

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE
DEGRADAÇÃO DE DIESEL E BIODIESEL

Fabíola Medeiros Schultz

Bióloga (UNISINOS)

Agosto, 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE
DEGRADAÇÃO DE DIESEL E BIODIESEL**

Fabíola Medeiros Schultz
Bióloga - UNISINOS

Dissertação apresentada
como um dos requisitos para a
obtenção
do Grau de Mestre em
Microbiologia
Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil
Agosto de 2010

“Muitas das coisas mais importantes do mundo foram conseguidas por pessoas que continuaram tentando quando parecia não haver mais nenhuma esperança de sucesso”. **Dale Carnegie**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Fátima Menezes Bento pela sua sabedoria e pela oportunidade de trabalho nesta área.

A minha mãe Irêda pelo amor e constante incentivo a continuidade deste trabalho. Ao meu pai Celso e sua esposa Pilar pelo apoio “logístico”, que carinhosamente possibilitaram o andamento do trabalho em muitos momentos difíceis, mas sempre confiantes.

Ao meu esposo Max, que esteve durante todo o tempo incansavelmente ao meu lado dedicando muito amor e confiança.

Ao meu irmão João Francisco, cunhada Dione e afilhado João Vítor, pelo carinho e alegria nos poucos momentos que estávamos juntos.

Aos colegas e amigos de Laboratório da UFRGS: Vanessa, Andressa, “Patrícias”, Daniel, Lucélia, Naiara, Fernanda, Fran, Valdionir, Mica e Adriane, pelo companheirismo e ajuda sempre que precisei.

Ao Centro Universitário Metodista do Sul - IPA que permitiu a utilização da infra-estrutura para a realização de parte do experimento.

As queridas colegas do IPA Vanessa e Patrícia pela agradável convivência nas madrugadas no laboratório e em casa.

Aos mestres do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela grande contribuição em minha formação acadêmica.

E agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o andamento do trabalho realizado durante esta etapa da minha formação profissional.

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DIESEL E BIODIESEL¹

Autor: Fabíola Medeiros Schultz
Orientador: Fátima Menezes Bento

RESUMO

A utilização do petróleo e seus derivados, pode ocasionar acidentes envolvendo vazamentos que podem atingir ambientes aquáticos e terrestres. No Brasil, atualmente é utilizada a mistura B5, que corresponde a 95% de óleo diesel com 5% de biodiesel, apresentando desta forma uma composição diversa de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e, ainda, ésteres de ácidos graxos de cadeia longa. O objetivo do estudo neste trabalho foi isolar microrganismos com competência para degradar diesel e biodiesel de um solo contaminado com hidrocarbonetos. Em uma primeira etapa foram isoladas oito espécies bacterianas e oito fungos filamentosos e, a seguir, realizou-se curvas de crescimento onde foram avaliados aumento de biomassa, produção de enzimas específicas, detecção de compostos biossurfactantes e a degradação de ésteres. Os isolados bacterianos selecionados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas*, que apresentaram crescimento e produção de biossurfactantes monitorado pelo índice de emulsificação e pela redução na medida da tensão superficial após 14 dias. Em relação aos isolados fúngicos F e H houve produção de biomassa significativa ao final de 30 dias, produziram lípases e estereases, porém não produziram compostos biossurfactantes. Na avaliação cromatográfica de ésteres totais, *Bacillus* sp. e a *Pseudomonas* sp. apresentaram valores próximos a 100% de degradação de alguns ésteres presentes no biodiesel e para o isolado fúngico H, os valores ficaram próximos a 30%.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Agosto, 2010.

ABSTRACT

The use of oil and its derivatives, can lead to accidents involving leaks that may affect aquatic and terrestrial environments. In Brazil, currently is used B5 blend, which is 95% diesel oil with 5% biodiesel, thus presenting a diverse composition of aliphatic and aromatic hydrocarbons and also esters of long chain fatty acids. The aim of this study was to isolate microorganisms from soil contaminated with hydrocarbons power to degrade diesel and biodiesel. In a first step we isolated eight bacterial species and eight filamentous fungi, and then held growth curves which assessed increase in biomass production of specific enzymes, detection of biosurfactant compounds and the degradation of esters. The bacterial isolates selected were identified as belonging to the genus *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. *Sphingomonas* and showed growth and production of biosurfactants monitored by emulsification index and reduction in the extent of surface tension after 14 days. Regarding fungal isolates F and H, there was significant production of biomass at 30 days, they produced lipases and estereases, but did not produce biosurfactant compounds. On the chromatographic evaluation of total esters, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. showed values close to 100% degradation of some esters present in biodiesel, and the fungal isolate H, values were approximately 30%.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	0
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Caracterização do óleo diesel.....	4
2.2 Caracterização do biodiesel.....	4
2.3 Biodegradação de combustíveis no ambiente	6
2.4 Degradação microbiana de diesel e biodiesel.....	9
<i>2.4.1 Degradação abiótica do biodiesel.....</i>	<i>11</i>
<i>2.4.2 Degradação biótica do biodiesel.....</i>	<i>12</i>
<i>2.4.3 Degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos</i>	<i>13</i>
3 BIOSSURFACTANTES.....	23
4 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIODEGRADAÇÃO DE COMBUSTÍVEIS	26
4.1 Monoxigenases e Dioxigenases	26
4.2 Lipases e Esterases.....	27
5 MICRORGANISMOS DEGRADADORES	28

6. MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1 Combustíveis	32
6.2 Amostragem de solo	32
6.3 Caracterização de solo	33
6.4 Isolamento de microrganismos	33
6.5 Padronização do Inóculo bacteriano	34
6.6 Pré-seleção de bactérias e fungos biodegradadores de hidrocarbonetos utilizando dois Indicadores redox TTC e DCPIP	35
<i>6.6.1 Avaliação do Crescimento</i>	38
<i>6.6.2 Tensão Superficial e Índice de emulsificação</i>	38
<i>6.6.3 Detecção de ramnolipídios</i>	39
<i>6.6.4 Atividade Hemolítica</i>	40
<i>6.6.6 Medidas de Condutividade</i>	42
<i>6.6.7 Medidas de pH</i>	42
<i>6.6.8 Detecção das enzimas</i>	43
6.6.8.1 Atividade Lipolítica	43
6.6.8.2 Monoxigenases e dioxigenases	44
6.7 Análise dos microrganismos pré-selecionados	44
<i>6.7.1 Curvas de crescimento</i>	45

6.7.2 <i>Análise de pH, Tensão superficial, índice de emulsificação (IE24), lipase e esterase</i>	47
6.7.3 <i>Avaliação Cromatográfica</i>	48
6.7.4 <i>Identificação dos isolados</i>	49
6.7.5 <i>Análise estatística</i>	50
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
7.1 Isolamento de microrganismos	46
7.2 Pré-seleção de bactérias e fungos biodegradadores de hidrocarbonetos utilizando dois Indicadores redox TTC e DCPIP	46
7.2.1 <i>Avaliação do crescimento</i>	48
7.2.2 <i>Biossurfactante</i>	52
7.2.3 <i>Detecção de ramnolipídios</i>	56
7.2.4 <i>Atividade hemolítica</i>	56
7.2.5 <i>Hidrofobicidade</i>	57
7.2.6 <i>Medidas de condutividade</i>	59
7.2.7 <i>Medidas de pH</i>	60
7.2.8 <i>Detecção de enzimas</i>	62
7.2.8.1 <i>Atividade Lipolítica</i>	62
7.2.8.2 <i>Atividade das Monoxigenases e Dioxigenases</i>	64

7.3 Análise de microrganismos pré-selecionados	69
7.3.1 <i>Identificação bioquímica dos isolados</i>	70
7.3.2 <i>Curvas de crescimento</i>	71
7.3.3 <i>Análises de pH, tensão superficial, índice de emulsificação (IE24), lipase e esterase</i>	76
7.3.3.1 <i>Medidas de pH.....</i>	76
7.3.3.2 <i>Atividade lipolítica</i>	76
7.3.3.3 <i>Atividade da enzima esterase</i>	77
7.3.3.4 <i>Índice de emulsificação</i>	77
7.3.3.5 <i>Medidas de tensão superficial.....</i>	78
7.3.4 <i>Degradação dos ésteres totais no biodiesel.....</i>	81
8 CONCLUSÕES.....	87
9 AGRADECIMENTOS.....	88
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	2
11 ANEXOS	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pré-seleção de bactérias biodegradadoras de hidrocarbonetos utilizando os indicadores redox TTC e DCPIP.....	47
Tabela 2 - Pré-seleção de fungos biodegradadores de hidrocarbonetos utilizando os indicadores redox TTC e DCPIP.....	47
Tabela 3 - Medidas de pH, tensão siperficial, índice de emulsificação e proteínas totais (Bradford) dos oito isolados bacterianos em BO, B20 e B100 durante 14 dias de cultivo em MM1 com adição de 1% de combustível.....	55
Tabela 4 – Medidas da condutividade da fase aquosa dos cultivos bacterianos em meio mineral e misturas de diesel/biodiesel.....	60
Tabela 5 - Atividade Lipolítica de oito isolados bacterianos utilizando o método titulométrico utilizando 20% de biodiesel no diesel e somente biodiesel.....	63
Tabela 6 - Atividade enzimática específica dos isolados bacterianos testados.....	69
Tabela 7 – Resultados das provas bioquímicas realizadas para a identificação dos três isolados bacterianos.....	71

Tabela 8 – Resultados das análises de índice de emulsificação, produção de lípase e esterase dos três isolados bacterianos selecionados previamente.....	80
Tabela 9 – Resultados obtidos das análises para os isolados fúngicos durante 30 dias de cultivo em meio mineral com biodiesel.....	81
Tabela 10 – Resultados obtidos da medida de pH e tensão superficial, em B100, dos três isolados bacterianos cultivados em meio mineral.....	82
Tabela 11 – Perfil dos ésteres totais da degradação do biodiesel proveniente de um ensaio de 30 dias em meio mineral M1 na presença de fungos.....	87
Tabela 12 – Perfil dos ésteres totais da degradação do biodiesel proveniente de um ensaio de 14 dias em meio mineral M1 na presença de bactérias.....	87.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural dos principais ésteres alquílicos de ácidos graxos que compõem o biodiesel. (R = CH ₃ ou CH ₂ CH ₃). Fonte: Gomes, 2008.....	06
Figura 2. Degradação de alcanos. 1-n-alcanos monoxigenases. 2-álcool desidrogenase. 3- aldeído desidrogenase (Bücker, 2009).....	15
Figura 3. Etapas metabólicas básicas para degradação de hidrocarbonetos aromáticos (Bücker, 2009).....	16
Figura 4. Hidrólise do éster ácido linoléico. (Fonte: Bücker, 2009).....	20
Figura 5. Etapas da β - oxidação do palmitato. (Fonte: Bücker, 2009).....	21
Figura 6 – Porcentagem de hidrofobicidade da parede celular dos oito isolados cultivados em caldo nutriente.....	58
Figura 7 – Avaliação do crescimento dos oito isolados bacterianos pelo método de Bradford, crescendo a 180rpm e 30°C em meio mineral MM1 com 1% de combustível, avaliado pelo período de 14 dias. (A) Valores encontrados para B0. (B) Valores encontrados para B20. (C) Valores encontrados para B100.....	51
Figura 8 – Atividades das enzimas catecol 1,2, catecol 2,3, protocatecol 3,4 e monoxigenases em isolados bacterianos crescendo a 180rpm e 30°C, em meio mineral MM1 com 1% de combustível (B0 e B20), avaliados durante 14 dias.....	65

