,030; ágar, 15,0) após 7 dias, actinomicetos em meio RBSCN (composição em g.L⁻¹: amido, 10,0; caseína hidrolisada, 0,3; KNO₃, 2,0; NaCl, 2,0; K₂HPO₄, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 0,05; CaCl₂, 0,02; FeSO₄.7H₂O, 0,01, rosa bengala, 0,035; ágar, 15,0) após 14 dias e microrganismos heterotróficos totais em meio R2A após 7 dias (Alef & Nannipieri, 1995).

2.3 Isolamento de microrganismos

O isolamento de bactérias foi realizado a partir do efluente orgânico, solo do *Landfarming* e borra oleosa através da técnica de enriquecimento. A técnica consistiu em inocular, em frascos tipo erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio mínimo mineral (MM1) estéril [composição em g.L⁻¹: KCl, 0,7; KH₂PO₄, 2,0; Na₂HPO₄, 3,0; NH₄NO₃, 1,0; solução de micronutrientes, 1mL.L⁻¹ (MgSO₄, 4,0; FeSO₄, 0,2; MnCl₂, 0,2; CaCl₂, 0,2)] (Richard & Vogel, 1999) 1%(v/v) de borra oleosa para isolar bactérias da borra oleosa e 1 g de solo úmido ou 1 mL de efluente acrescido de 1%(v/v) de borra oleosa para isolar bactérias de solo e efluente, respectivamente.

Após a inoculação, os frascos foram mantidos em incubador rotatório a 100 rpm e 30°C. Uma alíquota (1 mL) foi transferida a cada 5 dias para novo meio MM1 e incubado nas mesmas condições. Após 5 transferências, realizadas a cada 5 dias (30 dias), foi realizada a técnica de espalhamento em superfície em placas de petri contendo ágar nutriente. As colônias foram submetidas à técnica de esgotamento em placas contendo ágar nutriente para obtenção de colônias puras.

Os isolados bacterianos purificados foram primeiramente caracterizados quanto à morfologia celular e coloração diferencial de Gram e posteriormente identificados através do seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os isolados bacterianos foram armazenados refrigerados em tubos de ensaio contendo ágar nutriente inclinado a 4°C e armazenados congelados em microtubos contendo caldo nutritivo e glicerol 20%. Os isolados foram testados quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos e posteriormente à capacidade de produção de biossurfactante e produção de enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos.

2.4 Avaliação preliminar da capacidade degradativa

2.4.1 Preparo do pré-inóculo bacteriano

O pré-inóculo bacteriano foi preparado através da transferência, com o auxílio de alça de platina, do isolado (cultura estoque) para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo nutritivo estéril. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 100 rpm, 30°C durante 24 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4 °C, 9000 rpm durante 15 minutos e posteriormente lavadas com meio mineral MM1 estéril, sendo este processo repetido 3 vezes. O *pellet* obtido foi ressuscitado em meio mineral MM1. Os frascos em estudo foram inoculados com os respectivos microrganismos de forma a obter uma concentração inicial de inóculo de

10^7 UFC.mL⁻¹, correspondendo a densidade ótica de 0,1 a 0,2 a 600 nm em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220).

Nos experimentos realizados para a avaliação da capacidade degradativa foi também testada outra forma de preparo de inóculo, que consistiu na adição de mais uma etapa no processo, onde se manteve em incubador rotatório durante 24 h a 100 rpm e 30°C o inóculo bacteriano em meio mínimo mineral, visando esgotar reservas energéticas.

2.4.2 Avaliação da capacidade degradativa utilizando indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

Para verificar o indicativo de degradação de hidrocarbonetos pelos isolados foi utilizada a técnica do indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), que serve como um acceptor artificial de elétrons (Braddock & Catterall, 1999, Mariano, 2006, Piróllo, 2006).

Durante a oxidação microbiana de hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até o acceptor de elétrons TTC, o qual através de reações de oxi-redução promove a mudança de cor do meio de incolor (oxidado) a rosa e roxo (reduzido). Desta forma, pela redução do TTC é possível prever a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata em placas de poliestireno de 96 poços estéreis, onde foram inoculados microrganismos com a concentração inicial de 10^7 UFC.mL⁻¹ em 250 µL de meio mínimo mineral MM1 contendo o indicador redox e diferentes fontes de carbono (gasolina, óleo diesel metropolitano com e sem aditivo, biodiesel de soja e borra oleosa) na concentração de 1 e 3%. As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 144 h. A leitura foi

realizada qualitativamente através de observação visual da mudança de coloração do indicador redox.

2.5 Avaliação da produção de biomassa celular, biossurfactantes e detecção de enzimas

A partir dos isolados pré-selecionados nos ensaios utilizando TTC, foram realizados ensaios para avaliar a capacidade de crescimento em borra oleosa como única fonte de carbono, capacidade de produção de biossurfactante e de enzimas. Para isto, os isolados foram crescidos em meio mineral mínimo MM1 (100 mL) contendo 1% de borra oleosa, em incubador rotatório a 100 rpm, 30°C durante 14 dias. O preparo do inóculo foi feito conforme descrito no item 2.4.1 com adição da etapa de esgotamento. Os ensaios controles consistiram de meio mineral adicionado da fonte de carbono sem inoculação de microrganismo.

As amostragens foram realizadas no tempo 0, 7 dias e 14 dias. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Anteriormente à realização das análises, as amostras coletadas contendo borra oleosa foram submetidas à separação de fases em funil de separação, sendo coletadas as amostras livres de óleo, com intuito de não haver interferência nas análises. Também foi testada a capacidade de utilização de glicerol como fonte de carbono.

2.5.1 Determinação da biomassa bacteriana

A biomassa bacteriana foi determinada indiretamente através da quantificação do conteúdo total de proteínas. A concentração de proteína no extrato celular foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

2.5.2 Avaliação da produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactante pelos isolados selecionados foi estimada pelo índice de emulsificação, redução da tensão superficial e medida do grau de hidrofobicidade.

2.5.2.1 Índice de emulsificação

A avaliação do índice de emulsificação foi realizada na presença e ausência de células no meio mineral (as células foram removidas por centrifugação a 9000 rpm durante 15 min a 4 °C). Uma alíquota de 2 mL de meio mineral foi agitada com querosene em tubos de vidro Pyrex de fundo chato (100 mm x 15 mm) usando agitador de tubos por 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24h e a atividade emulsificante foi determinada pela relação entre a altura de óleo emulsificado e a altura total (Cooper & Goldenberg, 1987; Bento et al., 2005b; Bento et al., 2008).

2.5.2.2 Medida da Tensão superficial

A medida da tensão superficial foi avaliada na ausência de células microbianas, utilizando medidor digital de tensão superficial (Gibertini, Milão, Itália), através do método da placa de Wilhelmy. Como padrões foram utilizados água destilada (72,1 mN. m⁻¹) e etanol (24 mN.m⁻¹).

2.5.2.3 Medida da hidrofobicidade celular

O grau de hidrofobicidade celular foi avaliado através de duas metodologias diferentes: medida de adesão a hidrocarbonetos (BATH) e o método de agregação salina (SAT).

A BATH foi determinada de acordo com método semelhante ao descrito por Rosenberg (1984). As células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato/uréia/Mg

- PUM [composição em g.L^{-1} : $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 22,2; KH_2PO_4 , 7,26; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; uréia 1,8 (pH 7,1)] e ressuspensas no mesmo tampão até obter densidade óptica entre 0,6 a 0,8 a 600nm. Uma alíquota de 2,4 mL de suspensão celular foi agitada com 0,4 mL de querosene ou octano em tubos de vidro Pirex (100 mm x 15 mm) usando agitador de tubos por 2 minutos. Os tubos foram mantidos em repouso durante 20 minutos para a separação de fases. A densidade ótica (DO) da fase aquosa foi então medida a 600nm. A hidrofobicidade foi expressa como a porcentagem de aderência ao hidrocarboneto calculado conforme segue: $100 \times [1 - (\text{DO da fase aquosa} / \text{DO da suspensão celular inicial})]$.

O SAT foi realizado conforme descrito por Pruthi & Cameotra (1997). O teste foi realizado em placas de poliestireno de 24 poços estéreis onde foram misturados 25 μL de suspensão bacteriana (aproximadamente 10^{10} UFC. mL^{-1}) e 25 μL de diferentes concentrações de sulfato de amônio (0,2 M a 4,0 M, diferindo por 0,2 M). Após a mistura, as placas foram levemente agitadas durante 2 minutos a 30°C, e a seguir, foram observadas quanto à formação de grumos contra uma superfície preta. Os resultados foram expressos como a menor molaridade de sulfato de amônio que promoveu a agregação bacteriana. Reação positiva para a agregação mostra uma solução clara e agregados brancos com diâmetro de aproximadamente 0,1 mm. Como controle positivo, todas as leituras são comparadas a reação de mais alta molaridade. A suspensão bacteriana misturada com 0,002 M de fosfato de sódio sem adição de sal é usado como controle negativo.

2.5.3 Atividades enzimáticas

Os extratos celulares foram centrifugados a 9000 rpm por 10 min a 4°C. As células foram lavadas com tampão fosfato 50 mM e centrifugadas a 9000 rpm por 10 min a 4°C. Este procedimento foi realizado duas vezes. A biomassa obtida foi ressuspensa em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0). Os extratos celulares foram

mantidos em banho de gelo e preparados por rompimento ultrassônico (20 kHz) através da aplicação de três ciclos de 40s, com intervalos de 1 minuto, com pulsos de 70 W cada, utilizando sonicador (550 Sonic Dismembrator, Fischer Scientific, Pittsburg). As células rompidas foram removidas por centrifugação e o sobrenadante foi usado como fonte de enzimas intracelular.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para reduzir 1 μmol de substrato por minuto por mg de proteína. Todas as atividades enzimáticas foram ajustadas às concentrações de proteínas totais para obter as atividades enzimáticas específicas.

A catecol 1,2 dioxigenase (C12DO) foi quantificada pela determinação da formação de *cis,cis*-muconato através do aumento de absorbância em espectrofotômetro a 260 nm, conforme descrito por Hegeman (1966).

A catecol 2,3 dioxigenase (C23DO) foi quantificada pela determinação da formação do produto 2- hidroximucônico semialdeído através do aumento da absorbância em espectrofotômetro a 375 nm, conforme descrito por Baggi et al (1987).

A protocatecol 3,4 dioxigenase (P34DO) foi quantificada pela formação de *cis*-muconato através da diminuição da absorbância em espectrofotômetro a 290nm, conforme descrito por Fujisawa & Hayaishi (1968).

A alcanol hidroxilase foi determinada de acordo com método descrito por Lee et al. (1996), através da diminuição da absorbância em espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade de atividade de alcanol hidroxilase corresponde à quantidade de enzima que oxida 1 μmol de NADH por minuto.

A concentração de proteína no extrato celular foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

2.5.4 Determinação do pH e condutividade

Ao longo do período experimental foram determinados o pH e a condutividade através de medidas em pHmetro digital (Digimed, DM-22) e condutímetro (Waterproof Conductivity EC/CF/TDS meter - EC1385), respectivamente. As leituras foram realizadas a temperatura ambiente.

2.6 Avaliação da tolerância dos microrganismos selecionados em diferentes concentrações de borra oleosa

Os isolados pré-selecionados foram testados quanto à capacidade de crescimento em meio mineral contendo as seguintes concentrações de borra oleosa: 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 15; 20; 30 e 50%. Os ensaios foram realizados em frascos de vidro, contendo meio mineral MM1 adicionado de TTC, inóculo e o contaminante nas diferentes concentrações, em um volume final de 15 mL. Os frascos foram mantidos em incubador rotatório a 30 °C, 100 rpm durante 14 dias. A avaliação da tolerância foi feita através da observação visual da mudança de coloração do indicador e a avaliação da viabilidade celular ao longo do tempo foi feita através da inoculação pontual de 10 µL dos ensaios em ágar nutriente. A análise de tolerância também foi realizada em placas de poliestireno de 96 poços estéreis, onde foram adicionados meio mineral MM1 adicionado de TTC, inóculo e contaminantes nas diferentes concentrações, em um volume final de 300µL. As placas foram mantidas em estufa a 30°C durante 14 dias. A análise foi feita através da mudança de coloração.

2.7 Identificação dos isolados bacterianos

Os isolados foram identificados com base no seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA. As bactérias foram crescidas em 10 ml de caldo nutriente à 37°C por 24 horas. O DNA genômico de cada cultivo foi extraído de um volume de 1,5 ml, de acordo com Sambrook & Roussel (2001) pela técnica de lise por brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) com pequenas modificações. Inicialmente, as culturas

foram recuperadas por centrifugação a 14000 rpm. As células foram lisadas com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e proteinase K (20 mg.ml⁻¹), seguida de incubação com CTAB 1% e posterior extração com 1 V de fenol:clorofórmio. O DNA foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e ressuspensão em 10 µl de água ultrapura. A preparação de DNA genômico foi tratada com RNase (10 mg.ml⁻¹) a 37°C por 1 hora. A integridade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% e posteriormente, o DNA foi armazenado a -20°C.

Os ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do gene 16S rRNA de cada isolado em estudo foi conduzido utilizando oligonucleotídeos universais correspondendo as posições 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). As reações foram preparadas utilizando 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo, 1,25 U de Go Taq DNA polimerase (Promega) e 1 µl de DNA genômico, totalizando 25 µl de reação de PCR. O controle negativo, preparado em paralelo, diferiu das demais reações apenas pela ausência de DNA genômico. As amplificações se deram nas seguintes condições: um ciclo a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 65°C por 1,3 min, 72°C por 1 min e um passo final de extensão a 72°C por 5 min. Os fragmentos gerados nas reações foram precipitados com o kit de RNA transportador (tRNA - Invitrogen). Para tanto, 1 µg de tRNA e 2,5 volumes de etanol absoluto (4°C) foram adicionados a cada reação de PCR e incubados a -20°C por 16 horas. Após centrifugação por 30 min e lavagem com etanol 70%, os DNAs foram ressuspensos em 18 µl de água ultrapura e armazenados a -20°C até a realização do seqüenciamento.

Os fragmentos amplificados e purificados por kit tRNA foram submetidos à reação de seqüenciamento automático utilizando o *Kit Dyanamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), no seqüenciador automático MEGABACE

1000, conforme manual do fabricante. Para a confirmação das seqüências de nucleotídeos do gene 16S, cada produto de amplificação foi seqüenciado em triplicata, utilizando os oligonucleotídeos específicos.

Os resultados do seqüenciamento foram processados utilizando o pacote de programas *Staden* (STADEN et al., 2003), sendo analisados no banco de dados a partir do algoritmo *Blastn* do programa BLAST/NCBI (ALTSCHUL et al., 1997).

2.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística empregando o teste de Tukey (comparação entre médias) a um nível de confiança de 95%, utilizando o programa *Statística 7.1*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento bacteriano

Para obter microrganismos tolerantes e com capacidade degradativa de hidrocarbonetos optou-se por utilizar amostras ambientais com histórico de contaminação através da técnica de enriquecimento seletivo. Em ambientes contaminados, a maior parte da microbiota adquire tolerância aos contaminantes devido à pressão natural ocasionada por aplicações sucessivas, utilizando o poluente como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo, bem como desenvolvendo aparato enzimático necessário à degradação destes poluentes. Com isto, a seleção inicial utilizando a técnica de enriquecimento seletivo possibilitou o isolamento de 11 bactérias do efluente (BE), 13 bactérias da borra oleosa (BB) e 21 bactérias do solo *Landfarming* (BS), totalizando 45 isolados.

3.2 Seleção preliminar de degradadores de hidrocarbonetos

Tendo em vista que as contaminações ambientais por hidrocarbonetos normalmente ocorrem na forma de misturas, torna-se interessante selecionar microrganismos que tenham a capacidade de degradar estes compostos, visando a sua futura aplicação em processos de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Assim, testou-se a atividade metabólica dos isolados na degradação de diferentes misturas de hidrocarbonetos, caracterizadas pela gasolina, diesel metropolitano com e sem aditivo, biodiesel de soja e borra oleosa petroquímica nas concentrações de 1 e 3%. A técnica que utiliza o indicador redox TTC se baseia na expressão da atividade metabólica através da degradação e utilização do contaminante como fonte de carbono e energia, onde este indicador serve como aceptor artificial de elétrons, em substituição ao oxigênio, necessário para a metabolização aeróbica do composto. Além disto, devido ao fato do preparo do inóculo ser realizado em meio rico, surgiu a hipótese de que os microrganismos poderiam estar utilizando suas reservas energéticas obtidas durante o cultivo neste meio. Neste caso, foi realizado um novo experimento onde, após a separação das células do meio rico e das lavagens com meio mineral, as células foram mantidas em meio mineral durante 24 h em incubador rotatório a 100 rpm e 30°C, objetivando esgotar estas reservas energéticas. Os experimentos foram realizados durante 144 h sendo avaliados em 18, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Os resultados obtidos nas diferentes concentrações e fontes de carbono estudadas para as bactérias isoladas de borra oleosa, solo *Landfarming* e efluente orgânico estão mostrados na Figura 1.

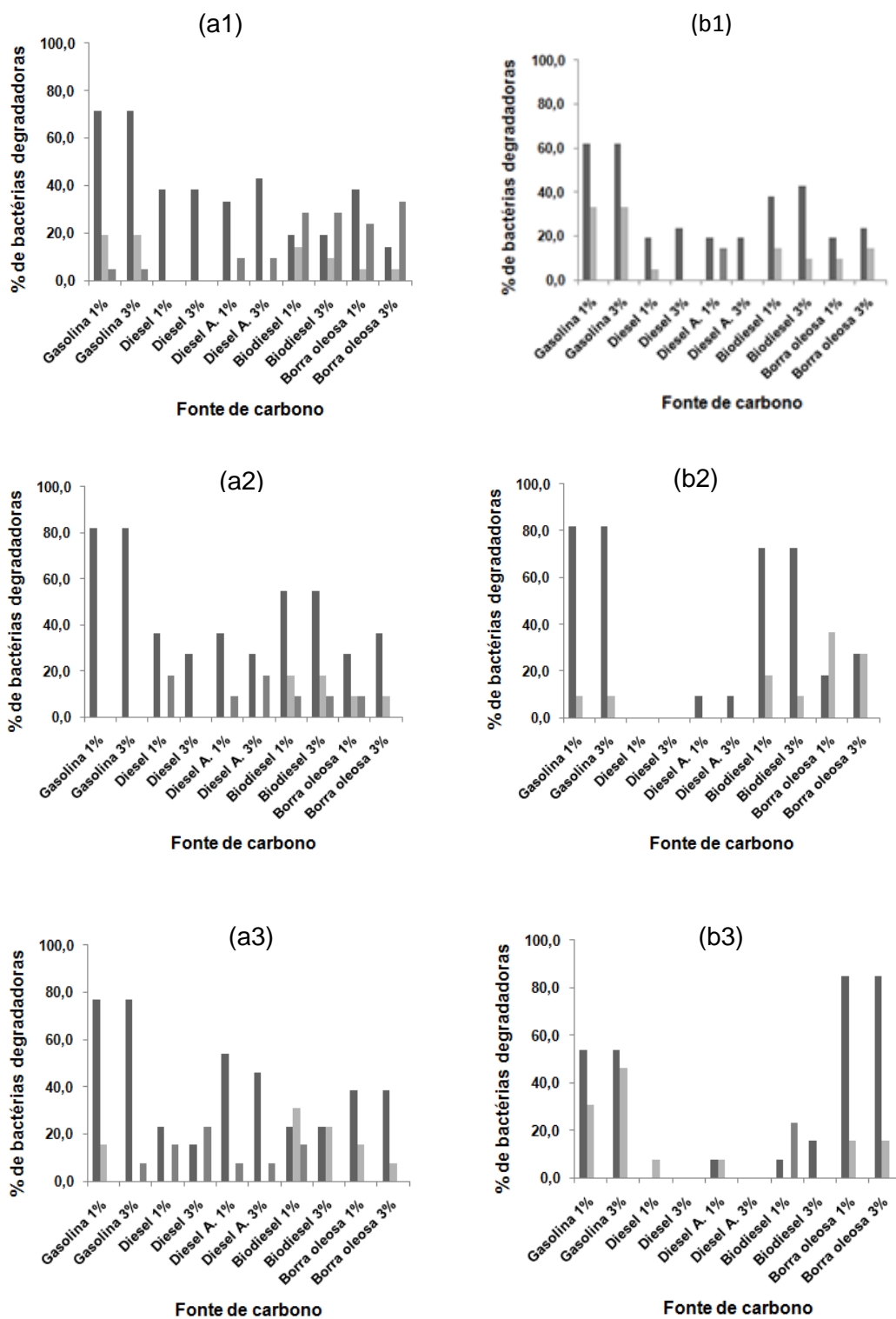


Figura 1: Porcentagem de bactérias degradadoras de diferentes fontes de carbono nas concentrações de 1% e 3% utilizando o indicador TTC em diferentes condições de preparo de inóculo. A: sem e B: com etapa prévia de esgotamento das reservas. 1: isolados do solo *Landfarming*, 2: isolados do efluente, 3: isolados da borra oleosa. ■ 18-48h. ■ 72-96h. ■ 120-144h. Diesel A.: diesel aditivado.

Os isolados mostraram comportamentos variados quanto à fonte de carbono e concentração, e tempo de viragem do indicador. Em relação à concentração de contaminante testada verificou-se comportamento semelhante entre 1 e 3% para todas as fontes de carbono testadas, mostrando habilidade de adaptação e metabolização do contaminante em concentrações maiores (3%) que a anteriormente utilizada (1%). Os isolados mostraram eficiência quanto à utilização das fontes de carbono, visto que utilizaram todas as fontes testadas, sendo a maioria utilizada nos períodos iniciais.

Considerando os 45 isolados cultivados sem etapa prévia de esgotamento (Figura 1a) foi verificado, em média, como ordem preferencial de utilização de fonte de carbono no tempo inicial de cultivo (18-48h) a gasolina, diesel metropolitano com aditivo, borra oleosa e diesel metropolitano sem aditivo, e biodiesel de soja. Em relação a etapa prévia de esgotamento (Figura 1b) foi verificado, em média, como ordem preferencial de utilização de fonte de carbono no tempo inicial de cultivo (18-48h) a gasolina, borra oleosa e biodiesel de soja, diesel metropolitano com aditivo, e diesel metropolitano sem aditivo.

Entre os contaminantes avaliados, a gasolina mostrou ser a mais prontamente utilizada pelos microrganismos quando testadas em diferentes concentrações e com e sem etapa prévia de esgotamento. A gasolina apresenta em sua constituição hidrocarbonetos de menor cadeia carbônica (normalmente de 4 a 12 átomos de carbono) quando comparada ao óleo diesel, que normalmente apresenta cadeia carbônica de 6 a 30 átomos de carbono. A degradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos apresenta uma seqüência preferencial de compostos a serem degradados, sendo os alifáticos mais rapidamente degradados, seguidos dos cicloalcanos e aromáticos. A composição da gasolina por ser mais “leve” favorece a degradação mais rápida frente aos demais compostos. O biodiesel de soja apresenta

maior degradabilidade frente ao óleo diesel puro, uma vez que é formado por ésteres de ácidos graxos, compostos mais facilmente degradados pelos microrganismos (Bucker et al., 2011). Em relação ao óleo diesel metropolitano, a presença do aditivo mostrou favorecer a degradação do composto. Isto pode ser explicado pelo fato de que os aditivos acrescidos nos combustíveis apresentam propriedades dispersante e detergente, características estas que atuam no favorecimento do ataque microbiano ao óleo pelo aumento da superfície de contato. Além disto, os aditivos apresentam-se como fontes extras de nutrientes (Bento & Gaylarde, 2001).

Quanto à utilização da fonte de carbono borra oleosa verificou-se que os isolados do solo e do efluente mostraram utilização mais rápida quando cultivada sem etapa prévia de esgotamento. No entanto, os microrganismos isolados da borra oleosa apresentaram degradação mais rápida quando cultivada com etapa prévia de esgotamento (84,6% dos isolados) quando comparado ao cultivo sem etapa prévia de esgotamento (38,5% dos isolados). Portanto, a redução de reservas energéticas promoveu a utilização do composto pelo microrganismo de forma mais rápida, provavelmente pelo menor tempo de expressão de genes catabólicos de degradação dos constituintes dos contaminantes.

A maioria dos isolados utilizaram as fontes de carbono no período entre 18 e 48h. Em estudos realizados por Khleifat (2006), a degradação de fenol por células de *Ewingella americana*, cultivadas em meio mineral adicionado de fenol com pré-etapa de esgotamento das reservas de 24h em meio mineral somente, mostrou ser mais rápida do que as células cultivadas sem esgotamento das reservas nas fases exponencial e estacionária, requerendo um menor tempo de adaptação. Geralmente, a resposta comum ao esgotamento das reservas de bactérias Gram negativas, por exemplo, é um aumento na sua capacidade de metabolizar e consumir os nutrientes do ambiente. As células cultivadas com pré-etapa de esgotamento das reservas são

mais sensíveis a toxicidade do contaminante, comparada às células sem esgotamento das reservas (Khleifat, 2006).

A fim de selecionar os microrganismos com maior capacidade de degradação de hidrocarbonetos foi considerado primeiramente aqueles que degradaram todas as fontes de carbono estudadas no período entre 18 e 48h de cultivo tanto nos experimentos com e sem etapa prévia de esgotamento. A partir disto foram selecionados 22% dos isolados, sendo 5 isolados do solo *Landfarming* (BS5, BS10, BS18, BS20, BS21), 2 do efluente orgânico (BE2 e BE11) e 3 da borra oleosa (BB5, BB6, BB8).

Tendo em vista que os microrganismos isolados da borra oleosa mostraram melhor desempenho nos tempos iniciais quando cultivado com etapa prévia de esgotamento e o objetivo do presente trabalho é selecionar microrganismos com capacidade de degradar a borra oleosa, foram selecionados os isolados que apresentaram degradação deste contaminante no tempo inicial de cultivo (18-48h) tanto nos experimentos com e sem etapa prévia de esgotamento. Assim, os isolados que degradaram a fonte borra oleosa foram: BS5, BS10, BS11, BS18, BS20, BS21, BE2, BE6, BE11, BB1, BB3, BB4, BB5, BB6, BB7, BB8, BB9, BB10, BB11, BB12.

Portanto, a partir dos dois critérios utilizados, foram selecionados para estudos posteriores de crescimento celular, avaliação de produção de biossurfactantes, produção de enzimas e capacidade de utilização de borra oleosa em diferentes concentrações, 20 isolados, sendo 6 isolados do solo, 3 do efluente e 11 da borra oleosa, os quais mostraram-se como potenciais degradadores de hidrocarbonetos.

3.3 Identificação dos isolados

Os microrganismos são extremamente diversos e podem sobreviver em ambientes inóspitos. Locais contaminados freqüentemente apresentam uma ampla comunidade microbiana a qual é capaz de utilizar o contaminante como fonte de carbono e energia (Singh & Lin, 2008).

A análise da seqüência parcial do gene 16S rRNA mostrou que dentre os microrganismos isolados selecionados a partir do solo *Landfarming* (BS) contaminado com borra oleosa quatro pertencem ao gênero *Bacillus*, um ao gênero *Pseudomonas* e um ao gênero *Stenotrophomonas* (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação das bactérias isoladas de borra oleosa (BB), solo *Landfarming* (BS) e efluente orgânico (BE).

Isolado	Identificação	Identidade	E-value
BS05	<i>Bacillus cereus</i> BS5	98%	0,00
BS10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> BS10	97%	2,00 E-87
BS11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%	0,00
BS18	<i>Bacillus megaterium</i> BS18	98%	0,00
BS20	<i>Bacillus cereus</i> BS20	98%	2,00E-151
BS21	<i>Bacillus thuringiensis</i> BS21	99%	7,00E-77
BE02	<i>Bacillus cereus</i> BE2	97%	2,00E-68
BE06	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	100%	9,00E-76
BE11	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> BE11	99%	0,00
BB01	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	99%	0,00
BB03	<i>Comamonas testosteroni</i>	99%	1,00E-128
BB04	<i>Ochrobactrum haemophilum</i>	99%	0,00
BB05	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> BB5	99%	0,00
BB06	<i>Bacillus megaterium</i> BB6	99%	0,00
BB07	<i>Bacillus cibi</i>	98%	0,00
BB08	<i>Bacillus thuringiensis</i> BB8	99%	0,00
BB09	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	0,00
BB10	<i>Cloacibacterium normanense</i>	99%	9,00E-153
BB11	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98%	6,00E-51
BB12	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> BB12	99%	9,00E-150

Diversos trabalhos têm demonstrado o isolamento de *Bacillus* em amostras de solos contaminados com hidrocarbonetos e sua potencialidade no tratamento de derrames de óleos (Bento et al., 2005a, Ijah & Antai, 2003, Nkwelang et al., 2008). Tem sido reportado que *Bacillus* sp. são mais tolerantes a altos níveis de hidrocarbonetos nos solos devido a seus endósporos resistentes. Em estudos realizados por Ijah & Antai (2003) citado por Singh & Lin (2008) foi verificado que *Bacillus* sp. predominou entre todas as bactérias utilizadoras de óleo cru caracterizadas de amostras de solo altamente poluídas. Em outro estudo avaliando a diversidade, abundância e sucessão de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos em solos poluídos com borra oleosa foram verificadas mudanças na diversidade e sucessão com variações sazonais (Nkwelang et al., 2008). Entre os principais gêneros de bactérias nos solos poluídos estavam *Pseudomonas* e *Bacillus*, sendo que estas se apresentaram no solo poluído ao longo do período experimental independentemente da estação. Em trabalho realizado por Morelli et al. (2005), os quais avaliaram as mudanças da população bacteriana durante processo de biorremediação de solos contaminados com borra oleosa em laboratório, foi verificado que bactérias do gênero *Pseudomonas* foi o principal componente da população degradadora de hidrocarbonetos, havendo aumento significativo com o aumento da concentração de borra no sistema. O sistema solo contendo 2,5% de borra oleosa mostrou uma maior diversidade em gêneros entre as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, sendo as predominantes *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium* e *Comamonas*. No sistema solo contendo 5% de borra os gêneros predominantes foram *Alcaligenes* e *Pseudomonas* e no sistema solo contendo 10% de borra os gêneros predominantes foram *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Chryseomonas*, e *Pasteurella*. Em estudo realizado por Kataoka (2001) citado por De Moraes e Tauk-Tornisielo (2009) foram isoladas de amostras de solo

impactadas com hidrocarbonetos de petróleo os microrganismos *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus* e *Ochrobactrum anthropi*.

No presente trabalho, os isolados da borra oleosa (BB) mostraram pertencer aos gêneros *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Cloacibacterium* e *Staphylococcus*.

Tem sido reportado que cepas de *Comamonas testosteroni* são degradadoras de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Em trabalhos realizados por Hollender et al. (1994) foi verificado que *C. testosteroni* isolada de lodo ativado foi capaz de mineralizar completamente uma mistura de 4-clorofenol e 4-metilfenol em meio líquido.

Em trabalho realizado por Arulazhagan & Vasudevan (2010) foi isolado de ambiente contaminado com petróleo cepa de *Ochrobactrum* sp. a qual foi capaz de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de baixa e alta massa molecular cultivada em condições salinas.

A partir da amostra de borra oleosa foi possível isolar uma cepa de *Cloacibacterium normanense*. Até o momento, não há relatos na literatura sobre a capacidade deste microrganismo em degradar hidrocarbonetos. O primeiro relato foi o isolamento e identificação de *C. normanense* de efluentes municipais em Norman, Estados Unidos (Allen et al., 2006). Não há relatos na literatura sobre capacidade de degradação de hidrocarbonetos.

Outro resultado importante foi o isolamento de *Bacillus cibi* de borra oleosa. Poucos relatos na literatura foram encontrados sobre *Bacillus cibi*, sendo este microrganismo isolado de água do mar (Khaneja et al., 2010) e de fezes humanas para o estudo de produção de biocompostos (Duc et al., 2006). Não há dados na literatura sobre sua capacidade de degradação de hidrocarbonetos.

Em relação aos isolados do efluente orgânico (BE) foi observado que esses pertencem aos gêneros, *Bacillus*, *Sphingobacterium* e *Stenotrophomonas*.

Em estudos realizados por Carvalho et al. (2002) foram isoladas por enriquecimento seletivo de sedimentos contendo efluentes químicos industriais cepas de *Sphingobacterium multivorum* capazes de degradar aerobicamente fluorobenzeno. Os compostos fluorados são mais resistentes a degradação microbiana quando comparado a outros compostos químicos halogenados.

Stenotrophomonas maltophilia tem sido reportada como eficiente degradadora de hidrocarbonetos, em especial, fenantreno, fluoranteno, criseno, benzoantraceno, benzopireno e dibenzoantraceno (Kim et al., 2009).

3.3 Avaliação do crescimento celular, produção de biossurfactantes e detecção de enzimas

Para avaliar a cinética bacteriana, produção de biossurfactantes e detecção da produção de enzimas foram conduzidos ensaios em meio líquido contendo borra oleosa durante 14 dias, sendo feitas amostragens nos períodos 0, 7 e 14 dias. A determinação da concentração celular foi feita de acordo com Bradford (1986) através da medida da quantidade de proteínas totais, e os resultados obtidos para os 20 isolados selecionados estão mostrados na Figura 2.

As curvas de crescimento mostraram que a maioria dos isolados apresentaram comportamentos semelhantes ao longo do tempo. A concentração de proteínas totais máxima alcançada foi de 0,277 mg.mL⁻¹ para o isolado *Bacillus cibi* ao final de 14 dias de experimento. Além deste, as maiores concentrações de proteínas foram alcançadas em 14 dias com os isolados *P. aeruginosa* (0,153 mg.mL⁻¹), *B. cereus* BS20 (0,116 mg.mL⁻¹) e *S. acidaminiphila* BB5 (0,112 mg.mL⁻¹), e em 7 dias para *B. thuringiensis* BS21(0,109 mg.mL⁻¹).

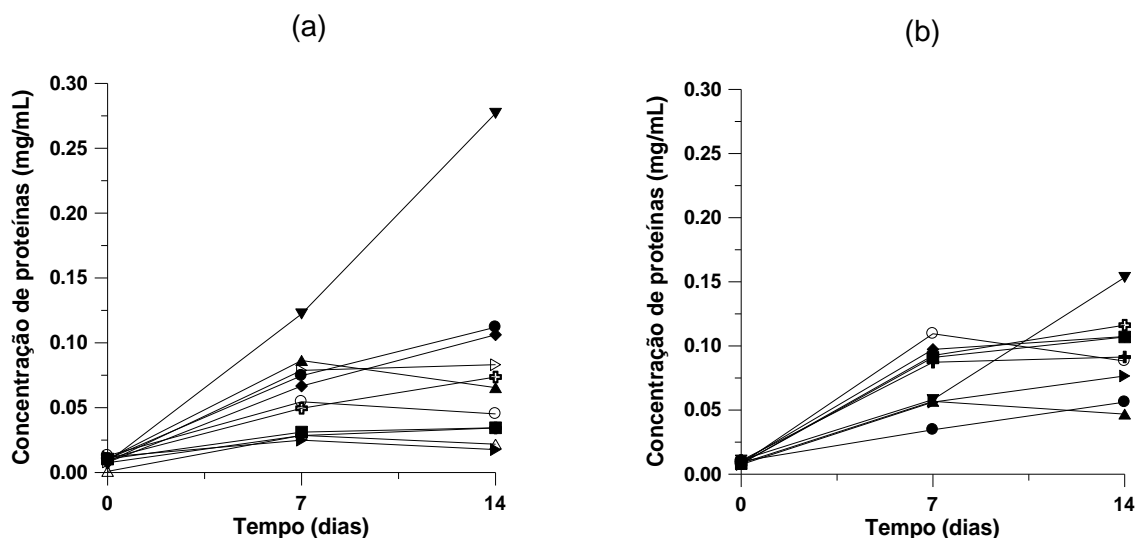


Figura 2: Curvas de crescimento bacteriano de 20 isolados cultivados em borra oleosa. (a) Isolados da borra oleosa + *P. nitroreducens*, ◆ *C. testosteroni*, ■ *O. haemophilum*, ● *S. acidaminiphila* BB5, ▲ *B. megaterium* BB6, ▼ *B. cibi*, ► *B. thuringiensis* BB8, ⊕ *B. subtilis*, ○ *C. normanense*, △ *S. saprophyticus*, ▷ *S. acidaminiphila* BB12. (b) Isolados do solo e efluente + *B. cereus* BE2, ◆ *S. multivorum*, ■ *S. maltophilia* BE11, ● *B. cereus* BS5, ▲ *S. maltophilia* BS10, ▼ *P. aeruginosa*, ► *B. megaterium* BS18, ⊕ *B. cereus* BS20, ○ *B. thuringiensis* BS21. Controles: Borra 0,002 mg.mL⁻¹.