Figura 9 – Curva de crescimento dos três isolados bacterianos em meio mineral M1 com biodisel. (C) *Bacillus* sp. (E) *Sphingomonas* sp.. (F) *Pseudomonas* sp.....74

Figura 10 – Curva de crescimento dos dois isolados fúngicos em meio mineral M1 com biodisel, durante 30 dias a 28°C.....75

LISTA DE ABREVIATURAS

mg/mL	Miligramas por mililitro
ms/cm²	Milisimems por centímetro quadrado
AD	Ágar Diesel
AB	Ágar Biodiesel
MM1	Meio mineral M1
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
°C	Grau Celsius
mN.m⁻¹	MiliNewton por metro
B0	Somente diesel
B20	20% de biodiesel em diesel
B100	Somente biodiesel
COPEsul	Companhia Petroquímica do Sul
IE_{24%}	Índice de emulsificação
C1,2	Catecol 1,2
C2,3	Catecol 2,3
P3,4	Protocatecol 3,4
NO_x	Óxido de Nitrogênio
C:N:P	Carbono:Nitrogênio:Fósforo
rpm	Rotações por minuto
g/h	gramas por hora
mM	Milimol
min	Min.
mg	Miligrama
mL	Mililitro

1 INTRODUÇÃO

Devido à grande utilização do petróleo e seus derivados, freqüentemente ocorrem acidentes envolvendo vazamentos de óleo que podem atingir tanto ambientes aquáticos como terrestres. Tais acidentes são provenientes das inúmeras atividades como a exploração, produção, refino, transporte e principalmente o armazenamento dos combustíveis. O petróleo é uma substância inflamável, com cheiro característico e composto por uma mistura de hidrocarbonetos, captado para as mais diversas finalidades, entre elas a utilização na forma de combustível, podendo ser tóxico para alguns organismos. Os combustíveis são produtos do refino do petróleo compreendendo cadeias carbônicas de C₅ a C₂₀. No Brasil, a partir de Janeiro de 2010 foi estabelecida a obrigatoriedade do uso de Diesel B5, que é uma mistura de 95% de óleo diesel e 5% de biodiesel. Com esta decisão, o Brasil dá mais um importante passo na busca por combustíveis alternativos. O biodiesel é considerado um substituto natural do diesel de petróleo e, por esta razão, este biocombustível e suas misturas tem sido avaliados em pesquisas com relação ao impacto no solo e em diferentes compartimentos ambientais, no caso de acidentes.

Na composição de óleo diesel, estão presentes desde hidrocarbonetos alifáticos de fácil degradação, até compostos mais recalcitrantes, como os hidrocarbonetos aromáticos. Portanto, os microrganismos com potencial enzimático para metabolizar o diesel, podem optar inicialmente pela degradação das frações menos recalcitrantes, como os alifáticos até as frações aromáticas. O biodiesel apresenta muitas vantagens sobre os demais combustíveis, porém apresenta algumas vulnerabilidades, podendo citar-se a baixa estabilidade química. Vários fatores contribuem para a biodegradabilidade do biodiesel, tais como a presença de cadeias C₁₆ - C₁₈ (ácidos graxos) que são facilmente degradadas pelos microrganismos, a ausência de moléculas aromáticas, propriedades higroscópicas e a disponibilidade de ligações éster de alta energia.

No Brasil, a utilização do potencial microbiano para a detoxificação de contaminantes ambientais no processo chamado biorremediação, é ainda insipiente. Neste sentido é que o efeito combinado de estratégias para a biorremediação, utilizando enzimas, biossurfactantes e uma competente população microbiana poderão incrementar significativamente a degradação de combustíveis no caso de acidentes em solo.

O objetivo deste trabalho foi isolar, selecionar e caracterizar microrganismos quanto ao crescimento em Meio Mineral com diesel (B0), 20% de biodiesel no diesel (B20) e somente biodiesel (B100) em amostras

de solo proveniente de área impactada com resíduos petroquímicos (*landfarming*) e de borra biológica de uma centrífuga de biodiesel. Foram avaliadas, durante o crescimento dos microrganismos em meio mineral e 1% de biodiesel, a produção de biomassa (UFC e peso seco), produção de enzimas monoxigenases, catecol 1,2 e 2,3 dioxigenase, protocatecol, lipase, esterase, biossurfactantes, medidas de pH, condutividade e *degradação* de ésteres totais por cromatografia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização do óleo diesel

No Brasil, o óleo diesel é o principal produto do fracionamento do petróleo. A composição básica deste combustível é de 2000 a 4000 de hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos, sendo que as cadeias carbônicas variam de 6 a 30 átomos. (Mariano 2009).

Pesquisas nesta área têm demonstrado que algumas populações microbianas podem degradar frações alifáticas e aromáticas de hidrocarbonetos simultaneamente, embora as adições de determinados compostos assim como a composição de algumas misturas podem interferir na degradação dos componentes (Bento *et al.*, 2005).

2.2 Caracterização do biodiesel

Na composição do biodiesel encontram-se ésteres alquílicos, provenientes de um processo denominado transesterificação. O biodiesel é obtido a partir de uma reação química, com a conversão de ésteres de longa cadeia de ácidos graxos em mono alquil ésteres. A fonte de ácido graxo para esta reação pode ser obtida de plantas (palma, soja, girassol, dentre outras) ou animais (sebo bovino, etc.), ou seja, geralmente envolvendo uma fonte renovável (Bucker, 2009). Para que esta reação ocorra é necessária a

presença de um álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, além de um catalisador adequado. Este biocombustível também pode ser gerado a partir da esterificação direta de ácidos graxos livres, mas este processo raramente é utilizado, uma vez que fontes de triglicerídeos são mais disponíveis do que de ácidos graxos (Gomes, 2008).

O biodiesel apresenta diversas vantagens sobre o diesel, tais como alto número de cetano, alto ponto de fulgor, baixas emissões de material particulado, assim como baixas concentrações de monóxido de carbono e dióxido de carbono, alta biodegradabilidade, além de não apresentar enxofre e compostos aromáticos (Passman, 2005; Lapuerta, 2009). Por outro lado, apresenta algumas vulnerabilidades, por possuir uma baixa complexidade estrutural e ser composto por diferentes ácidos graxos (C₁₆₋₁₈) metil esterificados, incluindo oleato, palmitato, linoleato, mirístico, laureato e linoleato, podendo facilmente ser atacado por microrganismos (Gomes, 2008). Outros fatores como a ausência de moléculas aromáticas, algumas propriedades higroscópicas e a disponibilidade de ligações éster de alta energia contribuem para a biodegradabilidade do biodiesel (Vieira *et al.*, 2006).

Estudos mostram que a substituição do óleo diesel mineral pelo biodiesel apresenta como consequência grandes reduções de emissões de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e material particulado (Clemente, 2005). No entanto, estudos têm demonstrado um aumento nas emissões de óxido do nitrogênio (NO_x) nas misturas com biodiesel (Altıparmak *et al.*,

2007). A fórmula estrutural dos principais ésteres alquílicos de ácidos graxos que compõem o biodiesel são mostrados na Figura 1.

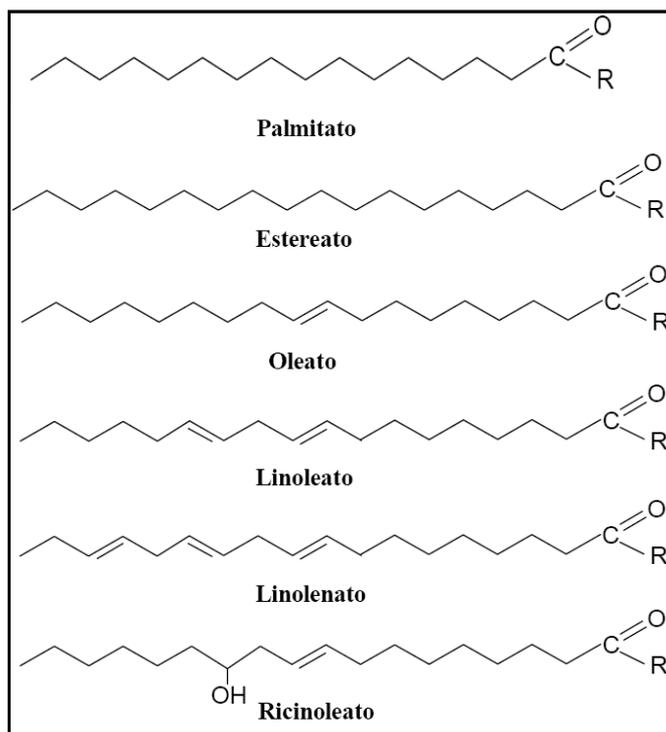


Figura 1 - Fórmula estrutural dos principais ésteres alquílicos de ácidos graxos que compõem o biodiesel. (R = CH₃ ou CH₂CH₃). Fonte: Gomes, 2008.

2.3 Biodegradação de combustíveis no ambiente

No ano de 1895, surgem os primeiros relatos de Myoshe em relação aos microrganismos com a capacidade de crescimento em parafina, ou seja um dos compostos do fracionamento do óleo cru. Este

microrganismo era um fungo da espécie *Botrytis cinerea* (Bento, 2001).

Em 1941 foi desenvolvido um meio mineral mínimo para isolar microrganismos com capacidade de utilizar hidrocarbonetos provenientes do petróleo como única fonte de carbono e energia, propiciando assim seu crescimento. Estes mesmos criadores deste meio, Bushnell & Haas também concluíram que outros produtos como a querosene, a gasolina, óleos minerais e a parafina também podiam ser utilizados como fonte de carbono por uma ampla diversidade de microrganismos (Bücker, 2009).

Em 1946, ZoBell relatou que microrganismos específicos eram capazes de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono, mas que essa capacidade estava relacionada com a natureza química dos compostos presentes nas misturas de petróleo de acordo com as condições ambientais adequadas (Bento, 2001).

A biodegradação ocorre quando microrganismos utilizam um determinado composto orgânico como fonte de energia e carbono. Neste processo, os compostos podem ser quebrados em moléculas com estruturas mais simples encontradas no ambiente, como por exemplo o dióxido de carbono e água, ou ainda é possível que em alguns casos a atividade metabólica seja capaz de alterar a forma química do composto (biotransformação), mas não resultando em uma mineralização completa (Atlas & Bartha, 1996).

O processo de biodegradação do petróleo utilizando populações

naturais de microrganismos representa uma estratégia primária pelo qual os compostos tóxicos são eliminados do meio ambiente. Algumas destas substâncias podem ser facilmente volatilizadas ou biodegradadas, enquanto outras permanecem recalcitrantes no ambiente (Ostberg *et al.*, 2007).

A presença da fração de n-alcenos de C₁₀-C₂₀ no óleo diesel torna-o mais suscetível à degradação microbiana. Uma grande diversidade de estudos relacionados à degradação deste tipo de combustível informa que isto só é possível graças à presença de microrganismos providos de um aparato enzimático específico, capaz de converter o óleo diesel presente no ambiente, em fonte de carbono e energia (Nwaugu, 2008).

A estocagem de combustíveis em tanques que no passado eram enterrados diretamente no solo, podem provocar acidentes como derrames contínuos no solo. Os tanques sem revestimentos externos são suscetíveis à corrosão que conseqüentemente podem, pela liberação de combustível, comprometer o solo, subsolo e aquíferos naturais. Nestes casos, torna-se importante o uso de medidas de remediação da área atingida, a fim de minimizar os efeitos destes combustíveis na natureza (Uller, 1996). Atualmente muitos postos de combustível apresentam vazamentos devido à falta de manutenção dos tanques e de medidas de prevenção. Algumas medidas de proteção para impedir o aparecimento de pontos de corrosão localizadas podem ser tomadas, como por exemplo: a impermeabilização do solo, construção do tanque com paredes jaquetadas em aço, o revestimento a

base de tintas convencionais ou a base de fibras de vidro, ou até mesmo a construção do tanque inteiramente de fibras de vidro (Bento, 2005).