Em estudos realizados por Wong et al., 2002, os quais avaliaram a capacidade de crescimento de bactérias, isoladas de solo contaminado com hidrocarbonetos, em meio líquido contendo diferentes concentrações de fenantreno durante 16 dias, foi observado que com o aumento da concentração do contaminante no meio havia maior crescimento bacteriano, alcançando valores próximos a 0,15, 0,25 e 0,35 mg.mL⁻¹ para concentrações de fenantreno de 100, 500 e 1000 mg.L⁻¹, respectivamente, em 5 dias de cultivo.

A concentração de 1% de borra oleosa no meio líquido possibilitou o crescimento dos microrganismos isolados, mostrando ser utilizada como única fonte de carbono para a produção de biomassa celular. A utilização de borra oleosa como fonte alternativa de carbono e energia para os microrganismos se torna uma

alternativa favorável ambientalmente, visto que este resíduo é altamente recalcitrante caracterizado como uma mistura complexa de hidrocarbonetos, apresentando frações alifáticas, resinas e asfaltenos, e principalmente aromáticos.

3.4 Produção de biossurfactantes e detecção de enzimas

Para a detecção de biossurfactantes foram aplicados diferentes testes: tensão superficial, atividade emulsificante em querosene e grau de hidrofobicidade celular.

O grau de hidrofobicidade celular foi avaliado através de duas metodologias, o método de agregação salina (SAT) e a medida de adesão a hidrocarbonetos (BATH). A hidrofobicidade é um importante fator na adesão inicial de microrganismos em interfaces entre a fase aquosa e hidrofóbica. Algumas espécies de bactérias são capazes de degradar hidrocarbonetos líquidos após aderência a superfícies de gotas. Este contato direto entre uma célula bacteriana e um hidrocarboneto alvo pode aumentar significativamente a taxa de difusão na célula, aumentando assim o crescimento e a taxa aparente de dissolução do hidrocarboneto (Vasileva-Tonkova & Gesheva, 2004).

Para avaliar a hidrofobicidade celular pelo método BATH foram empregados querosene e octano. Os resultados obtidos para a hidrofobicidade celular estão mostrados na Tabela 2. Maiores taxas de hidrofobicidade foram consideradas aquelas maiores de 40% (Vasileva-Tonkova & Gesheva, 2004). Foi observado que os isolados apresentaram comportamentos distintos entre os compostos testados. Em relação ao querosene, os valores encontraram-se entre 5,6 e 46,5%, sendo o máximo obtido com o isolado *Stenotrophomonas maltophilia* BE11 e com *Stenotrophomonas acidaminiphila* BB5. Em relação ao octano, os valores encontraram-se entre 9,4 e 34,8%, sendo o máximo obtido com o isolado *Sphingobacterium multivorum*, seguido

do isolado *Bacillus cereus* BE2 (34%). Vasileva-Tonkova & Gesheva (2004) obtiveram valores de hidrofobicidade frente ao heptano entre 7,6 e 85,6% durante o cultivo de diferentes isolados do solo em meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono. Pruthi & Cameotra (1997) verificaram que *Acinetobacter calcoaceticus* quando cultivada em meio mineral acrescido de hexadecano mostrou valores de hidrofobicidade de 32, 27 e 16% frente à hexadecano, dodecano e pristano, respectivamente, valores maiores quando comparado a outros isolados cultivados nas mesmas condições, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus laterosporous*.

A medida de hidrofobicidade pelo método de agregação salina (SAT) é originalmente baseada em um método postulado para proteínas para medir a hidrofobicidade celular relativa de células bacterianas. Quanto mais hidrofóbica a superfície celular menor é a concentração salina requerida para agregar as células (Pruthi & Cameotra, 1997). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 2), verifica-se que os isolados *S. acidaminiphila* BB5, *B. cereus* BS20 e *B. thuringiensis* BS21 se destacaram por apresentarem agregação em sulfato de amônio em concentrações de 0,2M. A medida de hidrofobicidade avalia o grau de hidrofobicidade da superfície celular através da porcentagem de células aderidas a compostos hidrofóbicos, sendo, portanto um indicativo da produção de biossurfactantes, que pode facilitar a entrada dos hidrocarbonetos hidrofóbicos para dentro da célula para serem degradados. O conhecimento das propriedades de superfície da bactéria é importante na determinação da taxa de bactéria adicionada no ambiente contaminado, como por exemplo, solo por causa de sua influência no transporte vertical, distribuição e sobrevivência (Vasileva-Tonkova & Gesheva, 2004).

Foram analisadas as medidas de tensão superficial ao longo de 14 dias de processo. Os valores mínimos alcançados para a tensão superficial durante os 14 dias

variaram entre 39,4 e 48,8 mN.m^{-1} (Tabela 2). Redução acima de 20% da tensão superficial inicial foi considerada bom produtor de biossurfactante ($\text{TS} < 45,7 \text{ mN.m}^{-1}$). Os isolados *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cibi* mostraram produzir biossurfactantes, quando comparado aos demais, pois reduziram a tensão superficial do meio MM1 de 57,1 mN.m^{-1} para valores de 40,0 mN.m^{-1} e 39,4 mN.m^{-1} em 7 e 14 dias de processo, respectivamente.

Tabela 2: Hidrofobicidade celular em relação à querosene e octano através do método da medida da aderência microbiana a hidrocarbonetos (BATH) e através do método de Agregação Salina (SAT) e medida da atividade emulsificante (AE) na ausência (ac) e presença (pc) de células aos 14 dias de experimento e valores de mínima tensão superficial (TS) durante os 14 dias.

Isolado	Hidrofobicidade (%)			TS (mN.m^{-1})	AEac (%)	AEpc (%)
	BATH (%)		SAT (M)			
	Querosene	Octano				
<i>P.nitroreducens</i>	15,7	13,0	3,6	44,8	12,0	17,9
<i>C. testosteroni</i>	10,3	18,9	3,4	43,3	0,0	0,0
<i>O.haemophilum</i>	29,3	28,7	2,0	42,2	0,0	0,0
<i>S.acidaminiphila</i> BB5	40,0	11,8	0,2	42,3	19,2	12,0
<i>B. megaterium</i> BB6	16,2	18,6	1,8	41,9	22,2	21,7
<i>B. cibi</i>	36,2	11,7	2,0	39,4	40,0	32,1
<i>B. thuringiensis</i> BB8	7,0	11,9	1,8	45,2	0,0	0,0
<i>B. subtilis</i>	5,6	9,4	0,0	44,0	14,8	18,5
<i>C.normanense</i>	16,8	20,9	1,4	42,5	4,0	7,7
<i>S.saprophyticus</i>	25,3	25,7	1,4	44,4	0,0	0,0
<i>S.acidaminiphila</i> BB12	21,9	20,3	2,0	48,8	11,1	17,9
<i>B. cereus</i> BE2	20,6	34,0	1,8	47,3	0,0	0,0
<i>S. multivorum</i>	28,2	34,8	2,0	43,4	10,3	11,5
<i>S. maltophilia</i> BE11	46,5	21,2	1,2	41,0	4,0	12,0
<i>B. cereus</i> BS5	7,2	18,3	3,8	47,2	8,0	17,2
<i>S. maltophilia</i> BS10	19,6	21,9	1,8	44,3	3,8	11,1
<i>P. aeruginosa</i>	18,8	19,7	1,6	40,0	23,7	21,1
<i>B. megaterium</i> BS18	6,8	13,2	3,4	48,3	3,6	4,0
<i>B. cereus</i> BS20	30,0	26,7	0,2	42,0	20,0	24,1
<i>B. thuringiensis</i> BS21	21,7	24,9	0,2	44,6	0,0	0,0
Controle				57,1	0,0	0,0

Atividade emulsificante (AE) foi detectada apenas aos 14 dias para os isolados estudados. Os isolados *Bacillus megaterium* BB6, *Bacillus cibi*, provenientes da borra oleosa, e *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* BS20, provenientes do solo *Landfarming* mostraram-se como as mais eficientes produtoras de emulsão comparada às demais (AE>20%).

Alguns isolados mostraram capacidade de reduzir a tensão superficial do meio MM1, no entanto não apresentaram atividade emulsificante. Provavelmente isto se deve ao tipo de biossurfactante produzido. Os biossurfactantes podem ser divididos em duas grandes categorias em função do peso molecular. Os surfactantes de baixo peso molecular apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial, quando presentes em meio aquoso. Os surfactantes de alto peso molecular, chamados de bioemulsificantes, são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão, porém não causam necessariamente a redução da tensão superficial, pois podem não apresentar composição anfipática, ou seja, uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica (Bento et al., 2008). Os bioemulsificantes são também considerados uma subclasse de surfactantes que estabilizam dispersões de um líquido em outro, como por exemplo as emulsões de óleo em água (Bento et al., 2008). Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, freqüentemente bactérias, têm desenvolvido diferentes adaptações para a utilização de substratos pouco solúveis. A maioria deles produzem biossurfactantes, moléculas anfifílicas de diversas naturezas química e tamanho molecular e com efetivas propriedades biológicas, que ajudam a dispersar os hidrocarbonetos, aumentando a área superficial de substratos hidrofóbicos insolúveis em água e sua biodisponibilidade, estimulando assim o crescimento bacteriano e a taxa de biodegradação (Vasileva-Tonkova & Gesheva, 2004, Das & Mukherjee, 2007).

Cinco isolados, *Stenotrophomonas acidaminiphila* BB5, *Bacillus megaterium* BB6, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* BS20, mostraram ser os mais potentes produtores de biossurfactantes (Tabela 2).

Foram também realizados ensaios para a detecção da expressão de enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos durante o crescimento dos isolados em borra oleosa petroquímica. A borra oleosa é uma mistura complexa de alcanos saturados, cicloalcanos, aromáticos, metais pesados, e asfaltenos. Em relação à degradação da fração alifática, em especial, os alcanos, as primeiras enzimas envolvidas no processo são as monooxigenases, a qual introduz um grupo hidroxila na cadeia alifática, levando a formação de alcoóis. Os principais intermediários da degradação de alcanos são ácidos graxos, os quais podem ser decompostos por rotas biossintéticas típicas de degradação de ácidos carboxílicos, em que a molécula é quebrada em ácidos menores. Ácidos graxos podem servir como fontes de carbono para bactérias de uma comunidade, podendo aumentar o índice de degradação de hidrocarbonetos. Em relação aos compostos aromáticos, diferentes rotas de biodegradação têm sido demonstradas, onde o metabolismo pode iniciar-se pela atividade enzimática de uma monooxigenase ou dioxigenase, havendo a adição de um ou dois átomos de oxigênio no substrato. A molécula é oxidada formando um diol, havendo a subsequente clivagem do anel (Vasconcellos, 2006). As vias de biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos podem formar como intermediário central o protocatecol, o gentisato ou na maioria dos casos o catecol, o qual é tipicamente clivado por dioxigenases por via orto (via também conhecida como β -ceto adipato), realizada pela enzima catecol 1,2 dioxigenase formando cis-cis-muconato, ou por via meta, realizada pela enzima catecol 2,3 dioxigenase, formando 2-hidroximucônico semialdeído (Dhote et al, 2010, Jacques et al, 2007, Loh & Chua, 2002). Na via orto, ligações covalentes são clivadas entre dois carbonos hidroxil

substituídos, C1 e C2, enquanto na via meta, ligações covalentes são quebradas entre o carbono hidroxil substituído, C2, e o carbono adjacente a ele, C3. Tanto as vias meta ou orto, mas não ambas, tipicamente ocorrem em algumas espécies bacterianas para o metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos (Husain, 2008).

A fim de verificar a presença das enzimas alcano hidroxilase e determinar a via de degradação dos compostos aromáticos através da detecção do intermediário da clivagem do anel (catecol ou protocatecol) e se a borra foi degradada através de clivagem orto ou meta, ensaios enzimáticos foram realizados com os extratos celulares crus dos isolados crescendo em borra oleosa na concentração de 1% no período de 14 dias (Tabela 3).

A enzima alcano hidroxilase foi detectada para a maioria dos isolados, sendo os mais altos valores encontrados para *O. haemophilum* (0,0903 U.mg⁻¹), *B. megaterium* BB6 (0,0420 U.mg⁻¹) e *S. maltophilia* BS10 (0,0418 U.mg⁻¹). Os isolados *P. nitroreducens* e *P. aeruginosa* apresentaram valores de 0,0228 U.mg⁻¹ e 0,0171 U.mg⁻¹, respectivamente. Estes dados corroboram com estudos realizados por Lee et al (1996) sobre expressão de alcano hidroxilase em *Pseudomonas maltophilia* cultivada em meio mineral acrescido de alcanos, onde foi observado atividade específica da enzima alcano hidroxilase de 0,0116 U.mg⁻¹. Fennewald & Shapiro (1977), em estudo com diversos isolados de *Pseudomonas putida* para avaliação da expressão de enzima alcano hidroxilase em diferentes substratos (octano, decano e nonanol), observaram maiores atividades quando a bactéria foi exposta ao octano como indutor, alcançando valores entre 0,00041 e 0,00286 U.mg⁻¹.

No presente estudo foram obtidos valores mais elevados de alcano hidroxilase que pode estar relacionado ao fato de que na borra oleosa há uma maior diversidade de alcanos agindo como indutores específicos desta enzima.

A maioria dos isolados não apresentaram atividade da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase (P34DO), mostrando que a degradação dos compostos aromáticos presentes na borra oleosa ocorreu tendo como metabólito central o catecol. Apenas os isolados *B. megaterium* BB6 e *B. cibi* apresentaram atividade da enzima P34DO.

Tabela 3: Resultados de pH, condutividade elétrica, atividades da catecol 1,2 dioxigenase (C12DO), catecol 2,3 dioxigenase (C2,3DO), protocatecol (P34DO) e alceno hidroxilase (AlcH) após 14 dias de cultivo dos isolados em meio mineral contendo 1% de borra oleosa. nd: não detectado. C.(Bo)= Controle borra

Isolados	pH	Cond. (mS.cm ⁻¹)	C12DO (U.mg ⁻¹)	C23DO (U.mg ⁻¹)	P34DO (U.mg ⁻¹)	AlcH (U.mg ⁻¹)
<i>P.nitroreducens</i>	6,82	7,71	0,0069	0,0178	nd	0,0228
<i>C. testosteroni</i>	6,85	7,58	0,0126	nd	nd	0,0218
<i>O.haemophilum</i>	7,04	7,64	0,0637	0,0626	nd	0,0903
<i>S.acidaminiphila</i> BB5	6,95	7,51	0,0043	0,0335	nd	0,0059
<i>B. megaterium</i> BB6	6,96	7,60	0,0094	0,0300	0,0008	0,0420
<i>B. cibi</i>	6,01	7,20	0,0006	0,0031	0,0005	nd
<i>B. thuringiensis</i> BB8	6,98	7,61	0,0029	0,0530	nd	0,0244
<i>B. subtilis</i>	6,87	7,57	0,0123	0,0224	nd	0,0133
<i>C.normanense</i>	6,81	7,49	0,0024	nd	nd	0,0227
<i>S.saprophyticus</i>	6,90	7,41	0,0201	nd	nd	0,0395
<i>S.acidaminiphila</i> BB12	6,86	7,55	0,0169	0,0052	nd	nd
<i>B. cereus</i> BE2	6,99	7,96	0,0083	nd	nd	0,0332
<i>S. multivorum</i>	7,01	7,76	0,0083	0,0185	nd	0,0213
<i>S. maltophilia</i> BE11	6,82	7,50	0,0029	0,0254	nd	0,0036
<i>B. cereus</i> BS5	6,82	7,51	0,0165	nd	nd	nd
<i>S. maltophilia</i> BS10	6,91	7,55	0,0095	nd	nd	0,0418
<i>P. aeruginosa</i>	6,93	7,55	0,0014	0,0160	nd	0,0171
<i>B. megaterium</i> BS18	6,77	7,49	0,0011	0,0081	nd	nd
<i>B. cereus</i> BS20	7,04	7,72	0,0080	0,0485	nd	0,0283
<i>B. thuringiensis</i> BS21	6,88	7,79	0,0080	0,0224	nd	0,0149
Controle	6,93	7,63	nd	nd	nd	nd

Os isolados *O. haemophilum* (0,0637 U.mg⁻¹) e *S. saprophyticus* (0,0201 U.mg⁻¹) apresentaram maior atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase (C12DO). Foi detectada a enzima C12DO em todos os isolados cultivados em meio contendo borra oleosa como única fonte de carbono, mostrando que os isolados utilizaram a via orto de degradação do catecol.

Os isolados *O. haemophilum* (0,0626 U.mg⁻¹), *B. thuringiensis* BB8 (0,0530 U.mg⁻¹) e *B. cereus* BS20 (0,0485 U.mg⁻¹) apresentaram os mais altos valores de atividade da enzima catecol 2,3 dioxigenase (C23DO). Nos isolados *C. testosteroni*, *C. normanense*, *S. saprophyticus*, *B. cereus* BE2, *B. cereus* BS5 e *S. maltophilia* BS10 não foram detectadas as atividades das enzimas catecol 2,3 dioxigenase e protocatecol 3,4 dioxigenase, indicando utilizarem a via orto para a degradação do catecol.

Foi verificado que a maioria dos isolados apresentaram atividades tanto para a catecol 1,2 dioxigenase como para a catecol 2,3 dioxigenase. Este fato também foi verificado por Guzik et al (2009) ao estudar a atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase, catecol 2,3 dioxigenase, protocatecol 3,4 dioxigenase e protocatecol 4,5 dioxigenase em extratos livres de células de *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 crescendo em compostos aromáticos (fenol, catecol, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido 3,4 dihidroxibenzóico, ácido vanílico e ácido benzóico) na concentração de 3mM. Estes autores citam que dependendo da estrutura do indutor, várias dioxigenases foram induzidas para a cepa *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. Os resultados sugerem que esta cepa apresenta três principais rotas metabólicas para degradar compostos aromáticos. A existência de duas rotas metabólicas diferentes para a quebra aromática dos compostos é agora bem estabelecida em bactérias. A presença de diferentes rotas metabólicas de degradação é interessante visto que aumenta o

potencial de biodegradação pela cepa tornando-a ferramenta para combater o aumento da poluição ambiental.

Com base no exposto, no presente estudo foi observado que diversos isolados do solo, efluente e borra oleosa mostraram a capacidade de produzir duas ou mais enzimas de degradação, mostrando serem potenciais degradadoras de hidrocarbonetos contidas no resíduo petroquímico, borra oleosa.

3.5 Avaliação da capacidade degradativa em diferentes concentrações de borra oleosa

A capacidade de degradação de diferentes concentrações de borra oleosa foram testadas utilizando o indicador redox TTC (Tabela 4). A maioria dos isolados mostraram maior intensidade de cor nas concentrações de 4, 6 e 10% de borra oleosa no meio MM1.

As bactérias *B. megaterium* BB6, *B. cibi*, *S. saprophyticus*, *B. cereus* BE2, *S. multivorum*, *S. maltophilia* BE11, *B. cereus* BS5, *S. maltophilia* BS10, *B. megaterium* BS18 e *B. cereus* BS20 mostraram redução do indicador até a concentração de 30% de borra oleosa. Estes isolados mostraram maiores capacidades de sobrevivência, tolerância e degradação em ambientes altamente contaminados.

Através da análise qualitativa de detecção de crescimento microbiano foi possível verificar resultados positivos ao longo dos 14 dias para todas as concentrações testadas para todos isolados estudados. Embora tenham apresentado capacidade de crescimento no meio, alguns isolados não apresentaram a capacidade de degradar o composto. Na concentração mais alta testada (50%) nenhum isolado foi capaz de degradar a borra, embora tenham apresentado crescimento positivo (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação da tolerância dos microrganismos selecionados em diferentes concentrações de borra oleosa ao longo de 14 dias de processo.

Isolados	Concentração (%)										Contagem de células viáveis (NMP/mL)
	0,5	1	2	4	6	10	15	20	30	50	
<i>P.nitroreducens</i>	-	*	*	**	****	***	**	*	-	-	$1,2 \times 10^7$
<i>C. testosteroni</i>	*	*	**	****	****	***	**	*	-	-	$2,4 \times 10^6$
<i>O.haemophilum</i>	*	*	**	***	****	***	**	*	-	-	$5,4 \times 10^6$
<i>S.acidaminiphila</i> BB5	*	*	***	***	**	**	*	*	-	-	$4,4 \times 10^8$
<i>B. megaterium</i> BB6	*	*	**	**	**	***	**	*	*	-	$4,1 \times 10^9$
<i>B. cibi</i>	*	*	**	***	***	***	**	*	*	-	$4,1 \times 10^7$
<i>B. thuringiensis</i> BB8	*	*	**	***	****	**	*	-	-	-	$3,2 \times 10^7$
<i>B. subtilis</i>	*	*	**	**	***	**	*	-	-	-	$1,8 \times 10^8$
<i>C.normanense</i>	-	*	*	**	***	**	-	-	-	-	$1,8 \times 10^8$
<i>S.saprophyticus</i>	**	**	**	***	***	***	**	*	*	-	$7,0 \times 10^8$
<i>S.acidaminiphila</i> BB12	**	**	**	***	***	**	*	-	-	-	$2,8 \times 10^8$
<i>B. cereus</i> BE2	*	*	**	***	***	**	**	**	*	-	$6,6 \times 10^6$
<i>S. multivorum</i>	**	**	****	****	***	***	**	**	*	-	$2,0 \times 10^5$
<i>S. maltophilia</i> BE11	*	*	**	***	***	**	**	**	*	-	$1,09 \times 10^7$
<i>B. cereus</i> BS5	-	*	**	***	****	***	***	***	*	-	$7,40 \times 10^7$
<i>S. maltophilia</i> BS10	-	*	**	***	***	***	**	**	*	-	$9,80 \times 10^7$
<i>P. aeruginosa</i>	*	*	**	***	**	*	-	-	-	-	$6,50 \times 10^8$
<i>B. megaterium</i> BS18	*	*	**	***	***	**	**	*	*	-	$1,22 \times 10^8$
<i>B. cereus</i> BS20	*	*	*	**	***	**	**	*	*	-	$5,20 \times 10^8$
<i>B. thuringiensis</i> BS21	*	*	***	***	**	**	*	-	-	-	$3,6 \times 10^6$

Simbologia indica intensidade de cor : (-) resultado negativo; asteriscos representam resultados positivos (*) menor intensidade e (****) maior intensidade.

3.6 Efeito da adição de glicerol como co-substrato no crescimento e produção de biossurfactantes em meio de cultivo contendo borra oleosa

A capacidade de utilização de glicerol como co-substrato foi estudada. O glicerol é um poliálcool caracterizado como um composto de cadeia aberta, e portanto

um composto com maior facilidade de ataque e utilização metabólica pelo microrganismo. A utilização de co-substratos tende a favorecer o crescimento microbiano e a produção de diversos metabólitos secundários. Diversos compostos têm sido testados, tais como glicose, sacarose, maltose, extrato de levedura, glicerol, óleos vegetais e vários resíduos agroindustriais para a produção de biomassa celular (Kim et al., 2003; Das et al., 2009). O glicerol tem sido muito utilizado como substrato em processos fermentativos, pois pode ser recuperado como um subproduto quando os óleos são saponificados no processo de fabricação industrial de sabão, ou separado diretamente de gorduras na produção de ácidos graxos (Arruda et al, 2007). A borra oleosa é caracterizada por apresentar em sua composição principalmente hidrocarbonetos aromáticos que são compostos de maior persistência no ambiente e de mais difícil degradação. A utilização de co-substratos visando maior taxa de degradação faz-se interessante.

A Figura 3 mostra as curvas de produção de proteínas totais para os isolados cultivados em meio com glicerol e borra oleosa (G+B) e em meio contendo apenas glicerol (G). As curvas de crescimento mostraram que os isolados apresentaram comportamentos distintos quanto às fontes de carbono utilizadas. Com relação à máxima produção de proteínas obtida para cada isolado, foi possível observar que 40% dos isolados obtiveram máxima proteína ao serem cultivados em borra e glicerol, 40% cultivados em glicerol somente, e 20% quando cultivados em borra oleosa somente.

Em relação aos cultivos em meio contendo glicerol e borra oleosa, a máxima produção de proteínas (0,297 mg.mL⁻¹) foi alcançada em 14 dias para o isolado *B. cibi*, o qual apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais ($p < 0,05$). Os isolados *P.aeruginosa* e *B. cereus* BS20 também apresentaram

elevada produção de biomassa 0,258 e 0,205 mg.mL⁻¹, respectivamente, mostrando diferença estatística entre eles ($p < 0,05$).

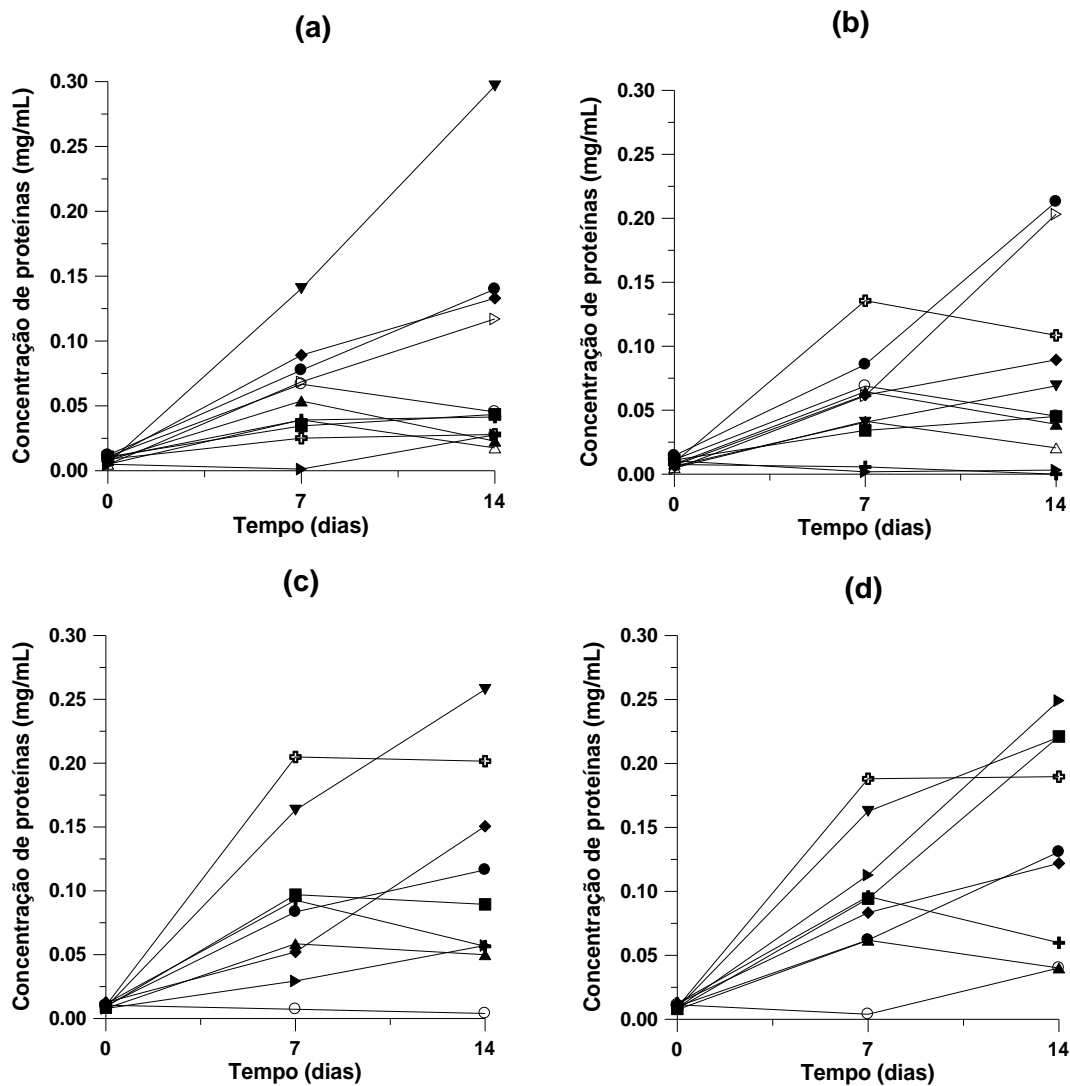


Figura 3: Curvas de crescimento bacteriano de 20 isolados. Isolados da borra oleosa (a) cultivo em glicerol e borra oleosa, (b) cultivo em glicerol. + *P. nitroreducens*, ◆ *C. testosteroni*, ■ *O. haemophilum*, ● *S. acidaminiphila* BB5, ▲ *B. megaterium* BB6, ▼ *B. cibi*, ► *B. thuringiensis* BB8, ⊕ *B. subtilis*, ○ *C. normanense*, △ *S. saprophyticus*, ▷ *S. acidaminiphila* BB12. Isolados do solo e efluente (c) cultivo em glicerol e borra oleosa, (d) cultivo em glicerol. + *B. cereus* BE2, ◆ *S. multivorum*, ■ *S. maltophilia* BE11, ● *B. cereus* BS5, ▲ *S. maltophilia* BS10, ▼ *P. aeruginosa*, ► *B. megaterium* BS18, ⊕ *B. cereus* BS20, ○ *B. thuringiensis* BS21. Controles: glicerol: 0,001 mg.mL⁻¹ e glicerol e borra oleosa: 0,002 mg.mL⁻¹.

Em relação aos cultivos contendo glicerol como única fonte de carbono a máxima quantidade de proteínas totais ($0,249 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi obtida em 14 dias de cultivo para o *B. megaterium* BS18, o qual diferiu estatisticamente com as demais ($p < 0,05$). Os isolados *S. maltophilia* BE11 ($0,221 \text{ mg.mL}^{-1}$), *P. aeruginosa* ($0,220 \text{ mg.mL}^{-1}$) e *S. acidaminiphila* BB5 ($0,213 \text{ mg.mL}^{-1}$) mostraram mais altos valores de biomassa, os quais não apresentaram diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

Para o isolado *B. cibi* foi obtido maior produção de proteínas quando cultivado em meio contendo glicerol e borra oleosa ($0,297 \text{ mg.mL}^{-1}$), seguido quando cultivado em meio contendo borra oleosa ($0,277 \text{ mg.mL}^{-1}$) e em meio contendo glicerol ($0,069 \text{ mg.mL}^{-1}$), os quais apresentaram diferença significativa entre eles ao nível de 95% de confiança.

Em média, a máxima produção de proteínas foi obtida quando os isolados foram cultivados em meio contendo borra oleosa e glicerol ($0,114 \text{ mg.mL}^{-1}$), seguidos dos cultivos em borra oleosa ($0,102 \text{ mg.mL}^{-1}$) e em glicerol ($0,089 \text{ mg.mL}^{-1}$). No entanto, a fonte de carbono não apresentou diferença significativa ao nível de confiança de 95%, mostrando a possibilidade de utilização de borra oleosa petroquímica como única fonte de carbono para o crescimento celular.

Nos ensaios utilizando borra oleosa e glicerol a mínima tensão superficial alcançada foi para o isolado *B. cereus* BS20, o qual reduziu a tensão superficial do meio de $52,3$ para $33,4 \text{ mN.m}^{-1}$ (Tabela 5). Nos ensaios contendo apenas glicerol foi obtida a mínima tensão com o isolado *B. subtilis*, o qual reduziu a tensão do meio de $66,0$ para $29,1 \text{ mN.m}^{-1}$.

As fontes de carbono borra oleosa, borra oleosa e glicerol, e glicerol mostraram em média valores mínimos de tensão superficial de $43,8$, $44,4$ e $55,1 \text{ mN.m}^{-1}$. A fonte de carbono borra oleosa mostrou diferir significativamente do glicerol,

no entanto, não apresentou diferença estatística do meio contendo borra oleosa e glicerol ($p>0,05$).

Tabela 5: Resultados de tensão superficial (TS) mínima durante 14 dias e atividade emulsificante (AE) aos 14 dias de cultivo em meio mineral mínimo. G+B= cultivo em glicerol e borra oleosa. G= cultivo em glicerol

Isolados	Fonte de carbono	TS (mN.m ⁻¹)	AE ac (%)	AE pc (%)
<i>P.nitroreducens</i>	G+B	46,7	3,6	4,2
	G	45,0	3,6	3,6
<i>C. testosteroni</i>	G+B	35,0	16,0	40,0
	G	30,5	30,8	34,5
<i>O.haemophilum</i>	G+B	38,0	0,0	0,0
	G	40,6	0,0	0,0
<i>S.acidaminiphila</i> BB5	G+B	43,5	14,8	20,0
	G	43,3	4,0	7,4
<i>B. megaterium</i> BB6	G+B	39,2	11,5	29,2
	G	60,0	22,2	19,2
<i>B. cibi</i>	G+B	41,9	19,2	30,8
	G	67,2	3,3	20,0
<i>B. thuringiensis</i> BB8	G+B	42,8	16,0	28,0
	G	69,3	8,0	12,5
<i>B. subtilis</i>	G+B	44,8	17,9	20,0
	G	29,1	36,0	44,8
<i>C.normanense</i>	G+B	50,0	0,0	0,0
	G	49,8	11,5	19,2
<i>S.saprophyticus</i>	G+B	51,1	0,0	0,0
	G	55,0	0,0	3,8
<i>S.acidaminiphila</i> BB12	G+B	47,7	20,0	40,0
	G	62,8	10,7	16,0
<i>B. cereus</i> BE2	G+B	49,9	0,0	0,0
	G	62,9	11,1	24,0
<i>S. multivorum</i>	G+B	49,5	6,9	25,9
	G	64,6	65,5	66,7
<i>S. maltophilia</i> BE11	G+B	47,5	4,0	25,9
	G	71,4	3,8	13,3
<i>B. cereus</i> BS5	G+B	43,7	8,0	28,0
	G	70,6	7,7	19,2
<i>S. maltophilia</i> BS10	G+B	47,4	3,8	16,7
	G	49,0	7,7	18,5
<i>P. aeruginosa</i>	G+B	33,5	10,0	20,0
	G	46,0	20,0	22,0
<i>B. megaterium</i> BS18	G+B	47,3	0,0	4,0
	G	70,6	19,2	22,2
<i>B. cereus</i> BS20	G+B	33,4	60,0	63,3
	G	49,0	23,1	36,7
<i>B. thuringiensis</i> BS21	G+B	54,7	0,0	0,0
	G	65,8	21,7	36,7
Controle	G+B	52,3	0,0	0,0
	G	66,0	0,0	0,0

A máxima atividade emulsificante obtida foi para o isolado *S. multivorum* quando cultivado em meio contendo glicerol (66,7%).

Os isolados mostraram comportamentos variados em relação à produção de biossurfactantes quando cultivados nas diferentes fontes de carbono.

O *B. cibi* mostrou maior atividade emulsificante quando cultivado em borra oleosa e valor elevado de tensão superficial quando cultivado em glicerol. O *B. subtilis* apresentou maior atividade emulsificante e menor medida de tensão superficial quando cultivado em glicerol, mostrando que este isolado utiliza mais facilmente o glicerol do que a borra oleosa. O *S. multivorum* apresentou elevada atividade emulsificante (65,5 e 66,7%) quando cultivada em meio contendo glicerol. No entanto, no mesmo meio, não apresentou capacidade de redução da tensão superficial, mostrando ser produtor de bioemulsificantes. O isolado *C. testosteroni* mostrou não produzir emulsificantes em meio contendo apenas borra oleosa. No entanto foi capaz de reduzir a tensão superficial e apresentar atividade emulsificante quando cultivada em meio contendo apenas glicerol e quando cultivada em borra na presença de glicerol.

A fonte de carbono é um importante fator limitante que afeta a produção de surfactantes microbianos. O tipo de substrato (carbono) usado para a produção tem mostrado influenciar a qualidade e a quantidade de biossurfactantes (Das et al, 2009). Dentre os compostos de origem mineral estudados, o óleo diesel e óleo cru têm mostrado serem boas fontes de carbono para a produção de biossurfactantes. Além destes, compostos solúveis em água, como glicose, sacarose e glicerol também têm sido reportados como fontes de carbono para a produção de surfactantes microbianos (Rahman & Gapke, 2008).