2.4 Degradação microbiana de diesel e biodiesel

Diversas técnicas de remediação vêm sendo utilizadas na tentativa de recuperação de áreas contaminadas com combustíveis, incluindo a biorremediação, que é considerada uma técnica barata e aceitável do ponto de vista ambiental. Atualmente pesquisas relacionadas à remediação de áreas atingidas por hidrocarbonetos são realizadas com o objetivo de restaurar a qualidade destes solos contaminados. Alguns métodos podem ser utilizados para remoção de hidrocarbonetos do solo, como a extração de vapor, bombeamento e biorremediação. Tratamentos físicos isolam os contaminantes do solo sem extingui-los ou modificá-los quimicamente, mas apresentam um fator limitante: o alto custo. Durante o período em que os hidrocarbonetos circulam no solo, a maior parte deles é absorvida, diminuindo assim sua remoção eficaz. Desta maneira os processos biológicos apresentam uma tecnologia promissora para remover estes contaminantes, com ênfase principalmente na simplicidade e eficiência de custos quando comparados a outras alternativas (Mariano *et al.*, 2007).

A biodegradação durante a biorremediação está relacionada à diversidade metabólica dos microrganismos e às limitações intrínsecas do local, como depleção de nutrientes, baixa difusão de oxigênio, controle do

pH, temperatura, além da quantidade de combustíveis. Para a degradação das frações de hidrocarbonetos dos combustíveis em geral, é necessária a bioestimulação com nutrientes, onde se destacam o nitrogênio e o fósforo como os mais exigidos. Uma relação C:N:P de 70:5:1 é considerado uma condição ótima de nutrientes para que ocorra a biodegradação de combustíveis (Bento *et al.*, 2005). Na remediação de solos contaminados com petróleo, a adição de nutrientes, a aeração, o controle de pH e a temperatura são práticas comumente utilizadas para estimular os microrganismos nativos na etapa de degradação do poluente. Além disso, a estimulação da degradação também pode ser obtida pela adição de matéria orgânica ou produtos químicos em ambientes naturais, como por exemplo um surfactante químico (Ostberg *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que a adição de uma determinada fonte de carbono facilmente degradável pode encurtar o tempo de degradação dos n-alcenos em meio aquoso e estimular a biodegradação de n-hexadecano em solo contaminado com diesel. Este efeito estimulatório, poderia estar relacionado ao aumento da biomassa microbiana com a capacidade de biodegradar hidrocarbonetos, ou ainda estar relacionado diretamente com a biodisponibilidade do substrato (solo) (Ostberg *et al.*, 2007).

A degradação microbiológica possui uma seqüência preferencial de compostos derivados do petróleo para serem degradados. Os hidrocarbonetos alifáticos (alcenos e alcenos) parecem ser mais rápidos e

facilmente degradados, seguidos pelos hidrocarbonetos aromáticos e finalmente os cicloalcanos (Bento, 2005; Vieira *et al.*, 2006).

Desta forma a biodegradação inicia, na maioria das vezes, com a oxidação dos grupos metila das extremidades da cadeia até sua transformação em álcoois primários. Estes são, então, oxidados a aldeídos, que sofrem a ação da enzima NAD desidrogenase e, conseqüentemente, oxidam-se em seus respectivos ácidos graxos. Os lipídios também podem ser utilizados como fonte de carbono e energia, pois através de enzimas como as lípases, algumas bactérias conseguem degradar triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos. Estes compostos são degradados por β -oxidação, dando origem a unidades de acetil-CoA que posteriormente será usada pelo ciclo de Krebs (Vermelho *et al.*, 2007; Bückner, 2009).

Podem ser citadas três rotas básicas para a absorção de hidrocarbonetos: a primeira, rota de absorção de materiais solúveis, geralmente não é utilizada pois a solubilidade de alcanos é baixa; as outras duas são a via microgotículas (gotículas menores que a célula microbiana) e a via macrogotícula, estas são mais comuns e ocasionam a produção de biosurfactantes (Bento, 2001).

2.4.1 Degradação abiótica do biodiesel

A estabilidade do biodiesel pode ser afetada por diversos itens, como luz, temperatura, hidrólise e a oxidação, que irão provocar alterações na qualidade final deste combustível. Pelo fato do biodiesel ser produzido a partir de óleos vegetais e outras fontes naturais, este combustível acaba

sendo mais suscetível ao processo de oxidação, devido à exposição maior ao oxigênio do ar, bem como a uma maior temperatura (Jain & Sharma, 2010). A presença de numerosas ligações duplas nas moléculas de ácidos graxos livres levam a uma desestabilização da molécula, o que permite a entrada de oxigênio para que ocorra o processo de oxidação, além disso o biodiesel é composto por cerca de 50% de metil-ésteres insaturados tornando-o mais suscetível à oxidação (Cavalcanti, 2009).

2.4.2 Degradação biótica do biodiesel

Diversos microrganismos são capazes de utilizar óleos minerais como fonte de energia em meio aquoso. Estes microrganismos ocupam diversos lugares na natureza e são capazes de metabolizar diferentes tipos de hidrocarbonetos constituintes dos óleos minerais. A degradação destes hidrocarbonetos depende do metabolismo microbiano e das condições ambientais. A taxa de degradação é influenciada pela fonte de nutrição e oxigênio disponível (Schleicher *et al.*, 2008).

Vieira *et al.* (2006), em estudo realizado com bactérias degradadoras de óleo diesel previamente isoladas por Peixoto & Vieira (2006), constataram que apenas 1 dos 5 isolados bacterianos testados degradou os constituintes do biodiesel de óleo de palma. Este resultado sugere que existe uma especificidade bacteriana para os diferentes ésteres metílicos constituintes deste combustível.

Bento (2005) em estudo simulando derrame de óleo diesel em

solo, Ilha dos Cavalos – Lagos dos Patos – RS, verificou que aos 30 dias de experimento boa parte dos hidrocarbonetos alifáticos já haviam sido degradados e após 180 dias houve quase total degradação destes, com exceção dos alcanos de cadeia maior que 25 carbonos que tiveram suas concentrações praticamente constantes até o final do experimento.

2.4.3 Degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

As moléculas de hidrocarbonetos suscetíveis à oxidação microbiana podem estar sob a forma de cadeias alifáticas, aromáticas, longas, curtas, lineares ou ramificadas, que são modificadas para a obtenção de compostos usados no metabolismo celular. Dentre os hidrocarbonetos acima citados, os de cadeia alifática são considerados um grande potencial em termos de substrato para o crescimento de algumas espécies de microrganismos. A solubilidade dos componentes alifáticos decresce rapidamente com o aumento do peso molecular (Bento, 2001).

Uma grande diversidade de compostos aromáticos pode ser encontrada facilmente no ambiente. No entanto, de algumas décadas até o presente, vem ocorrendo um expressivo acréscimo de compostos aromáticos provenientes do aumento de população e o desenvolvimento de tecnologias novas, causando assim transtornos ecológicos irreversíveis (Barbosa *et al.*, 2008).

Nas rotas metabólicas de oxidação de hidrocarbonetos inicialmente ocorre a incorporação do oxigênio ao substrato. Dentro deste processo estão

envolvidos dois tipos de oxigenases: as monoxigenases e as dioxigenases .

A degradação de hidrocarbonetos alifáticos pode ocorrer através de diferentes rotas metabólicas (Figura 2):

- Oxidação Terminal: via sistema monoxigenase inicialmente um dos grupos metil-terminal sofre oxidação, posteriormente recebe um grupo hidroxila do álcool primário. Já através do sistema dioxigenase os alcanos são convertidos em um hidroperóxido, que será reduzido ao álcool correspondente.

- Oxidação Subterminal: este tipo de oxidação resulta em um álcool secundário, apesar de ser raramente encontrada algumas espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Bacillus* spp. optam por esta rota.

- Oxidação Diterminal: ocorre a formação de um ácido carboxílico através da oxidação de ambos grupos metil-terminal, que posteriormente são degradados via B-oxidação (Bento, 2001).

Na oxidação de hidrocarbonetos aromáticos inicialmente ocorre a fissão do anel através da oxidação a compostos dihidroxilados. Segue uma sequência de reações onde há a formação de cis-dihidrodiol, que origina ácido cis-mucônico ou 2-hidroxi-mucônico semialdeído, que serão encaminhados para o ciclo de Krebs. Neste processo, o sistema enzimático envolvido é a dioxigenase (Figura 3) (Bento, 2001). A oxidação enzimática dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos formados de dois ou mais anéis aromáticos, é feita pela ação das monoxigenases dependentes do Citocromo P450, levando à formação de óxidos de arenos que posteriormente

serão oxidados à quinonas (Silva, 2008).

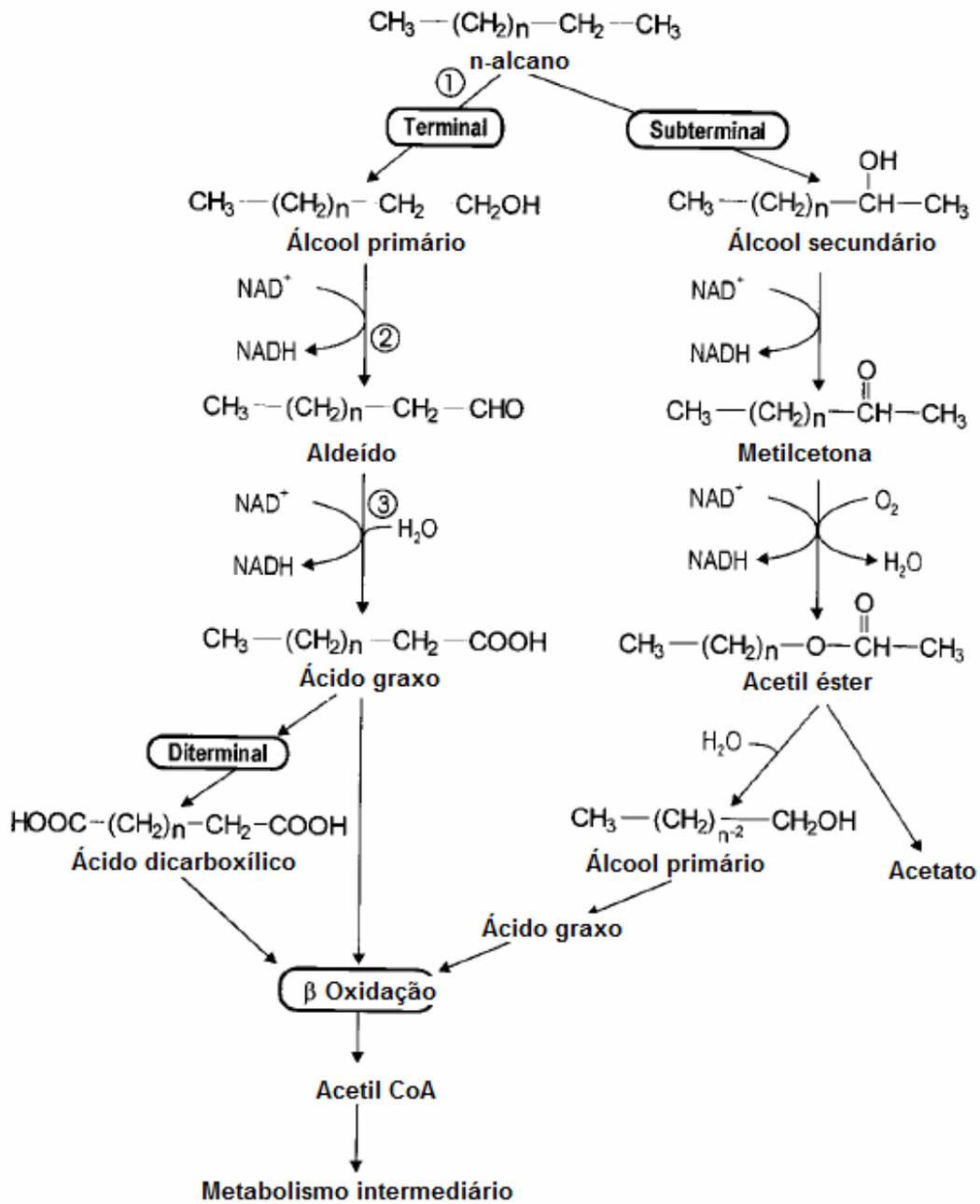


Figura 2. Degradação de alcanos. 1-n-alcanos monoxigenases. 2-álcool desidrogenase. 3- aldeído desidrogenase (Bücker, 2009).

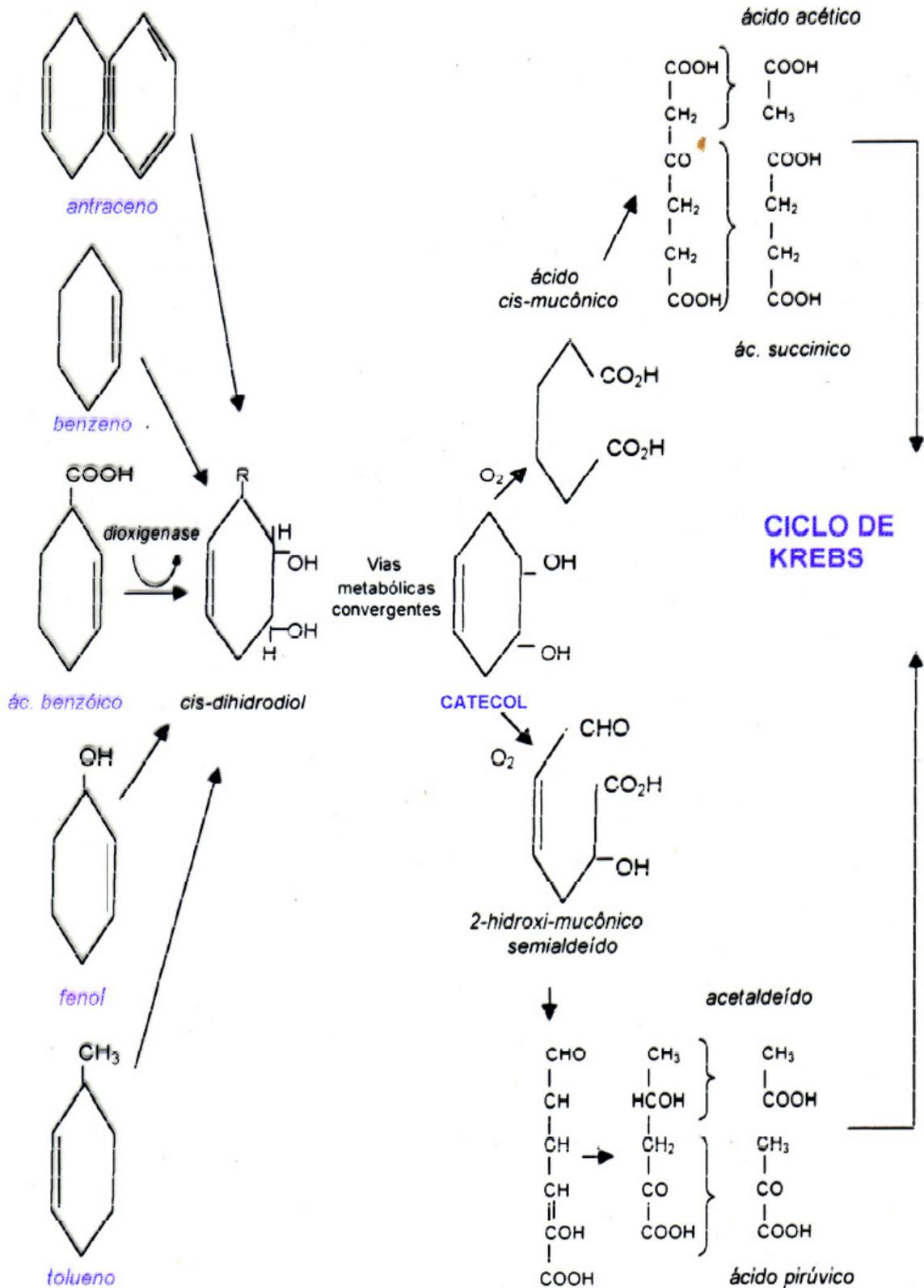


Figura 3. Etapas metabólicas básicas para degradação de hidrocarbonetos aromáticos (Bücker, 2009).

Os hidrocarbonetos aromáticos demonstram um menor coeficiente de partição do que os hidrocarbonetos alifáticos (C_{15} a C_{30}), desta forma sendo mais tóxicos ao meio ambiente pela sua maior mobilidade na água, atingindo assim ambientes naturais também centros de abastecimento nas cidades. A quebra do anel benzênico pode ser considerada como a etapa mais complexa durante o procedimento de biodegradação de um determinado composto aromático por apresentar uma alta estabilidade química (Tiburtius *et al.*, 2004).

Para que a quebra de um anel benzênico ocorra e resulte em uma degradação total de um determinado contaminante, que na maioria das vezes é o desejado, seria necessário a conversão total deste produto em CO_2 e H_2O (mineralização completa), mas por outro lado também podem ocorrer a degradação parcial ou apenas a biotransformação de um composto aromático específico em seus compostos derivados, que muitas vezes podem ser mais tóxicos que o contaminante primário (Kalbitz *et al.*, 2003).

O índice de biodegradação dos compostos aromáticos está relacionado diretamente com a capacidade de metabolizar as estruturas químicas dos componentes dos resíduos que estarão disponíveis para o tratamento. Como fatores de extrema importância para o desenvolvimento de microrganismos nativos citamos a aeração, a temperatura, o pH, a disponibilidade de nutrientes e a umidade (Barbosa *et al.*, 2008). A ausência

das condições ideais para o desenvolvimento e o crescimento de microrganismos é um agravante presente em processos de biodegradação de compostos aromáticos, pois o solo acaba adsorvendo diversas substâncias que, conseqüentemente, apresentarão pouca disponibilidade para os microrganismos (Thiele & Brümer, 2002). Maki *et al.* (2003), em estudo realizado no Japão, demonstraram que uma quantidade excessiva de macronutrientes é necessária para que de uma forma rápida e satisfatória aconteça o processo de biodegradação de petróleo, por exemplo após um derrame de combustível.

Conforme Silva (2008), os microrganismos do solo em relação à biomassa e diversidade fisiológica, podem ser considerados potentes reservatórios catalíticos e no momento em que são expostos a moléculas orgânicas específicas que apresentam um enriquecimento seletivo, possibilitando assim a conversão destes em fonte de carbono e energia, atingindo assim sua degradação. Por esse motivo o solo pode ser considerado como um ambiente favorável a biodegradação de resíduos orgânicos (Moreira & Siqueira, 2006).

Após a década de 50, novas pesquisas na área de degradação de contaminantes ambientais surgiram na tentativa de selecionar microrganismos com a capacidade para degradar compostos alifáticos e aromáticos, principalmente pertencente aos gêneros *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Aeromonas*, *Mycobacterium*, bem como fungos dos gêneros *Fusarium*,

Cândida, Penicillium, Aspergillus entre outros (Zhang *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2007). Atualmente os consórcios microbianos capazes de degradar certos poluentes vêm recebendo destaque, pois em contraste com as culturas puras, apresentam maior efetividade na degradação destes compostos, por apresentarem uma maior capacidade de utilizar estas substâncias como fonte de carbono, conseqüentemente atingindo uma taxa de degradação elevada e principalmente a maior mineralização destes compostos, aumentando assim a probabilidade de que um processo de biodegradação eficiente ocorra (Silva, 2008).

O biodiesel é o composto mais facilmente degradado em relação aos derivados de petróleo, que normalmente possuem em sua composição compostos recalcitrantes. A constituição do biodiesel é baseada em cadeias de hidrocarbonetos na forma de éster com dois átomos de oxigênio ligados a outros dois radicais orgânicos que o torna biologicamente ativo (Lapuerta *et al.*, 2009). Em relação ao biodiesel, ele possui uma grande vantagem quando falamos de biodegradabilidade, pois como sua estrutura molecular é menos estável, acaba proporcionando e facilitando o ataque enzimático microbiano que poderá usufruir do biodiesel como seu substrato para crescimento (Silva *et al.*, 2005).

A rota para degradação do biodiesel inicia com a clivagem do grupo metil éster por uma esterase, produzindo assim uma molécula de ácido graxo juntamente com um álcool. Logo após esta etapa ocorre a quebra desta molécula de ácido graxo pelo Ciclo do Ácido Tricarboxílico.

Nesta segunda fase os ácidos graxos são oxidados via β -oxidação e degradados a ácido acético e a uma molécula de ácido graxo com dois carbonos a menos (Vieira *et al.*,2006; Bücken, 2009). Nesta reação, o primeiro passo será a conversão do ácido graxo a éster coenzima A (CoA). Depois, o éster-CoA é oxidado na posição beta e dois átomos de carbono do final da molécula são clivados para produzir a acetil-CoA. Este processo de diminuição da molécula permanece até o ácido inicial ser degradado completamente a acetil-CoA (Gomes, 2008). As etapas deste processo podem ser visualizadas, respectivamente nas figuras 4 e 5.