Em estudos realizados por Das et al (2009) testando o efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento e produção de biossurfactantes por *Bacillus*

circulans foi verificado que o glicerol foi o melhor frente as demais fontes testadas (glicose, sacarose, amido, gluconato de sódio, citrato de sódio, extrato de levedura e extrato de carne). Rashedi et al (2005) verificaram que a produção de biomassa de *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo 1% de glicerol mostrou resultados positivos, alcançando valores de 1470 mg.L^{-1} em 168h de cultivo, bem como favoreceu a produção de biossurfactantes alcançando concentração de 1000 mg.L^{-1} .

Em média, os isolados mostraram capacidade de crescer e produzir biossurfactantes em meio contendo borra oleosa na presença e ausência de glicerol, não apresentando diferença estatística significativa entre eles, indicando que a adição de glicerol ao meio não se faz necessária. A utilização de borra oleosa no meio de cultivo como única fonte de carbono proporciona a produção de biomassa celular e produção de biossurfactantes.

A determinação do pH mostrou que para a maioria dos isolados houve pequenas variações nos valores em relação ao pH inicial do meio (7,2). Os isolados *B. cibi* e *B. megaterium* BS18 quando cultivados em ambos os meios mostraram os menores valores quando comparado aos demais. Isto se deve provavelmente a produção de metabólitos de caráter ácido.

No tempo final, os valores de condutividade encontraram-se dentro da faixa de 6,51 a 8,06 mS.cm^{-1} . As maiores reduções na condutividade, tendo como valor inicial $7,40 \text{ mS.cm}^{-1}$, ocorreram para os isolados *B. cibi* e *P. aeruginosa* quando cultivados em meio contendo borra oleosa e glicerol. A condutividade fornece um indicativo da quantidade de sais consumidos ou metabólitos gerados no meio durante o processo de fermentação.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram isoladas 11 bactérias de efluentes, 21 bactérias de solo *Landfarming* e 13 bactérias de borra oleosa petroquímica. Os isolados mostraram capacidade de utilização de diferentes misturas de hidrocarbonetos, sendo selecionados 20 isolados mais eficientes para análise de crescimento, produção de biossurfactante e detecção de enzimas envolvidas no processo de degradação. Os isolados foram capazes de crescer em meio mineral contendo somente borra oleosa como fonte de carbono, bem como em meio contendo glicerol como co-substrato, mostraram atividades biossurfactantes e bioemulsificantes, e expressaram diversas enzimas envolvidas nas etapas de degradação da borra oleosa. Levando-se em consideração os resultados máximos obtidos em cada parâmetro analisado e frequência, destacam-se os isolados *Stenotrophomonas acidaminiphila* BB5, *Bacillus megaterium* BB6, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* BS20 para serem utilizados em futuros processos de biorremediação de borra oleosa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEF, K. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K., NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995.

ALLEN, T.D., LAWSON, P.A., COLLINS, M.D., FALSEN, E., TANNER, R.S. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Flavobacteriaceae* isolated from municipal wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, 1311–1316, 2006.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, 25, 3389-340, 1997.

ARRUDA, P.V., RODRIGUES, R.C. L. B., FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, 26, 2007.

ARULAZHAGAN, P., VASUDEVAN, N. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. *Marine Pollution Bulletin*, *in press*, 2010.

BAGGI, G., BARBIERI, P., GALLI, E., TOLLARI, S. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. **Applied and Environmental Microbiology**, 53, 9, 2129-2132, 1987.

BENTO, F.M., GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 47, 2, 107-112, 2001.

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

BENTO, F. M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, 160, 249-255, 2005b.

BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., GAYLARDE, C.C. Biossurfactantes. Em: Melo, I.S., Azevedo, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2008.

BRADDOCK, J.F., CATTERALL, P.H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, 3, 81-84, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.

BUCKER, F., SANTESTEVAN, N.A., ROESCH, L.F., JACQUES, R.J.S., PERALBA, M.C.R., CAMARGO, F.A.O., BENTO, F.M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 65, 172-178, 2011.

CAMEOTRA, S.S., SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62, 274–280, 2008.

CARVALHO, M.F., ALVES, C.C.T., FERREIRA, M.I.M., DE MARCO, P., CASTRO, P.M.L. Isolation and initial characterization of a Bacterial Consortium able to mineralize Fluorobenzene. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 1, 102-105, 2002.

CHANG, S.W., LA, H.J., LEE, S.J., Microbial degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) contaminated groundwater in Korea. **Water Science Technology**, 44, 7, 165-171, 2001.

COOPER, D.G., GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, 53, 2, 224-229, 1987.

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**, 102, 195–203, 2007.

DAS, P., MUKHERJEE, S., SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresource Technology**, 100, 1015-1019, 2009.

DE MORAES, E.B., TAU-K-TORNISIELO, S.M. Biodegradation of oil refinery residues using mixed-culture of microorganisms isolated from a landfarming. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 6, 2009.

DEL PANNO, M.T., MORELLI, I.S., ENGELEN, B., BERTHE-CORTI, L. Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. **FEMS Microbiology Ecology**, 53, 305–316, 2005.

DELILLE D, PELLETIER E, COULON F.. **Cold Regions Science and Technology**, 48, 2, 74-83, 2007.

DHOTE, M., JUWARKAR, A., KUMAR, A., KANADE, G.S., CHAKRABARTI, T. Biodegradation of chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 26, 2, 329-335, 2010.

DUC, L.H., FRASER, P., CUTTING, S.M. Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. **FEMS Microbiol Lett**, 255, 215–224, 2006.

FENNEWALD, M., SHAPIRO, J. Regulatory Mutations of the *Pseudomonas* Plasmid alk Regulon. **Journal Of Bacteriology**, 132, 2, 622-627, 1977.

FUJISAWA, H.; HAYAISHI, O. Protochatechuate 3,4- Dioxygenase. I. Crystallization and Characterization. **Journal of Biological Chemistry**, 243, 10, 2673-2681, 1968.

GUZIK U., GRE, I., WOJCIESZY, D.S., ABU, S.E. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40, 285-291, 2009.

HEGEMAN, G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida* I. Synthesis of enzymes by the wild type. **Journal of Bacteriology**, 91, 3, 1140-1154, 1966.

HOLLENDER, J., DOTT, W., HOPP, J. Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5. **Appl. Environ. Microbiol.** 60:2330–2338, 1994.

HUSAIN, S. Literature Overview: Microbial Metabolism of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Remediation**, 131-161, 2008.

JACQUES, R.J.S., SANTOS, E.C., BENTO, F.M., PERALBA, M.C.R., SELBACH, P.A., SÁ, E.L.S., CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming site. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 56, 3, 143-150, 2005.

JACQUES, R.J.S., BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, UFSM, 29,1, 7 - 24, 2007.

JÚNIOR, J.S., MARIANO, A.P., ANGELIS, D.D. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, 8, 12, 2774-2778, 2009.

KHANEJA, R., PEREZ-FONS, L., FAKHRY, S., BACCIGALUPI, L., STEIGER, S., TO, E., SANDMANN, G., DONG, T.C., RICCA, E., FRASER, P.D., CUTTING, S.M. Carotenoids found in *Bacillus*. **Journal of Applied Microbiology**, 108, 1889–1902, 2010.

KHLEIFAT, K.M. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon esgotamento das reservas and some growth conditions. **Process Biochemistry**, 41, 2010–2016, 2006.

KIM, T.J., LEE, E.Y., KIM, Y.J., CHO, K.S., RYU, H.W. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 19, 411– 417, 2003.

KIM, Y.M., AHN, C.K., WOO, S.H., JUNG, G.Y., PARK, J.M. Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, 144, 293–298, 2009.

LEE, N.R., HWANG, M.O., JUNG, G.H., KIM, Y.S., MIN, K.H. Physical Structure and Expression of *alkBA* Encoding Alkane Hydroxylase and Rubredoxin Reductase from *Pseudomonas maltophilia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 218, 17-21, 1996.

LIU, W., LUO, Y., TENGA, Y., LI, Z., CHRISTIE, P. Prepared bed bioremediation of oily sludge in an oilfield in northern China. **Journal of Hazardous Materials**, 161, 479–484, 2009.

LOH, K.C., CHUA, S.S. Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations. **Enzyme and Microbial Technology**, 30, 620–626, 2002.

MAGALHÃES, L.C., ABREU, M.C., GURGEL, C.H. Plano de gerenciamento de resíduos sólidos para a indústria de petróleo: o caso da Petrobras/lubnor. Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP, 2006.

MAKKAR, R.S., ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22, 10, 2280 - 2292, 2003.

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

MARIANO, A.P., TOMASELLA, R.C., DE OLIVEIRA, L.M., CONTIERO, J., DE ANGELIS, D.D. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, 7, 9, 1323-1328, 2008.

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

MORELLI, I.S., DEL PANNO, M.T., DE ANTONI, G.L., PAINCEIRA, M.T. Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 55, 4, 271-278, 2005.

NKWELANG, G., KAMGA, H.F.L., NKENG, G.E., ANTAI, S.P. Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro organisms in tropical soil polluted with oily sludge. **African Journal of Biotechnology**, 7, 8, 1075-1080, 2008.

OKOH, A.I., TREJO-HERNANDEZ, M.R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: Exploiting the bioremediation strategies. **African Journal of Biotechnology**, 5, 25, 2520-2525, 2006.

OLIVEIRA, N.M., BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., KNORST, A.J., SANTOS, A.L., PIZZOLATO, T.M., PERALBA, M.C. Biodegradation of commercial gasoline (24% ethanol added) in liquid medium by microorganisms isolated from a landfarming site. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, 46, 1, 86 -96, 2011.

OWSIANIAK, M., CHRZANOWSKI, L., SZULC, A., STANIEWSKI, J., OLSZANOWSKI, A., OLEJNIK-SCHMIDT, A., HEIPIEPER, H. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, 100, 3, 1497-1500, 2009.

PIRÔLLO, M.P.S. Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos. **Dissertação em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada**. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Rio Claro/ SP, 2006.

PRENAFETA-BOLD'U, F.X., BALLERSTEDT, H., GERRITSE, J., GROTENHUIS, J.T.C. Bioremediation of BTEX hydrocarbons: Effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. **Biodegradation**, 15, 59–65, 2004.

PRUTHI, V., CAMEOTRA, S.S. Rapid identification of biosurfactant producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, 11, 9, 671-674, 1997.

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

RAHMAN, P.K.S.M., GAKPE, E. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants – Review. **Biotechnology**, 7, 2, 360-370, 2008.

RASHEDI, H., JAMSHIDI, E., ASSADI, M.M., BONAKDARPOUR, B. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. **International Journal of Environmental Science Technology**, 2, 2, 121-127, 2005.

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

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. **Série tecnologia Ambiental**. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

ROSENBERG, M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, 22, 289-295, 1984.

SAMBROOK, J., ROUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANSCARTIER D, ZEEB B, KOCH I. Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. **Cold Regions Science and Technology**, 55, 1, 167-173, 2009.

SANTOS, V.L., LINARDI, V.R. Phenol degradation by yeasts isolated from industrial effluents. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 47, 213–221, 2001.

SANTOS, E.C., JACQUES, R.J.S., BENTO, F.M., PERALBA, M.C.R., SELBACH, P.A., SÁ, E.L.S., CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. **Bioresource Technology**, 99, 7, 2644-2649, 2008.

SCHIPPERS, C., GEBNER, K., MULLER, T., SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sphorolipid mixture. **Journal of Biotechnology**, 83, 189 - 198, 2000.

SILVA, I.S., SANTOS, E.C., MENEZES, C.R., FARIA, A.F., FRANCISCON, E., GROSSMAN, M., DURRANT, L.R. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. **Bioresource Technology**, 100, 4669–4675, 2009.

SINGH, C., LIN, J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, 7, 12, 1927-1932, 2008.

SOLANO-SERENA, F., MARCHAL, R., ROPARS, M., LEBEAULT, J.M., VANDECASTEELE, J.P. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, 86, 6, 1008-1016, 1999.

STADEN, R., BEAL, K.F., BONFIELD, J.K. The staden package. **Methods Mol Biol**, 132:115-130, 2000.

USEPA - **United States Environmental Protection Agency**. www.epa.gov

VASCONCELLOS, S.P. Atividades enzimáticas e de biodegradação de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul). **Tese de Doutorado em Ciências**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2006.

VASILEVA-TONKOVA, E., GESHEVA, V. Potential for biodegradation of hydrocarbons by microorganisms isolated from Antarctic Soils. **Zeitschrift für Naturforschung**, 59c, 140-145, 2004.

VERMA, S., BHARGAVAA, PRUTHI, V. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 57, 207–213, 2006.

WONG, J.W.C., LAI, K.M., WAN, C.K., MA, K.K., FANG, M. Isolation and optimization of pah-degradative bacteria from contaminated soil for pahs bioremediation. **Water, Air, and Soil Pollution**, 139, 1–13, 2002.

ZHANG., G.L., WU, Y.T., QIAN, X.P., MENG, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, 6B, 8, 725-730, 2005.

CAPÍTULO III-

BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA PETROQUÍMICA POR CULTURAS PURAS E MISTAS

BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA PETROQUÍMICA POR CULTURAS PURAS E MISTAS

RESUMO

A borra oleosa é um resíduo gerado em grandes quantidades por indústrias petroquímicas. Devido a sua composição de hidrocarbonetos apresenta potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico aos humanos. A tecnologia de biorremediação, baseada no metabolismo microbiano para a degradação de contaminantes, tem surgido como uma alternativa ambientalmente favorável para o tratamento de áreas contaminadas. Em vista disto, no presente trabalho, a capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de borra oleosa petroquímica em meio líquido por um consórcio bacteriano e cinco culturas puras bacterianas foram analisadas. Três bactérias isoladas de borra oleosa petroquímica, identificadas como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cibi*, e duas bactérias isoladas de solo contaminado com resíduos petroquímicos, identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* mostraram eficiência na degradação de borra oleosa quando cultivadas durante 40 dias. O consórcio bacteriano mostrou excelente capacidade de degradação da borra oleosa, reduzindo 90,7% da fração alifática e 51,8% da fração aromática, e capacidade de produção de biossurfactantes, alcançando redução de 39,4% no valor da tensão superficial do meio de cultura e atividade emulsificante de 55,1%. Os resultados indicaram que estes isolados bacterianos têm potencial para a aplicação em processos de biorremediação de ambientes contaminados com borra oleosa petroquímica, contribuindo assim, na redução de passivos ambientais e aumento de rendimentos nos processos industriais.

Palavras-chave: biodegradação, biossurfactantes, borra oleosa, consórcio, hidrocarbonetos.

1. INTRODUÇÃO

A indústria do petróleo é um dos principais segmentos da economia mundial, a qual aponta o Brasil como um país emergente de enormes potenciais econômicos e ambientais. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (ANP), em 2009 o Brasil alcançou a 14^a posição entre os maiores produtores mundiais de petróleo atingindo 2 milhões de barris/dia.

Dentro do cenário industrial brasileiro, a indústria petroquímica ocupa posição de destaque visto sua importância para o desenvolvimento sócio-econômico do país. A crescente demanda por produtos derivados do petróleo tem ocasionado o aumento da capacidade de produção em refinarias, unidades produtoras de gás natural e indústrias petroquímicas, alcançando produção nacional de 109,8 milhões/m³ (ANP, 2010).

Cabe ressaltar que a indústria do petróleo, apesar dos inúmeros benefícios à sociedade, é mundialmente reconhecida como uma das atividades econômicas com maior potencial de impacto ao meio ambiente. As indústrias geram, durante toda sua cadeia produtiva, grande quantidade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos. Dentre estes, o de maior preocupação nas refinarias e indústrias petroquímicas é a borra oleosa, resíduo classificado segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR 10004, de Classe I ou Resíduos perigosos, que são aqueles não reutilizáveis nem recicláveis, e que podem apresentar características de inflamabilidade, corrosividade, toxicidade ou patogenicidade. Estima-se que a produção anual em uma indústria petroquímica, a qual processa 200-500 barris de óleo diariamente, alcance aproximadamente 10.000m³ de borra (Gafarov et al., 2006).

A borra oleosa se caracteriza como uma emulsão de água, óleos, gorduras, sólidos grosseiros, compostos orgânicos e metais. Entre os compostos orgânicos presentes os mais comuns são alcanos, cicloalcanos, benzeno, tolueno,

etilbenzeno, xilenos, fenóis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Kriipisalu et al., 2008). Os compostos de maior preocupação são os HPAs, os quais são listados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, devido sua toxicidade a vários organismos e seu potencial mutagênico e carcinogênico a humanos (Dhote et al., 2009, Janbandhu & Fulekar, 2011, Lu et al., 2011).

O conhecimento dos riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde pública no caso de contaminação do ar, águas e solos juntamente com o aumento da pressão por parte da sociedade e de órgãos fiscalizadores ambientais tem motivado as empresas ao desenvolvimento de tecnologias limpas. Dentro deste contexto, a tecnologia de biorremediação surge como uma alternativa social e ambientalmente favorável (Cerqueira, 2007). A biorremediação pode ser definida como o uso de microrganismos para remover poluentes ambientais de solos e águas, objetivando a degradação completa de hidrocarbonetos em gás carbônico e água (Sarkar et al., 2005; Mukred et al., 2008). Nas últimas décadas, muitos trabalhos têm avaliado duas estratégias para o aumento da eficiência do processo de biorremediação: bioaugmentação, que consiste na adição de microrganismos com efetiva capacidade degradativa, e a bioestimulação, que consiste na suplementação de fontes de carbono ou outros nutrientes para estimular a atividade de microrganismos exógenos ou endógenos (Thomassin-Lacroix et al., 2002; Bento et al., 2005a; Andreoni & Gianfreda, 2007, Xu & Lu, 2010).

A introdução de culturas puras ou consórcios bacterianos, isolados de ambiente contaminados com óleo, em processos de biorremediação vem sendo analisado (Bento et al., 2005a, Verma et al. 2006, Mukred et al., 2008, Hosokawa et al., 2009, Janbandhu & Fulekar, 2011). O emprego de cultura mista em ambientes contaminados tem se mostrado mais vantajoso frente às culturas puras devido aos efeitos das interações de sinergismo entre os membros das associações. O

cometábólito uma vez transformado por uma determinada espécie pode resultar em uma substância útil para outra espécie, podendo levar a uma completa degradação do produto (Pedroti, 2007). A busca e seleção de microrganismos com comprovado potencial de degradação do contaminante em estudo e capacidade de sobrevivência no ambiente contaminado é uma etapa crucial para o sucesso da bioaugmentação (Melo & Azevedo, 2008). Em vista disto, o presente trabalho teve por objetivo estudar a capacidade de degradação e utilização de borra oleosa petroquímica como única fonte de carbono por culturas puras e mistas bacterianas isoladas de borra oleosa e solo *Landfarming* para utilização em processos de biorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

As amostras de borra oleosa foram coletadas assepticamente de Valos de tratamento e disposição (VTD's) da unidade do Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos (SICECORS)/CORSAN, na cidade de Triunfo/RS. As amostras de solo foram coletadas assepticamente de células de *Landfarming*, a qual recebe resíduos petroquímicos há 24 anos. As amostras foram coletadas em 5 pontos aleatórios e distintos. As amostras foram transportadas até o laboratório e mantidas sob refrigeração (4°C) até o início do processo de isolamento. As amostras foram homogeneizadas e alíquotas foram retiradas para o isolamento de microrganismos.

2.2 Isolamento bacteriano

O isolamento bacteriano foi realizado de acordo com metodologia descrita no item 2.3 do capítulo II.

Os isolados purificados foram pré-selecionados quanto à capacidade de utilização de diferentes misturas de hidrocarbonetos como fonte de carbono,

capacidade de crescimento e tolerância a diferentes concentrações de borra oleosa e produção de biossurfactantes.

2.3 Identificação bacteriana

Os isolados pré-selecionados foram identificados com base no seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA conforme metodologia descrita no item 2.7 do capítulo II.

2.4 Preparo do inóculo

O pré-inóculo bacteriano foi preparado através da transferência, com o auxílio de alça de platina, do isolado (cultura estoque) para um frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo nutritivo estéril. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 100 rpm, 30°C durante 24 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4 °C, 9000 rpm durante 15 minutos e posteriormente lavadas com meio mineral MM1 estéril, sendo este processo repetido 3 vezes. O *pellet* obtido foi ressuscitado em meio mineral MM1 e mantido em incubador rotatório durante 24 h a 100rpm e 30°C visando esgotar reservas energéticas.

2.5 Biodegradação de borra oleosa em meio líquido

A capacidade de biodegradação de borra oleosa pelos isolados bacterianos pré-selecionados foram avaliados individualmente e em consórcio através de cultivo em sistema submerso em biorreatores do tipo respirômetros de Bartha & Pramer (Bartha & Pramer, 1965). O método respirométrico de Bartha, prescrito na norma técnica L6350 da CETESB e a NBR 14283/99, visa determinar diretamente a atividade microbiana através da medida do gás carbônico produzido durante a respiração microbiana e indiretamente a biodegradação de contaminantes orgânicos. Os experimentos foram realizados em triplicata em respirômetros de 125 mL de capacidade. Os isolados foram inoculados a uma concentração inicial de 10^5 - 10^6

células/mL em meio mineral mínimo MM1 (50 mL) contendo 1% de borra oleosa como única fonte de carbono, e mantidos em incubador rotatório a 100 rpm, 30°C durante 40 d. A cada 5 dias, os respirômetros foram aerados durante 5 minutos através dos filtros de ascarita (cal sodada).

Foram realizados ensaios controles, os quais consistiram de meio mineral adicionado da fonte de carbono sem inoculação de microrganismo e ensaios brancos, os quais consistiram de frascos vazios contendo apenas a solução de KOH na lateral do respirômetro.

2.6 Análises

As análises realizadas foram: quantificação de microrganismos heterotróficos e medida da atividade microbiana através da quantificação do gás carbônico produzido nos dias 0, 3, 8, 13, 18, 23, 28, 33 e 40. No tempo inicial e final do processo foram avaliados o pH do meio, produção de biossurfactantes e taxa de degradação de borra oleosa.

2.6.1 Avaliação do crescimento bacteriano

A contagem da população microbiana foi estimada através do método de NMP (Número mais provável). Inicialmente, a amostra foi submetida a diluições decimais em solução salina estéril 0,85% em placas de poliestireno de 24 poços estéreis.

Para a determinação de microrganismos heterotróficos totais, foi utilizado o meio TSB (250 μ L) em placas de poliestireno de 96 poços estéreis, adicionado de 10 μ L de cada diluição. As placas foram incubadas a 30°C durante 14 dias, e o crescimento microbiano foi determinado por turbidimetria. A população microbiana foi então determinada usando tabelas de NMP (APHA, 1995).

2.6.2 Medida da atividade microbiana

O gás carbônico produzido durante a atividade microbiana foi capturado por uma solução de KOH 0,20 M (10 mL) localizada na parte lateral do respirômetro. A solução de KOH foi removida com o auxílio de uma seringa para um novo frasco, onde foram posteriormente adicionados 1mL de uma solução de cloreto de bário 0,5M e 3 gotas de fenolftaleína 1%. O KOH residual foi titulado com solução padronizada de HCl 0,1M. A quantidade de gás carbônico produzido foi dada pela equação:

$$\text{CO}_2 \text{ gerado (mg)} = (V_B - V_A) \cdot (M_{\text{CO}_2}/2) \cdot M_{\text{HCl}} \cdot \text{FC} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

V_B é o volume de HCl 0,1 M utilizado para titular o branco, em mL; V_A é o volume de HCl 0,1 M utilizado para titular o tratamento, em mL; M_{CO_2} é a massa molar do gás carbônico em $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$; M_{HCl} é a concentração molar da solução padronizada de HCl, em $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; e FC é o fator de correção da molaridade de ácido/base ($M_{\text{HCl}}/M_{\text{KOH}}$).

2.6.3 Avaliação da produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes foi avaliada através da medida da atividade emulsificante e da tensão superficial.

A determinação da atividade emulsificante no meio de cultivo foi feita na presença e ausência de células. Uma alíquota de 2 mL de meio mineral foi agitada com 2mL de querosene em tubos de vidro Pirex de fundo chato (100 mm x 15 mm) usando agitador de tubos durante 2 minutos. Os tubos foram mantidos em repouso durante 24h e a atividade emulsificante foi determinada pela relação entre a altura de óleo emulsificado e a altura total (Cooper & Goldenberg, 1987; Bento et al., 2005b; Bento et al.,2008).

A medida da tensão superficial foi avaliada na ausência de células microbianas, utilizando medidor digital de tensão superficial (Gibertini, Milão, Itália),

através do método da placa de Wilhelmy. Como padrões foram utilizados água destilada ($72,1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) e etanol ($24 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$).

2.6.4 Avaliação do pH

As células foram removidas do meio de cultura por centrifugação a 9000 rpm durante 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após repouso até alcançar a temperatura ambiente o pH do sobrenadante foi medido em pHmetro digital (Digimed, DM-22).

2.6.5 Avaliação da biodegradação

A borra oleosa remanescente no meio líquido ao final do período de 40 dias foi removida através de extração líquido-líquido utilizando diclorometano (CH_2Cl_2) como solvente. Inicialmente, o meio de cultura foi acidificado até alcançar pH 2,0, sendo posteriormente submetido a três extrações com diclorometano em funil de separação. Para a remoção do excesso de água contida no meio mineral após as extrações, foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). O extrato foi concentrado em rotavapor e posteriormente pesado.

2.6.5.1 Cromatografia a líquido preparativa (CLP)

A separação das frações saturadas (n-alcanos, iso-alcanos e alcanos cíclicos) e aromáticas das amostras de borra oleosa foram realizadas em colunas de vidro usando 1,5 g de Sílicagel 60 (SiO_2) e 3,0 g de Óxido de Alumínio 90 (Al_2O_3) como fases estacionárias. Foi adicionado ao topo da coluna sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remoção de água na amostra. Para a separação da fração de hidrocarbonetos saturados (F1) foi utilizado como fase móvel 20mL de n-hexano e para a separação da fração dos hidrocarbonetos aromáticos (F2) foi utilizado 20mL da mistura de n-hexano e tolueno (12:8). As frações F1 e F2 foram concentradas em rotavapor e posteriormente transferidos para frascos de 2mL e concentrado sob leve fluxo de nitrogênio até a evaporação dos solventes.

2.6.5.2 Cromatografia a gás com espectrometria de massas (CG/EM)

As frações saturadas e aromáticas foram analisadas por cromatografia em um cromatógrafo a gás (modelo AGILENT 6890 Series GC System) com detector seletivo de massas (modelo AGILENT 5973 Network mass Selective detector). A análise quantitativa foi realizada através de padronização interna, adicionando-se à fração saturada concentração conhecida do padrão deuterado do n-alcano C₂₀, e à fração aromática, concentrações conhecidas dos padrões deuterados naftaleno, fenantreno e criseno. As condições de análise foram: coluna de sílica fundida como fase estacionária, tipo 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano (30m x 0,25 mm x 0,25 µm); temperatura do injetor: 290°C; temperatura inicial do forno: 40°C por 1 minuto seguido de uma rampa de temperatura de 6°C/minuto até 300°C e mantido nesta temperatura por 20 minutos; quantidade de amostra: 1µL no modo *splitless*; temperatura da linha de transferência de 290°C e fluxo do gás carregadas de 1mL/min.

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados empregando o teste de Tukey (comparação entre médias) a um nível de confiança de 95%, utilizando o programa *Statistica 7.1*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação bacteriana

Isolados bacterianos foram obtidos de amostras de borra oleosa petroquímica e de solos de *Landfarming* com histórico de disposição de resíduos petroquímicos há quase 3 décadas. Através da técnica de enriquecimento sucessivo em meio mineral líquido utilizando borra oleosa como única fonte de carbono foi possível isolar 21 bactérias do solo e 13 bactérias da borra oleosa. Através de estudos prévios de avaliação dos isolados quanto a capacidade de crescimento e tolerância a diferentes concentrações do contaminante e da produção de biosurfactantes (dados mostrados no Capítulo II) foi possível selecionar 3 bactérias da borra oleosa e 2 bactérias do solo como potenciais para aplicação em processos de biodegradação de borra oleosa. A análise da seqüência parcial do gene 16S rRNA mostrou que três bactérias pertencem ao gênero *Bacillus*, uma ao gênero *Pseudomonas* e uma ao gênero *Stenotrophomonas* (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação de bactérias isoladas de solo *Landfarming* e borra oleosa petroquímica.

Isolado	Origem	Identificação	Identidade
BB05	Borra oleosa	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	99%
BB06	Borra oleosa	<i>Bacillus megaterium</i>	99%
BB07	Borra oleosa	<i>Bacillus cibi</i>	98%
BS11	Solo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%
BS20	Solo	<i>Bacillus cereus</i>	98%

Existem poucos relatos na literatura quanto ao isolamento de bactérias diretamente da borra oleosa sendo mais comumente encontradas bactérias isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos. Diversas cepas dos gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Bacillus* têm mostrado ser isoladas de ambientes contaminados com hidrocarbonetos e capazes de crescer e degradar hidrocarbonetos

alifáticos e aromáticos (Assih et al., 2002; Samanta et al., 2002; Zanaroli et al., 2010; Fernández-Luqueño et al., 2011; Thavasi et al., 2011). Em estudos realizados por Assih et al. (2002), *Stenotrophomonas acidaminiphila* foi isolada de lodo anaeróbico de um reator anaeróbico de fluxo ascendente (UASB) em escala laboratorial tratando efluentes petroquímicos. *Pseudomonas aeruginosa* tem sido isolada de solos contaminados com hidrocarbonetos e tem mostrado ser produtora de biossurfactantes (Rocha & Infante, 1997; Kumar et al., 2008). Estudos também têm sido reportados quanto à capacidade de cepas de *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus* de degradar hidrocarbonetos e produzir biossurfactantes (Tuleva et al., 2005; Thavasi et al., 2011). No entanto, poucos relatos foram encontrados na literatura quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos, bem como ausência de estudos de produção de biossurfactantes por *Bacillus cibi*. Wen et al. (2010) isolaram *Bacillus cibi* de lodo ativado em sistemas de tratamento de efluentes contendo fenol e testado quanto a capacidade degradativa de fenol em diferentes condições salinas.

Em nossos trabalhos, a técnica de enriquecimento sucessivo a partir de borra oleosa e de solo *Landfarming* contaminado com borra oleosa possibilitou o isolamento e seleção de bactérias altamente tolerantes a diferentes concentrações deste resíduo para ser aplicado em processos de biodegradação de borra oleosa. Para o tratamento de áreas contaminadas faz-se interessante a busca de microrganismos nativos do ambiente contaminado com excelente potencial degradador, uma vez que apresentam diversas vantagens frente aos microrganismos exógenos, tais como sua maior adaptabilidade ao meio, maior resistência às variações das condições ambientais locais, menor susceptibilidade a variações genéticas causados por condições de estresse do meio, exploração da potencialidade regional, entre outros.

3.2 Crescimento microbiano

A população bacteriana ao longo de 40 dias de cultivo em borra oleosa foi estimada através da técnica do número mais provável- NMP (Figura 1).

Foi observado aumento da população bacteriana ao longo do tempo alcançando máximo de 10^{10} NMP/mL para os isolados *B. megaterium* (13 e 33 dias), *B. cibi* (33 dias), *P. aeruginosa* (40 dias), e para o consórcio bacteriano (28, 33 e 40 dias) e máximo de 10^8 NMP/mL para os isolados *S. acidaminiphila* (33 dias) e *B. cereus* (23 dias). O aumento na população bacteriana indicou que a borra oleosa estimulou o crescimento e metabolismo dos diferentes isolados através de sua utilização como única fonte de carbono.

Dentre os experimentos realizados, apenas o consórcio bacteriano mostrou redução da população microbiana no período inicial do processo. Isto pode estar relacionado ao impacto às bactérias pela adição da borra oleosa ao meio ou pelo período de adaptabilidade ou competição entre as cepas. Após 13 dias de processo, o consórcio mostrou crescimento da população bacteriana, alcançando população microbiana máxima entre 28 e 40 dias, indicando que neste período não houve inibição ou competição da atividade microbiana ao utilizá-los em conjunto.

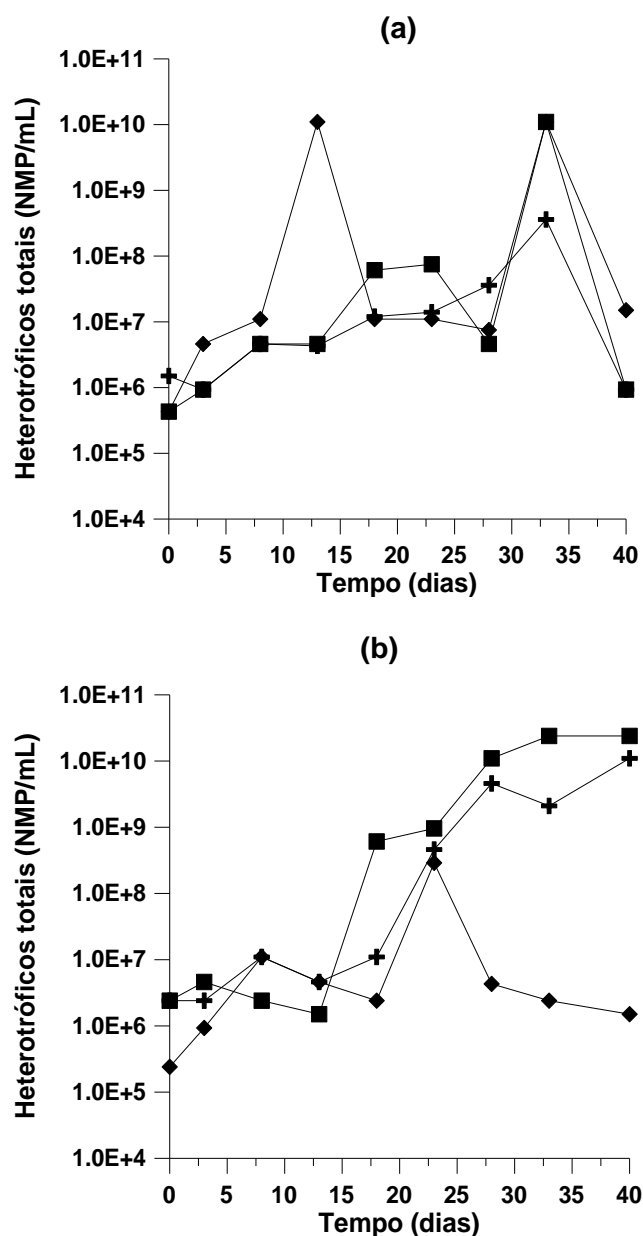


Figura 1: Estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais ao longo de 40 dias de experimento. (a) Bactérias isoladas da borra oleosa + BB5, ◆ BB6 ■ BB7. (b) Bactérias isoladas do solo *Landfarming* e Consórcio bacteriano + BS11, ◆ BS20, ■ Consórcio bacteriano.

3.3 Medida da atividade microbiana (CO₂) e medida de pH

Neste estudo foi empregada uma metodologia de respirometria adaptada a água (Montagnolli et al., 2009). A respiração microbiana é um dos mais antigos parâmetros para quantificar a atividade microbiana. Em condições aeróbias, a atividade respiratória pode ser facilmente avaliada através da determinação do gás carbônico gerado pela atividade microbiana, em condições controladas, ou em campo, ao longo de um período determinado (Moreira e Siqueira, 2006). Os microrganismos são capazes de assimilar os hidrocarbonetos como fonte de carbono em seu metabolismo, assim liberando o gás carbônico.

As Figuras 2a e 2b mostram, respectivamente, a produção diária e a produção acumulada de CO₂ ao longo de 40 dias de experimento nos respirômetros de Bartha. A Figura 2a mostra que a maior geração de gás carbônico ocorreu em 8 dias de processo para todos os ensaios, alcançando máximo de produção de 15,1 mg com o isolado *P. aeruginosa*. Maiores produções de CO₂ foi verificada nos períodos iniciais de processo (até 13 dias). Comportamento semelhante foi observado por Mariano et al. (2008) em estudos de biodegradabilidade de diesel puro (B0), biodiesel (B100) e misturas com diferentes proporções de biodiesel (2, 5 e 20%) em água empregando método respirométrico durante 50 dias, onde foi obtido máximo de produção diária de CO₂ nos primeiros dias de processo para todas os compostos e concentrações testadas.

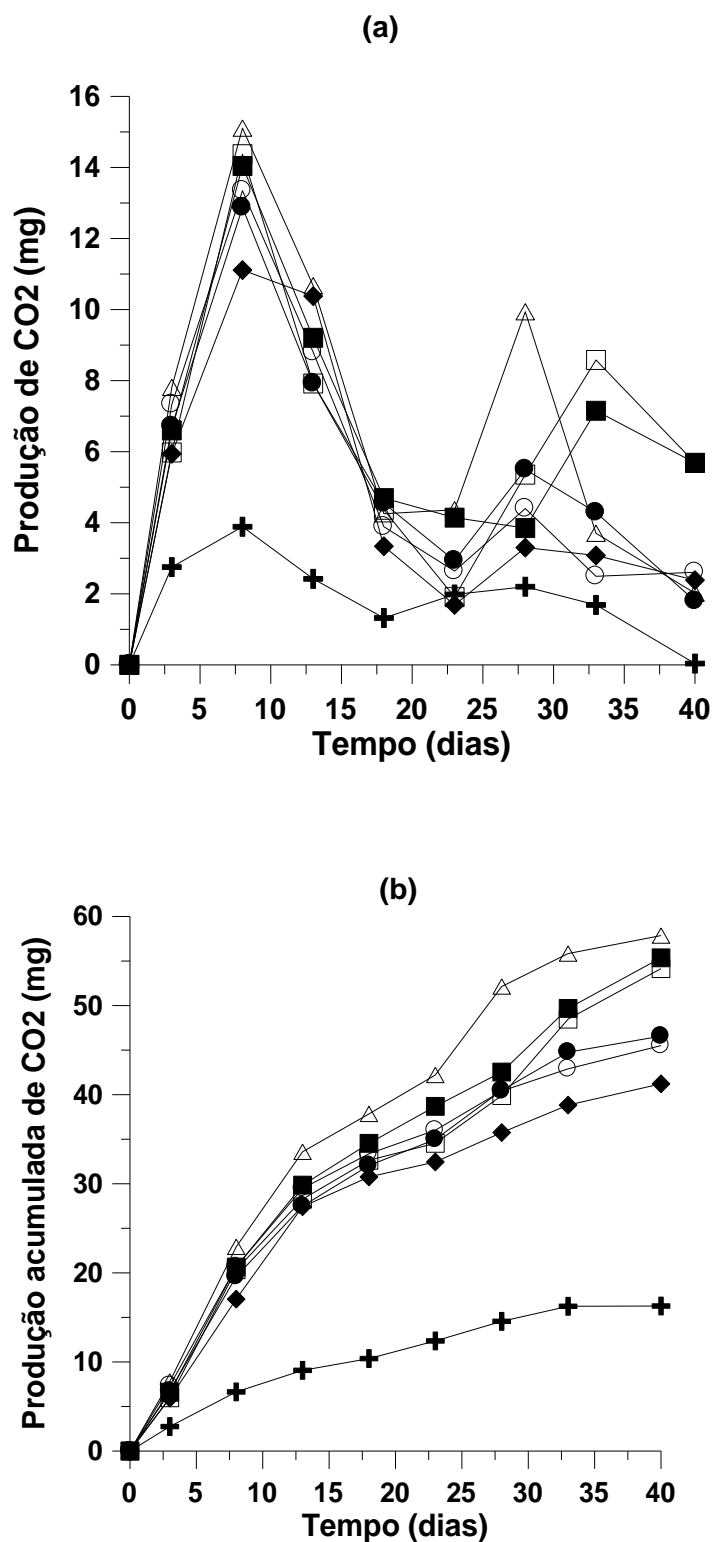


Figura 2: (a) Produção de CO₂ (mg) e (b) Produção acumulada de CO₂ (mg) durante 40 dias de cultivo. + Controle, ◆ *S.acidaminiphila* BB5, ■ *B. megaterium* BB6, ● *B. cibi*, △ *P. aeruginosa*, ○ *B. cereus*, □ Consórcio bacteriano.

A partir do comportamento do crescimento microbiano e da produção de CO₂ infere-se que os isolados mostraram rápida utilização da borra oleosa como fonte de carbono e energia, não apresentando fase de adaptação. Isto se deve provavelmente a utilização de etapa de esgotamento previamente a inoculação, uma vez que em estudos anteriores (Capítulo II), foi observado que a adição desta etapa ao processo ocasionou utilização mais rápida da borra oleosa como fonte de carbono. A alta produção de gás carbônico no início do processo faz deduzir que a borra oleosa foi prontamente utilizada nas primeiras semanas. Provavelmente, a fração alifática, a qual é mais lábil quando comparada a fração aromática, foi mais rapidamente utilizada pelos microrganismos.

De acordo com a Figura 2b, pode-se verificar que a maior produção de CO₂ ao longo do tempo foi obtida com o isolado *P. aeruginosa*, mostrando produção acumulada de 57,9 mg. Conforme mostrado na Tabela 2, valores próximos a este foram obtidos para o isolado *Bacillus megaterium* BB6 (55,4 mg) e para o consórcio microbiano (54,2 mg). A produção de CO₂, a qual mede a atividade microbiana, mostrou comportamento diretamente proporcional ao crescimento bacteriano. Os isolados *P. aeruginosa*, *Bacillus megaterium* BB6 e o consórcio microbiano foram os que apresentaram maior crescimento microbiano ao longo do tempo e maior produção acumulada de CO₂. Comportamento semelhante também foi observado para os isolados *B. cereus* e *S. acidaminiphila*, os quais mostraram as menores produções acumuladas de CO₂ e menores concentrações de microrganismos quando comparado aos demais.

A mistura de isolados na formulação do consórcio mostrou efeitos sinérgicos positivos, uma vez que apresentou ótimo crescimento microbiano, bem como alta produção de CO₂. A utilização de consórcios microbianos pode resultar em complementaridade metabólica, uma vez que os metabólitos produzidos pela

degradação incompleta por um determinado microrganismo pode ser utilizado como fonte de carbono por outro microrganismo, o que aumenta a possibilidade de eliminação completa de hidrocarbonetos do ambiente.

Tabela 2: Produção acumulada de gás carbônico e medida do pH para os diferentes isolados e consórcio microbiano aos 40 dias de cultivo.

Isolado	CO ₂ (mg) acumulado	pH
<i>S. acidaminiphila</i>	41,2 ± 1,4 ^d	6,83 ± 0,18 ^a
<i>B. megaterium</i>	55,4 ± 0,7 ^{a,b}	6,26 ± 0,03 ^b
<i>B. cibi</i>	46,6 ± 1,3 ^c	6,73 ± 0,13 ^{a,b}
<i>P. aeruginosa</i>	57,9 ± 1,0 ^a	6,74 ± 0,01 ^{a,b}
<i>B. cereus</i>	45,5 ± 0,7 ^c	6,72 ± 0,10 ^{a,b}
Consórcio	54,2 ± 1,4 ^b	6,74 ± 0,16 ^{a,b}

pH inicial do meio = 7,2.

Letras iguais indicam os ensaios que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para cada resposta estudada

O crescimento e atividade microbiana no meio mineral mostrou redução no pH para todos os ensaios. O *B. megaterium*, o qual apresentou alta produção de CO₂ e alta população microbiana, mostrou a maior redução de pH. Conforme mostrado na Tabela 2, a redução de pH para o isolado *B. megaterium* diferiu estatisticamente somente do isolado *S. acidaminiphila* que apresentou a menor redução de pH ($p < 0,05$) e também menor produção acumulada de CO₂. A redução no pH durante o cultivo pode ser atribuída a liberação de ácidos orgânicos como uma consequência da degradação de hidrocarbonetos ou também a produção de polímeros extracelulares (Verma et al., 2006). Comportamento semelhante foi obtido em estudos realizados por Janbandhu & Fulekar (2011), onde foi verificado que o crescimento de um consórcio microbiano formado por *Sphingobacterium* sp., *Bacillus cereus* e *Achromobacter insolitus* MHF crescendo durante 14 dias em meio mineral contendo 100, 250 e 500mg/L de fenantreno causou redução de pH de 7,0 a 5,6, 5,3 e 5,2 respectivamente.

Também foi verificada redução no pH do meio em estudos realizados por Verma et al. (2006) quando *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* foram cultivadas em meio mineral contendo borra oleosa como única fonte de carbono durante 7 dias.

O pH é um fator ambiental seletivo, o qual afeta a diversidade e atividade microbiana, controlando atividades enzimáticas, processos de transporte e solubilidade de nutrientes (Dhote et al., 2009).

3.4 Produção de biossurfactantes

Um dos principais fatores que interferem na eficiência do processo de biodegradação de compostos oleosos complexos é a baixa disponibilidade dos contaminantes ao ataque microbiano (Cerqueira & Costa, 2009; Qiu et al., 2009). Uma alternativa de incremento da biodisponibilidade e metabolização destes contaminantes é aumentar a solubilização dos substratos através da atuação de biossurfactantes ou bioemulsificantes. Os biossurfactantes são metabólitos secundários produzidos por diversas bactérias, fungos e leveduras, que se caracterizam como moléculas orgânicas contendo uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, o que lhes confere a capacidade de atuar na interface de compostos de diferentes naturezas, aumentando a dissolução de compostos imiscíveis (Cerqueira & Costa, 2009).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a capacidade de aumento da efetividade e eficiência na degradação de poluentes pela adição de biossurfactantes em ambientes contaminados. O interesse de aplicar surfactantes microbianos se deve ao fato de que quando comparados aos surfactantes sintéticos apresentam vantagens como menor toxicidade, alta biodegradabilidade e produção a partir de substratos renováveis (Nitschke & Pastore, 2002).

Atualmente, os biossurfactantes não são amplamente utilizados devido a seus altos custos de produção e devido a algumas deficiências no processo de recuperação e purificação. Estudos vêm sendo realizados visando à utilização de

resíduos industriais para a produção de biossurfactantes e/ou aplicação de microrganismos produtores de biossurfactantes em ambientes contaminados visando reduzir custos de processo.

No tratamento de áreas contaminadas com compostos complexos e de difícil degradação, como a borra oleosa, faz-se interessante e mais adequado, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental, utilizar microrganismos que apresentem excelente capacidade de degradação e utilização do contaminante como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes do que bactérias que apresentam somente capacidade degradativa (Cameotra & Singh, 2008). Em vista disto, para estudos da potencialidade de degradação de borra oleosa por diferentes microrganismos, no presente estudo, foram utilizadas bactérias previamente selecionadas como potenciais produtoras de biossurfactantes. A Tabela 3 apresenta os resultados de produção de biossurfactantes ao final de 40 dias de experimento.

Tabela 3: Valores de Tensão superficial (TS), atividade emulsificante na ausência (AEac) e presença (AEpc) de células bacterianas obtidos em 40 dias de cultivo.

Isolado	TS (mN/m)	AEac (%)	AEpc (%)
<i>S. acidaminiphila</i>	41,0 ± 0,2 ^a	40,0 ± 0,0 ^a	40,0 ± 4,0 ^a
<i>B. megaterium</i>	41,0 ± 0,1 ^a	23,3 ± 0,0	20,0 ± 0,0
<i>B. cibi</i>	42,6 ± 0,1 ^b	44,0 ± 3,8 ^{a,b}	46,7 ± 3,3 ^{a,b}
<i>P. aeruginosa</i>	41,8 ± 0,0 ^{a,b}	40,0 ± 1,6 ^a	48,0 ± 0,0 ^{b,c}
<i>B. cereus</i>	41,4 ± 0,3 ^a	33,3 ± 0,1	44,0 ± 4,0 ^{a,b}
Consórcio	36,6 ± 0,1	47,8 ± 1,9 ^b	55,1 ± 1,7 ^c

Tensão superficial do meio para o ensaio controle em 40 dias = 60,4 mN/m.

Letras iguais indicam os ensaios que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para cada resposta estudada

As análises de tensão superficial e atividade emulsificante mostraram que todos os isolados e o consórcio microbiano foram capazes de produzir biossurfactantes em meio mineral contendo borra oleosa como única fonte de carbono. A maior redução da tensão superficial foi alcançada com o consórcio microbiano, o qual atingiu valor de 36,6 mN/m em 40 dias de cultivo mostrando diferença significativa quando comparado aos demais experimentos ($p < 0,05$). O consórcio microbiano apresentou atividade emulsificante de 47,8% na ausência de células e 55,1% na presença de células.

Alta atividade emulsificante na presença de células também foi verificada com *P. aeruginosa*. Diversos estudos têm mostrado a potencialidade de *Pseudomonas aeruginosa* na produção de biossurfactantes. Ramnolipídios estão entre os grupos mais comuns de glicolipídios, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Este isolado produz principalmente duas famílias de ramnolipídios contendo um ou dois resíduos de ramnose (mono- ou di-ramnolipídios, respectivamente). Atualmente, ramnolipídios é um dos três biossurfactantes que estão disponíveis comercialmente, juntamente com soforolipídios e surfactina, e o único aprovado pela USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) para uso em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (Toribio et al., 2010).

Os isolados mostraram atividade emulsificante de até 55,1% e redução de até 39,4% no valor da tensão superficial. Em estudos realizados por Dhote et al. (2009) foi reportado a capacidade de duas bactérias isoladas de borra oleosa petroquímica, tentativamente identificadas como *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., de produzir biossurfactantes quando cultivadas em meio mineral contendo criseno como única fonte de carbono. Foi encontrado reduções na tensão de 42 a 30 mN/m e de 51 a 34 mN/m e índice de emulsificação de 46 e 57%. Verma et al. (2006) reportaram que bactérias identificadas como *Bacillus* sp. SV9, *Pseudomonas* sp. SV17 e *Acinetobacter*

sp. SV4 isoladas de solo contaminado com borra oleosa foram capazes de reduzir a tensão superficial em 59%, 51% e 32%, respectivamente, após 5 dias de cultivo em meio mineral contendo 1% de borra oleosa como única fonte de carbono. Já em estudos realizados por Das e Mukherjee (2007a) foi observado produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de solo contaminado com óleo crescendo em meio mineral contendo pireno através da medida da tensão superficial do meio de cultura o qual reduziu de 67,4 a 30,0 mN/m para *B. subtilis* DM-04, a 45,9 para *P. aeruginosa* M e 45,0 para *P. aeruginosa* NM.

3.5 Degradação da borra oleosa

A degradação da borra oleosa ao final de 40 dias foi avaliada através de análise cromatográfica. A Tabela 4 mostra as taxas de degradação das frações alifática e aromática obtidas nos ensaios com os diferentes isolados e com o consórcio microbiano. As Figuras 3 e 4 mostram o perfil cromatográfico da fração alifática e as Figuras 5 e 6 mostram o perfil cromatográfico da fração aromática obtidos nos ensaios com o consórcio microbiano.

Tabela 4: Degradação da fração alifática e aromática da borra oleosa para os diferentes isolados e consórcio microbiano.

Isolado	Biodegradação (%)	
	Fração Alifática	Fração Aromática
<i>S. acidaminiphila</i>	91,7 ± 3,0	33,2 ± 1,1 ^a
<i>B. megaterium</i>	89,0 ± 2,2	39,6 ± 3,8 ^{a,b}
<i>B. cibi</i>	89,7 ± 1,0	64,3 ± 1,3 ^c
<i>P. aeruginosa</i>	86,7 ± 0,8	39,5 ± 2,6 ^{a,b}
<i>B. cereus</i>	88,4 ± 0,6	40,3 ± 6,7 ^{a,b}
Consórcio	90,7 ± 1,1	51,8 ± 2,1^{b,c}

Letras iguais indicam os ensaios que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para cada resposta estudada

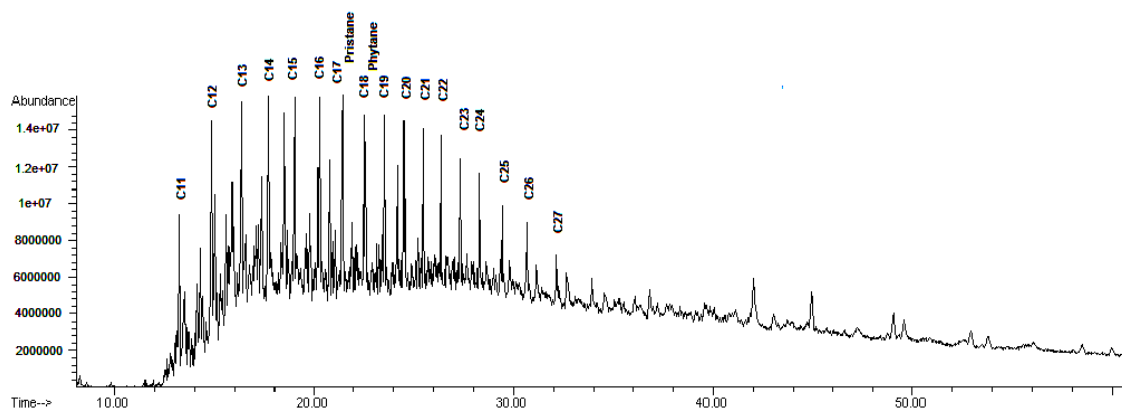


Figura 3: Perfil cromatográfico da fração saturada da borra oleosa no tempo inicial de processo para o ensaio com o consórcio microbiano.

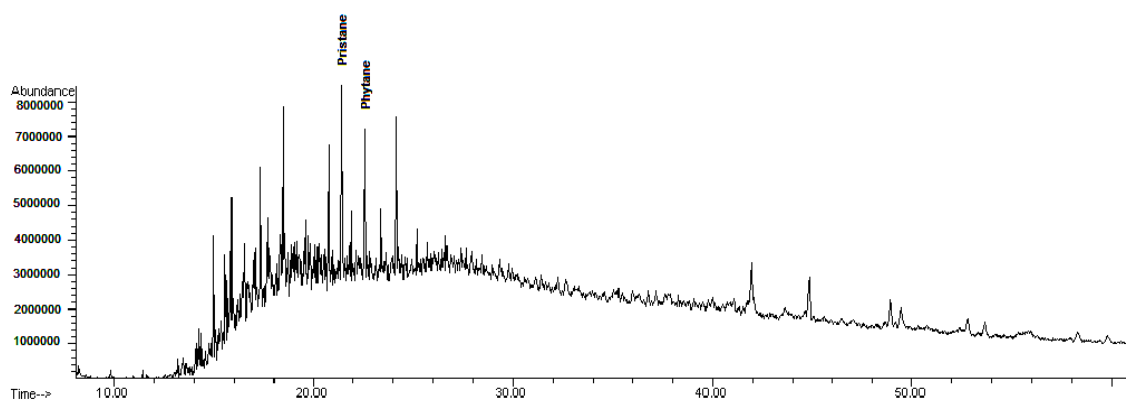


Figura 4: Perfil cromatográfico da degradação da fração saturada da borra oleosa no tempo final de processo para o ensaio com o consórcio microbiano.

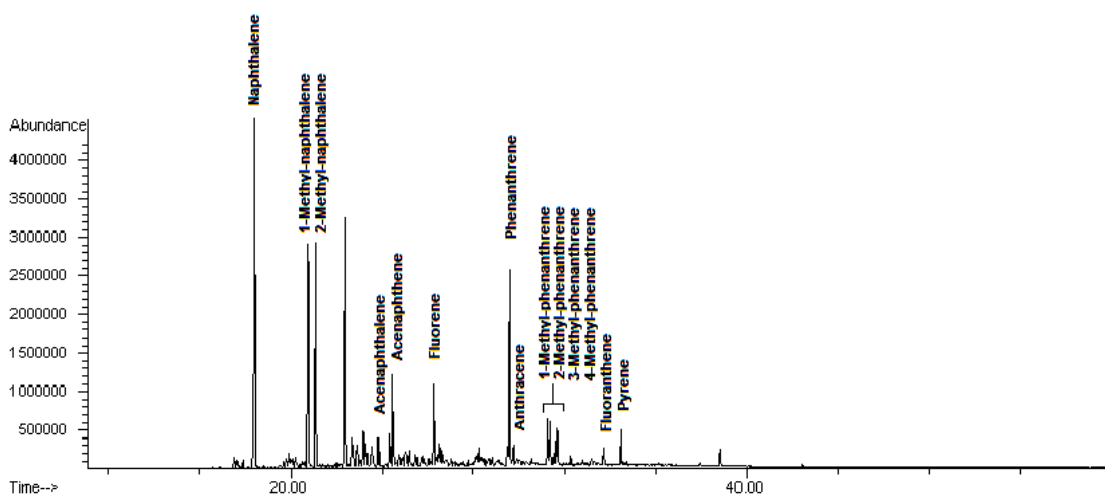


Figura 5: Perfil cromatográfico da fração aromática da borra oleosa no tempo inicial de processo para o ensaio com o consórcio microbiano.

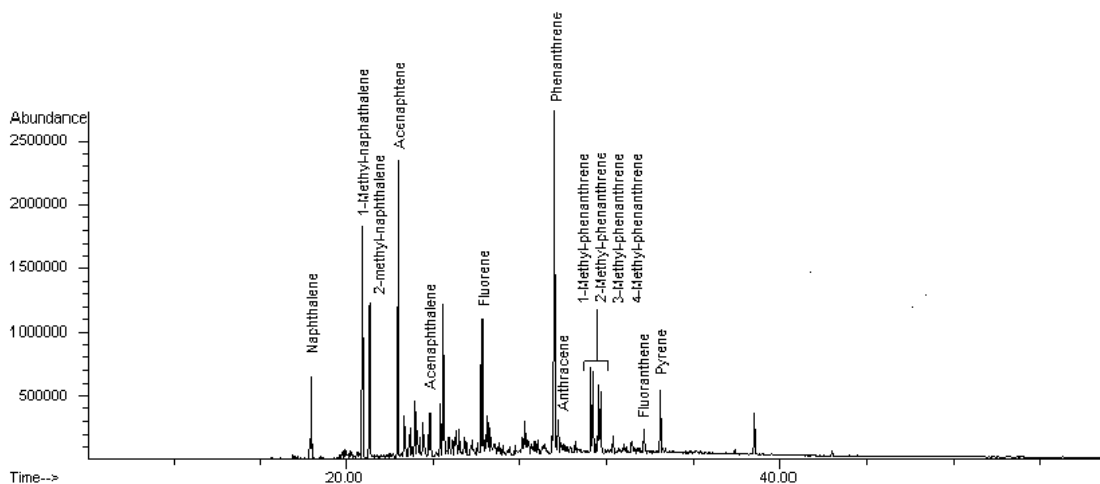


Figura 6: Perfil cromatográfico da degradação da fração aromática da borra oleosa no tempo final de processo para o ensaio com o consórcio microbiano.

Os resultados mostraram que os isolados e o consórcio microbiano foram capazes de degradar a borra oleosa, mostrando taxas de degradação de 83,1 a 87,4% na fração total. Resultados inferiores foram obtidos por Zhang et al. (2007), os quais verificaram aumento da taxa de biodegradação de borra oleosa proveniente de refinaria de 69,4 a 77,4% após otimização das condições de fermentação de *Bacillus* HJ-1 crescendo em meio líquido durante 7 dias. Valores inferiores também foram

obtidos em estudos realizados por Verma et al. (2006), em que o isolado *Bacillus sp.* SV9 crescendo durante 5 dias em meio mineral líquido mostrou-se o mais eficiente na degradação de borra oleosa alcançando 59% de degradação da fração total.

A borra oleosa é uma mistura complexa de compostos alifáticos, aromáticos, compostos contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio e frações de asfaltenos. No presente estudo foram determinadas apenas as frações de alcanos e aromáticos, as quais mostraram quantidades de aproximadamente 90 e 10%, respectivamente, na caracterização da amostra inicial. Segundo Toledo et al. (2006), as proporções relativas destas frações variam de óleo para óleo, e a suscetibilidade de um óleo específico à degradação microbiana pode ser predita desta composição.

Os resultados obtidos nos ensaios de biodegradação mostraram que em média, a maior taxa de biodegradação foi alcançada para os compostos alifáticos quando comparada aos compostos aromáticos. É conhecido que a biodegradabilidade dos componentes do petróleo segue uma ordem decrescente preferencial: n-alcanos > alcanos de cadeia ramificada > alcenos cadeia ramificada > monoaromáticos > cicloalcanos > poliaromáticos > asfaltenos (Mohamed et al., 2006). As frações aromáticas são mais dificilmente biodegradadas, e a suscetibilidade diminui quando o número de anéis aromáticos ou anéis cíclicos na molécula aumenta.

Normalmente, as frações que contêm n-alcanos são as mais suscetíveis à biodegradação, considerando que as frações saturadas contendo alcanos ramificados são menos vulneráveis ao ataque microbiano (Toledo et al., 2006). Isto foi evidenciado no presente estudo uma vez que, no tempo final de cultivo, os isolados mostraram degradar eficientemente os compostos alifáticos (n-C11 a n-C28), apresentando apenas quantidades significativas dos compostos pristano e fitano. Pristano ($C_{19}H_{40}$) e fitano ($C_{20}H_{42}$) são dois alcanos isoprenóides presentes em combustíveis. Segundo Paudyn et al. (2008), devido sua natureza ramificada, os isoprenóides são

relativamente resistentes a biodegradação, sendo mais lentamente biodegradado quando comparado com os lineares. A razão de alcanos lineares em relação aos compostos altamente ramificados pode refletir a extensão de degradação de derivados de petróleo causada por microrganismos (Balba et al., 1998).

Todos os isolados bacterianos e o consórcio mostraram alta taxa de degradação da fração alifática. Diversos estudos têm mostrado maior taxa de degradação da fração alifática em relação aos aromáticos. Em estudos realizados por Das e Mukherjee (2007b) foi observado que uma cepa de *Bacillus subtilis* e um consórcio formado por duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* exibiram mais altas taxas de degradação da fração de n-alcanos do que da fração aromática durante a degradação de petróleo em solos. Verma et al. (2006) verificaram a capacidade de degradação de borra oleosa por três culturas puras cultivadas separadamente em meio mineral líquido após 5 dias. *Bacillus sp.* SV9 mostrou-se a mais eficiente alcançando 89% da fração alifática e 75% da fração aromática, seguido de *Acinetobacter sp.* SV4, a qual degradou 78% dos alifáticos e 58% de aromáticos e *Pseudomonas sp.* SV 17 que degradou aproximadamente 60% de ambas as frações.

No presente estudo, maiores valores foram alcançados com o consórcio microbiano (90,7%) e *S. acidaminiphila* (91,7%), os quais não mostraram diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$).

Quando comparado aos demais, o isolado *S. acidaminiphila* apresentou a maior taxa de degradação dos compostos alifáticos, menor taxa de degradação de compostos aromáticos, menor taxa de produção acumulada de CO₂ e menor população microbiana máxima. Provavelmente este isolado utilizou preferencialmente os compostos alifáticos como fonte de carbono e energia, desenvolvendo aparato enzimático específico para a degradação desta parcela de hidrocarbonetos. Devido à menor taxa de liberação de CO₂, pode-se inferir que sua atividade metabólica ocorreu

de forma mais lenta quando comparada as demais, alcançando máximo crescimento em 33 dias de processo. Presumivelmente, a alta degradação da fração alifática levou a exaustão dos hidrocarbonetos mais facilmente degradáveis e ao consumo de nutrientes ocasionando retardamento na atividade catabólica da fração aromática. Como consequência, a degradação da fração aromática pode ter sido dificultada pela falta de energia necessária para a expressão e produção de enzimas específicas no ataque a moléculas aromáticas. Outra possibilidade é a repressão catabólica, na qual um composto não pode ser degradado na presença de outro composto, agindo como repressor para a síntese de um grande número de enzimas envolvidas em diversas rotas metabólicas. Devido a sua estrutura, os compostos aromáticos são mais difíceis de serem atacados e consumidos como fonte de carbono pelos microrganismos. De acordo com Mohamed et al. (2006), o consumo primário ou o esgotamento dos alcanos (fração saturada) pode resultar em elevados conteúdos da fração poliaromática e de asfaltenos (fração insaturada com alta taxa C/H), as quais são mais resistentes a biodegradação.

Em relação à fração aromática, o isolado *B. cibi* e o consórcio microbiano foram os que apresentaram maior taxa de degradação, não apresentando diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

Cabe ressaltar, que o consórcio microbiano mostrou a maior produção de biossurfactantes, mostrando atividade emulsificante de 55,1% e redução da tensão superficial do meio para 36,6 mN/m. Todas as bactérias presentes no consórcio quando cultivadas isoladamente mostraram capacidade de produção de biossurfactantes. No entanto, esta atividade aumentou quando utilizada na forma de consórcio. A mais alta capacidade destes isolados em degradar a fração aromática pode estar intimamente relacionado com capacidade de produção de biossurfactantes. Os biossurfactantes têm a capacidade de aumentar a dispersão aquosa de compostos

pouco solúveis, como os hidrocarbonetos aromáticos, por muitas ordens de magnitude mudando a afinidade entre as células bacterianas e os hidrocarbonetos através do aumento da hidrofobicidade celular (Abalos et al., 2004). Conseqüentemente, os biossurfactantes causam o aumento da acessibilidade dos microrganismos aos compostos lipofílicos, acelerando a biodegradação destes compostos em diferentes meios (Qiu et al., 2009, Fernández-Luqueño et al., 2011).

É importante salientar que no presente estudo, o isolado *B. cibi* mostrou ótima capacidade de biodegradação de compostos aromáticos e capacidade de produção de biossurfactantes alcançando atividade emulsificante de 46,7%. Ao melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro relato da capacidade de produção de biossurfactantes e de biodegradação de borra oleosa por *Bacillus cibi*.

Em todos os experimentos realizados foi verificado que dentre a fração dos aromáticos o composto que apresentou maior degradação foi o naftaleno, seguido do metil naftaleno. Os isolados mostraram uma ordem preferencial de degradação dos compostos aromáticos mostrando que os de menor massa molecular apresentaram maior taxa de degradação. De acordo com Molina et al. (2009), diversos estudos sobre a degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos por bactérias apresentaram uma tendência mostrando uma relação inversa entre a taxa de biodegradação e o número de anéis aromáticos e massa molecular.

Os isolados mostraram taxas de degradação da fração aromática variando de 33,2 a 64,3%. As menores taxas foram obtidas com os isolados *S. acidaminiphila*, *B. megaterium* e *P. aeruginosa*. No entanto, o uso dos isolados na forma de consórcio promoveram aumento na taxa de biodegradação. Este comportamento também foi verificado na fração alifática. Embora culturas puras de diversas bactérias degradadoras de hidrocarbonetos podem prontamente utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, resultados satisfatórios de degradação podem ser obtidos se uma

cultura bacteriana mista for usada. Além disto, geralmente, a biodegradação usando uma cultura pura não representa o real comportamento de microrganismos ambientais durante a biorremediação em ambientes naturais contaminados com hidrocarbonetos, pois na natureza, a biorremediação depende de atividades metabólicas cooperadas de populações microbianas mistas (Janbandhu & Fulekar, 2011).

A vantagem de utilizar consórcios microbianos pode ser atribuída às múltiplas capacidades metabólicas e aos efeitos sinérgicos entre os membros da associação acarretando o aumento da eficiência do processo de biorremediação. Os mecanismos nos quais os degradadores se beneficiam das interações sinérgicas podem ser complexos. É possível que uma espécie remova os metabólitos tóxicos das espécies (que de outra forma pode dificultar a atividade microbiana) das espécies precedentes. É também possível que outras espécies degradem compostos que o primeiro é capaz de degradar parcialmente, promovendo processos de cometabolismo (Singh & Cameotra, 2008). Uma vez que a borra oleosa é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos, a ampla faixa de substratos de degradação pelos isolados estudados apresenta vantagem significativa na biorremediação de locais contaminados.

4 . CONCLUSÃO

As bactérias *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* isoladas de borra oleosa petroquímica e de solo *Landfarming* apresentaram capacidade de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em meio líquido contendo borra oleosa como única fonte de carbono durante 40 dias. Estes isolados mostraram alta taxa de degradação da fração alifática e capacidade de produção de biossurfactantes.

O consórcio microbiano, composto de 5 bactérias, mostrou capacidade de degradação tanto da fração alifática quanto aromática, bem como excelente produção de biossurfactantes a partir de borra oleosa, o que sugere sua aplicabilidade em processos de biorremediação de áreas contaminadas com este importante passivo ambiental.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. *Resíduos Sólidos*: classificação, NBR 10.004. Rio de Janeiro, 1987. 63p.

ABALOS, A., VIÑAS, M., SABATÉ, J., MANRESA, M.A., SOLANAS, A.M. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. **Biodegradation**, 15, 249–260, 2004.

ANDREONI, V., GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 76, 287- 308, 2007.

ANP- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**, Rio de Janeiro, 2010. INSS 1983-5884.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed., Washington, 1995.

ASSIH, E.A., OUATTARA, A.S., THIERRY, S., CAYOL, J.L., LABAT, M., MACARIE, H. *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52, 2, 559-568, 2002.

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

BARTHA, R., PRAMER, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, 100, 1, 68-70, 1965.

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

BENTO, F. M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, 160, 249-255, 2005b.

BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., GAYLARDE, C.C. Biosurfactantes. Em: Melo, I.S., Azevedo, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2008.

CAMEOTRA, S.S., SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62, 274-280, 2008.

CERQUEIRA, V.S. Produção de biosurfactante e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 2007.

CERQUEIRA, V.S., COSTA, J.A.V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química nova**, 32, 394-400, 2009.

COOPER, D.G., GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, 53, 2, 224-229, 1987.

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**, 102, 195–203, 2007a.

DAS, K., MUKHERJEE, A.S. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, 98, 1339–1345, 2007b.

DHOTE, M., JUWARKAR, A., KUMAR, A. KANADE, G.S., CHAKRABARTI, T. Biodegradation of chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26, 329-335, 2009.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F., VALENZUELA-ENCINAS, C., MARSCH, R., MARTÍNEZ-SUÁREZ, C., VÁZQUEZ-NÚÑEZ, E., DENDOOVEN, L. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, 18, 12-30, 2011.

GAFAROV, A.B., PANOV, A.V., FILONOV, A.E., BORONIN, A.M. Change in the Composition of a Bacterial Association Degrading Aromatic Compounds during Oil

Sludge Detoxification in a Continuous-Flow Microbial Reactor. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 42, 2, 160 - 165, 2006.

HOSOKAWA, R., NAGAI, M., MORIKAWA, M., OKUYAMA, H. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25, 1519-1528, 2009.

JANBANDHU, A., FULEKAR, M.H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. **Journal of Hazardous Materials**, 187, 333 - 340, 2011.

KRIIPSALU, M., MARQUES, M., MAASTIK, A. Characterization of oily sludge from a wastewater treatment plant flocculation–flotation unit in a petroleum refinery and its treatment implications. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, 10, 79-86, 2008.

KUMAR, M., LEÓN, V., MATERANO, A.D.S., ILZINS, O.A., LUIS, L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, 1047-1057, 2008.

LU, X.Y., ZHANG, T., FANG, H.H.P. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, 89, 1357 – 1371, 2011.

MARIANO, A.P., TOMASELLA, R.C., OLIVEIRA, L.M., CONTIERO, J., DE ANGELIS, D.F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, 7, 9, 1323-1328, 2008.

MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. Estratégias de isolamento de microrganismos envolvidos na degradação de xenobióticos. In MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. 2 ed. Ed. Embrapa, Rio de Janeiro/RJ, 2008, p. 199-216.

MOHAMED, M.E., AL-DOUSARY, M., HAMZAH, R.Y, FUCHS, G. Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacteria active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 58, 213–223, 2006.

MOLINA, M.C., GONZÁLEZ, N., BAUTISTA, L.F., SANZ, R., SIMARRO, R., SÁNCHEZ, I., SANZ, J.L. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. **Biodegradation**, 20, 789-800, 2009.

MONTAGNOLLI, R.N., LOPES, P.R.M., BIDOIA, E.D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63, 297–305, 2009.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MUKRED, A.M., HAMID, A.A., HAMZAH, A., YUSOFF, W.M.W. Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. **OnLine Journal of Biological Sciences**, 8, 4, 73-79, 2008.