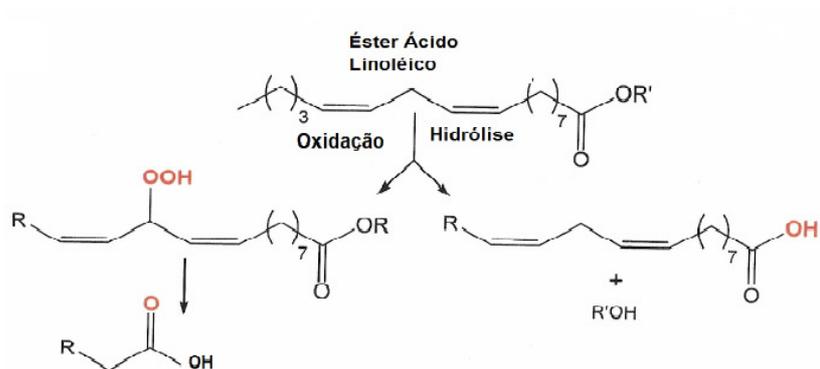


Figura 4. Hidrólise do éster ácido linoléico. (Fonte: Bücken, 2009)

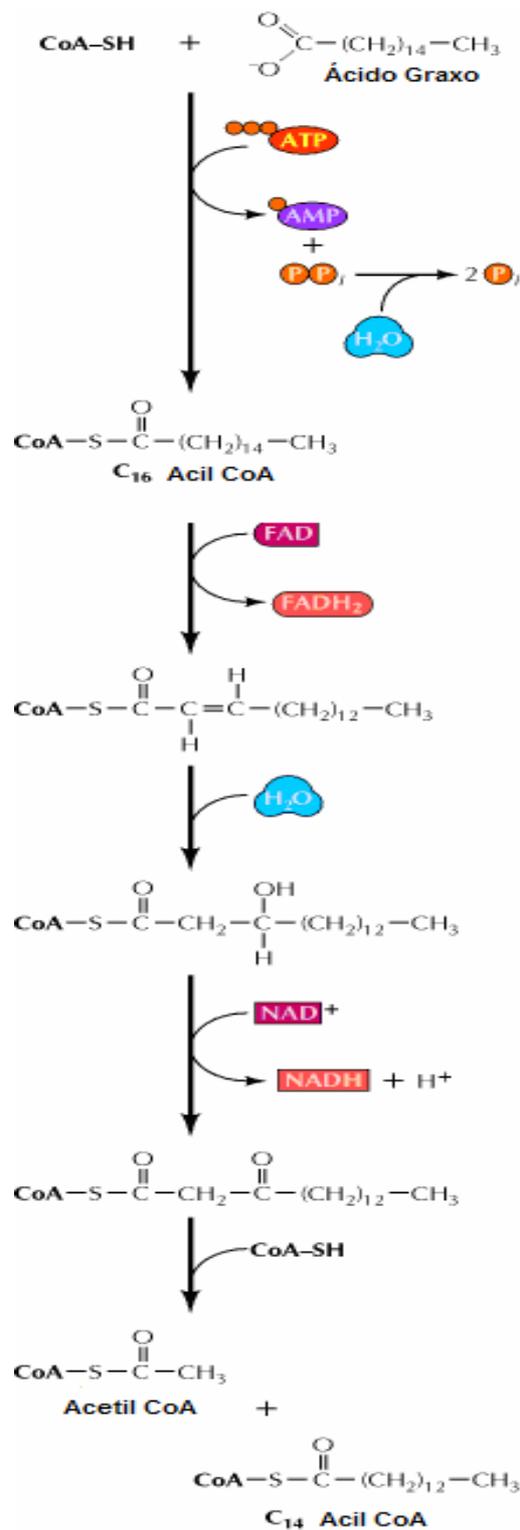


Figura 5. Etapas da β - oxidação do palmitato. (Fonte: Bücker, 2009)

Diversos microrganismos apresentam potencial para biodegradar o biodiesel como as *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Marinomonas vaga*, *Escherichia coli*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus subtilis* entre outros (Mancera-López *et al.*, 2007; Nwaogu *et al.*, 2008;).

Estudos de Pasqualino *et al.* (2006) utilizaram o método de liberação de CO₂ para verificar a biodegradabilidade do biodiesel puro e misturas com diesel e gasolina, e como resultado obtiveram uma biodegradabilidade de 98% para o biodiesel puro, enquanto que para as misturas com diesel e gasolina obtiveram 50 e 56%, respectivamente. Importante ressaltar que a biodegradabilidade das misturas aumentou com a adição de biodiesel. Também em pesquisas conduzidas por DeMello *et al.* (2007) foi realizada a comparação da degradação microbiana de misturas de biodiesel com diesel e somente diesel em microcosmos montados com água do mar tendo concluído que a presença dos ésteres de ácidos graxos diminuía a biodegradação inicial dos n-alcenos do diesel de petróleo, por apresentarem estruturas químicas menos complexas, facilitando assim a biodegradação.

Estudos comprovam que o biodiesel é biodegradável com um tempo de meia-vida de alguns dias ao contrário do diesel que tem um tempo de meia-vida de meses ou até anos, com isso é esperado que o biodiesel tenha impactos menores em relação aos prejuízos no ambiente em caso de acidentes (Ainslie, 2006). Porém, um derramamento em grande escala de

biodiesel pode causar uma desoxigenação provisória da água, mas é menos prejudicial do que um derramamento de combustível diesel.

Diversas técnicas vem sendo utilizadas para avaliar as taxas de degradação e entre uma delas podemos citar a cromatografia, que é uma ferramenta analítica utilizada na separação de misturas complexas e identificação dos seus componentes. Esta separação depende da diferença entre o comportamento dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. Os hidrocarbonetos estão entre as substâncias separáveis por esta técnica, sendo identificadas as principais frações consumidas pelos microrganismos durante seu crescimento em derivados do petróleo (Bento *et al.*, 2005; Bento, 2005; Gazim *et al.*, 2008).

3 Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas (com porção polar e apolar) que possuem a capacidade de reduzir as tensões superficial e/ou interfacial entre gases, líquidos e sólidos com uma ampla aplicabilidade, como nas indústrias e na limpeza de locais contaminados com hidrocarbonetos. A redução da tensão superficial ocorre devido à característica anfipática (porção polar/apolar) da molécula, capaz de reduzir a energia livre do sistema pela transferência de moléculas de alta energia do interior de uma solução para a interface (Maier, 2003; Mulligan, 2005; Bento *et al.*, 2008).

Os biossurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos, e apresentam baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidade altos, além de serem eficazes na recuperação de ecossistemas acelerando a biodegradação dos hidrocarbonetos provenientes de vazamentos (Bento *et al.*, 2008). Além disso, alguns biossurfactantes apresentam capacidades anti-fúngicas, anti-virais e de sorção de metais e são usados na indústria do petróleo para aumentar a recuperação do petróleo (Mariano, 2006). Outras funções primordiais dos biossurfactantes estão relacionadas com a movimentação celular, a comunicação célula-célula e a atividade antimicrobiana (Morales, 2008).

Diversas pesquisas que estão sendo desenvolvidas e tentam esclarecer quais os mecanismos envolvidos na interação microrganismos e compostos orgânicos hidrofóbicos. Os biossurfactantes têm sido comumente citados como meios de ação de um mecanismo pelo qual os microrganismos se beneficiam para aumentar seu contato com substratos pouco solúveis, sendo transportados tanto passivamente como ativamente (Van Hamme *et al.*, 2006). Uma das principais propriedades de todo surfactante é sua habilidade em reduzir a tensão superficial de um meio líquido. A medida de tensão superficial da água destilada é de 73 mN/m, enquanto um surfactante efetivo produzido por microrganismos (biossurfactante) pode reduzir este valor para um valor menor que 30 mN/m. Por esta razão, a medida da tensão superficial das soluções aquosas tem sido uma técnica muito

utilizada em estudos que envolvem a detecção de biossurfactantes (Bento *et al.*, 2008).

Segundo Singh *et al.* (2007) os microrganismos já conseguiram desenvolverem várias formas naturais para degradar compostos orgânicos, normalmente relacionados à sua capacidade de originar superfícies hidrofóbicas nas células ou secretar surfactantes no meio, ao redor das células. A ligação hidrofóbica é a tendência das moléculas apolares se ligarem com outras moléculas apolares, sendo assim, um microrganismo pode aderir a substratos devido ao efeito hidrofóbico (Nascimento, 2007). A característica hidrofóbica é um dos fatores determinantes na adesão bacteriana a substratos diversos (Ahimou *et al.*, 2001), como por exemplo, aos hidrocarbonetos.

A atividade emulsificante pode ser apresentada pelos biossurfactantes, que pode ser verificada durante o processo de crescimento microbiano em meio mínimo mineral, com a formação de macro e microemulsões na fonte de carbono insolúvel, comparando-se com o controle, sem microrganismos (Bento *et al.*, 2008). De acordo com Bento *et al.* (2008) uma das técnicas mais simples de avaliar a atividade emulsificante foi descoberta por Cooper & Goldenberger em 1987 e baseia-se no índice de emulsificação ($IE_{24\%}$). Para uma emulsão ser definida como estável, o IE após 24 horas deverá apresentar uma emulsão melhor que 50% do que a emulsão após 2 horas de agitação. Conforme Bento *et al.* (2008) um isolado

bacteriano considerado bom produtor de biossurfactante deverá apresentar um IE > 0,5 (equivalente a 50% de emulsificação do óleo diesel).

4 Enzimas envolvidas na biodegradação de combustíveis

4.1 Monoxigenases e Dioxigenases

As duas classes de oxigenases envolvidas no processo de degradação de combustíveis são as monoxigenases e as dioxigenases. As monoxigenases fazem a incorporação de um átomo de oxigênio ao substrato e o outro se reduz à água, enquanto as dioxigenases fazem a incorporação de ambas moléculas ao substrato (Bento, 2001).

A natureza química dos compostos contaminantes é muito diversa, variando de estruturas alifáticas saturadas simples até complexos compostos policíclicos aromáticos. O primeiro passo para a biodegradação de hidrocarbonetos é a hidroxilação, que é catalisada pelo complexo de proteínas citocromo P-450. Dois mecanismos tem sido propostos para explicar a incorporação da molécula de oxigênio no produto hidroxilado: um átomo de oxigênio no caso de monoxigenases e dois átomos no caso de dioxigenase. O citocromo P-450 é capaz de utilizar uma ampla escala de substâncias xenobióticas como substrato e, assim transformações químicas irão ocorrer, levando à produção de alcoóis (Zazueta-Sandoval *et al.*, 2003).

4.2 Lipases e Esterases

As enzimas lipolíticas podem ser encontradas em animais, plantas e microrganismos. As lipases são responsáveis pela hidrólise dos triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol e, ainda sob certas condições de catalisar a reação reversa, ou seja, a produção de glicerídeos de ácidos graxos e glicerol (Burker *et al.*, 2003). Elas atuam na interface entre uma fase de substrato e uma fase aquosa, em que a enzima é dissolvida. Lipases também são capazes de catalisar a interesterificação e a transesterificação em meio não aquoso. Estas enzimas constituem o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas e são enzimas muito importantes em relação ao ponto de vista fisiológico e biotecnológico. Enzimas lipolíticas atualmente atraem uma grande atenção devido às suas características únicas: especificidade de substrato, região específica e seletividade quiral (Bussamara *et al.*, 2010).

Em relação às esterases podemos dizer que são enzimas capazes de hidrolisar ligações do tipo éster de uma grande variedade de substratos sendo classificadas em A-esterases, B-esterases e C-esterases. Esta classificação está baseada no tipo de grupamento químico que está covalentemente ligado ao carbono da carbonila do grupo éster que será hidrolisado. As A-esterases são um grupo de esterases que preferem grupos arilas ligados à carbonila dos carboxil-ésteres e que hidrolisam ésteres de organofosfatos. As B-esterases preferem grupamentos alquilas ligados a

carbonila e são inibidas por ésteres de organofosfatos. Já as C-esterases preferem ésteres de acetato, isto é, um grupo metil ligado ao carbono da carbonila do éster, não sendo capazes de interagir com organofosfatos (Casaburi *et al.*, 2006). Na rota de degradação do biodiesel pela ação da enzima esterase há a formação de ácido graxo e um álcool associado. devido à clivagem do metil éster presente neste combustível (Vieira, 2006). A enzima lipase é uma classe especial de esterase que atua sobre ligações ésteres; a diferença desta para as demais esterases está no fato de que a lipase catalisa reações de substratos que não são solúveis em água, diferentemente das demais (Dalla-Vecchia, 2004).