MULLIGAN, C.C., YONG, R.N., GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, 60, 371-380, 2001.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25, 772-776, 2002.

PAUDYN, K., RUTTER, A., ROWE, R.K., POLAND, J.S. Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. **Cold Regions Science and Technology**, 53, 102–114, 2008.

PEDROTI, G.I. Ensaios de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

QIU, X., WUB, P., ZHANG, H., LI, M., YAN, Z. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. HY2 capable of degrading a high concentration of p-nitrophenol. **Bioresource Technology**, 100, 5243–5248, 2009.

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

ROCHA, C., INFANTE, C. Enhanced oily sludge biodegradation by a tensio-active agent isolated from *Pseudomonas aeruginosa* USB-CS1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 47, 615-619, 1997.

SAMANTA, S.K., SINGH, O.V., JAIN, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, 20, 6, 243-248, 2002.

SARKAR, D., FERGUSON, M., DATTA, R., BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136, 1, 187-195, 2005.

THAVASI, R., JAYALAKSHMI, S., BANAT, I.M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology**, 102, 2, 772-778, 2011.

THOMASSIN-LACROIX, E.J.M., ERIKSSON, M., REIMER, K.J., MOHN, W.W. Biostimulation and bioaugmentation for on site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, 551-556, 2002.

TOLEDO, F.L., CALVO, C., RODELAS, B., GONZÁLEZ-LOPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. **Systematic and Applied Microbiology**, 29, 244-252, 2006.

TORIBIO, J., ESCALANTE, A.E., SOBERÓN-CHAVEZ, G. Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 112, 1082–1087, 2010.

TULEVA, B., CHRISTOVA, N., JORDANO, B., NIKOLOVA-DAMYANOVA, B., PETROV, P. Naphthalene Degradation and Biosurfactant Activity by *Bacillus cereus* 28BN. **Zeitschrift für Naturforschung**, 60c, 577-582, 2005.

VERMA, S., BHARGAVAA, R., PRUTHI, V. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 57, 207–213, 2006.

XU, Y., LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials**, 183, 395-401, 2010.

WEN, H.Y, YANG, L. HAN, B.P., PING, W.J., CHEN, Y.H., MA, X.C. Influence on Phenol Degradation by Bacterial Strains under Different Salinity Conditions. **Environmental Science & Technology**, 2010.

ZANAROLI, G., TORO, S.D., TODARO, D., VARESE, G.C., BERTOLOTTI, A., FAVA, F. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. **Microbial Cell Factories**, 9, 10, 2010.

ZHANG, X., WU, W., ZHANG, Y., WANG, J., LIU, Q., GENG, C., LU, J. Screening of Efficient Hydrocarbon-Degrading Strains and Study on Influence Factors of Degradation of Refinery Oily Sludge. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 46, 26, 2007.

CAPITULO IV-

POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA EM SOLOS ATRAVÉS DE ATENUAÇÃO NATURAL, BIOESTIMULAÇÃO E BIOAUMENTAÇÃO

POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA EM SOLOS ATRAVÉS DE ATENUAÇÃO NATURAL, BIOESTIMULAÇÃO E BIOAUMENTAÇÃO

RESUMO

A tecnologia de biorremediação é baseada na utilização de microrganismos para degradar contaminantes tóxicos em substâncias com menor ou nenhuma toxicidade e tem mostrado resultados promissores no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. A utilização de nutrientes e microrganismos com efetiva capacidade degradativa pode aumentar a eficiência do processo. Em vista disto, o presente trabalho avaliou a eficiência de um consórcio bacteriano composto pelos isolados *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* e duas formulações de nutrientes durante a biorremediação de borra oleosa petroquímica presentes em solos impactados há duas décadas (*Landfarming*) e em um solo sem histórico de contaminação (Nativo). Os experimentos foram realizados durante 90 dias em sistema fechado. A taxa de biodegradação de borra oleosa, em termos de TPH, alcançou máximo de 74,9% no tratamento de bioestimulação e 74,3% em experimentos de bioaumentação em solos *Landfarming*. Em ambos os solos, a adição de nutrientes e consórcio microbiano favoreceram a biodegradação de borra oleosa. O solo *Landfarming* mostrou maior potencialidade no tratamento de borra oleosa, visto maior redução nas frações TPH, TPH-GRO (C₆-C₁₀) e TPH-DRO (C₁₀-C₂₈) nos processos de bioaumentação e bioestimulação durante 90 dias.

Palavras-chave: atenuação natural, bioaumentação, bioestimulação, borra oleosa, *Landfarming*.

1. INTRODUÇÃO

O mercado petrolífero apresenta papel de destaque na economia mundial, visto que o petróleo representa a maior parcela da matriz energética do mundo, em torno de 35%, seguido do carvão mineral (29%) e do gás natural (24%) (BP Statistical Review of World Energy, 2010).

Nos últimos anos, a evidência do crescimento populacional e o aumento da demanda pelos produtos derivados de petróleo vêm promovendo a intensificação da industrialização neste setor. Em vista disto, e inerente a qualquer processo produtivo, há maior geração de resíduos, e por conseqüência aumento dos riscos de impactos ambientais e sociais.

A cadeia produtiva do petróleo gera inevitavelmente volumes consideráveis de resíduos sólidos, líquidos e/ou gasosos. Dentre estes, a borra oleosa, resíduo gerado em altas quantidades em refinaria e indústrias petroquímicas, recebe destaque visto sua alta periculosidade. A borra oleosa é composta de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), água e sedimentos. Os TPHs constituem uma mistura complexa de alcanos, aromáticos, compostos contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre (NOS) e frações de asfaltenos (Sood et al., 2010). A maioria dos componentes da borra oleosa são tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, sendo classificados como poluentes ambientais prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA (Liu et al., 2010).

Nos últimos anos, o aumento da preocupação com os danos causados ao ambiente e à saúde populacional decorrentes da maior geração de resíduos e possível ocorrência de contaminação ambiental juntamente com o aumento da rigidez na legislação ambiental, tem motivado as empresas ao desenvolvimento de tecnologias mais limpas, visando reduzir seus impactos ambientais e contribuir para a

sustentabilidade ambiental e social. Neste sentido, o processo de biorremediação se destaca como uma alternativa favorável na gestão ambiental industrial para o tratamento de resíduos industriais altamente tóxicos.

Dentre os métodos de tratamento existentes para os resíduos de petróleo, o mais utilizado por diversas refinarias é o *Landfarming*. O *Landfarming* é uma técnica de biorremediação, que se baseia na degradação do contaminante através do metabolismo da microbiota local (Seabra, 2008). Neste processo, o resíduo é disposto diretamente na camada superficial do solo e os microrganismos heterotróficos do solo são estimulados a degradar os contaminantes presentes, transformando-os em substâncias inertes como o material orgânico estabilizado, água e CO₂. Esta estimulação ocorre através do revolvimento periódico do solo por operações de aragem e gradagem (visando a aerar e homogeneizar as camadas com diferentes concentrações de contaminantes), além da adição de corretivos, fertilizantes e, se necessário, de água através da irrigação (Jacques et al., 2007).

O processo de *Landfarming* tem sido amplamente utilizado devido a sua simplicidade e custo efetivo. Outras vantagens do método são a possibilidade de tratar grandes volumes de solo, requerimento de equipamentos simples para a manutenção, baixo consumo de energia e reduzido impacto ambiental (Hejazi et al., 2003, Maila & Cloete, 2004). Entretanto, há aspectos físicos, químicos e biológicos que dificultam o processo de biorremediação, promovendo baixo rendimento ao processo. Entre os vários fatores responsáveis pode-se destacar a baixa biodisponibilidade destes compostos, a baixa seletividade dos microrganismos aos compostos, uma provável limitação de nutrientes à biota degradadora e condições desfavoráveis de temperatura, umidade e aeração (Rizzo et al., 2006, Tyagi et al., 2011).

Como forma de aumentar a eficiência nos processos degradativos, duas estratégias tem se mostrado promissoras: bioestimulação e bioaumentação. A bioestimulação consiste na adição de oxigênio, fontes de carbono ou outros nutrientes

como nitrogênio e fósforo para estimular a atividade de microrganismos endógenos ou exógenos e a bioaugmentação consiste na adição de microrganismos com desejável capacidade degradativa no local contaminado visando aumentar a densidade de degradadores específicos do contaminante e conseqüentemente a taxa de biodegradação do contaminante (Bento et al., 2005, Andreoni & Gianfreda, 2007, Abdulsalam & Omale, 2009, Tyagi et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes técnicas de biorremediação (atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação) na biodegradabilidade de borra oleosa presentes em solos. Solos coletados de células de *Landfarming* e de área próxima sem histórico de contaminação foram comparados quanto à eficiência de remoção de hidrocarbonetos totais presentes neste importante passivo ambiental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

As amostras de borra oleosa foram coletadas de unidades de Valos de tratamento e disposição (VTD's) localizados no SICECORS (Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos)/CORSAN, na cidade de Triunfo/RS.

As amostras de solo, classificado como Argissolo Vermelho Distrófico, foram coletadas de dois locais distintos na unidade do SICECORS. Para cada local amostrado foram efetuadas coletas de 5 pontos aleatórios e distintos.

Para o estudo da biodegradação em solos impactados foram coletadas amostras de solo de células de *Landfarming*. Para estudo da biodegradação em solos não impactados foram coletadas amostras de solo sem histórico de contaminação dentro do complexo do SICECORS, o qual foi denominado de solo Nativo.

As amostras de solos foram encaminhadas ao laboratório e posteriormente homogeneizadas e peneiradas a 2 mm. Amostras representativas de solo e borra foram encaminhadas para caracterização química no Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A partir dos resultados das análises químicas (Tabela 1) a correção de pH foi realizada apenas no solo não impactado através da adição de uma mistura de CaCO_3 e MgCO_3 na relação de 3:1 e incubação dos solos até o alcance do pH requerido 6,4.

Tabela 1: Análises químicas dos solos *Landfarming* e Nativo e da borra oleosa.

Parâmetros	Solo <i>Landfarming</i>	Solo Nativo	Borra oleosa	Metodologia
Umidade	15 %	15 %	ND	Gravimetria/ 105°C
pH	6,4	5,8	ND	pH em água 1:1
Índice SMP	6,8	6,0	ND	-
Óleos e graxas	1,75 %	0,02 %	48 %	Extração por Soxhlet
Carbono orgânico	9,5 %	1,3 %	88 %	Combustão úmida/ Walkey Black
Nitrogênio	0,14 %	0,08 %	0,06 %	Kjeldahl
Fósforo Total	0,08 %	0,01 %	0,01 %	Digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP;OES
Potássio Total	0,08 %	0,07 %	<0,01 %	Digestão úmida nítrico-perclórica/ ICP;OES

ND: não determinado

2.2 Experimentos de biorremediação

Para estudar a eficiência da biodegradação de borra oleosa, foram realizados, para cada solo coletado, os tratamentos de Atenuação Natural, Bioestimulação e Bioaumentação. Foram testadas 2 formulações de nutrientes. Para cada solo testado foram montados os seguintes tratamentos em duplicata:

- 1) Solo (controle)
- 2) Atenuação Natural (AN): Solo + borra oleosa
- 3) Bioestimulação BE(N+P+): Solo + borra oleosa + Nutrientes em maior concentração

- 4) Bioaugmentação BA(N+P+): Solo + borra oleosa + Nutrientes em maior concentração
+ Consórcio bacteriano
- 5) Bioestimulação BE(N-P-): Solo + borra oleosa + Nutrientes em menor concentração
- 6) Bioaugmentação BA(N-P-): Solo + borra oleosa + Nutrientes em menor concentração
+ Consórcio bacteriano

2.3 Preparo do consórcio microbiano

O consórcio microbiano consistiu de cinco isolados bacterianos pré-selecionados como degradadores de borra oleosa e produtores de biosurfactantes. As bactérias foram isoladas de amostras de solo *Landfarming* e borra oleosa petroquímica através da técnica de enriquecimento seletivo utilizando borra oleosa como única fonte de carbono. Os isolados foram identificados com base no seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, conforme descrito no item 2.7 do capítulo II. Da borra oleosa foram selecionadas as bactérias identificadas como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cibi* e do solo foram selecionadas *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*.

O inóculo bacteriano foi preparado isoladamente através da transferência, com o auxílio de alça de platina, do isolado (cultura estoque) para frascos contendo caldo nutritivo estéril, os quais foram mantidos em agitador rotatório a 100 rpm, 30°C durante 24 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4 °C, 9000 rpm durante 15 minutos e posteriormente lavadas com solução salina estéril (0,85%), sendo este processo repetido 3 vezes. As células foram ressuspendidas em solução salina estéril (0,85%). O inóculo de cada isolado foi padronizado e o consórcio foi adicionado aos solos de cada unidade experimental de forma a inocular 10⁸ células/g de solo.

2.4 Montagem dos experimentos

Os experimentos foram realizados em frascos de vidro com fechamento hermético de capacidade útil de 1,0L. Para o cálculo da quantidade de solo colocado

em cada frasco foi levado em consideração o peso em base seca (200g). O ajuste de umidade, adição de nutrientes, microrganismos e contaminantes foi realizada em cada unidade experimental sob constante homogeneização. Os solos foram contaminados com 1,5%_{m/m} de borra oleosa petroquímica. Nos ensaios de bioestimulação e bioaumentação foram preparadas soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 , como fonte de nitrogênio e fósforo, respectivamente. Na formulação N+P+ a taxa C:N:P foi ajustada para 100:10:1 e na formulação N-P- a taxa C:N:P foi ajustada para 100:0,4:0,2. A umidade dos solos foi ajustada através da adição de água destilada estéril de forma a manter em 70% da capacidade de campo. Periodicamente, foram realizadas a aeração dos solos através de revolvimento do solo e a correção da umidade. Os experimentos foram conduzidos na antecâmara da casa de vegetação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul durante 90 dias. A temperatura ambiente foi monitorada ao longo do tempo.

2.5 Análises no solo

Os solos foram amostrados em 0 e 90 dias para a quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) e nos dias 7, 14, 21, 30, 60 e 90 para análises microbiológicas.

2.5.1 Contagem de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e heterotróficos totais

A contagem de microrganismos nos solos foi estimada através do método do Número Mais Provável (NMP) (Braddock & Catterall, 1999, Bento et al., 2005). Primeiramente, a amostra de solo foi adicionada em solução salina (0,85%) na proporção de 1:9 em tubo de ensaio e homogeneizada utilizando agitador de tubos durante 30 s. Posteriormente procederam-se diluições em placas de cultivo de 24 poços.

Para a determinação de microrganismos heterotróficos totais, foi utilizado 250 µL de caldo Triptona de Soja (TSB) em placas de cultivo de 96 poços, adicionado de 10 µL de cada diluição. As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias e o crescimento microbiano foi determinado por turbidimetria. Para a determinação de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos foi utilizado o meio mínimo mineral MM1 (composição em g/L: KCl, 0,7; KH₂PO₄, 2,0; Na₂HPO₄, 3,0; NH₄NO₃, 1,0; solução de micronutrientes, 1m/L (MgSO₄, 4,0; FeSO₄, 0,2; MnCl₂, 0,2; CaCl₂, 0,2)) (Richard & Vogel, 1999) e uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) como indicador (Bento et al., 2005, Cerqueira & Costa, 2009). Após a inoculação de cada diluição, as placas foram inoculadas com 1% de borra oleosa. As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias e o crescimento microbiano foi determinado por desenvolvimento de cor violeta (indicando redução do indicador via respiração).

A população microbiana foi então determinada usando-se tabelas de NMP (APHA, 1995).

2.5.2 Atividade respiratória

A atividade respiratória microbiana nos microcosmos contendo solos contaminados com borra oleosa foi avaliada baseada na evolução acumulativa de C-CO₂ (Stotzky, 1965). Um sistema de captura de CO₂ foi montado em cada microcosmo constituído basicamente de um copo plástico contendo 20 mL de NaOH 0,5M e suspenso em um suporte de metal. Dois frascos sem solo foram utilizados como prova em branco a fim de quantificar o CO₂ presente no frasco. Os frascos foram mantidos hermeticamente fechados e somente abertos periodicamente para determinação da respiração basal. No momento da análise, foi adicionado ao NaOH, 1 mL de BaCl₂ 30% e 3 gotas de fenolftaleína 1%. A quantidade de NaOH residual na solução foi titulada com HCl 0,5M. A quantidade de gás carbônico produzido foi dada pela equação:

$$\text{C-CO}_2 \text{ gerado (mg/Kg de solo)} = (V_B - V_A) \cdot (M_C/2) \cdot M_{\text{HCl}} \cdot \text{FC} / m \quad \text{Equação 1}$$

onde:

V_B é o volume de HCl 0,5 M utilizado para titular o branco, em mL; V_A é o volume de HCl 0,5 M utilizado para titular o tratamento, em mL; M_C é a massa molar do carbono em g/mol; M_{HCl} é a concentração molar da solução padronizada de HCl, em mol/L; FC é o fator de correção da molaridade de ácido/base ($M_{\text{HCl}}/ M_{\text{NaOH}}$) e m é massa (Kg) de solo seco no frasco.

2.5.3 Análises de Hidrocarbonetos totais de petróleo

As frações TPH-GRO (C_6 - C_{10}) e TPH-DRO (C_{10} a C_{28}) e os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foram determinados usando o método EPA 8015B/3540. As amostras de solo foram extraídas com hexano e diclorometano na proporção de 1:1,5 e uma alíquota do extrato (2 μ L) foi injetada em um cromatógrafo a gás (Dani GC1000 Laboratory Gas Chromatograph) equipado com um Detector de Ionização de Chama (FID) e coluna capilar VF-5MS (30m x 0,53mm x 1,5 μ m). O gás de arraste foi o nitrogênio. A concentração de hidrocarbonetos de petróleo foi quantificada por padronização externa. O limite de detecção do método foi de 0,05 mg/Kg.

2.5.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados empregando o teste de Tukey (comparação entre médias) a um nível de confiança de 95%, utilizando o programa *Statistica 7.1*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do crescimento microbiano

A estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais (HT) e de degradadores de hidrocarbonetos (DH) ao longo de 90 dias de tratamento estão mostrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Os tratamentos de atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação aplicados ao solo contaminado com borra oleosa mostraram maiores populações de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de hidrocarbonetos quando comparados ao solo controle ao longo do tempo. Isto indica a capacidade de tolerância e de utilização da borra oleosa como fonte de carbono e energia pela microbiota presente nos solos.

No início do processo, os tratamentos de bioestimulação e bioaugmentação mostraram maior densidade populacional microbiana do que o tratamento de atenuação natural em ambos os solos, indicando que a adição de nutrientes nas duas formulações testadas mostrou estimular o crescimento microbiano. Os microrganismos necessitam de fontes de nutrientes para seu crescimento, os quais devem estar presentes em quantidades adequadas no local contaminado (Guimarães et al., 2010). Nitrogênio, fósforo e potássio são os principais nutrientes inorgânicos adicionados ao solo para favorecer o crescimento microbiano e, conseqüentemente, aumentar a taxa degradativa do contaminante (Cerqueira & Costa, 2009). O nitrogênio (N) é necessário na síntese de aminoácidos e o fósforo (P) está envolvido no transporte de energia como a adenosina trifosfato (Mrayyan & Battikhi, 2005).

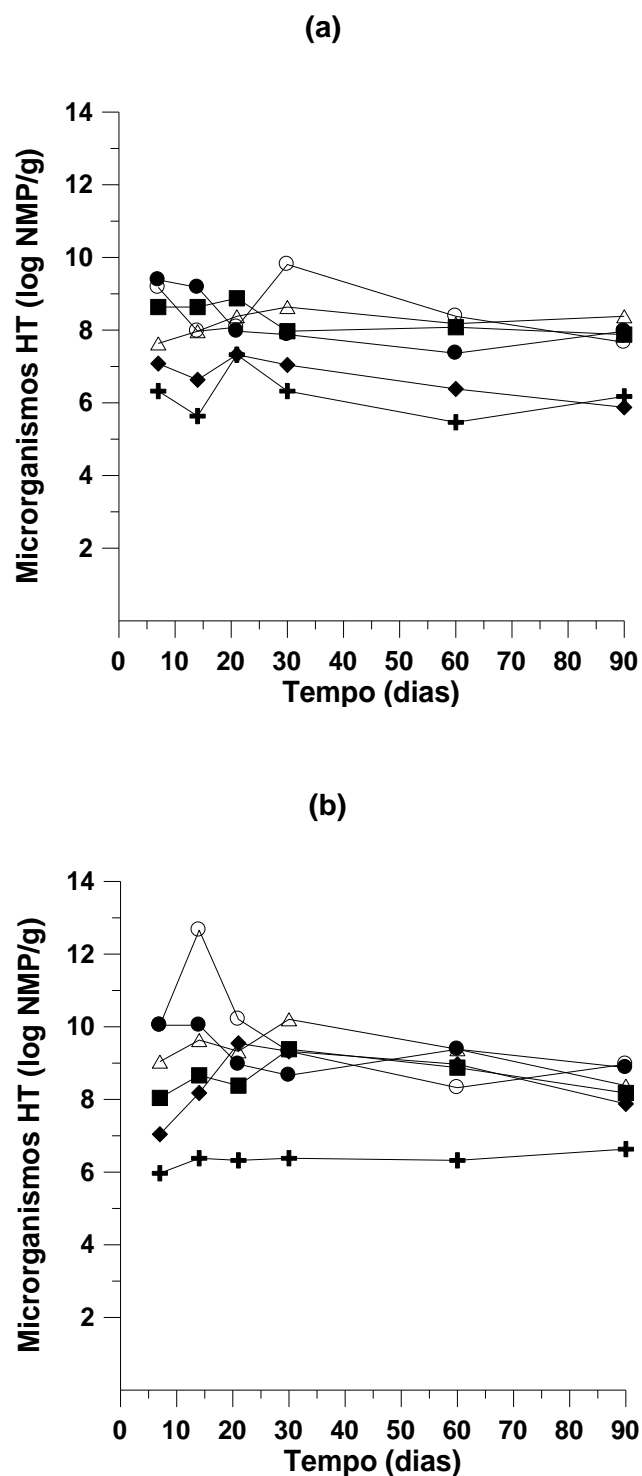


Figura 1: Estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais (log NMP/g de solo) presentes nos solos contaminados com borra oleosa ao longo de 90 dias de experimento. (a) solo *Landfarming*. (b) solo Nativo. + Controle, ◆ Atenuação Natural, ■ Bioestimulação BEN+P+, ● Bioaugmentação BAN+P+, △ Bioestimulação BEN-P-, ○ Bioaugmentação BAN-P-.

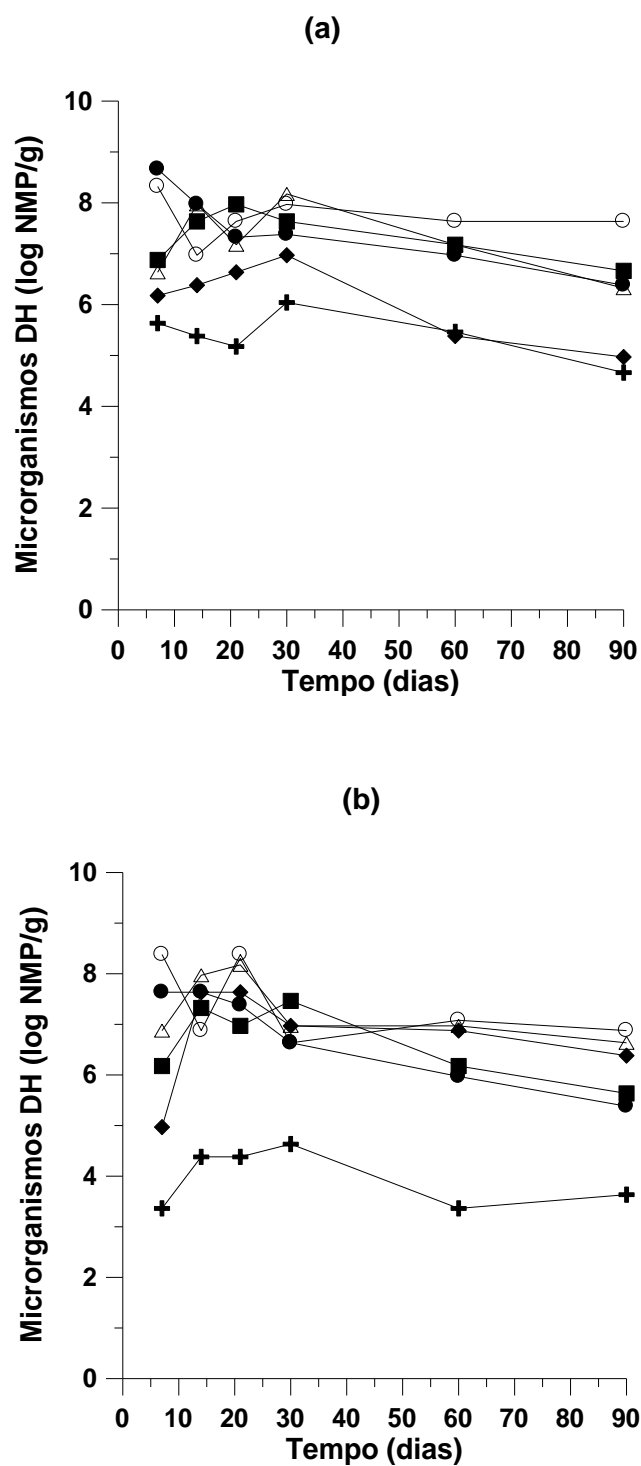


Figura 2: Estimativa do número de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (log NMP/g de solo) presentes nos solos contaminados com borra oleosa ao longo de 90 dias de experimento. (a) solo *Landfarming*. (b) solo Nativo. + Controle, ◆ Atenuação Natural, ■ Bioestimulação BEN+P+, ● Bioaugmentação BAN+P+, △ Bioestimulação BEN-P-, ○ Bioaugmentação BAN-P-.

No presente estudo, a população endógena inicial de bactérias degradadoras de borra oleosa foi de 10^3 e 10^5 NMP/g de solo. Segundo Mishra et al. (2001) este nível de população é inadequada para a biorremediação, sendo portanto necessário a adição de inóculos microbianos. De acordo com Forsyth (1995), citado por Mishra (2001), quando a população de microrganismos endógenos capazes de degradar o contaminante alvo é menor do que 10^5 UFC/g de solo, a biorremediação não ocorrerá a uma taxa significativa.

Durante o processo de degradação foi observado maior população de microrganismos heterotróficos em relação à população de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos para ambos os solos. Comportamento semelhante foi observado em estudos de biodegradação de óleo diesel em solos contaminados submetidos aos processos de atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação realizados por Bento et al. (2005).

Ao analisar a taxa de DH/HT ao longo do processo foi verificado, em média, menores valores no solo Nativo, mostrando uma maior diferença entre as populações. Isto se deve a maior população de HT alcançadas neste solo ao longo do tempo, uma vez que os solos *Landfarming* e Nativo mostraram populações próximas de DH. Provavelmente, a menor concentração de microrganismos HT nos solos *Landfarming* quando comparado ao solo Nativo, no início do processo, pode ter ocorrido devido a uma possível competição entre a microbiota pré-existente e os microrganismos adicionados. O solo *Landfarming* é caracterizado por receber e tratar resíduos do processamento do petróleo há 24 anos, o que provavelmente tenha selecionado microrganismos adaptados e com desenvolvida competência enzimática para a degradação do contaminante em estudo. A adição do consórcio pode ter provocado uma competição inicial no meio, mostrando assim densidade populacional menor do que o do solo Nativo que não apresenta histórico de contaminação. Outra

possibilidade é o fato dos microrganismos já adaptados à borra terem a utilizado mais prontamente como fonte de carbono, acarretando ao longo do tempo uma limitação de nutrientes ou possível formação de intermediários tóxicos para alguns microrganismos, reduzindo assim a taxa de crescimento.

Em relação às máximas populações de microrganismos HT e DH para cada tratamento avaliado, estas foram alcançadas nos primeiros 30 dias de processo. Após 60 dias foi observado redução na população de HT e DH para a maioria dos experimentos, indicando possível limitação de nutrientes.

3.2 Atividade microbiana

A atividade microbiana foi medida pela taxa de respiração basal através da quantificação do gás carbônico liberado no processo. As Figuras 3 e 4 mostram, respectivamente, a produção diária e acumulada de C-CO₂ ao longo de 90 dias.

Os diferentes tratamentos aplicados promoveram comportamentos semelhantes na produção de C-CO₂ em ambos solos, *Landfarming* e Nativo.

Através da Figura 3, verifica-se que as maiores produções de C-CO₂ ocorreram nos primeiros 24 dias com máxima produção em 10 dias de processo. Conforme dados obtidos no crescimento microbiano, a maior densidade populacional, em ambos os solos, ocorreu nos primeiros 30 dias de processo. Isto sugere que neste período a borra oleosa estimulou, de forma mais acentuada, o crescimento dos microrganismos e a atividade catabólica dos hidrocarbonetos presentes no contaminante.

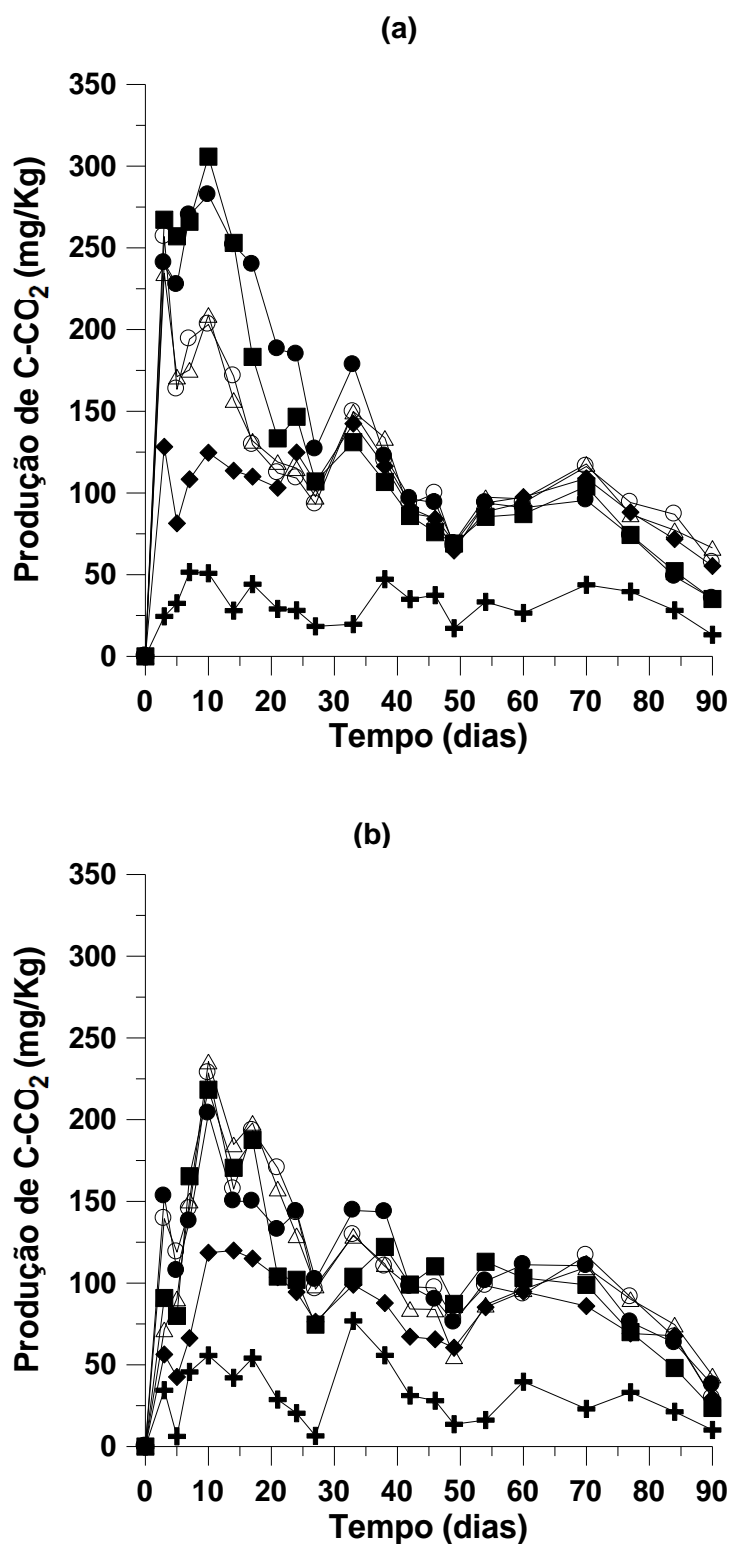


Figura 3: Produção diária de C-CO₂ (mg/Kg de solo) ao longo de 90 dias para os ensaios realizados com: (a) solo *Landfarming*. (b) solo Nativo. + Controle, ◆ Atenuação Natural, ■ Bioestimulação BEN+P+, ● Bioaumentação BAN+P+, △ Bioestimulação BEN-P-, ○ Bioaumentação BAN-P-.

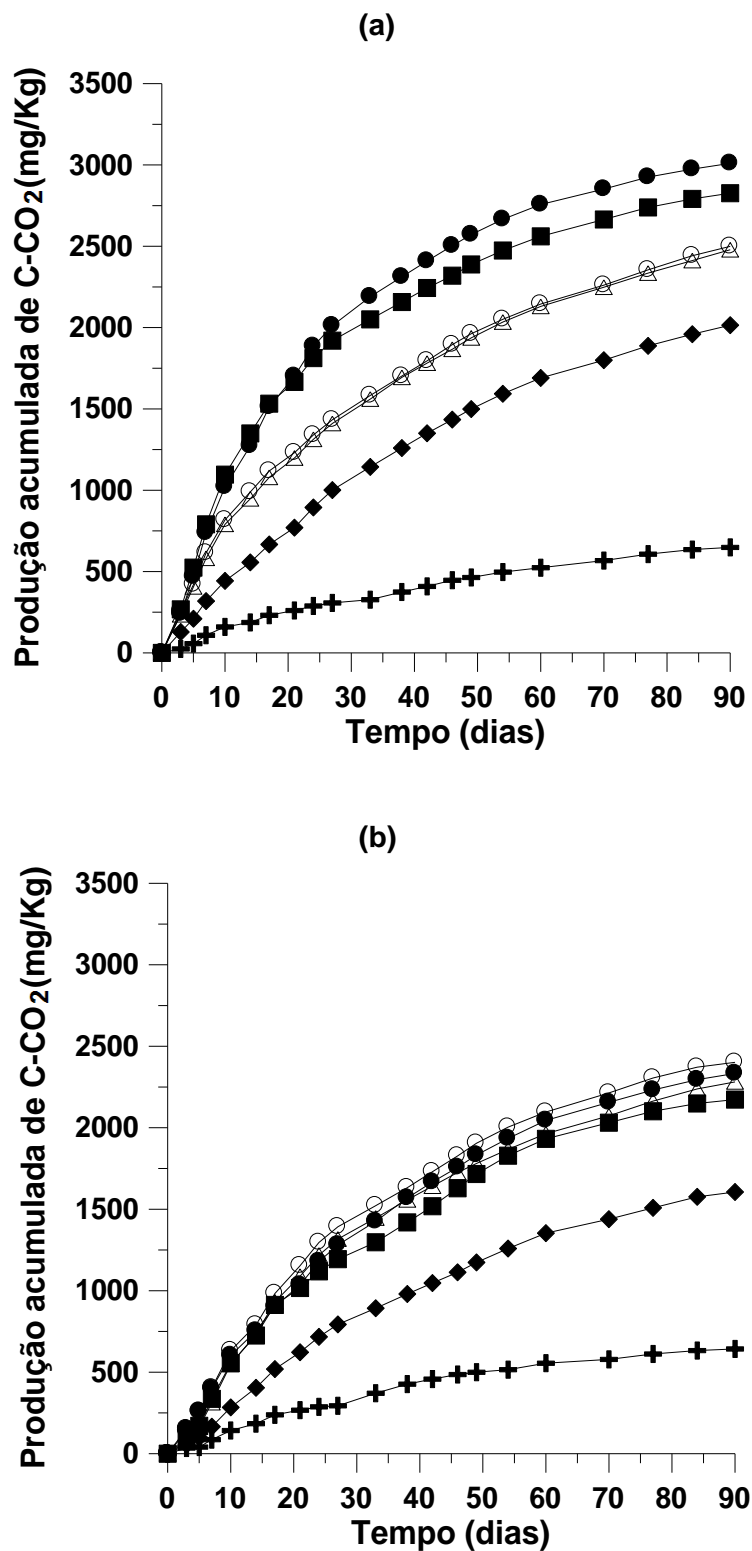


Figura 4: Produção acumulada de C-CO₂ (mg/Kg de solo) ao longo de 90 dias para os ensaios realizados com: (a) solo *Landfarming*. (b) solo Nativo. + Controle, ◆ Atenuação Natural, ■ Bioestimulação BEN+P+, ● Bioaumentação BAN+P+, △ Bioestimulação BEN-P-, ○ Bioaumentação BAN-P-.

A máxima atividade respiratória no período inicial em experimentos de biodegradação em solos também foi verificada em outros trabalhos. Em estudos realizados por Silva et al. (2009) foi observado máxima produção de C-CO₂ (aproximadamente 140 µg/g de solo) em 7 dias de tratamento de solos contaminados com uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por um consórcio formado por 5 bactérias e 3 fungos. Mariano et al. (2009) observaram produção máxima diária de CO₂ nos primeiros 20 dias em solos contaminados com óleo diesel e tratados com nutrientes e consórcio microbiano composto de *Staphylococcus hominis* e *Kocuria palustris*. Entretanto, em estudos realizados por Mielniczuk (1991) foi observado que a fase de maior produção acumulada de C-CO₂ iniciou apenas aos 30 dias de incubação em solos contaminados com 2,5, 5,0 e 10% de borra oleosa sem adição de nutrientes e de consórcio.

As adições de nutrientes e de consórcio microbiano aos solos mostraram favorecer a produção de C-CO₂ quando comparados a atenuação natural, que foi o tratamento que produziu a menor quantidade de C-CO₂ alcançando máximo de 142,4 mg/Kg em 33 dias no solo *Landfarming* e 120,0 mg/Kg em 14 dias no solo Nativo. Em trabalho realizado por Jesus (1998) durante 90 dias não foi constatado diferença significativa entre o tratamento sem a adição de bactérias e os tratamentos contendo a adição de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas* sp. aplicadas distintamente em solos contaminados com 5% de borra oleosa.

A análise da produção diária mostrou que tanto para o solo *Landfarming* quanto para o solo Nativo houve redução na produção de C-CO₂ nos diferentes tratamentos a partir de 70 dias de processo. Também foi evidenciado, para a maioria dos ensaios, redução na taxa de crescimento dos microrganismos entre 60 e 90 dias de processo. Isto provavelmente está relacionado com a limitação de nutrientes no meio. Provavelmente a microbiota apresentou maior eficiência de biodegradação de

hidrocarbonetos no primeiro mês de processo, visto que neste período foi encontrada maior densidade populacional e maior taxa de liberação de C-CO₂. Após este período, a alta população presente e a limitação de fontes facilmente utilizáveis podem ter limitado o processo de degradação de outras frações mais dificilmente degradáveis.

Em relação à produção acumulada de C-CO₂ em solos *Landfarming*, foi verificado que o tratamento de atenuação natural, o qual apresentou valor de 2014,5 mg/Kg foi o menos eficiente quando comparado aos demais tratamentos, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). O tratamento mais eficiente foi o BAN+P+, apresentando produção acumulada de 3010,1 mg/Kg. Entretanto este tratamento não diferiu estatisticamente do tratamento BEN+P+. Ao utilizar a menor quantidade de nutrientes foi verificado maior taxa metabólica no experimento de bioaugmentação, o qual apresentou 2499 mg/Kg, quando comparado ao tratamento de BEN-P- ($p > 0,05$). A utilização de nutrientes na formulação mais alta na presença somente de microrganismos endógenos e na presença de endógenos e exógenos mostrou ser mais efetiva no solo *Landfarming* do que quando utilizando a formulação de nutrientes mais baixas nos experimentos de bioestimulação e bioaugmentação ($p < 0,05$).

Em relação à produção acumulada de C-CO₂ em solos Nativo, foi verificado que o tratamento de atenuação natural foi o menos eficiente quando comparado aos demais tratamentos, apresentando valor de 1605,5 mg/Kg ($p < 0,05$). Maior produção de C-CO₂ foi obtido para o tratamento de BAN-P-, apresentando valor de 2401,1 mg/Kg. Entretanto, este tratamento não diferiu de BAN+P+ e BEN-P- que apresentaram taxas de 2332,9 e 2281,3 mg/Kg, respectivamente.

Comparando os dois solos, verifica-se que as maiores produções de C-CO₂ foram obtidas nos tratamentos de BAN+P+ e BEN-P- no solo *Landfarming*, os quais diferiram significativamente de todos os demais tratamentos ($p < 0,05$). Nestes experimentos foi possível alcançar máximo de 18% de mineralização do carbono

adicionado no início do processo. As técnicas aplicadas no presente estudo se mostraram potenciais, visto que em estudos anteriores realizados por Mielniczuk (1991) foi verificado que menos de 6% do carbono existente na borra oleosa foi liberado como C-CO₂.

3.3 Degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo

A biodegradação de borra oleosa nos dois solos pelos diferentes tratamentos foi avaliada pela redução da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) medida através de análises cromatográficas. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 2. A Figura 5 mostra a taxa de remoção das frações de TPH-GRO e TPH-DRO em relação ao conteúdo de hidrocarbonetos totais.

Tabela 2: Percentual de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) ao final de 90 dias de experimento em solo *Landfarming* e solo Nativo.

Trat.	Solo	TPH (%)	Solo	TPH (%)
AN	<i>Landfarming</i>	59,7 ± 1,5 a	Nativo	40,1 ± 0,0 c
BEN+P+	<i>Landfarming</i>	74,9 ± 2,5 b	Nativo	50,7 ± 0,0 d
BAN+P+	<i>Landfarming</i>	72,4 ± 3,9 b	Nativo	51,2 ± 0,8 ad
BEN-P-	<i>Landfarming</i>	72,2 ± 4,4 b	Nativo	46,6 ± 1,0 cd
BAN-P-	<i>Landfarming</i>	74,3 ± 0,0 b	Nativo	46,7 ± 1,5 cd

Abreviações: Trat.-Tratamento: AN- Atenuação Natural; BE- Bioestimulação ; BA- Bioaumentação; N+P+: adição de nitrogênio e fósforo em maior quantidade e N-P-: adição de nitrogênio e fósforo em menor quantidade

Letras minúsculas iguais indicam que os ensaios não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

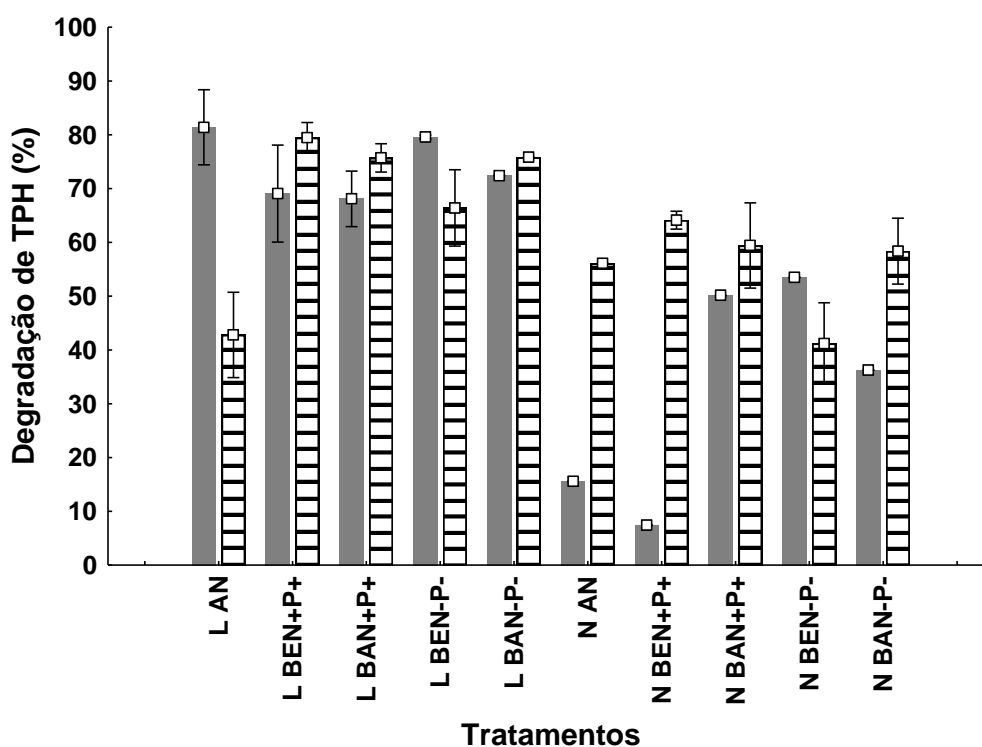


Figura 5: Valores de degradação das frações GRO (C6-C10) e DRO (C10-C28) nos diferentes tratamentos nos solos *Landfarming* e Nativo. As letras L e N na frente da sigla do tratamento indicam solo *Landfarming* e solo Nativo, respectivamente. ■ GRO, ▨DRO.

A concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo é um dos mais importantes parâmetros na avaliação de locais contaminados com petróleo. Os TPHs são divididos em grupos de acordo com o tamanho de suas cadeias de carbono. A fração de TPH-GRO compreende os compostos com cadeias de carbono entre C₆-C₁₀ e a fração de TPH-DRO compreende os compostos com cadeias de carbono entre C₁₀ e C₂₈.

Através dos resultados mostrados na Tabela 2, verifica-se que, em média, maiores taxas de biodegradação da fração TPH ocorreu em solo *Landfarming* em relação ao solo Nativo. Através da Figura 5 observa-se que, em média, a fração de TPH-GRO e TPH-DRO apresentou maior redução nos tratamentos aplicados no solo *Landfarming*.

Em ambos os solos, o tratamento de atenuação natural apresentou menores taxas de biodegradação de TPH assim como menores taxas de produção de CO₂ quando comparado aos demais tratamentos. Provavelmente, este baixo rendimento foi devido às menores populações microbianas observadas.

Em relação aos tratamentos realizados no solo *Landfarming* foi observada maior taxa de biodegradação nos tratamentos de BEN+P+ (74,9%) e BAN-P- (74,3%), os quais não apresentaram diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) e também com os tratamentos de BAN+P+ e BEN-P-. No entanto, estes foram melhores do que o tratamento de atenuação natural ($p < 0,05$). Em estudos realizados por Trindade et al. (2005) foi obtido máximo de 14,4% de biodegradação de TPH através de suplementação com nutrientes (K₂HPO₄) e da adição de inóculo (*Nocardia nova* e *Rhodotorula glutinis var. dairenensis*) em solos de *Landfarming* contaminados há 4 anos. Valores próximos ao obtido no presente trabalho, foram obtidos em estudos de Das & Mukherjee (2007), que verificaram que os níveis de TPH em solos contaminados com óleo cru foram reduzidos de 84000 para 21000 mg/Kg de solo (75% de degradação) durante a bioaugmentação utilizando duas bactérias, *P. aeruginosa* M e NM.

Dentre os tratamentos realizados no solo *Landfarming* observa-se que a AN e a BEN-P- apresentaram maior degradação na fração TPH-GRO. Isto indica a maior capacidade dos microrganismos endógenos do solo em degradar os hidrocarbonetos de cadeias mais curtas, na faixa de C₆ a C₁₀. Na AN ocorreu a maior degradação de TPH-GRO e a menor degradação de TPH-DRO. O consumo de hidrocarbonetos mais facilmente biodegradáveis (hidrocarbonetos lineares e de cadeias abertas) pode resultar na redução da biodisponibilidade de compostos mais complexos, tornando essas frações mais resistentes a degradação. A falta de fontes mais lábeis no ambiente exige da microbiota uma adaptação metabólica para

consumirem hidrocarbonetos mais recalcitrantes tornando o processo mais demorado. Além disto, em alguns casos, pode haver a produção de compostos tóxicos durante a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, que podem dificultar a subsequente biodegradação, devido à repressão no metabolismo microbiano (Xu & Lu, 2010). Já os tratamentos de BEN+P+, BAN+P+ e BAN-P- mostraram maior taxa de degradação da fração TPH-DRO. A adição de nutrientes em mais alta quantidade mostrou favorecer o metabolismo microbiano visto a maior taxa de mineralização dada pela produção de C-CO₂ e maior degradação de compostos de mais longa cadeia carbônica e, portanto menos lábeis. Ao utilizar o consórcio foi verificado maior capacidade de degradação de TPH-DRO. Além disto, visto que a degradação de hidrocarbonetos segue uma ordem preferencial, sendo os de menor cadeia mais facilmente biodegradados, pode-se inferir que a maior taxa de compostos na faixa de TPH-GRO no período final pode ter surgido como resultado da quebra de cadeias maiores, elevando seu conteúdo.

Em relação aos ensaios realizados no solo Nativo foram observadas maiores taxas de remoção de TPH nos tratamentos de BAN+P+ (51,2%) e de BEN+P+ (50,7%), não havendo diferença significativa entre eles. Estes resultados mostraram-se mais altos do que o encontrado por Xu & Lu (2010), os quais verificaram que a bioaugmentação não aumentou a taxa de remoção de TPH de óleo cru em solos durante 12 semanas, alcançando valores de 26% para experimentos contendo solo e nutrientes e 27% em solos adicionados de nutrientes e bactérias. Estes dados também foram maiores que o encontrado em estudos realizados por Mishra et al. (2001), onde foi verificado que a biodegradação de borra oleosa em 120 dias em solos foi favorecida pela adição de nutrientes e consórcio microbiano composto de 5 bactérias alcançando 48,5% comparado a somente 17% quando tratado com nutrientes somente. Valores mais altos foram encontrados por Liu et al. (2010) estudando a biorremediação por bioestimulação dos microrganismos endógenos de solos

contaminados com 241000 mg/Kg de borra oleosa durante 360 dias, alcançando degradação de 58,2% no conteúdo de TPH de borra oleosa.

No solo Nativo, os ensaios contendo a adição de nutrientes em maiores quantidades mostraram favorecer o crescimento microbiano e a atividade catabólica de hidrocarbonetos quando comparado ao tratamento de atenuação natural. A adição de nutrientes em menores concentrações favoreceu o crescimento microbiano, alcançando a máxima concentração de heterotróficos totais. No entanto, apresentou menor taxa de biodegradação não diferindo estatisticamente da atenuação natural ($p>0,05$). Neste sentido, provavelmente os nutrientes tenham favorecido o crescimento de microrganismos não degradadores os quais competiram com os degradadores pelos nutrientes disponíveis, resultando na repressão da degradação do composto. Culturas de microrganismos capazes de degradar poluentes orgânicos podem falhar nessa função quando inoculados em ambientes naturais, pois estão susceptíveis a toxinas ou predadores presentes no ambiente. Eles podem usar outros compostos em preferência ao contaminante ou ser incapaz de se mover através do solo para o local contaminado causado pela adsorção física às partículas de solo (Márquez-Rocha et al., 2001).

No solo Nativo foi observado que os tratamentos BAN+P+ e BEN+P+ foram os que apresentaram maior taxa de degradação da fração TPH-DRO. O tratamento de BAN+P+ se destacou visto que apresentou remoção de 42,7% da fração TPH-GRO a mais do que o experimento de BEN+P+.

Os microrganismos endógenos do solo mostraram maior capacidade de degradar a fração TPH-GRO quando foram adicionados nutrientes em menor quantidade. O consórcio microbiano mostrou maior potencial de degradação da fração TPH-DRO, assim como os microrganismos endógenos em meio contendo nutrientes em maior quantidade. Isto indica que os microrganismos presentes no consórcio

apresentam enzimas especializadas na quebra de cadeias carbônicas mais complexas.

Embora no solo nativo, o tratamento de BAN+P+ mostrou ser o mais efetivo visto à maior taxa degradativa de TPH e alta degradação de TPH-DRO e TPH-GRO, este não diferiu estatisticamente da taxa de degradação de TPH na atenuação natural em solos *Landfarming*.

O melhor tratamento da borra oleosa ocorreu em solo *Landfarming*, alcançando taxas de degradação em torno de 70%, provavelmente devido à existência de microbiota altamente adaptada ao contaminante. O aumento na concentração de nutrientes mostrou maior atividade microbiana, no entanto não afetou significativamente a taxa de biodegradação de TPH entre os tratamentos de bioestimulação e bioaumentação no solo *Landfarming*. Entretanto, a adição de nutrientes e do consórcio bacteriano aos solos mostrou favorecer a biodegradação de borra oleosa quando comparada à atenuação natural. A partir do estudo, foi possível verificar que se faz interessante a adição do consórcio bacteriano e de nutrientes na mais alta taxa testada visando aumentar a eficiência no processo de mineralização de TPH no *Landfarming*.

4. CONCLUSÃO

Os tratamentos de bioestimulação e bioaumentação mostraram maiores taxas de biodegradação de borra oleosa em solos intemperizados e em solos sem histórico de contaminação quando comparado ao tratamento de atenuação natural. A utilização de nutrientes em maior quantidade mostrou favorecer o crescimento microbiano e a taxa de biodegradação no solo Nativo (em torno de 50%) e nos solos *Landfarming* (em torno de 74%). Os resultados obtidos sugerem a potencialidade da adição do consórcio bacteriano e correção nutricional em mais altas doses em solos

Landfarming para o aumento da eficiência da mineralização da borra oleosa petroquímica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao SICECORS e à BRASKEM pela disponibilidade da coleta das amostras de borra oleosa e solos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão de bolsa de Iniciação Científica. O trabalho foi financiado com recursos do Laboratório de Biodeterioração de Biocombustíveis e dos Programas de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e em Ciência dos Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULSALAM, S., OMALE, A.B. Comparison of biostimulation and bioaugmentation techniques for the remediation of used motor oil contaminated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 3, 747-754, 2009.

ANDREONI, V., GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 76, 287- 308, 2007.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed., Washington, 1995.

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

BRADDOCK, J.F., CATTERALL, P.H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, 3, 81-84, 1999.

CERQUEIRA, V.S., COSTA, J.A.V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química nova**, 32, 394-400, 2009.

DAS, K., MUKHERJEE, A.S. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, 98, 1339–1345, 2007.

GUIMARÃES, B.C.M., ARENDS, J.B.A., HA, D.V.D., WIELE, T.V., BOON, N., VERSTRAETE, W. Microbial services and their management: Recent progresses in soil bioremediation technology. **Applied Soil Ecology**, 46, 157-167, 2010.

HEJAZI, R.F., HUSAIN, T., KHAN, F.I. *Landfarming* operation of oily sludge in arid region—human health risk assessment. **Journal of Hazardous Materials B99**, 287–302, 2003.

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

JESUS, H.S. Isolamento e caracterização de bactérias biodegradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactantes. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

LIU, W., LUO, Y., TENG, Y., LI, Z., MA, L.Q. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. **Environmental Geochemistry and Health**, 32, 1, 23-29, 2010.

MAILA, M.P., CLOETE, T.E. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through *Landfarming*: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? **Reviews in Environmental Science & Bio/Technology**, 3, 3, 349–360, 2004.

MARIANO, A.P., ANGELIS, D.F., PIRÔLLO, M.P.S., CONTIERO, J., BONOTTO, D.M. Investigation about the Efficiency of the Bioaugmentation Technique when Applied to Diesel Oil Contaminated Soils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 5, 1297-1312, 2009.

MÁRQUEZ-ROCHA, F.J., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, V. LAMELA, M.A.T. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. **Water, Air, and Soil Pollution**, 128, 313–320, 2001.

MIELNICZUK, C. A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo. **Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

MISHRA, S., JYOT, J., KUHAD, R.C., LAL, B. Evaluation of Inoculum Addition To Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 4, 1675–1681, 2001.

MRAYYAN, B., BATTIKHI, M.N. Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordanian petroleum sludge. **Journal of Hazardous Materials B120**, 127–134, 2005.

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

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. **Série tecnologia Ambiental**. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

SEABRA, P.N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. Em: Melo, I.S., Azevedo, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2008.

SILVA, I.S., SANTOS, E.C., MENEZES, C.R., FARIA, A.F., FRANCISCON, E., GROSSMAN, M., DURRANT, L.R. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. **Bioresource Technology**, 100, 4669–4675, 2009.

SOOD, N., PATLE, S., LAL, B. Bioremediation of acidic oily sludge-contaminated soil by the novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6. **Environmental Science & Pollution Research**, 17, 603-610, 2010.

STOTZKY, G. Microbial Respiration. In: **Methods in soil analysis**. Black, C.A. (Ed.). Madison:SSSA, 1965. P:1550-1572.

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

TYAGI, M., FONSECA, M.M.R., CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and Biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, 22, 231–241, 2011.

XU, Y., LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials**, 183, 1-3, 395-401, 2010.

CAPÍTULO V-

**COMPARAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS
IMPACTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE BORRA OLEOSA E SOB DIFERENTES SISTEMAS**

COMPARAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS IMPACTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BORRA OLEOSA E SOB DIFERENTES SISTEMAS

RESUMO

O tratamento de resíduos químicos industriais utilizando técnicas de biorremediação em solos tem mostrado ser uma alternativa ambientalmente favorável. O emprego das técnicas de bioestimulação (adição de nutrientes) e de bioaugmentação (adição de microrganismos) tem surgido como potenciais métodos visando o estímulo da atividade microbiana, aumento da população de microrganismos degradadores e conseqüentemente o aumento da eficiência no processo de remoção dos poluentes ambientais. No presente trabalho, foram avaliadas diferentes técnicas de biorremediação (atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação) em solos contaminados com diferentes concentrações de borra oleosa (1,5 e 6,0%) em dois sistemas diferentes (aberto e fechado). Os solos utilizados foram coletados de células de *Landfarming*, os quais recebem resíduos petroquímicos há 24 anos. Os experimentos foram mantidos em ambiente protegido de intempéries e com temperatura variável durante 90 dias. Os resultados mostraram que maiores taxas de biodegradação foram obtidas em solos contaminados a 6% e em sistema fechado. A adição de consórcio microbiano composto de 5 bactérias e a adição de nutrientes em diferentes doses mostraram eficiência na taxa de biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) quando comparados ao tratamento de atenuação natural. Os solos tratados em sistema fechado mostraram maior taxa de biodegradação (84,1%) quando contaminados a 6% e adicionados de consórcio bacteriano e menor taxa de nutrientes. Em sistema aberto, os solos contaminados a 6% utilizando o tratamento de bioestimulação na maior quantidade de nutrientes mostrou a maior taxa de degradação (78,7%). A utilização de consórcios microbianos e nutrientes mostrou favorecer a taxa de biodegradação de TPH presentes na borra oleosa.

Palavras-chave: bioaugmentação, bioestimulação, biorremediação, borra oleosa, hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH)

1. INTRODUÇÃO

Durante o processamento do petróleo consideráveis volumes de um resíduo denominado de borra oleosa são gerados. Um dos principais problemas enfrentados pelas refinarias e indústrias petroquímicas se refere à disposição segura deste resíduo, visto que seu destino e/ou tratamento inadequado pode ocasionar sérios impactos ambientais e potenciais riscos à saúde humana (Cameotra & Singh, 2008, Xu & Lu, 2010). A borra oleosa é caracterizada pelos elevados níveis de hidrocarbonatos totais de petróleo (TPH), que são constituídos basicamente pelas frações alifáticas, aromáticas, resinas e asfaltenos (Ayotamuno et al., 2007). Compostos como o benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos contribuem significativamente para as propriedades toxicológicas do resíduo, apresentando potencial mutagênico e carcinogênico (Rizzo et al., 2006, Kriipsalu et al., 2008).

O processo de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos, o qual visa degradar e/ou destoxificar os contaminantes orgânicos através do metabolismo microbiano, tem sido estabelecido como um tratamento eficiente, econômico, versátil (Singh & Lin, 2008). Nas indústrias processadoras de petróleo, o processo de *Landfarming* é um método freqüentemente escolhido para o tratamento de resíduos do processamento, em especial a borra oleosa, devido à sua simplicidade de operação, seu menor custo quando comparado a outras técnicas, alto potencial na remoção de contaminante e potencial de alta taxa de aplicação de resíduos, que varia de 83 a 252 m³/ha/ano (Marín et al., 2005, Jacques et al., 2007). Entretanto, este método apresenta diversas limitações. Dentre estas podemos citar a necessidade de grandes espaços, a necessidade de gerenciamento e controle adequado, exposição a condições ambientais desfavoráveis ao crescimento

microbiano e ineficiência na redução dos níveis de contaminantes inorgânicos (Khan et al., 2004).

A eficiência de um processo de biorremediação de áreas contaminadas depende de diversos fatores, sendo os mais importantes a presença de microrganismos com excelente capacidade catabólica no local contaminado, condições ambientais e nutricionais favoráveis ao crescimento e metabolismo microbiano, a composição e concentração do contaminante, e a biodisponibilidade do poluente ao ataque pela microbiota local.

Para o aumento da eficiência nos processos de biorremediação de contaminantes ambientais, duas técnicas têm sido propostas: bioestimulação e/ou bioaugmentação. O processo de bioestimulação consiste na introdução de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos, no sistema contaminado objetivando estimular o crescimento e atividade da população microbiana presente. O processo de bioaugmentação consiste na introdução de microrganismos, previamente caracterizados como potenciais degradadores do contaminante alvo, no ambiente contaminado visando aumentar a população microbiana e conseqüentemente a taxa de biodegradação (Sarkar et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de biorremediação de solos contaminados com diferentes concentrações de borra oleosa em sistemas aberto e fechado utilizando as técnicas de bioestimulação e bioaugmentação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

A borra oleosa foi coletada de unidades de Valos de Tratamento e Disposição (VTDs) localizados no Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos (SICECORS) do Pólo Petroquímico de Triunfo, na cidade de Triunfo/RS, Brasil.

O solo (Argissolo Vermelho Distrófico) foi coletado de células de *Landfarming*, pertencentes à UNIB-BRASKEM localizados no SICECORS, no período final de tratamento da última remessa de borra oleosa. Foram feitas coletas em 5 pontos ao acaso de cada local. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Biorremediação de Solos, homogeneizadas e no caso do solo, peneirada a 2 mm. As amostras foram então encaminhadas ao Laboratório de Análise de Solos para a caracterização química.

2.2 Experimentos de Biorremediação

Foram testadas diferentes taxas de contaminação (1,5 e 6%) em diferentes sistemas (aberto e fechado). A contaminação do solo foi realizada no laboratório no momento da instalação dos experimentos. Para cada combinação de taxa de contaminação e sistema foram montados os seguintes tratamentos em triplicata:

- 1) Atenuação Natural (AN): Solo + borra oleosa
- 2) Bioestimulação BE(N+P+): Solo + borra oleosa + Nutrientes em maior concentração
- 3) Bioaugmentação BA(N+P+): Solo + borra oleosa + Nutrientes em maior concentração
+ Consórcio bacteriano
- 4) Bioestimulação BE(N-P-): Solo + borra oleosa + Nutrientes em menor concentração
- 5) Bioaugmentação BA(N-P-): Solo + borra oleosa + Nutrientes em menor concentração
+ Consórcio bacteriano

Nos ensaios de bioestimulação e bioaumentação foi avaliada a eficiência de duas formulações diferentes de nutrientes. Foram realizados ensaios controle consistindo de solo sem aplicação de contaminação e tratamentos.

2.3 Preparo do inóculo bacteriano

Nos ensaios de bioaumentação foram utilizados um consórcio microbiano composto de 5 bactérias com potencial de biodegradação de borra oleosa e de produção de biosurfactantes isolados diretamente da borra oleosa (*Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cibi*) e do solo (*Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*). Os isolados foram identificados com base no seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA conforme descrito no item 2.7 do Capítulo II.

O inóculo bacteriano foi preparado isoladamente através da transferência, com o auxílio de alça de platina, do isolado (cultura estoque) para frascos contendo caldo nutritivo estéril, os quais foram mantidos em agitador rotatório a 100 rpm, 30°C durante 24 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4 °C, 9000 rpm durante 15 minutos e posteriormente lavadas com solução salina estéril (0,85%), sendo este processo repetido 3 vezes. As células foram ressuspensas em solução salina estéril (0,85%). O inóculo de cada isolado foi padronizado e o consórcio foi adicionado aos solos de cada unidade experimental de forma a inocular 10^8 células/g de solo.

2.4 Montagem dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em frascos de vidro com capacidade útil de 1,0L. Nos ensaios em sistema fechado os frascos foram hermeticamente tampados. A quantidade de solo colocado em cada frasco foi calculada em base do

peso seco (200g). Os solos foram contaminados com 1,5 e 6%_{p/p} de borra oleosa petroquímica.

Nos experimentos de bioestimulação e bioaumentação foi feita a adição de nitrogênio e fósforo usando soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 , respectivamente. A taxa C:N:P foi ajustada para 100:10:1 e 100:0,4:0,2 nos experimentos de maior e menor quantidades de nutrientes, respectivamente.

A umidade dos solos foi ajustada periodicamente pela adição de água destilada estéril de forma a manter a capacidade de campo em 70%. O revolvimento dos solos foi feito periodicamente com o intuito de aumentar a taxa de aeração nos solos. Os experimentos foram conduzidos na antecâmara da casa de vegetação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul durante 90 dias. A temperatura ambiente foi monitorada ao longo do tempo (Anexos A2 e A3).

2.5 Análises no solo

Os solos foram amostrados em 0 e 90 dias para a quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) e nos dias 7, 14, 30, 60 e 90 para análises microbiológicas.

2.5.1 Contagem de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e heterotróficos totais

A contagem de microrganismos nos solos foi feita pelo método de NMP (Número Mais Provável) (Braddock & Catterall, 1999). Inicialmente, a amostra de solo foi adicionada em solução salina (0,85%) na proporção de 1:9 em tubo de ensaio e homogeneizada utilizando agitador de tubos durante 30 s. A seguir foram feitas diluições em placas de cultivo de 24 poços.

Para a determinação de microrganismos heterotróficos totais, foi utilizado 250 µL de meio TSB (Tryptic Soy Broth) em placas de cultivo de 96 poços, adicionado

de 10 µL de cada diluição. As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias e o crescimento microbiano foi determinado por turbidimetria. Para a determinação de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos foi utilizado o meio mínimo mineral MM1 (composição em g/L: KCl, 0,7; KH₂PO₄, 2,0; Na₂HPO₄, 3,0; NH₄NO₃, 1,0; solução de micronutrientes, 1m/L (MgSO₄, 4,0; FeSO₄, 0,2; MnCl₂, 0,2; CaCl₂, 0,2)) (Richard & Vogel, 1999) e uma solução de cloreto de tetrazólio (TTC) como indicador (Bento et al., 2005, Cerqueira & Costa, 2009). Após a inoculação de cada diluição, as placas foram inoculadas com 1% de borra oleosa. As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias e o crescimento microbiano foi determinado por desenvolvimento de cor violeta (indicando redução do indicador via respiração). A população microbiana foi então determinada usando-se tabelas de NMP (APHA, 1995).

2.5.2 Atividade respiratória

A atividade respiratória microbiana nos microcosmos em sistema fechado contendo solos contaminados com borra oleosa foi avaliada pela evolução acumulativa de CO₂ (Stotzky, 1965). Um sistema de captura de CO₂ foi montado em cada microcosmo constituído por um copo plástico contendo 20 mL de NaOH 0,5M e suspenso em um suporte de metal. Dois frascos sem solo foram utilizados como prova em branco para quantificar o CO₂ presente no frasco. Os frascos foram mantidos hermeticamente fechados e somente abertos periodicamente para determinação da respiração basal. Para a análise, foi adicionado ao NaOH, 1 mL de BaCl₂ 30% e 3 gotas de fenolftaleína 1%. A quantidade de NaOH residual na solução foi titulada com HCl 0,5M. A quantidade de gás carbônico produzido foi calculada pela equação:

$$\text{C-CO}_2 \text{ gerado (mg/Kg de solo)} = (V_B - V_A) \cdot (M_C/2) \cdot M_{\text{HCl}} \cdot FC / m \quad \text{Equação 1}$$

onde:

V_B é o volume de HCl 0,5 M utilizado para titular a prova em branco, em mL; V_A é o volume de HCl 0,5 M utilizado para titular o tratamento, em mL; M_C é a massa molar

do carbono em g/mol; M_{HCl} é a concentração molar da solução padronizada de HCl, em mol/L; FC é o fator de correção da molaridade de ácido/base (M_{HCl}/M_{NaOH}) e m é massa (Kg) de solo seco no frasco.

2.5.3 Análises de Hidrocarbonetos totais de petróleo

Os hidrocarbonetos totais de petróleo foram determinados pelo método EPA 8015B/3540. As amostras de solo foram extraídas com hexano e diclorometano na proporção de 1:1,5 e uma alíquota do extrato (2 μ L) foi injetada em um cromatógrafo a gás (Dani GC1000 Laboratory Gas Chromatograph) equipado com um Detector de Ionização de Chama (FID) e coluna capilar VF-5MS (30m x 0,53mm x 1,5 μ m). Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste. A concentração de hidrocarbonetos de petróleo foi quantificada por padronização externa. O limite de detecção do método foi de 0,05 mg/Kg.

2.5.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Tukey (comparação entre médias) a um nível de confiança de 95%, utilizando o programa *Statistica 7.1*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do crescimento microbiano

A população de microrganismos heterotróficos totais (HT) e microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (DH) foram quantificados ao longo do tempo nos experimentos de biodegradação de solos contaminados com 1,5% e 6,0% de borra oleosa conduzidos em sistema aberto (Figuras 1 e 2) e em sistema fechado (Figuras 3 e 4).

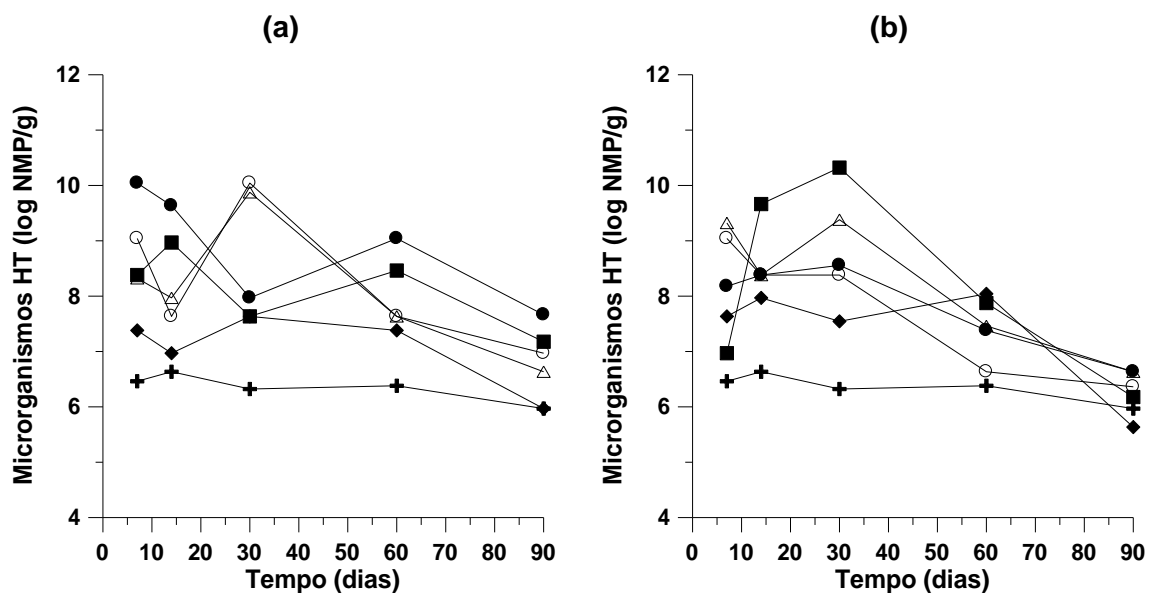


Figura 1: Estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais (log NMP/g de solo) ao longo de 90 dias em solos contaminados com (a) 1,5% e (b) 6% em sistema aberto. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaumentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaumentação BA(N-P-).