5 Microrganismos degradadores

A capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias e fungos. Eles podem ser encontrados em ambientes marinhos, de água doce e no solo. Os organismos podem metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente, de forma que é requerida uma mistura de populações com capacidade enzimática ampliada para degradação de complexos de hidrocarbonetos encontrados no petróleo existente no solo, água e no mar (Mohanty & Mukherji, 2008). Segundo Bidoia *et al.* (2005), os gêneros mais importantes de bactérias, tanto em ambientes terrestres como marinhos, responsáveis por significativos resultados em relação a biodegradação são: *Acromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*,

Achromobacter, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas spp* e os corineformes. As linhagens de *Vibrio* são limitadas ao ambiente marinho. *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Nocardia spp.*, pertencentes à família Enterobacteriaceae, actinomicetos e os corineformes perfazem 95% dos isolados. Nwaogu *et al.* (2008) em estudo realizado com duas espécies de *Bacillus* (*B.subtilis* e *B.cereus*), demonstrou que ambas apresentaram-se como potenciais degradadoras de óleo diesel, onde em 27 dias de experimento um valor de 1.05×10^{-3} g/h de degradação foi obtido utilizando métodos gravimétricos.

Atualmente pesquisas demonstram que bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de um solo contaminado com óleo diesel podem ser utilizadas no tratamento de bioaugmentação com organismos autóctones e conseqüentemente serem utilizadas na biorremediação de um local afetado por este contaminante (Ueno *et al.*, 2007). Guo *et al.* (2010) realizaram estudo no qual o gênero *Sphingomonas* também demonstrou ser degradador de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, atingindo valores de até 79% de degradação em apenas 7 dias de experimento.

Outros estudos apresentam a eficiência de fungos como *Rhizopus sp*, *Penicillium funiculosum*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *S porobolomyces*, *Trichosporium*, *Cladosporium* e *Aspergillus sydowii* na degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos quando um tratamento de bioaugmentação é utilizado, sendo que 70% destes compostos

foram mineralizados, desta forma sendo uma alternativa altamente promissora (Miranda *et al.*, 2007; Mancera-López, 2008).

Junior *et al.*, (2009) avaliaram a degradação de biodiesel e misturas de diesel (0, 2, 5, 20 e 100%) por *Candida viswanathii* em solo contaminado com combustível e concluíram que este isolado foi capaz de aumentar significativamente a produção de CO₂ em 50%, a biodegradação em solo das misturas de biodiesel e diesel, preferindo biodegradar o biodiesel puro.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biorremediação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As análises cromatográficas foram realizadas na central analítica na Universidade Federal de Pelotas.

6.1 Combustíveis

Para a seleção de bactérias e fungos com potencial para biodegradação de diesel, diesel acrescido de 20% de biodiesel e somente biodiesel foi realizado o isolamento de bactérias do solo contaminado. Foram utilizadas amostras de diesel metropolitano e biodiesel de soja, ambas fornecidas pela Ipiranga Distribuidora de Petróleo S.A. O solo utilizado foi proveniente de uma área de disposição de resíduos petroquímicos, o “landfarming”, que vem recebendo há 19 anos resíduos petroquímicos na Companhia Petroquímica do Sul – COPESUL, situada na cidade de Triunfo no Rio Grande do Sul.

6.2 Amostragem de solo

Foram coletados aproximadamente 50g de solo de cinco pontos equidistantes (20 passos) de duas células selecionadas do “landfarming” na altura 0-15cm e logo após misturadas e homogeneizadas manualmente em um recipiente de vidro estéril totalizando 250g formando, assim, uma amostra composta. Posteriormente foram acondicionadas em frasco de vidro

estéril e trazidas para o laboratório onde foram armazenadas a 4°C.

6.3 Caracterização de solo

O solo foi avaliado quanto às seguintes características: avaliação do pH, concentrações de: argila, fósforo, potássio, matéria orgânica, alumínio, cálcio, magnésio, enxofre, zinco, cobre, manganês e boro. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Química do Solo na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo 8).

6.4 Isolamento de microrganismos

Inicialmente, 1 grama da amostra composta foi adicionado a 99 mL de água destilada estéril em um agitador de tubos da marca Sieger a 300 rpm por uma hora. Após, 1 mL em triplicata foi inoculado em frascos do tipo erlenmayer, contendo 50 mL de meio mineral MM1 (Anexo 1) esterilizado, 1% de diesel e biodiesel metílico de soja sendo incubados sob agitação orbital a 150 rpm, à temperatura de 30°C, realizando-se transferências de 1 mL do inóculo para novos frascos contendo o mesmo meio mineral e 1% biodiesel ou diesel puros. Essas transferências foram realizadas a cada 7 dias, durante 3 semanas, com o objetivo de assegurar que o crescimento microbiano ocorresse às expensas do diesel ou do biodiesel como única fonte de carbono. A técnica de enriquecimento em meio mínimo mineral foi realizada por 3 semanas, como uma forma de selecionar os microrganismos

onde o crescimento microbiano pudesse ocorrer utilizando diesel e biodiesel como única fonte de carbono. Após a verificação do crescimento dos microrganismos, foram realizados isolamentos da população microbiana estabelecida. Após o período de 3 transferências, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada frasco e realizadas diluições decimais sucessivas de 10^{-1} a 10^{-7} . Foram inoculadas as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} para bactérias e 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} para fungos, em triplicata. Foi usado 0,1 mL da suspensão do solo para cada placa de Petri contendo Ágar nutritivo (Anexo 2), Ágar diesel e Ágar biodiesel onde aplicou-se a técnica de espalhamento com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas permaneceram em repouso por uma hora para que a amostra fosse absorvida pelo meio de cultura, sendo posteriormente invertidas e incubadas em estufa a 30 °C por 48h para bactérias e 25 °C por 5 dias para fungos. As colônias que apresentaram diferenças na morfologia colonial foram transferidas para o meio ágar nutritivo, Agar diesel (AD) e Agar biodiesel (AB) utilizando-se a técnica de esgotamento para bactérias e fungos até a obtenção das colônias isoladas, que foram armazenadas à temperatura de 4 °C.

6.5 Padronização do Inóculo bacteriano

Na preparação do inóculo, os isolados foram retirados do estoque onde estavam armazenados em glicerol 20% à temperatura de -20°C e transferidos para um erlenmeyer, contendo 50 mL de caldo nutriente (Anexo 3), com uma alça de platina. Os frascos foram incubados a 180rpm a 28°C

por 48h. As culturas foram centrifugadas a 6000rpm por 10 min e lavadas três vezes com MM1. Nos testes de biodegradação o inóculo inicial foi padronizado com absorbância de 0,07 na faixa de leitura de 600 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas diluições seriadas e plaqueadas 10^{-2} a 10^{-4} e incubadas a 28°C por até 48h .

6.6 Pré-seleção de bactérias e fungos biodegradadores de hidrocarbonetos utilizando dois Indicadores redox TTC e DCPIP

A pré-seleção dos microrganismos foi realizada utilizando-se indicadores redox, Cloreto de Tetrazolium (TTC) e 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), com o intuito de avaliar previamente a capacidade de degradação do diesel e biodiesel comercial pelos isolados.

A redução do TTC a TPF (trifenil formazan) foi avaliada visualmente pela mudança na coloração do meio de incolor para rosa e roxo. Os sais de tetrazolium competem com outros aceptores de elétrons pelo poder de redução da cadeia de transporte de elétrons. Desta forma, a redução do TTC para trifenil formazan reflete a atividade da cadeia de transporte de elétrons, informando sobre a atividade de uma dada população microbiana. O TTC tem sido utilizado para a avaliação da atividade de enzimas desidrogenases do solo (Bento *et al.*,2005) e no método do Número Mais Provável (NMP) para a estimativa de degradadores de óleo diesel e gasolina proposto por Braddock & Catterall, (1999). Pela incorporação de aceptores artificiais de elétrons como o DCPIP ao meio mineral (Anexo 4), é

possível prever a capacidade de um microrganismo em utilizar o substrato. Foi utilizado o biodiesel puro como única fonte de carbono e energia. Para o DCPIP a mudança de coloração do meio mineral é de azul (oxidado) para incolor (reduzido) e para o TTC de incolor (oxidado) para róseo (reduzido). Nos controles negativos, foram adicionados 10 mL de meio mineral em frascos de vidro de penicilina com cada indicador redox, além de 100 µL de biodiesel. O inóculo foi incubado a 180 rpm a 30° C e foi acompanhada a mudança de coloração dos indicadores por 24, 48, 72 e 144h. Para padronização do tamanho do inóculo foram utilizadas alças calibradas descartáveis, onde retirou-se uma colônia do meio de cultura AB e AD (Anexos 5 e 6) para bactérias.

Isolamento de microrganismos

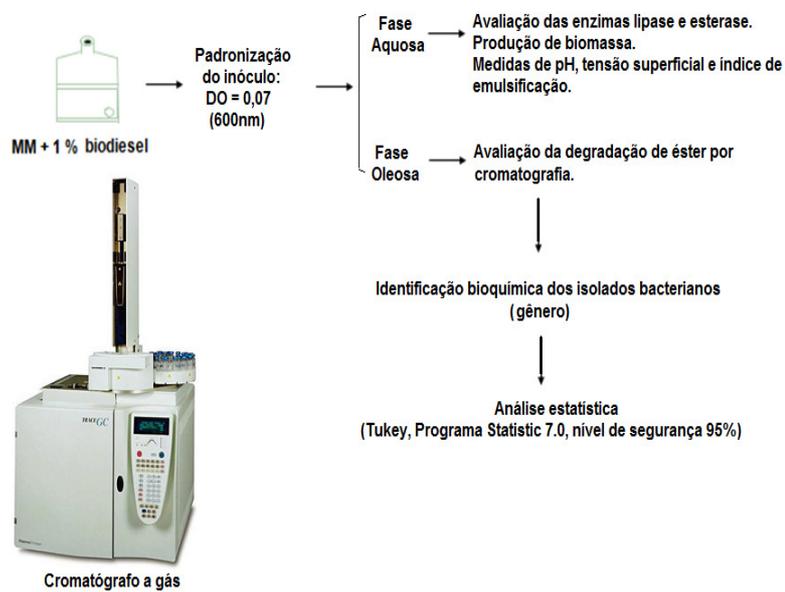
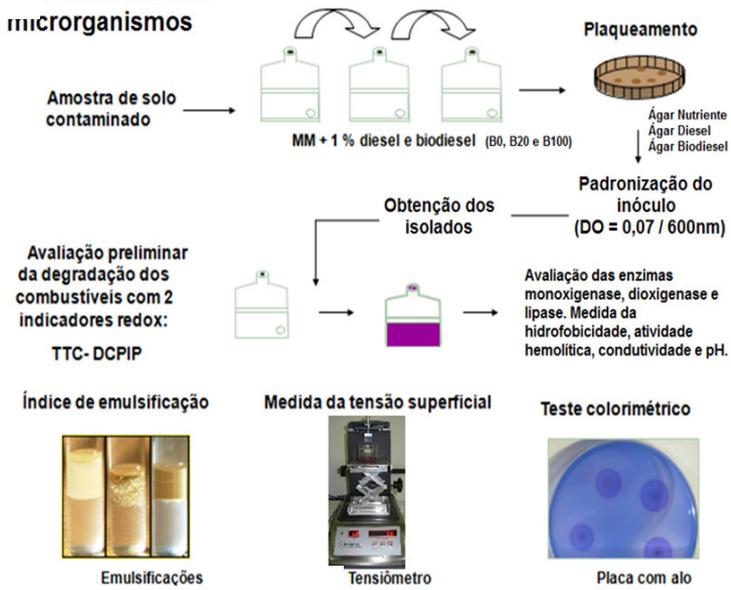


Figura 6 - Esquema geral com as etapas utilizadas na seleção dos microrganismos com potencial de degradação de óleo diesel e biodiesel

6.6.1 Avaliação do Crescimento

Para a avaliação do crescimento dos isolados bacterianos foi utilizado o método de proteínas totais. Este método é empregado para avaliar o crescimento microbiano através da quantificação de proteínas. A metodologia utilizada foi descrita por Bradford (1976), que está relacionada à ligação do reagente Coomassie Blue com as proteínas. Utilizou-se a proteína soro albumina bovina (SIGMA) como padrão e realizou-se o teste em triplicata. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 595 nm. Para a avaliação da produção de biomassa dos fungos foi utilizada a metodologia de peso seco, onde inicialmente separou-se as fases aquosa e oleosa com o auxílio de um funil de separação, sendo a biomassa formada retida em discos de papel filtro previamente pesados. Para a remoção do excesso de óleo utilizou-se 4mL de hexano sobre cada disco. Os discos foram colocados em estufa a 50 °C durante 4 dias para remoção da umidade, sendo transferidos da estufa diretamente para um dessecador, de onde foram retirados somente para a pesagem.