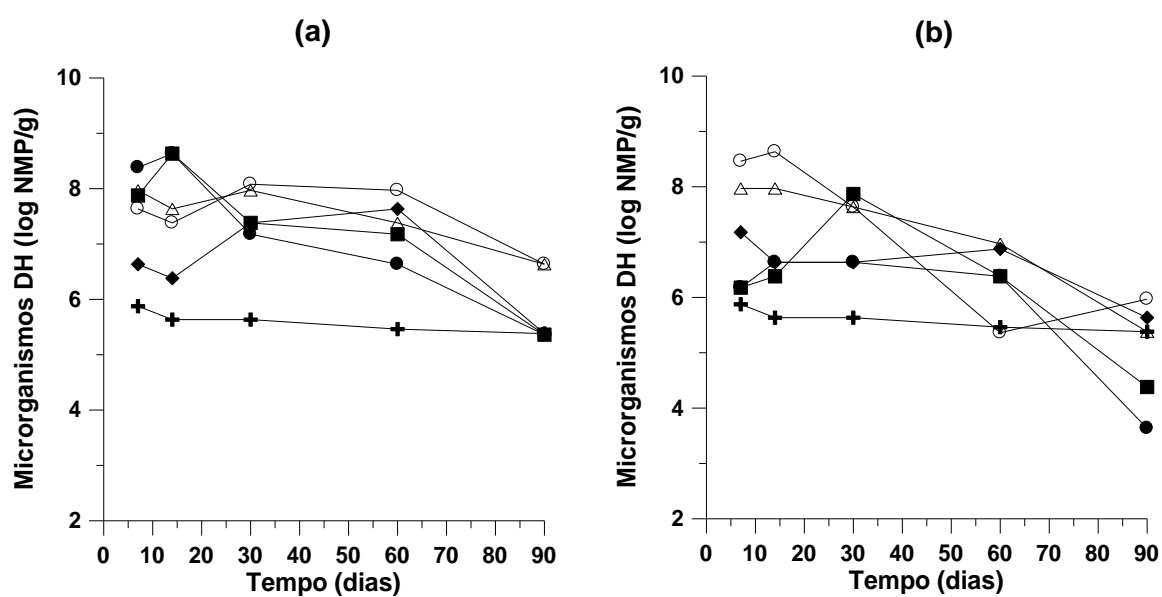


Figura 2: Estimativa do número de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (NMP/g de solo) ao longo de 90 dias em solos contaminados com (a) 1,5% e (b) 6% em sistema aberto. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaumentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaumentação BA(N-P-).

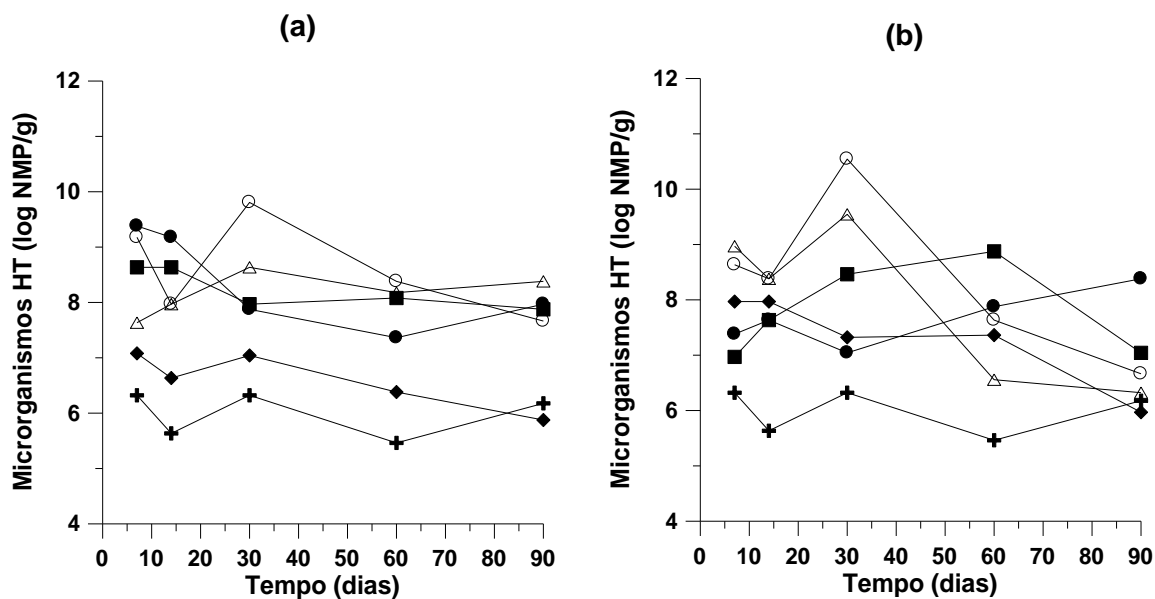


Figura 3: Estimativa do número de microrganismos heterotróficos totais (log NMP/g de solo) ao longo de 90 dias em solos contaminados com (a) 1,5% e (b) 6% em sistema fechado. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaumentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaumentação BA(N-P-).

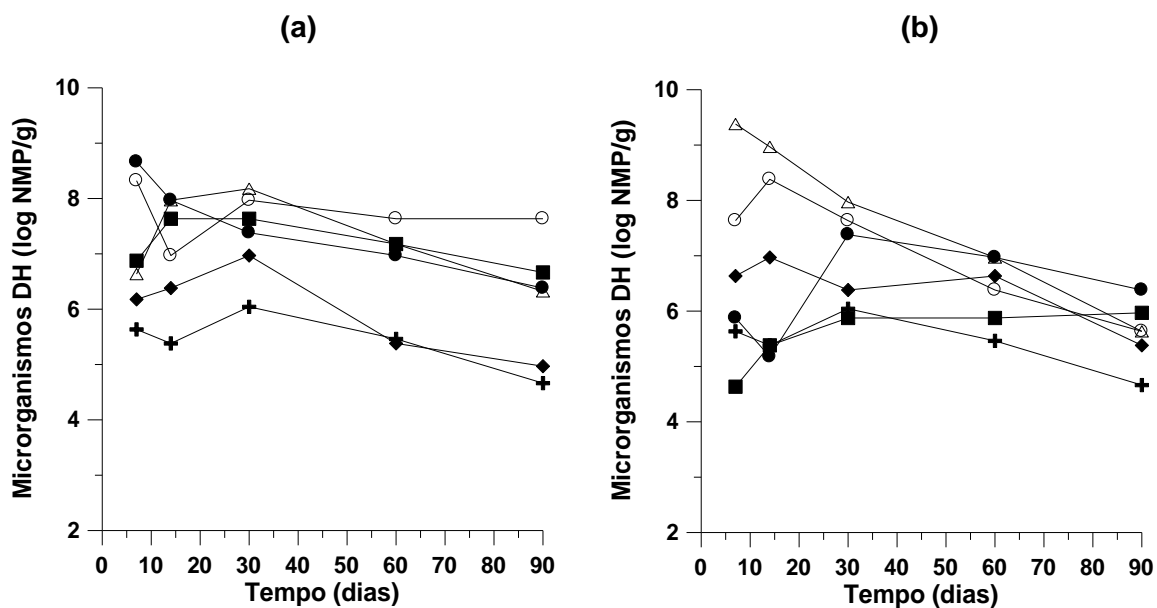


Figura 4: Estimativa do número de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (log NMP/g de solo) ao longo de 90 dias em solos contaminados com (a) 1,5% e (b) 6% em sistema fechado. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaumentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaumentação BA(N-P-).

Os experimentos de bioestimulação (BE) e bioaumentação (BA) em sistema aberto para ambas contaminações de 1,5 e 6% mostraram que as máximas populações de microrganismos HT e DH foram alcançadas em até 30 dias de processo. A máxima população de microrganismos HT ($2,1 \times 10^{10}$ NMP/g) foi obtida em 30 dias de processo no experimento de BEN+P+ em solos contaminados com 6%. Máxima população de microrganismos DH ($4,3 \times 10^8$ NMP/g) foi obtida nos experimentos de BEN+P+ e BAN+P+ em solos contaminados com 1,5% em 14 dias e no experimento de BAN-P- para solo contaminado a 6% em 14 dias.

Os experimentos de bioestimulação e bioaumentação em sistema fechado para a concentração de 1,5% mostraram que as máximas populações de microrganismos HT e DH foram alcançadas em até 30 dias de processo. Em solos contaminados a 6%, a adição de nutrientes em maior quantidade mostrou maiores populações de HT em 60 e 90 dias e de DH em 30 e 90 dias. Já a menor aplicação de nutrientes mostrou máximas de HT e DH em até 30 dias. O experimento de BAN-P- e contaminação de 6% foi o que apresentou maior população de microrganismos HT ($3,5 \times 10^{10}$ NMP/g) em 30 dias de processo. Máxima população de microrganismos DH ($2,4 \times 10^9$ NMP/g) foi obtida nos experimentos de BEN-P- em solos contaminados com 6,0 % em 7 dias de processo.

Em todos os tratamentos aplicados, os microrganismos mostraram capacidade de tolerância e crescimento na borra oleosa. Em ambientes contaminados com hidrocarbonetos, a sobrevivência de microrganismos após sua inoculação, o conteúdo e diversidade das comunidades microbianas endógenas e a depleção de nutrientes são importantes fatores que afetam a taxa de biodegradação do contaminante. A adição de nutrientes pode influenciar tanto a taxa como a extensão da biodegradação de poluentes orgânicos, pois alteram a dinâmica da comunidade de

populações microbianas heterotróficas (Das & Mukherjee, 2007, Machín-Ramírez et al., 2008).

3.2 Atividade respiratória microbiana

A atividade metabólica dos microrganismos foi monitorada pela medida da respiração microbiana nos solos contaminados a 1,5% e 6% de borra oleosa tratados em sistema fechado. As Figuras 5 e 6 mostram a produção de C-CO₂ avaliada durante o experimento e a produção acumulada ao longo de 90 dias, respectivamente.

Pode-se observar na Figura 5a que todos os tratamentos aplicados nos solos contaminados a 1,5% apresentaram maiores produções de C-CO₂ nos primeiros 30 dias de processo. As maiores taxas de mineralização ocorreram nos tratamentos BAN+P+ (282,4 mg/Kg) e BEN+P+ (305,9 mg/Kg) em 10 dias. Nos tratamentos com menor taxa de nutrientes, a máxima produção foi alcançada em 3 dias de processo. Provavelmente, no período inicial de processo as frações mais lábeis presentes na borra oleosa foram prontamente utilizadas como fonte de carbono e energia pela microbiota presente, visto que neste período foram observadas as máximas populações microbianas DH e máximas taxas de mineralização. Tem sido reportado que compostos orgânicos de baixa massa molecular e estruturas moleculares mais simples são preferencialmente degradados por muitos microrganismos, sendo que compostos com estruturas mais complexas, tais como HPAs, com mais do que cinco anéis benzênico, apresentam maior resistência ao ataque microbiano (López et al., 2008). Estudo feito por Marín et al. (2005) mostrou que as emissões de CO₂ diminuiriam gradualmente conforme as frações de hidrocarbonetos mais lábeis desapareciam, permanecendo somente a fração mais recalcitrante.

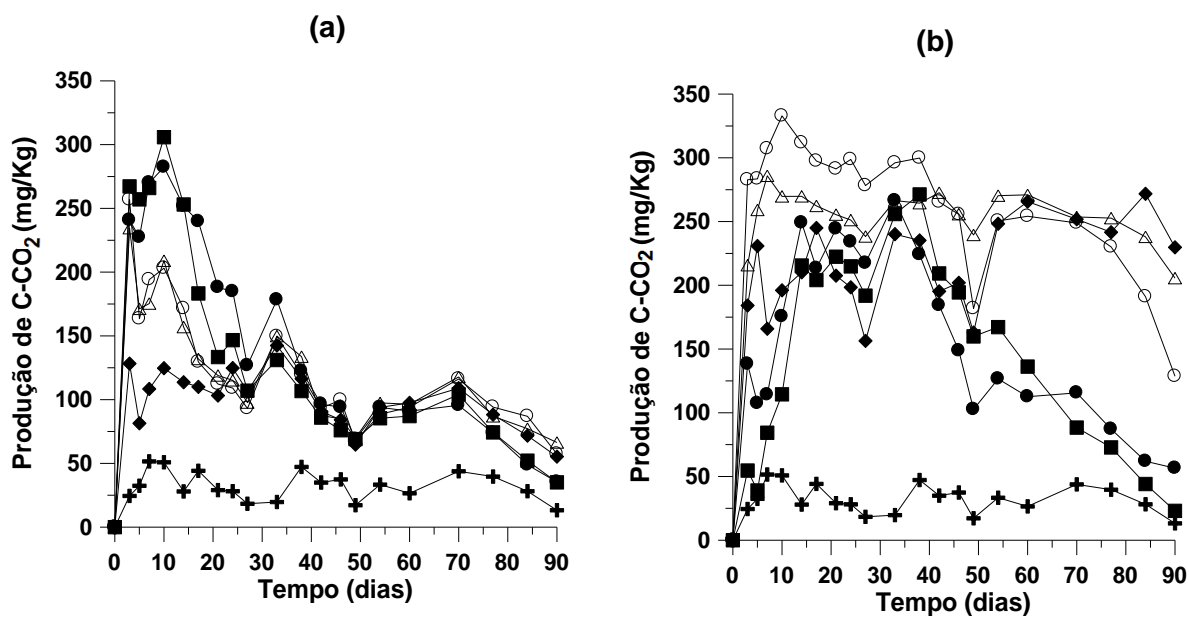


Figura 5: Produção diária de C-CO₂ (mg/Kg de solo) ao longo de 90 dias para os ensaios em sistema fechado contaminados com (a) 1,5% (b) 6,0%. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaumentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaumentação BE(N-P-).

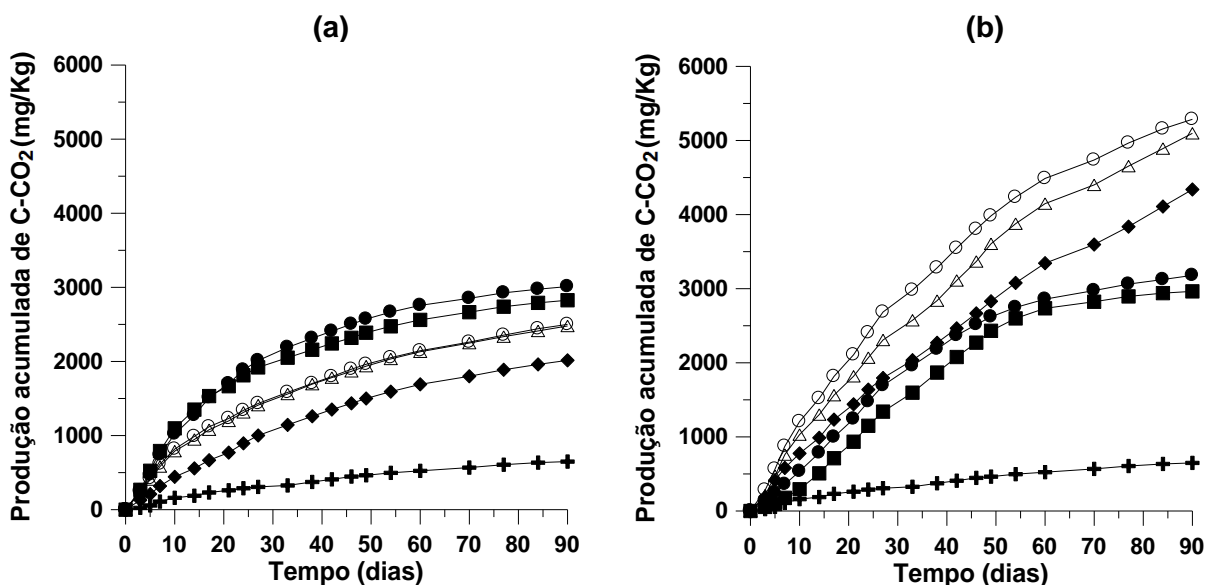


Figura 6: Produção acumulada de C-CO₂ (mg/Kg de solo) ao longo de 90 dias para os ensaios em sistema fechado contaminados com (a) 1,5% (b) 6,0%. + Controle, ◆ Atenuação Natural AN, ■ Bioestimulação BE(N+P+), ● Bioaumentação BA(N+P+), △ Bioestimulação BE(N-P-), ○ Bioaumentação BE(N-P-).

Conforme mostrado na Figura 6a observa-se que a partir do trigésimo dia a produção acumulada de C-CO₂ começou a estabilizar para todos os tratamentos avaliados. Isto indica que a mineralização da borra oleosa ocorreu acentuadamente em um período de 30 dias. A partir de 70 dias de processo, foi observada redução na produção de C-CO₂ em todos os tratamentos testados, indicando possível inibição da atividade catabólica da microbiota local.

Os tratamentos de bioestimulação e bioaumentação em solos contaminados a 1,5% mostraram maiores taxas de mineralização do que o tratamento de atenuação natural (Tabela 1). Maiores produções acumuladas de C-CO₂ aos 90 dias de tratamento ocorreram para os experimentos de BAN+P+ (3010,1 mg/Kg) e BEN+P+ (2825,9 mg/Kg), os quais diferiram estatisticamente do tratamento de atenuação natural.

Tabela 1: Produção acumulada de C-CO₂ em solos contaminados com 1,5 e 6,0% em sistema fechado (F).

Exp.	Cont.	Trat.	Prod.acumulada de C-CO ₂ (mg/Kg)
11	1,5%	AN	2014,5 ± 36,7 d
12	1,5%	BE(N+P+)	2825,9 ± 55,7 bc
13	1,5%	BA(N+P+)	3010,1 ± 63,9 bc
14	1,5%	BE(N-P-)	2478,3 ± 40,7 bd
15	1,5%	BA(N-P-)	2499,2 ± 35,2 bd
16	6,0%	AN	4338,4 ± 108,9e
17	6,0%	BE(N+P+)	2963,0 ± 37,9 bc
18	6,0%	BA(N+P+)	3179,8 ± 51,8 c
19	6,0%	BE(N-P-)	5097,0 ± 447,6 a
20	6,0%	BA(N-P-)	5286,2 ± 128,1 a

Abreviações: Exp.- experimento; Cont.- Nível de contaminação;

Trat.-Tratamento: AN- Atenuação Natural; BE- Bioestimulação; BA- Bioaumentação;

N+P+: adição de nitrogênio e fósforo em maior quantidade e N-P-: adição de nitrogênio e fósforo em menor quantidade

Letras minúsculas iguais indicam que os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para a resposta estudada.

Na Figura 5b observa-se que o período de alta produção de C-CO₂ nos experimentos contaminados com 6% de borra oleosa foi maior que nos solos contaminados a 1,5%, provavelmente devido à maior quantidade de hidrocarbonetos a serem metabolizados.

Os tratamentos atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação com menor taxa de nutrientes mostraram altas produções durante os 90 dias de processo. A máxima produção de C-CO₂ ocorreu em 10 dias no experimento de BAN-P- (332,9 mg/Kg) e em 7 dias no experimento BEN-P- (285,9 mg/Kg). Máxima população de microrganismos DH ($2,4 \times 10^9$ NMP/g) em solos contaminados com 6,0 % foi obtida em 7 dias de processo no experimento de BEN-P-. A adição de nutrientes em menor quantidade mostrou favorecer a mineralização ao longo de todo processo degradativo, mostrando maior produção diária nos tempos iniciais de processo. Provavelmente, a fase inicial de liberação de C-CO₂ esteja relacionada à fração de hidrocarbonetos alifáticos, que correspondem à fração mais lábil presente na borra oleosa, onde foi verificado máximo de mineralização. Provavelmente, nestes experimentos, a microbiota presente foi capaz de degradar em maior taxa a fração de hidrocarbonetos aromáticos, que se caracterizam como frações mais dificilmente biodegradáveis. Conforme citado por Tahhan et al. (2011), apesar da degradação de alcanos começar quase que imediatamente à incubação do solo, os compostos aromáticos são ativamente degradados em um estágio tardio em um cenário de degradação de hidrocarbonetos mistos, provavelmente porque os alcanos são as fontes de carbono preferidas até os microrganismos serem capazes de utilizar tanto alcanos como aromáticos. Além disso, os compostos aromáticos são mais fortemente sorvidos ao solo do que alcanos, o que faz com que sua degradação ocorra mais lentamente. Deve-se considerar que juntamente com a sorção, a baixa solubilidade e assim baixa

biodisponibilidade, constituem uma etapa limitante crítica na biodegradação de HPAs (Tahhan et al., 2011).

Nos tratamentos em que foram adicionados maiores taxas de nutrientes observou-se redução na produção de C-CO₂ a partir de 54 dias. Máximas produções para os tratamentos BEN+P+ (271,2 mg/K g) e BAN+P+ (266,5 mg/Kg) ocorreram em 38 e 33 dias, respectivamente. De acordo com a contagem microbiana, foram observadas máximas populações de DH em 30 e 90 dias. Além disto, foi observado que o tratamento de atenuação natural mostrou maior taxa de mineralização do que os tratamentos onde foram aplicadas maiores taxas de nutrientes ($p < 0,05$). Uma possibilidade é o fato dos microrganismos degradadores, os quais mostraram maiores populações nos períodos iniciais, terem degradado em maior quantidade as frações de hidrocarbonetos presentes na borra oleosa nos primeiros 30 dias e a partir de seus metabólitos produzidos terem estimulado o crescimento de HT, os quais mostraram maior densidade populacional a partir de 30 dias de processo. Assim, a competição pelas fontes de energia e possível limitação de nutrientes aos DH podem ter suprimido a atividade catabólica dos microrganismos DH. Em estudos realizados por Tahhan & Abu-Ateih (2009) a adição de nitrogênio (NH₄NO₃) e fósforo (KH₂PO₄) na taxa de C:N:P de 50:10:1 inibiu a mineralização de TPH de borra oleosa nas concentrações 44,2, 22,2, e 11,1 g/Kg de TPH adicionadas, aumentando com o aumento da taxa de aplicação de borra oleosa.

A adição do consórcio bacteriano mostrou maiores taxas de mineralização quando comparada aos tratamentos de bioestimulação. Isto mostra a capacidade dos microrganismos adicionados na contribuição do aumento da taxa de mineralização das diferentes frações de hidrocarbonetos presentes na borra oleosa. As bactérias presentes no consórcio foram isoladas do solo *Landfarming* e da borra oleosa, objetos do presente estudo, e selecionadas em meio líquido quanto à capacidade de

degradação de hidrocarbonetos presentes na borra oleosa e produção de biossurfactantes. Os isolados mostraram capacidade de crescimento e mineralização de TPH em solos contaminados a 1,5 e 6%. De acordo com Nasser et al. (2010), o uso de microbiota nativa para a bioaugmentação é preferida pois esses microrganismos têm maior capacidade para adaptação ao poluente do que microrganismos exógenos e microrganismos geneticamente modificados, os quais podem levar à transferência de gene, o que não é desejável (Nasser et al., 2010). A utilização de consórcios microbianos pode ser interessante quando se deseja aumentar a taxa e extensão da biodegradação dos hidrocarbonetos constituintes da borra oleosa, visto sua complexa composição de alcanos, compostos aromáticos, frações de resinas e asfaltenos. Populações mistas com uma ampla faixa de capacidades enzimáticas e relações de metabolismo são requeridas para a mineralização de borra oleosa, frente aos microrganismos individuais que podem mineralizar somente uma faixa limitada de substratos de hidrocarbonetos (Gallego et al., 2007, López et al., 2008).

O nível de contaminação e os tratamentos, bem como a interação destes fatores, mostraram influência na taxa de produção de $C-CO_2$. Em média, maiores taxas de mineralização foram obtidas nos solos contaminados a 6%. Pode-se observar que a melhor condição para obter maiores taxas de mineralização da borra oleosa em sistema fechado foi nos tratamentos de bioaugmentação e bioestimulação usando menores concentrações de nutrientes em solos contaminados com 6% de borra oleosa.

3.3 Degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo

A Tabela 2 mostra as taxas de biodegradação alcançadas nos diferentes tratamentos em sistema aberto e em sistema fechado em solos contaminados com 1,5 e 6,0% de borra oleosa.

Tabela 2: Degradação de TPH (%) obtido nos diferentes tratamentos aplicados aos solos contaminados com 1,5 e 6,0% em sistema aberto (A) e fechado (F).

Exp.	Sist.	Cont.	Trat.	Degradação de TPH (%)
1	A	1,5%	AN	52,7 ± 0,46 a
2	A	1,5%	BE(N+P+)	60,4 ± 3,53 ab
3	A	1,5%	BA(N+P+)	57,0 ± 0,16 a
4	A	1,5%	BE(N-P-)	67,2 ± 4,24 bdi
5	A	1,5%	BA(N-P-)	58,7 ± 0,33 ab
6	A	6,0%	AN	70,3 ± 2,36 cd
7	A	6,0%	BE(N+P+)	78,7 ± 1,31 cjk
8	A	6,0%	BA(N+P+)	74,6 ± 1,37 cdk
9	A	6,0%	BE(N-P-)	76,7 ± 3,24 cjk
10	A	6,0%	BA(N-P-)	72,8 ± 0,04 cdk
11	F	1,5%	AN	59,7 ± 1,5 ai
12	F	1,5%	BE(N+P+)	74,9 ± 2,5 eghcd
13	F	1,5%	BA(N+P+)	72,4 ± 3,9 egcd
14	F	1,5%	BE(N-P-)	72,2 ± 4,4 egcd
15	F	1,5%	BA(N-P-)	74,3 ± 0,0 egcd
16	F	6,0%	AN	74,9 ± 2,3 fgcd
17	F	6,0%	BE(N+P+)	78,8 ± 0,4 fgc
18	F	6,0%	BA(N+P+)	79,6 ± 2,8 fgc
19	F	6,0%	BE(N-P-)	84,1 ± 0,9 fhj
20	F	6,0%	BA(N-P-)	81,3 ± 0,5 fgk

Abreviações: Exp.- experimento; Sist.- Sistema; Cont.- Nível de contaminação;

Trat.-Tratamento: AN- Atenuação Natural; BE- Bioestimulação ; BA- Bioaumentação;

N+P+: adição de nitrogênio e fósforo em maior quantidade e N-P-: adição de nitrogênio e fósforo em menor quantidade

Letras minúsculas iguais indicam que os ensaios não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para a resposta estudada.

Ao analisar os sistemas aplicados, verifica-se que, em média, foram obtidas maiores taxas de degradação ao utilizar o sistema fechado ($p<0,05$). O sistema fechado apresenta como vantagens o maior controle de perdas abióticas bem como maior controle da umidade dos solos. Durante o período experimental foi verificado que o sistema aberto apresentou maior taxa de evaporação de água, com

necessidade de períodos mais freqüentes de correção da umidade para manter os solos com 70% da capacidade de campo. Em processo de biorremediação de solos contaminados o teor de umidade deve ser mantido entre 50-80% da capacidade de campo para que taxas ótimas de degradação sejam obtidas (Rizzo et al., 2006). A biorremediação em sistema aberto como é o caso do *Landfarming*, mostra como principal desvantagem a influência das condições ambientais tais como temperatura e umidade, fatores estes determinantes na atividade microbiana. Considerando que as estações do ano são marcadas por grandes variações climáticas, apresentando extremos de temperatura e de períodos com maior predominância de precipitações ou de estiagem, pode-se afirmar que o sistema aberto não apresenta regularidade na eficiência de degradação ao longo do ano. Deve-se considerar que reduzidos teores de umidade afetam negativamente o metabolismo microbiano, a movimentação dos microrganismos e o transporte de nutrientes no solo. Por outro lado, teores excessivos de umidade limitam o transporte de oxigênio no solo (Rizzo et al., 2006).

O nível de contaminação aplicado mostrou influência na taxa de biodegradação de borra oleosa ($p < 0,05$), sendo que a contaminação de 6% mostrou, em média, maior taxa de biodegradação.

Considerando os dois sistemas e os dois níveis de contaminação, em média, maiores degradações ocorreram nos tratamentos de BEN-P- e BEN+P+, seguido dos tratamentos BAN-P- e BAN+P+, e AN.

Foi observado que taxas de nutrientes na relação de C:N:P de 100:0,4:0,2 favoreceu, em média a taxa de biodegradação de TPH da borra oleosa. A taxa de C:N:P de 100:10:1 também mostrou ser efetiva na degradação de hidrocarbonetos. De acordo com Adoki & Orugbani (2007), a bactéria requer cerca de 10 partes de carbono para 1 parte de nitrogênio para um eficiente crescimento. Se esta taxa torna-se maior, por exemplo, 100:1 ou 1000:1, como um resultado de contaminação de ambientes por

produtos de petróleo, o crescimento e a utilização da fonte de carbono será retardada. Este fato não foi evidenciado no presente estudo.

Em média, a aplicação de microrganismos apresentou menores taxas de biodegradação do que nos tratamentos contendo apenas a adição de nutrientes.

Em estudos realizados por Mariano (2006), o bioaumento com o consórcio bacteriano foi a variável que apresentou relativamente o menor efeito positivo nas taxas de biodegradação. Conforme este autor, o bioaumento pode não apresentar efeitos positivos, ou meramente marginais, na biodegradação de hidrocarbonetos, pois pode ocorrer inibição entre as cepas usadas no consórcio construído artificialmente. De acordo com Hamed et al. (2010) a inibição das cepas inoculadas em ambientes naturais pode ocorrer uma vez que estas estão susceptíveis a competidores presentes no ambiente além dos efeitos tóxicos causados por metabólitos intermediários produzidos por algumas cepas. Além disso, os microrganismos podem metabolizar outros compostos orgânicos em preferência ao poluente ou serem incapazes de percolarem no solo até atingir os pontos de contaminação (Mariano, 2006). O sucesso do uso de inóculos microbianos requer que os microrganismos entrem em contato com os contaminantes, contudo, a adsorção física às partículas do solo ou a filtração através de pequenos poros podem limitar o transporte dos microrganismos. Em estudos conduzidos por Machín-Ramírez et al. (2008), onde foram estudados diferentes tratamentos de biodegradação de solos contaminados com borra oleosa, a remoção de TPH foi maior quando aplicada a bioestimulação do que a atenuação natural e bioaugmentação com consórcios endógenos e exógenos, sendo a concentração inicial de TPH reduzida de 133000 a 93000 mg/Kg de solo em 15 dias no tratamento de bioestimulação.

O percentual de biodegradação variou de 52,7% (AN em sistema aberto e contaminação de 1,5%) a 84,1% (BEN-P- em sistema fechado e contaminação de

6%). A adição de nutrientes e de microrganismos aos solos contaminados com 1,5 e 6,0% de borra oleosa, nos sistemas aberto e fechado, mostraram favorecer a biodegradação em comparação com os tratamentos de atenuação natural. Isto evidencia que a deficiência de nutrientes e/ou a baixa atividade degradadora da microbiota local é em parte responsável pela persistência do óleo no solo contaminado.

Considerando a taxa de redução de TPH de cada tratamento de bioestimulação e bioaumentação em relação ao tratamento de atenuação natural dentro de cada bloco experimental, observam-se maiores taxas de degradação nos solos contaminados na menor concentração testada (1,5%) em sistema fechado, sendo obtido máximo de 15,2% no BEN+P+. Comportamento semelhante foi observado por Tahhan & Abu-Ateih (2009), os quais verificaram que a eficiência na remoção de TPH da borra oleosa em diferentes concentrações (44,2, 22,2, e 11,1 g/Kg de TPH) em solos durante 120 dias foi maior para a menor taxa de borra aplicada. Já os solos contaminados a 6% de borra oleosa e tratados em sistema fechado, maior taxa de redução (9,3%) na concentração de TPH comparada à atenuação natural ocorreu no tratamento BEN-P-. Os tratamentos BEN+P+ e BAN+P+ em solos contaminados a 6% em sistema fechado mostraram menor taxa de redução (3,9 e 4,7% respectivamente) na concentração de TPH, bem como menor taxa de mineralização.

3.4 Comportamento da atividade microbiana x taxas de degradação

Nos solos contaminados a 1,5% e tratados em sistema aberto, verificou-se que a adição de nutrientes em menor quantidade favoreceu o crescimento dos microrganismos DH tanto nos experimentos BE como BA a partir de 2 semanas, mantendo-se em maior número até o final do cultivo quando comparado aos

experimentos com maior quantidade de nutrientes, os quais mostraram favorecer a população de HT. Os tratamentos BEN-P- e BAN-P- mostraram maiores taxas degradativas, alcançando 67,2 e 58,7% de redução de TPH, respectivamente. Neste caso, provavelmente a degradação ocorreu durante todo o período experimental, visto a predominância de DH após 30 dias. Já para BEN+P+ e BAN+P+, a degradação de TPH pode ter ocorrido nos tempos iniciais onde houve maior população de DH. A condição de maior quantidade de nutrientes favoreceu ao longo do tempo o desenvolvimento dos HT que provavelmente competiram pela fonte de carbono e nutrientes disponíveis com os DH, acabando por predominar no ambiente. Como consequência, menor taxa de biodegradação de TPH foi obtida. Um dos principais problemas da maioria dos isolados utilizados para a biorremediação de solos contaminados com óleo é sua incapacidade de competir com a população endógena do solo quando aplicada a campo (Adoki & Orugbani, 2007).

Nos solos contaminados a 1,5% e tratados em sistema fechado, a adição de nutrientes em menor quantidade mostrou favorecer o crescimento de DH no tratamento com o consórcio (BAN-P-), o qual se manteve com maior número após 30 dias. A adição de maior quantidade de nutrientes promoveu queda ao longo do tempo no tratamento com BA favoreceu o crescimento no período inicial com BE. As maiores taxas de degradação foram obtidas em BEN+P+ e em BAN-P-, que apresentaram degradação de TPH de 74,9 e 74,3%, respectivamente. Os tratamentos com maior e menor quantidades de nutrientes mostraram taxas de mineralização próximas ($p > 0,05$). De acordo com as análises de liberação de C-CO₂, observa-se que os experimentos com maior e menor quantidade de nutrientes não apresentaram diferença na taxa de mineralização.

Nos solos contaminados a 6% e tratados em sistema aberto, a adição de nutrientes em menor quantidade favoreceu o crescimento dos microrganismos DH no

período inicial. No entanto, foi verificado que para o tratamento com BAN-P-, houve queda acentuada no crescimento, principalmente em 8 semanas, o qual alcançou o mesmo número de microrganismos DH presente no tratamento com AN. Neste tratamento foi também evidenciada a menor taxa de biodegradação de TPH. Provavelmente, os nutrientes nitrogênio e fósforo foram limitantes, visto a presença de maior quantidade de microrganismos degradadores e maior quantidade de carbono adicionada. A adição de maiores quantidades de nutrientes mostrou pouca variação na população de DH no tratamento BAN+P+. No entanto, com BEN+P+ houve acentuado crescimento na população de DH, alcançando o máximo em 30 dias. As maiores taxas de biodegradação ocorreram com BEN+P+ (78,7%) e com BEN-P- (76,7%).

Nos solos contaminados a 6% e tratados em sistema fechado, verificou-se que a adição de nutrientes em menor quantidade favoreceu o crescimento de DH alcançando populações máximas de $2,4 \times 10^9$ e $2,4 \times 10^8$ NMP/g em 7 e 14 dias nos tratamentos BEN-P- e BAN-P-, respectivamente. Entretanto, o uso de nutrientes em maior quantidade mostrou inibir o crescimento de DH mostrando populações de $4,3 \times 10^4$ e $7,5 \times 10^5$ NMP/g em 7 dias em BEN+P+ e BAN+P+, respectivamente. A adição de maiores doses de nutrientes mostrou em média menores populações de DH comparado aos experimentos com menores doses de nutrientes. Nestes tratamentos, máximas populações de DH foram obtidas em 90 dias para o BEN+P+ ($9,3 \times 10^5$ NMP/g) e em 30 dias para o BAN+P+ ($2,4 \times 10^7$ NMP/g). Este efeito inibidor foi também evidenciado na medida da atividade microbiana onde houve a menor taxa de liberação de C-CO₂ quando comparado a AN e a BEN-P- e BAN-P-. No entanto, de acordo com as análises cromatográficas, não foi observada diferença significativa entre as taxas de biodegradação dos tratamentos BEN+P+ e BAN+P+ com os tratamentos BEN-P- e BAN-P-, que apresentaram as maiores taxas de degradação de

TPH, sendo de 84,1 e 81,3% respectivamente. Em estudo realizado por Chaîneau et al. (2005) foi verificado que um nível adequado de fertilização aumentou as taxas de biodegradação de óleo cru em solos durante 150 dias, enquanto que a fertilização excessiva teve efeito negativo. A máxima biodegradação alcançada foi de 62% em solos com baixa taxa de fertilização (850 mg N/Kg de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, 85 mg P /Kg de Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 e 240 mg /Kg de KH_2PO_4), seguida de 49% em solos com alta fertilização (3000 mg N/Kg de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, 450 mg P /Kg de Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 e 1500 mg /Kg de KH_2PO_4), enquanto que a atenuação natural contribuiu para 47% de degradação (Chaîneau et al., 2005).

No presente trabalho, a utilização de nutrientes e consórcio bacteriano mostrou incrementar a taxa de biodegradação da borra oleosa em solos, alcançando máximo de 84,1% de degradação de TPH em 90 dias de processo em solos contaminados a 6% e 74,9% em solos contaminados a 1,5%. Valores menores de biodegradação foram encontrados em outros trabalhos. Em estudos conduzidos por Vasudevan e Rajaram (2001), os quais estudaram o efeito da adição de nutrientes e de consórcio microbiano formado por *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium* e *Aeromonas*, na degradação de solos contaminados com 5% de borra oleosa durante 90 dias, foi encontrado máximo de 65% de degradação no tratamento contendo nutrientes inorgânicos e consórcio microbiano e degradação de 40% em tratamento contendo apenas a adição do consórcio microbiano. Liu et al. (2010) estudaram a biorremediação por bioestimulação dos microrganismos endógenos de solos contaminados com 241000 mg/Kg de borra oleosa durante 360 dias, atingindo máximo de 58,2% de degradação no conteúdo de TPH de borra oleosa. Em trabalho realizado por Marín et al. (2005), os quais estudaram a biorremediação de borra oleosa de refinaria por *Landfarming*, foi

verificado degradação de 80% de hidrocarbonetos em 11 meses de experimento, sendo que metade desta redução ocorreu nos primeiros três meses.

4. CONCLUSÃO

Os tratamentos de bioaumentação, pela aplicação do consórcio bacteriano selecionado, e de bioestimulação, pela adição dos nutrientes nitrogênio e fósforo, mostraram incremento na taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo da borra oleosa presente em solos. Maiores taxas biodegradativas foram obtidas com a utilização de sistema fechado e maiores taxas de contaminação (6%) de borra oleosa ($p < 0,05$). Os nutrientes adicionados na menor e maior dose mostraram não afetar a taxa de biodegradação em solos. No entanto, em solos contaminados com a maior taxa de contaminantes, o excesso de nutrientes causou a inibição da mineralização dos hidrocarbonetos comparada aos demais tratamentos.

Assim, o estudo mostrou a possibilidade do tratamento de maiores quantidades de borra oleosa utilizando menores quantidades de nutrientes em solos *Landfarming*. A utilização do consórcio bacteriano mostrou ser eficiente e favorecer a taxa de mineralização dos TPHs presentes na borra oleosa. O sistema fechado mostrou ser o mais adequado por apresentar maior degradação de TPH e melhor controle das variações das condições ambientais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao SICECORS e à BRASKEM pela disponibilidade da coleta das amostras de borra oleosa e solos, à CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado e à FAPERGS pela concessão de bolsa de Iniciação Científica. O trabalho foi financiado com recursos do Laboratório de Biodeterioração de Biocombustíveis e dos Programas de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e em Ciência dos Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOKI, A., ORUGBANI, T. Influence of nitrogenous fertilizer plant effluents on growth of selected farm crops in soils polluted with crude petroleum hydrocarbons. **African Journal of Agricultural Research**, 2, 11, 569-573, 2007.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25, 3389-340, 1997.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed., Washington, 1995.

AYOTAMUNO, M.J., OKPARANMA, R.N., NWENEKA, E.K., OGAJI, S.O.T., PROBERT, S.D. Bio-remediation of a sludge containing hydrocarbons. **Applied Energy**, 84,936-943, 2007.

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

BRADDOCK, J.F., CATTERALL, P.H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, 3, 81-84, 1999.

CAMEOTRA, S.S., SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62, 274-280, 2008.

CHAÎNEAU, C.H., ROUGEUX, G., YÉPRÉMIAN, C., OUDOT, J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. **Soil Biology & Biochemistry**, 37, 1490-1497, 2005.

CERQUEIRA, V.S., COSTA, J.A.V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química nova**, 32, 394-400, 2009.

DAS, K., MUKHERJEE, A.K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, 98, 1339-1345, 2007.

GALLEGO, J.L.R., MARTINÉZ, M.J.G., LLAMAS, J.F., BELLOCH, C., PELÁEZ, A.I., SÁNCHEZ, J. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. **Biodegradation**, 18, 269-281, 2007.

HAMED, S.B., REZGUI, R., HALLEB, A., GHRAM, A., OUESLATTI, R., LABAT, M., MAAROUFI, A. Efficiency of refinery sludge biodegradation using municipal wastewater and activated sludge and effect of hydrocarbon concentration on culturable bacteria community. **Annals of Microbiology**, 60, 747-755, 2010.

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

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

KRIIPSALU, M., MARQUES, M., MAASTIK, A. Characterization of oily sludge from a wastewater treatment plant flocculation–flotation unit in a petroleum refinery and its treatment implications. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, 10, 79-86, 2008.

LIU, W., LUO, Y., TENG, Y., LI, Z., MA, L.Q. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. **Environmental Geochemistry and Health**, 32, 23-29, 2010.

LÓPEZ, M.E.M., GARCIA, F.E., GÓMEZ, B.C., VAZQUEZ, R.R., CASTAÑEDA, G.S., CORTÉS, J.B. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 61, 151-160, 2008.

MACHÍN-RAMÍREZ, C., OKOH, A.I., MORALES, D., MAYOLO-DELOISA, K., QUINTERO, R., TREJO-HERNÁNDEZ, M.R. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. **Chemosphere**, 70, 737–744, 2008.

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

MARÍN, J.A., HERNANDEZ, T., GARCIA, C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. **Environmental Research**, 98, 185-195, 2005.

NASSERI, S., KALANTARY, R.R., NOURIEH, N., NADDAFI, K., MAHVI, A.H., BARADARAN, N. Influence of bioaugmentation in biodegradation of PHAs-contaminated soil in bio-slurry phase reactor. Iranian **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, 7, 3, 199-208, 2010.

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

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. **Série tecnologia Ambiental**. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

SAMBROOK, J., ROUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SARKAR, D., FERGUSON, M., DATTA, R., BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136, 1, 187-195, 2005.

SINGH, C., LIN, J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology** , 7, 12, 1927-1932, 2008.

STADEN, R., BEAL, K.F., BONFIELD, J.K. The staden package. **Methods in Molecular Biology**, 132:115-130, 2003.

STOTZKY, G. Microbial Respiration. In: **Methods in soil analysis**. Black, C.A. (Ed.). Madison:SSSA, 1965. p.1550-1572.

TAHHAN, R.A., ABU-ATEIH, R.Y. Biodegradation of petroleum industry oily-sludge using Jordanian oil refinery contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63, 1054-1060, 2009.

TAHHAN, R.A., AMMARI, T.G., GOUSSOUS, S.J., AL-SHDAIFAT, H.I. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 65, 130-134, 2011.

VASUDEVAN, N., RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environment International**, 26, 409- 411, 2001.

XU, Y., LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials**, 183, 395-401, 2010.

CAPÍTULO VI-

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

DISCUSSÃO GERAL

As indústrias petroquímicas no Brasil utilizam o processo de *Landfarming* para o tratamento de resíduos oleosos gerados durante toda a sua cadeia produtiva. Em países, tais como, os Estados Unidos, França, Nova Zelândia, Holanda e Suécia este método também tem sido utilizado. A escolha por este método se deve ao menor custo de implantação e manutenção quando comparado a outros métodos e por utilizar ferramentas biotecnológicas para o tratamento do resíduo, o que é favorável do ponto de vista ambiental. Embora o processo de *Landfarming* apresente diversas vantagens, resultados obtidos por pesquisas realizadas no Brasil apontam resultados insatisfatórios, principalmente em termos de porcentagem de liberação de carbono proveniente do resíduo borra oleosa (Gianello et al., 1989 citado por Mielniczuk, 1991).

Tendo em vista que a eficiência do tratamento de resíduos através do processo de *Landfarming* está condicionada à capacidade metabólica dos microrganismos presentes, deve-se considerar que as exigências ambientais e nutricionais dos diferentes microrganismos existentes devem ser fornecidas de modo a obter um melhor desempenho no processo.

Os microrganismos apresentam faixas ótimas de temperatura, umidade, pH e oxigênio para seu ótimo crescimento e atividade. Uma vez que o sistema de *Landfarming* funciona em sistema aberto, possivelmente fatores como umidade e temperatura influenciam de forma significativa a eficiência do processo. O Brasil, em especial a região Sul, apresenta diferentes características pluviométricas e de temperatura ao longo do ano, variações estas que afetam diretamente a atividade microbiana. Outros fatores podem afetar a taxa de degradação dos resíduos tais como, a presença de microrganismos com capacidade de degradar o contaminante

alvo de tratamento, condições nutricionais como a adição de nitrogênio e fósforo para fornecer energia à microbiota presente, agitação do solo para fornecer maior contato dos microrganismos com poluentes e nutrientes, nível de contaminação, composição do resíduo, e disponibilização do resíduo ao ataque microbiano.

Com o intuito de aumentar a eficiência de biodegradação deste importante passivo ambiental, no presente trabalho foi avaliada a influência de diferentes fatores no processo de degradação em solos tais como: solos com e sem histórico de contaminação, diferentes níveis de contaminação, tratamento em sistema aberto e fechado, adição de diferentes níveis de nitrogênio e fósforo e a adição de um consórcio bacteriano.

A primeira etapa do trabalho consistiu em isolar, identificar e selecionar isolados microbianos para a construção do consórcio bacteriano. Para selecionar microrganismos com capacidade de adaptação, crescimento e degradação da borra oleosa, foi feito o isolamento bacteriano a partir de áreas contendo este resíduo. Foram isoladas 45 bactérias, sendo 21 provenientes de solo *Landfarming*, o qual apresenta histórico de recebimento de resíduos petroquímicos há 24 anos; 11 bactérias foram isoladas de efluente contendo resíduos petroquímicos (pertencentes ao tratamento primário) e 13 bactérias foram isoladas diretamente da borra oleosa. A seleção inicial de degradadores de hidrocarbonetos utilizando a técnica de redução do indicador redox TTC (Cloreto de trifeniltetrazólio) possibilitou selecionar 20 isolados. A técnica que utiliza o indicador redox TTC é conveniente quando se pretende fazer uma seleção inicial entre diversos isolados. Esta técnica se baseia na expressão da atividade metabólica de utilização do contaminante como fonte de carbono e energia, onde este indicador serve como aceptor artificial de elétrons, em substituição ao oxigênio, necessário para a metabolização aeróbica do composto. Os vinte isolados selecionados foram então identificados por seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA. Dentre estes, seis foram isolados do solo sendo que quatro pertencem ao

gênero *Bacillus*, um do gênero *Pseudomonas* e um do gênero *Stenotrophomonas*. Os três isolados obtidos do efluente pertencem ao gênero *Bacillus*, *Sphingobacterium* e *Stenotrophomonas*. Em relação aos isolados da borra oleosa, foram selecionados 11 bactérias, sendo elas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Cloacibacterium* e *Staphylococcus*. Estes isolados foram submetidos a uma segunda seleção e avaliados quanto à capacidade de crescimento e produção de biossurfactantes em meio mineral contendo borra oleosa como única fonte de carbono. A partir desta seleção, 5 isolados bacterianos, sendo três provenientes da borra oleosa (*Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cibi*) e dois de solo *Landfarming* (*Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*) mostraram-se promissores para serem utilizados em processos de biorremediação de borra oleosa.

Visando avaliar a efetividade das cinco bactérias selecionadas na biodegradação de borra oleosa foram montados experimentos em biorreatores do tipo Bartha & Pramer (1965) contendo borra oleosa como única fonte de carbono. Os cinco isolados mostraram efetividade na degradação das frações alifática e aromática quando utilizadas na forma de monoculturas e na forma de consórcio. O consórcio bacteriano formado pelas cinco bactérias mostrou taxa de degradação da fração alifática de 90,7%, e de 51,8% da fração aromática e 87,4% da fração total em 40 dias de cultivo em meio líquido. As bactérias cultivadas isoladamente e em forma de consórcio mostraram ser produtoras de biossurfactantes. Os isolados na forma de consórcio mostraram a maior redução da tensão superficial do meio, alcançando o valor de 36,6 mN/m e máxima atividade emulsificante (55,1%). Ao pensar em biodegradação de resíduos complexos e recalcitrantes como é o caso da borra oleosa, faz-se interessante aplicar microrganismos que, além de apresentarem capacidade de biodegradação do resíduo, apresentem também a capacidade de produzir

biossurfactantes. Estes compostos auxiliam, através de processos de emulsificação, o aumento da superfície de contato do contaminante alvo e por consequência propiciam o aumento da biodisponibilidade do contaminante ao ataque microbiano. Um dos principais fatores limitantes do processo de biorremediação é a biodisponibilidade do contaminante. Embora haja no sistema a presença de microrganismos capazes de degradar os poluentes e todas as condições adequadas à atividade microbiana, a incapacidade dos microrganismos de entrar em contato com os contaminantes pode interferir negativamente na efetividade do processo. Assim, a possibilidade de utilizar microrganismos com a capacidade de utilizar a borra oleosa como fonte de carbono e de produzir biossurfactantes faz-se interessante para obter maiores taxas degradativas.

Dentre os isolados utilizados no consórcio, é interessante citar que o *Bacillus cibi* mostrou bom potencial de degradação dos hidrocarbonetos presentes na borra bem como na produção de biossurfactantes. Ao nosso conhecimento, esta foi a primeira constatação de capacidade de biodegradação de borra oleosa e produção de biossurfactantes. Na literatura, há poucos relatos de trabalhos com este microrganismo. Entretanto, com os demais é mais comum encontrar trabalhos de degradação de hidrocarbonetos. Cabe ressaltar que trabalhos com borra oleosa são escassos no Brasil, sendo mais encontrados na Índia e China.

O estudo de biorremediação de borra oleosa em diferentes solos mostrou que o solo *Landfarming* foi mais efetivo na biodegradação de borra oleosa quando comparado ao solo Nativo, o qual não apresentava histórico de contaminação. Máximo de 74,9% de biodegradação de TPH foi obtido em 90 dias no solo contendo nutrientes em mais alta quantidade. A maior efetividade em solo *Landfarming* se deve, provavelmente, à existência de microrganismos já adaptados ao contaminante

adicionado e com desenvolvido aparato enzimático para a biodegradação do composto.

Foi também verificado que o processo de bioaumentação em concentrações maiores e menores de nutrientes em solos *Landfarming* possibilitou maior eficiência no processo de biodegradação do contaminante quando comparado ao solo sem histórico de contaminação. Isto provavelmente está relacionado ao fato de que os microrganismos presentes no consórcio foram isolados do solo *Landfarming* e do resíduo borra oleosa. Assim, no caso da bioaumentação nos solos *Landfarming*, o enriquecimento da população de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos ocorreu pela adição de microrganismos endógenos. Já no solo Nativo, foram adicionados microrganismos exógenos. Isto pode ter provocado concorrência da microbiota presente pela fonte de carbono e nutrientes disponíveis. Outro fator que pode ter contribuído para a maior taxa de biodegradação é o fato de já existir no solo *Landfarming* microrganismos adaptados a este resíduo e com maior capacidade de degradação de compostos mais complexos, como foi observado na taxa de degradação da fração TPH-DRO que mostrou ser maior nos solos *Landfarming*. Em estudo realizado por Bento et al. (2005), a bioaumentação efetuada com microrganismos endógenos foi mais efetiva do que quando realizada com microrganismos exógenos no tratamento de solos contaminados com óleo diesel. Conforme Bento et al. (2005), o sucesso da biorremediação é dependente do nível de adaptação metabólica e genética da população microbiana nativa do ambiente.

A adição do consórcio e de nutrientes mostrou favorecer a taxa de biodegradação em comparação ao processo de atenuação natural. Entretanto, a adição do consórcio aos solos mostrou que a taxa obtida de degradação não apresentou diferença estatística com os tratamentos contendo apenas a adição de nutrientes.

Ao analisar a degradação das frações de TPH verificou-se que nos tratamentos contendo o consórcio obteve-se maior taxa de degradação nas frações TPH-DRO do que da fração TPH-GRO. Isto evidencia a capacidade do consórcio bacteriano em degradar as frações mais recalcitrantes. Uma vantagem ao utilizar consórcios microbianos é a possibilidade de efeitos sinérgicos entre os membros da associação na degradação dos contaminantes. É possível que uma espécie degrade compostos parcialmente degradados por outras espécies, bem como remova os metabólitos tóxicos gerados durante a degradação do poluente por outras espécies. De acordo com Hamed et al. (2010), estudos mostram que é difícil para uma simples espécie bacteriana degradar todos os componentes da borra oleosa. Isto é devido à composição variável da borra que contem alcanos, compostos aromáticos, compostos contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio e frações de asfaltenos.

O estudo apresentado no Capítulo V teve como objetivo avaliar o efeito dos tratamentos de bioestimulação, bioaumentação, diferentes concentrações de borra oleosa e diferentes sistemas (aberto e fechado) na eficiência de biodegradação em solos. Através dos resultados obtidos de degradação de TPH foi verificado que o solo contaminado a 6% apresentou, em média, maiores taxas de biodegradação quando comparado aos solos contaminados a 1,5%. A adição de nutrientes em maior quantidade mostrou efeito inibitório na taxa de mineralização. Isto evidencia que as doses utilizadas foram muito altas, o que pode ter acarretado na inibição da atividade microbiana, ou ter estimulado o crescimento de microrganismos não degradadores e, portanto competidores.

Em média, maiores taxas de biodegradação foram obtidos no sistema fechado. Isto provavelmente está relacionado ao fato do maior controle de umidade nos solos. No sistema aberto, foi observada evaporação muito rápida da água presente nos solos. Embora tenha sido freqüente a correção de umidade, ocorreram

períodos onde o teor de umidade estava baixo. Provavelmente, houve limitação da atividade microbiana presente. Conforme Rizzo et al. (2006) a umidade do solo deve ser mantida entre 50 a 80% da capacidade de campo para que sejam obtidas boas taxas de degradação.

Os tratamentos de bioestimulação mostraram ser eficientes na biodegradação de TPH presentes na borra oleosa, demonstrando que a deficiência de nutrientes é em parte responsável pela persistência do óleo no solo contaminado. A utilização do consórcio bacteriano mostrou favorecer a taxa de mineralização dos TPHs presentes na borra oleosa.

A partir dos resultados obtidos pode-se constatar que o consórcio microbiano mostrou capacidade de degradar a borra oleosa em meio líquido e em solos. Entretanto, a utilização do consórcio mostrou ser mais efetiva na biodegradação da borra oleosa em meio líquido do que em solos.

Considerando que a borra oleosa é obtida durante o tratamento primário dos efluentes petroquímicos nos sistemas de separação água-óleo, sendo após enviada para tanques de armazenamento onde permanece até ser aplicada no *Landfarming*, seria interessante o pré-tratamento desta borra oleosa em meio líquido antes da aplicação nas células de *Landfarming*. Este pré-tratamento da borra oleosa permitiria, além de reduzir a carga poluidora, reduziria o tempo de processo necessário para tratar este resíduo.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir de amostras ambientais foi possível isolar 45 bactérias, sendo que 11 bactérias foram provenientes de efluentes petroquímicos, 21 bactérias de solo *Landfarming* e 13 bactérias de borra oleosa petroquímica. Destas, 20 bactérias apresentaram capacidade de utilizar diferentes misturas de hidrocarbonetos. Através da avaliação de crescimento e produção de biossurfactante em meio contendo borra oleosa como única fonte de carbono, foram selecionadas 5 bactérias potenciais de aplicação em processos de bioaumentação. A partir da análise do seqüenciamento parcial do gene 16SrRNA foi possível identificá-las como *Stenotrophomonas acidaminiphila* BB5, *Bacillus megaterium* BB6, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* BS20.

O consórcio bacteriano composto de *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* mostrou capacidade de degradação de hidrocarbonetos alifáticos (90,7%) e aromáticos (51,8%) em meio líquido contendo borra oleosa como única fonte de carbono durante 40 dias. O consórcio foi capaz de produzir biossurfactantes, alcançando atividade emulsificante de 55,1% e redução da tensão superficial inicial do meio de 60,4 para 36,6 mN/m.

Os tratamentos de bioestimulação e bioaumentação em solo intemperizado e sem histórico de contaminação mostraram incremento nas taxas de biodegradação de TPH presentes na borra oleosa frente ao tratamento de atenuação natural. Os resultados obtidos sugerem a potencialidade da adição do consórcio bacteriano e correção nutricional em solos *Landfarming* para o aumento da eficiência do tratamento da borra oleosa petroquímica, visto que foram obtidas maiores taxas de degradação frente ao solo Nativo.

No estudo de biodegradação de solos contaminados com diferentes concentrações de contaminante e mantidos em diferentes sistemas foi observado que os tratamentos de bioaugmentação e de bioestimulação mostraram incremento da taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo. Maiores taxas biodegradativas foram alcançadas ao utilizar sistema fechado e maiores taxas de contaminação (6%) de borra oleosa ($p < 0,05$). Os nutrientes adicionados na menor e maior dose mostraram não afetar a taxa de biodegradação em solos. No entanto, em solos contaminados com maior taxa de contaminantes, o excesso de nutrientes causou a inibição da mineralização dos hidrocarbonetos comparada aos demais tratamentos.

Assim, o estudo mostrou a possibilidade do tratamento de maiores quantidades de borra oleosa utilizando menores quantidades de nutrientes em solos *Landfarming*. A utilização do consórcio bacteriano mostrou ser eficiente e favorecer a taxa de mineralização dos TPHs presentes na borra oleosa. O sistema fechado mostrou ser o mais adequado visto os melhores resultados de degradação de TPH e maior controle das variações das condições ambientais.

Em vista dos resultados obtidos no presente trabalho quanto à eficiência de biodegradação de borra oleosa em meio líquido e em solos, sugere-se o uso de tratamentos integrados a fim de aumentar a eficiência do processo. O pré-tratamento da borra oleosa em meio líquido antes do envio às células de *Landfarming* faz-se interessante visto a redução da carga poluente enviada ao tratamento em solos bem como a redução do tempo de processo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros propõem-se:

- estudar a degradação de borra oleosa utilizando efluentes petroquímicos como meio de cultivo;
- desenvolver biorreatores para a degradação de borra oleosa em efluentes;
- identificar os metabólitos produzidos durante a degradação de borra oleosa e estudar a possibilidade destes serem utilizados como fonte de carbono atuando em cometabolismo para os isolados do consórcio;
- avaliar as técnicas de bioestimulação e bioaugmentação de borra oleosa em solos em escala piloto;
- avaliar o impacto dos tratamentos de bioestimulação e bioaugmentação na comunidade microbiana presentes nos solos e efluentes pela técnica de DGGE (Análise de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante);
- Identificar o tipo de biosurfactante produzido pelas bactérias do consórcio.

ANEXOS

ANEXO A1: Características físico-químicas e contagem microbiológica do solo *Landfarming*, efluente e borra oleosa

	Parâmetro	Resultado	Parâmetro	Resultado
	Solo Landfarming	Umidade	13%	<i>Cobre</i>
pH		6,4	<i>Zinco</i>	560 mg.Kg ⁻¹
Argila		14%	<i>Cádmio</i>	0,6 mg.Kg ⁻¹
Óleos e graxas		1,70%	<i>Al_{troc.}</i>	0 cmol. dm ⁻³
<i>Matéria Orgânica</i>		>10 %	<i>Ca_{troc.}</i>	5,7 cmol. dm ⁻³
<i>Índice SMP</i>		6,8	<i>Mg_{troc.}</i>	1,4 cmol. dm ⁻³
<i>Fósforo</i>		80 mg.dm ⁻³	<i>Al+H</i>	1,7 cmol. dm ⁻³
<i>Potássio</i>		67 mg.dm ⁻³	<i>Relação Ca/Mg</i>	4,1
CTC		9,0 cmol. dm ⁻³	<i>Relação Ca/K</i>	33
<i>Chumbo</i>		32 mg.Kg ⁻¹	<i>Relação Mg/K</i>	8
% Satur. da CTC		81	Bactérias	2,0 x 10 ⁶ UFC.g ⁻¹
Bases			Fungos	3,3 x 10 ⁵ UFC.g ⁻¹
Al			0	Actinomicetos
	Heterotróficos totais		7,3 x 10 ⁵ UFC.g ⁻¹	
Efluente	pH	6,7	Cloretos	87,6 mg.L ⁻¹
	Óleos e graxas	1,18 %	Dureza total	60,4 mg CaCO ₃ .L ⁻¹
	Nitratos	<0,1 mg.L ⁻¹	Sólidos Totais Dissolvidos	371 mg/L
	Nitritos	<1,0 µg.L ⁻¹	Bactérias	3,2 x 10 ⁵ UFC.mL ⁻¹
	Sulfetos	76 mg.L ⁻¹	Fungos	5,0 x 10 ³ UFC.mL ⁻¹
	Surfactante	<0,01 mg.L ⁻¹	Actinomicetos	4,1 x 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹
			Heterotróficos totais	1,5 x 10 ⁵ UFC.mL ⁻¹
Borra oleosa	Umidade	76%	Zinco total	0,12%
	Carbono orgânico	56 %	Ferro total	1,5%
	Nitrogênio	0,90%	Manganês total	81 mg.Kg ⁻¹
	Fósforo Total	0,28%	Sódio total	480 mg.Kg ⁻¹
	Potássio Total	0,07%	Boro total	3 mg.Kg ⁻¹
	Cálcio Total	0,42%	Bactérias	3,2 x 10 ² UFC.mL ⁻¹
	Magnésio Total	0,07%	Fungos	2,1 x 10 ¹ UFC.mL ⁻¹
	Enxofre total	1,6%	Actinomicetos	2,5 x 10 ¹ UFC.mL ⁻¹
	Cobre total	99 mg.Kg ⁻¹	Heterotróficos totais	2,0 x 10 ² UFC.mL ⁻¹

ANEXO A2: Monitoramento da temperatura ao longo dos ensaios de biorremediação de solos

Tempo (dias)	Temperatura		
	Mínima	Máxima	Atual
0	22,2	27,1	26,1
3	23,2	27,2	23,8
5	21,9	27,5	27,5
7	23,5	29,6	29,1
10	22,0	30,0	29,4
14	20,7	30,1	28,0
17	23,1	28,6	23,3
21	19,1	28,6	27,0
24	25,4	29,6	29,6
27	25,5	30,1	28,0
33	25,7	31,2	29,1
38	26,3	30,4	27,2
42	25,3	30,0	29,9
46	25,5	37,3	26,7
49	24,1	30,9	25,2
54	25,2	33,5	28,5
60	26,0	33,1	31,7
63	29,1	33,2	29,9
70	26,8	31,6	28,3
77	26,4	33,7	26,7
84	25,0	28,0	27,7
90	26,7	28,8	27,0

ANEXO A3: Monitoramento da temperatura ao longo dos ensaios de biorremediação de solos

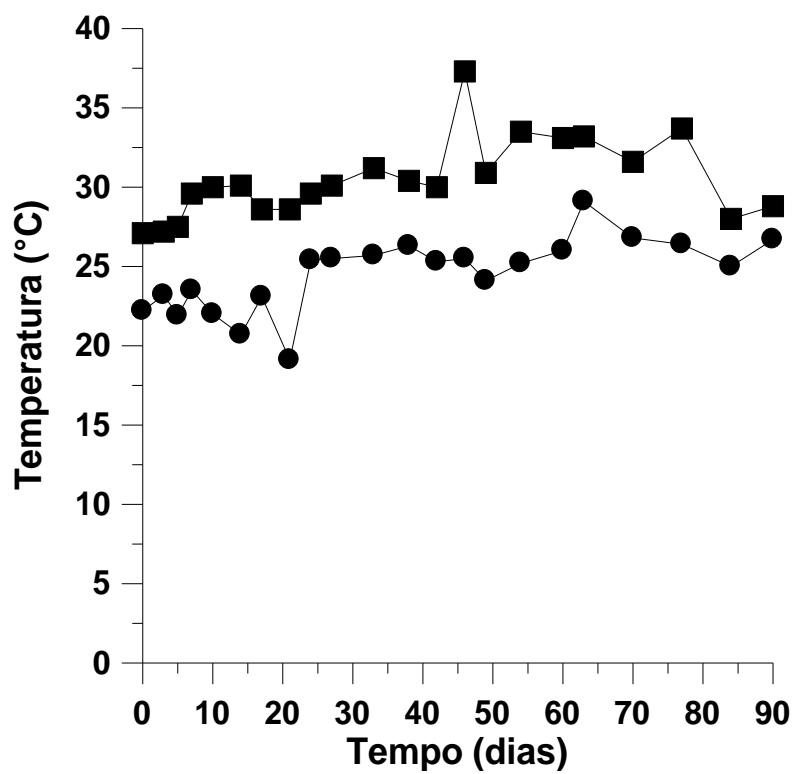


Figura: Monitoramento da temperatura ao longo de 90 dias de experimento em solos.

■ Máxima ● Mínima.

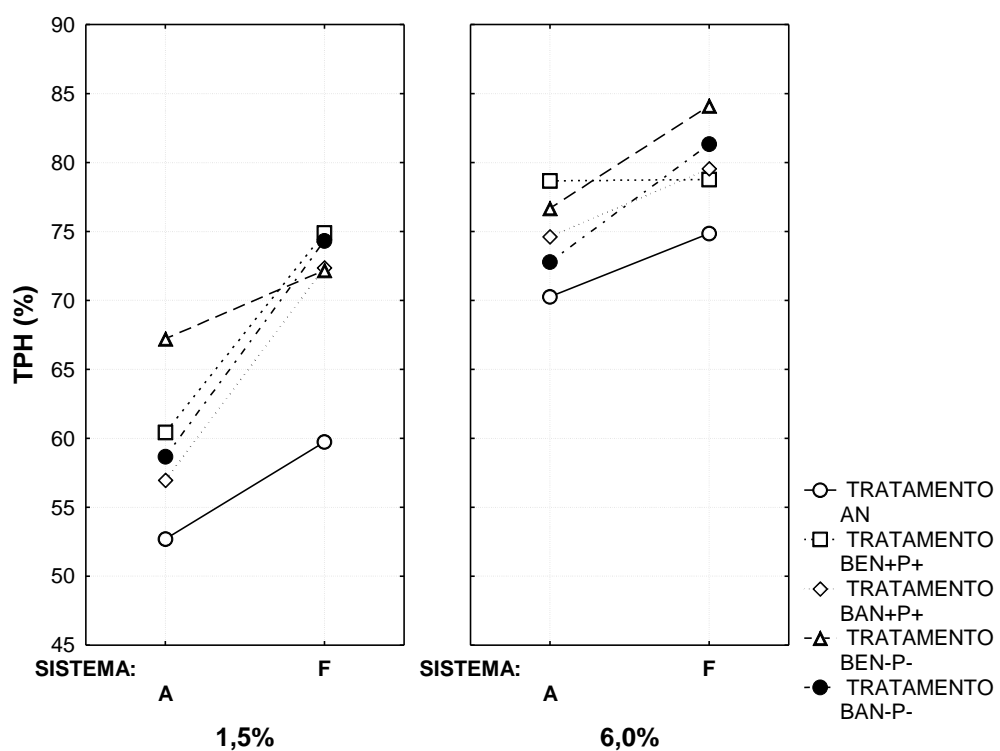
ANEXO A4: Monitoramento do pH no final dos ensaios de biorremediação de solos referente ao artigo “ Potencial de biodegradação de borra oleosa em solos através de atenuação natural, bioestimulação e bioaumentação”.

Solo	Trat.	pH
<i>Landfarming</i>	AN	6,13 ± 0,16
<i>Landfarming</i>	BE(N+P+)	4,89 ± 0,38
<i>Landfarming</i>	BA(N+P+)	4,70 ± 0,02
<i>Landfarming</i>	BE(N-P-)	6,05 ± 0,03
<i>Landfarming</i>	BA(N-P-)	6,07 ± 0,02
Nativo	AN	6,52 ± 0,10
Nativo	BE(N+P+)	6,45 ± 0,11
Nativo	BA(N+P+)	6,49 ± 0,10
Nativo	BE(N-P-)	6,73 ± 0,02
Nativo	BA(N-P-)	6,76 ± 0,00
<i>Landfarming</i>	Controle	6,04 ± 0,00
Nativo	Controle	6,56 ± 0,11

ANEXO A5: Monitoramento do pH no final dos ensaios de biorremediação de solos referente ao artigo “Comparação da biorremediação de solos impactados com diferentes concentrações de borra oleosa e sob diferentes sistemas”.

Exp.	Sist.	Cont.	Trat.	pH
1	A	1,5%	AN	6,02 ± 0,03
2	A	1,5%	BE(N+P+)	4,88 ± 0,04
3	A	1,5%	BA(N+P+)	4,94 ± 0,10
4	A	1,5%	BE(N-P-)	5,90 ± 0,00
5	A	1,5%	BA(N-P-)	6,03 ± 0,05
6	A	6,0%	AN	6,05 ± 0,04
7	A	6,0%	BE(N+P+)	5,47 ± 0,07
8	A	6,0%	BA(N+P+)	5,49 ± 0,03
9	A	6,0%	BE(N-P-)	5,63 ± 0,13
10	A	6,0%	BA(N-P-)	5,55 ± 0,01
11	F	1,5%	AN	6,13 ± 0,16
12	F	1,5%	BE(N+P+)	4,89 ± 0,38
13	F	1,5%	BA(N+P+)	4,70 ± 0,02
14	F	1,5%	BE(N-P-)	6,05 ± 0,03
15	F	1,5%	BA(N-P-)	6,07 ± 0,02
16	F	6,0%	AN	5,97 ± 0,13
17	F	6,0%	BE(N+P+)	5,94 ± 0,00
18	F	6,0%	BA(N+P+)	5,91 ± 0,11
19	F	6,0%	BE(N-P-)	5,57 ± 0,03
20	F	6,0%	BA(N-P-)	5,60 ± 0,05
	A	-	Controle	6,10 ± 0,07
	F	-	Controle	6,04 ± 0,00

ANEXO A6: Média de remoção de TPH nos diferentes tratamentos em solos contaminados com diferentes concentrações de borra oleosa em sistema aberto e fechado.



ANEXO A7: Fotos dos experimentos de biodegradação de borra oleosa em solos

Figura: Aparato experimental utilizado no estudo de biorremediação de solos em sistema fechado



Figura: Aparato experimental utilizado no estudo de biorremediação de solos em sistema aberto

Vita

Dados Pessoais

Nome Vanessa Sacramento Cerqueira
Filiação João da Cunha Cerqueira e Nilza Maria Sacramento Cerqueira
Nascimento 24/01/1982 - Pelotas/RS - Brasil
E-mail vanescerqueira@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2007 - 2011 Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 - 2007 Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos.
 Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, Brasil
 Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2000 - 2004 Graduação em Engenharia de Alimentos.
 Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, Brasil
 Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

1996-1998 Ensino médio (2º grau)
 Colégio Gonzaga – Pelotas, RS, Brasil

Atuação profissional

2008 – 2009 Colaborador da Disciplina de Biotecnologia do solo.
 Graduação em Agronomia. Professores: Flávio A.O. Camargo e Enilson Sá.

2006 Colaborador da Disciplina de Engenharia Bioquímica.
 Graduação em Engenharia de Alimentos. Professor: Jorge A.V. Costa.

2004 Estágio curricular na Cooperativa Sul-Riograndense de Laticínios.
 Laboratório de Microbiologia, Laboratório físico-químico e Área de produção.

2003 Estágio na Indústria Riograndense de óleos vegetais.
 Laboratório e Área de produção.

Produção Técnica

2009 Palestra ministrada no evento: IV Jornada em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
 Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Pelotas, RS
 Título da palestra: Biorremediação: Tecnologia à Serviço do Meio Ambiente.

2007 Palestra ministrada no evento: IV Jornada Acadêmica de Biologia – JABUFRG.
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.
 Título da palestra: Biorremediação de Hidrocarbonetos.

2007 Palestra ministrada no evento: I Simpósio de Microbiologia Aplicada
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.
 Título da palestra: Biorremediação e Biodegradação de resíduos industriais.