6.6.2 Tensão Superficial e Índice de emulsificação

A detecção da produção de biossurfactantes foi realizada pela medida do índice de emulsificação e da tensão superficial do meio de cultura, durante o período estipulado para acompanhamento do crescimento. O índice de emulsificação foi realizado na presença e na ausência de células bacterianas no meio de cultura. A remoção das células foi feita utilizando-se

o processo de centrifugação a 6.000 rpm por 15 min.. Para a avaliação do índice de emulsificação foi utilizado a metodologia sugerida por Bento *et al.* (2008), onde 2 mL do extrato celular foram misturados a 2 mL de diesel (B0) em um tubo de ensaio com fundo chato. A mistura foi agitada em vortex por dois min. e os frascos foram deixados em repouso por 24 horas, sendo então calculada a altura da emulsão (camada entre a fase aquosa e o hidrocarboneto) dividida pela altura total e multiplicada por 100. Desta forma, foi obtido o IE 24(%) (índice de emulsificação) no hidrocarboneto.

A avaliação da medida de tensão superficial foi realizada com aproximadamente 10 mL de MM1 da fase aquosa proveniente do crescimento, após a centrifugação, em um medidor de tensão superficial da marca Gibertini. A medida da tensão superficial expressa a força exigida para mover uma lamínula que está sobre um líquido, através do ar. Para esta aferição foi utilizado o método da Placa de Wilhelmy, sendo realizadas com as amostras à temperatura ambiente.

6.6.3 Detecção de ramnolipídios

A técnica para a detecção de ramnolipídios, biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, pode ser utilizada para qualquer biossurfactante aniônico de baixo peso molecular (Bodour *et al.*, 2003). Também pode ser utilizada para detectar surfactantes aniônicos, como por exemplo os sophorolipídeos, produzidos por *Candida spp* e outros ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas spp*. bem como avaliar a

capacidade de produção deste tipo de biossurfactante (Gunther *et al.*, 2004). Os isolados bacterianos foram inoculados em placas com o meio Agar Azul de Metileno (Anexo 11), incubadas em estufa a 30°C, durante 96 horas. A detecção de ramnolipídios foi realizada pela observação das colônias nas placas. Os ramnolípídios formam um par iônico insolúvel com o surfactante catiônico brometo de cetilmetilamônio e o corante básico azul de metileno, dando origem a um halo azul escuro ao redor da colônia, indicando resultado positivo para este teste (Morales, 2008; Pinzon, 2009).

6.6.4 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica pode ser utilizada como indicativo da produção de biossurfactantes (Iqbal *et al.*, 1995). Para avaliar a atividade hemolítica dos isolados foram utilizadas placas de Petri com meio Ágar Sangue (Laborclin), com cinco repetições para cada microrganismo. A inoculação bacteriana foi realizada com o auxílio de uma alça de platina pela técnica de esgotamento. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A formação de halos claros ao redor da colônia, apresentando hemólise, pode ocorrer devido à produção de biossurfactante ou à presença de hemolisina. Segundo Iqbal *et al.*, (1995) é importante avaliar se a hemólise foi causada por biossurfactantes, que são resistentes a altas temperaturas ou se foi devido às hemolisinas, que são sensíveis ao calor.

6.6.5 Medidas de Hidrofobicidade (BATH)

Este teste foi aplicado com o objetivo de avaliar o perfil

hidrofóbico e as características ácido-básicas dos isolados bacterianos, bem como suas transformações na parede celular devido ao crescimento em hidrocarbonetos.

Os solventes utilizados no experimento foram Clorofórmio-solvente ácido (Sinth) e Xilol-solvente apolar (Sinth). Foi utilizada a metodologia descrita por Rosenberg (1984) com algumas adaptações: inicialmente centrifugou-se os cultivos a 3500rpm durante 15 min., após lavou-se as células duas vezes com tampão fosfato 50mM (pH 7,0) e posteriormente as mesmas foram ressuspensas em KNO₃ (0,1M, pH 6,2). Em tubos de ensaio adicionou-se 1mL de solvente a 4mL de suspensão bacteriana, deixou-se em repouso durante 5 min. e misturou-se em vórtex por 2 min.. Na sequência, os tubos foram mantidos em repouso durante 60 min. e a leitura da fase aquosa foi realizada a 600 nanômetros (nm) em espectrofotômetro. A porcentagem de adesão bacteriana, de acordo com o solvente utilizado, deu-se de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{Hidrofobicidade} = \frac{(DO_A - DO_B)}{DO_A} \times 100$$

DO_A

Onde:

DO_A: Branco – 5mL de solução de KNO₃

Amostra – 5mL de solução de KNO₃ + Células

DO_B: Branco – 4mL de solução de KNO₃ + 1mL dos solventes em cada tubo

Amostra – 4mL de suspensão celular em solução de KNO₃ + 1mL dos solventes em cada tubo.

6.6.6 Medidas de Condutividade

Esta medida foi realizada com o objetivo de monitorar o consumo de íons de sais no meio mineral em que os isolados estavam crescendo. A condutividade da fase aquosa dos cultivos bacterianos, que estavam em temperatura ambiente, foi medida utilizando-se um Condutímetro Waterproof Eometer modelo EC – 1385. Aproximadamente 40mL do sobrenadante das culturas contendo MM1 foram acondicionadas em copos plásticos descartáveis e logo após o eletrodo do condutímetro foi mergulhado na solução. Após alguns segundos o valor foi obtido no visor do aparelho.

6.6.7 Medidas de pH

A detecção da produção de metabólitos ácidos ou básicos oriundos do metabolismo bacteriano nas condições estabelecidas, foi analisada pelo acompanhamento das medidas de pH da fase aquosa com o auxílio de um eletrodo de pH acoplado a um pHmetro digital DIGIMED DM-22. As amostras encontravam-se à temperatura ambiente.

6.6.8 Detecção das enzimas

6.6.8.1 Atividade Lipolítica

Para esta análise foi utilizado um método titulométrico descrito por Burkert *et al.*, (2004). Inicialmente foi retirado 1mL do extrato bacteriano e fúngico, previamente centrifugado a 6000rpm por 15 min. a 10 °C, do frasco de cultivo (50mL de MM1 + 1% do combustível). Logo após foram adicionados 5mL de emulsão de azeite de oliva (Anexo 10) e 2mL de tampão fosfato 10mM pH 7,0. Esta mistura foi acondicionada em agitador a 180rpm a 37°C por 30 min.. Logo após foram adicionados 15mL de álcool-acetona 1:1 com o intuito de retardar a velocidade da reação, e 5 gotas do indicador fenolftaleína 1%. Posteriormente foi realizada a titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05M. Para os frascos controle o álcool-acetona foi adicionado no mesmo tempo dos isolados. As análises foram realizadas para B20 (20% de biodiesel no diesel) e B100 (100% biodiesel) em relação às bactérias e em B100 para os fungos. Uma unidade da atividade da lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera um mol de ácido graxo por hora (Macêdo *et al.*, 1997). No tratamento controle a adição da acetona ocorreu no mesmo instante dos outros reagentes. Os resultados obtidos para os controles foram utilizados na fórmula para calcular o valor da atividade lipolítica conforme Macêdo *et al.*(1997).

6.6.8.2 Monoxigenases e dioxigenases

Para avaliação destas enzimas foi utilizada metodologia de espectrofotometria, para a catecol 1,2 dioxigenase tendo sido o protocolo descrito por Hegman (1996), já para o catecol 2,3 dioxigenase a descrição foi feita por Baggi *et al.* (1987), enquanto que para protococatecol 3,4 dioxigenase a descrição por Fujisawa e Hayaishi (1968) e a metodologia da detecção de monoxigenase foi descrita por Nieboer *et al.* (1999).

O “pellet” do extrato centrifugado a 6000rpm por 15 min. a 10°C foi lavado duas vezes com tampão fosfato 50mM pH 7,0 e centrifugado novamente nas condições acima. O “pellet” foi ressuspendido em 10mL do mesmo tampão e sonicado na frequência de por 2 vezes de 40 segundos com intervalo de 1 minuto entre cada sonicação. Foi novamente centrifugado e após retirado 1 mL e 0,1mL respectivamente, para análise das enzimas Catecol 1,2, Protocatecol, Catecol 2,3 e Monoxigenase. A atividade enzimática específica dos isolados testados foi obtida através da divisão dos valores da atividade enzimática relativa em relação aos valores de proteínas totais.

6.7 Análise dos microrganismos pré-selecionados

Após a etapa de pré-seleção dos isolados, os microrganismos foram avaliados quanto ao crescimento em meio mineral com 1% de biodiesel e caracterizados bioquimicamente quanto ao gênero. Durante o

crescimento foi monitorado a produção de biomassa, a presença de metabólitos pelas medidas de pH, tensão superficial e índice de emulsificação, detecção de lipases e esterases e avaliação da degradação de ésteres por cromatografia.

6.7.1 Curvas de crescimento

Fungos: A padronização do inóculo foi realizada a partir de culturas com 7 dias, cultivadas em ágar malte (Anexo 7) em tubo inclinado, mediante a adição de água destilada estéril e 2mL de surfactante, o Tween 80, preparado na concentração de 0,01%. A finalidade para o seu uso teve como objetivo facilitar a dispersão dos esporos, uma vez que apresentam propriedades adstringentes. O inóculo padronizado foi adicionado a cada frasco de cultivo, de modo a se obter uma concentração inicial de 10^4 esporos mL^{-1} , em frascos com meio mineral e 1% de biodiesel previamente esterilizado. Os frascos controle não receberam inóculo. O experimento foi incubado em estufa a 28°C. Foram feitos frascos com 3 repetições para cada tempo estipulado da curva de crescimento. Desta forma, as amostras destrutivas foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias. Utilizou-se 1mL da suspensão em cada frasco do cultivo do experimento, em que, por contagem em câmara de Neubauer, obteve-se uma concentração final com 10^4 esporos mL^{-1} .

A biomassa fúngica foi quantificada através da técnica do peso seco em triplicata. Após cada tempo amostral foi realizada a separação das fases aquosa e oleosa de cada frasco, sendo que a biomassa formada foi

filtrada em discos de papel filtro, previamente pesados. Para a remoção do excesso de óleo, utilizou-se 4mL de hexano sobre cada disco. Os discos foram colocados em estufa a 70°C, durante 4 dias, para remoção da umidade e transferidos da estufa diretamente para um dessecador com sílica gel, de onde foram retirados, somente para a pesagem.

A técnica de quantificação por peso seco exige alguns cuidados que são brevemente apresentados. É importante a observação dos passos utilizados na obtenção do valor final da biomassa quantificada, pois alguns fatores podem interferir, tais como:

* incorporação de frações de biodiesel à “biomassa quantificada” decorrente da composição do combustível, podendo ficar retida e causar desvios na determinação, uma vez que não são volatilizadas a 70°C (temperatura de secagem que foram colocados os filtros com a biomassa). Por esta razão, após a filtragem, a biomassa foi lavada com 15 mL de hexano.

* dificuldade de homogeneização decorrente da existência, nas diversas etapas de cultivo de fração de hidrocarbonetos não degradada, degradada parcialmente (formação de emulsão na interface) e da presença de longas hifas na fase oleosa e de conidiosporos na fase aquosa.

O cálculo utilizado para estimar o crescimento fúngico pelo peso seco em função do tempo é apresentado a seguir:

$$\text{Peso final do papel filtro} - \text{Peso inicial do papel filtro} = \text{Variação de massa (g)}$$

Os valores de biomassa foram utilizados para a confecção de um gráfico em função do tempo.

Bactérias:

Em meio mineral M1 com 1% de biodiesel previamente preparado (Anexo 1) adicionou-se o inóculo, que estava crescendo em Caldo Nutriente a 37°C durante 24h, ajustando-se a Densidade Ótica de 595nm, ao valor de 0,07. Incubou-se a 30°C e 180rpm. O crescimento das bactérias selecionadas no meio mineral com 1% de biodiesel (B100) foi expresso em UFC/mL. A análise foi realizada através da contagem em placas com meio de cultura Ágar Nutriente, conforme os tempos estabelecidos (0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias).

6.7.2 Análise de pH, Tensão superficial, índice de emulsificação (IE24), lipase e esterase

A fase aquosa proveniente do ensaio de crescimento dos fungos e das bactérias foi analisada em cada tempo amostral. Foram realizadas medidas de pH, tensão superficial, índice de emulsificação e de lipase conforme descrito no item 6.6. A atividade da enzima esterase foi realizada segundo metodologia descrita por Casaburi *et al.*, 2006. A fase aquosa dos frascos de cultivo, foram centrifugados a 6000rpm por 15 min. a 10°C e retirado o “pellet” do tubo falcon. Este foi ressuspendido em 50mL de tampão fosfato 50mM e centrifugado novamente nas mesmas condições descritas acima. Logo após as células foram sonicadas, no equipamento Sonics &

Materials INc Vibra cell, USA, para rompimento celular em dois ciclos de 40 segundos com o intervalo de 1 minuto entre cada sonicação e novamente centrifugadas. Após este processo utilizou-se 0,4mL deste extrato e 2,6mL de uma solução, conforme anexo 12. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectrumlab, 22PC, Brasil) em comprimento de onda de 415nm nos tempos 0 e 15 min. (acondicionada em estufa a 25°C). Como branco (para zerar o equipamento) foram utilizados 2,6mL de solução e 0,4mL de tampão fosfato 0,1mM. A atividade enzimática da esterase foi definida como a quantidade de enzima liberada por 1µmol/min de p-nitrofenol (U). Os valores obtidos foram calculados com base na fórmula descrita abaixo:

$$E = \frac{A}{C \cdot L}$$

$$A = \frac{\Delta A \cdot V}{\Delta t \cdot E \cdot V}$$

Onde:

E = coeficiente de extinção molar

A = absorvância à 415nm
(tempo 0min)

C = concentração do substrato (mM)

L = caminho percorrido pela luz (cm)

ΔA = variação da absorvância

V = volume total da reação (mL)

6.7.3 Avaliação Cromatográfica

A fase oleosa de cada frasco de cultivo proveniente dos

experimentos das curvas de crescimento de fungos (após 25 dias) e de bactérias (após 14 dias) foi transferida para um funil de separação, previamente desinfetado, separando a fase aquosa da fase oleosa. A fase oleosa foi transferida com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocada em eppendorfs de 1mL e encaminhadas para a análise cromatográfica. Para a avaliação da degradação do biodiesel foi realizada a quantificação de ésteres totais nas amostras utilizando uma comparação com o cromatograma do método EN14103 para ésteres totais, identificando cada pico em seu tempo de retenção. Utilizou-se um Cromatógrafo de fase gasosa GC-2010AF com a coluna DB Waxer e o padrão interno utilizado foi miristato de etila 10mg/ml. Os resultados foram obtidos pela média aritmética de três injeções efetuadas para cada amostra, com seu respectivo desvio padrão calculado. O método de normalização interno foi empregado para quantificação e consiste na análise preliminar de uma amostra padrão contendo todos os compostos de interesse.

6.7.4 Identificação dos isolados

Para a identificação dos três isolados bacterianos, quanto ao gênero, foram realizados os testes bioquímicos a partir de culturas de 12h de crescimento em ágar nutriente. Para esta caracterização baseou-se nas referências bibliográficas descritas por Mc-Fadin (1993) e Vermelho (2007). Os testes realizados foram: catalase, motilidade, indol, citrato, produção de gás sulfídrico, TSI (triple sugar iron), glicose, uréia, oxidase, nitrito/nitrato, formação de esporos, crescimento em Agar Mac-Conkey e Ágar fenilalanina,

VM (Vermelho de metila) e VP (Voges Proskauer).

6.7.5 Análise estatística

Foi realizada a análise estatística com os seguintes dados: degradação em área nas cromatografias, capacidade de emulsificação e valores das medidas de tensão superficial resultantes do crescimento de isolados no meio de cultura testado. O teste utilizado foi a comparação entre as médias pelo teste t de Tukey, com nível de confiança de 95%, utilizando-se o programa Statistica 7.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Isolamento de microrganismos

Após o processo de três transferências em meio mineral MM1 com adição de 1% de diesel e biodiesel, utilizando os indicadores redox TTC e DCPIP, foram selecionados oito isolados bacterianos. Após a caracterização celular das bactérias, com base nas diferenças morfológicas, as colônias foram purificadas e identificadas como bastonetes Gram - negativos. A manutenção destas colônias ocorreu com a inoculação por esgotamento em Agar Diesel e Agar Biodiesel a cada 30 dias.

7.2 Pré-seleção de bactérias e fungos biodegradadores de hidrocarbonetos utilizando dois Indicadores redox TTC e DCPIP

Na tabela 1 podemos verificar os resultados obtidos para os oito isolados bacterianos e na tabela 2 para os isolados fúngicos. Está representado a frequência de cada um dos isolados quando comparado os dois indicadores bem como a interpretação dos resultados (redução) dos indicadores redox.

Tabela 1 - Pré-seleção de bactérias biodegradadoras de hidrocarbonetos utilizando os indicadores redox TTC e DCPIP.

Indicador	TTC		DCPIP	
	T 24	T 144	T 24	T 144
A	-	++++	-	++
B	++	+++	-	+++
C	+	++	-	-
D	+	++	-	-
E	+	++	-	+++
F	+	+++	++	+++
G	++	++	-	-
H	+	++	-	-
Controle	-	-	-	-

Controle: isolado com indicador (sem biodiesel); T = Tempo de avaliação em horas.

Escala de avaliação: - sem mudança de cor; +, ++ e +++ com mudança de cor (conforme intensidade).

Tabela 2 - Pré-seleção de fungos biodegradadores de hidrocarbonetos utilizando os indicadores redox TTC e DCPIP.

Indicador	TTC				DCPIP			
	T 4	T 7	T 11	T 15	T 4	T 7	T 11	T 15
A	+	+	+	+	-	+	+	+
B	+	+	+	+	-	-	+	+
C	+	+	+	+	-	+	+	+
D	-	-	+	+	-	-	-	+
E	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-

Controle: isolado com indicador (sem biodiesel); T = Tempo de avaliação em horas. Escala de avaliação: - sem mudança de cor; +, ++ e +++ com mudança de cor (conforme intensidade).

De acordo com os resultados obtidos podemos verificar que ambos indicadores apontaram alguns isolados com capacidade para utilizar o biodiesel como fonte de carbono. Para o TTC, destacamos que todos os isolados foram capazes de causar a redução do indicador redox com destaque para o isolado B, que apresentou resultados positivos em apenas 18 horas. No DCPIP, apenas os isolados A, B, D e F apresentaram resultados positivos, com destaque para os isolados E e F, que foram capazes de reduzir o indicador a partir de 48 e 24 horas, respectivamente. Deste modo, ambos indicadores demonstraram resultados distintos na seleção. Em um estudo semelhante realizado por Miranda *et al.* (2005) foi constatado que apenas 5% das bactérias analisadas retiradas de condições semelhantes às do presente estudo, foram capazes de reduzir o indicador DCPIP em até 48 horas quando utilizou-se óleo diesel e gasolina como única fonte de carbono. Vieira *et al.* (2006) em estudo realizado com 15 bactérias degradadoras de óleo diesel verificou que 93,33% (14) apresentaram resultado positivo para a degradação de biodiesel, observado através da descoloração do DCPIP. Segundo o autor, esta técnica se mostrou fácil e rápida na verificação do potencial degradativo das espécies testadas, frente ao biodiesel (Vieira *et al.*, 2006).

7.2.1 Avaliação do crescimento

Na figura 7 podemos observar o crescimento bacteriano, em meio mineral M1 com 1% de biodiesel, dos oito isolados. Nos frascos que continham meio mineral M1 com 1% de óleo diesel puro (B0), observou-se

que os isolados E e F, no 7º dia de cultivo, demonstraram crescimento aproximado de 100mg/ml, já a partir do 14º dia do experimento estes valores decaíram para ambos isolados (10mg/ml). Os isolados D e G no primeiro dia do experimento apresentaram apenas 10mg/ml de produção de proteínas totais, mas este valor aumentou no 7º dia de cultivo atingindo um valor de 170mg/ml e 300mg/ml, respectivamente. Em relação às análises do 14º dia, verificamos que estes mesmos isolados diminuíram sua produção de proteínas, sendo que a amostra D apresentou o valor de 60mg/ml e o isolado G apresentou valores de 10mg/ml. Os isolados A, B e C permaneceram com a concentração estável de 10mg/ml de proteínas totais durante os 14 dias do experimento.

Com relação as análises realizadas em B20 (20% de biodiesel no diesel) podemos observar que os isolados A, B e C comportaram-se de forma semelhante, ou seja, durante o período do experimento os valores se mantiveram-se em 10mg/ml. Os isolados D e G no primeiro dia de cultivo apresentaram 10mg/ml de proteínas totais, no sétimo dia de cultivo este valor elevou-se para 190 e 370mg/ml, respectivamente. No décimo quarto dia os valores reduziram para 10 e 30mg/ml respectivamente para estes isolados. Os isolados E e F apresentaram crescimento no sétimo dia de cultivo com valores de 60 e 160mg/ml, respectivamente. No tempo 14 dias, o valor se manteve estável, porém para o isolado F reduziu para 10mg/ml.

Os resultados obtidos para as análises em biodiesel (B100), demonstraram que os isolados A e B mantiveram seus valores estáveis em

10mg/ml durante todo o período de análise. O isolado C nos tempos 7 e 14 apresentou seu valor constante de 60mg/ml, nos demais tempos do experimento seu valor se manteve abaixo de 10mg/ml. Os isolados E e F apresentaram valores crescentes até o término do experimento, onde no tempo 1 apresentaram valores inferiores a 10mg/ml e, no final do experimento, aos 14 dias os valores foram de 100 e 420mg/ml, respectivamente. Para os isolados D,G e H houve um crescimento até o sétimo dia de cultivo (260, 820 e 710mg/ml, respectivamente) e no 14º dia, os valores reduziram acentuadamente.

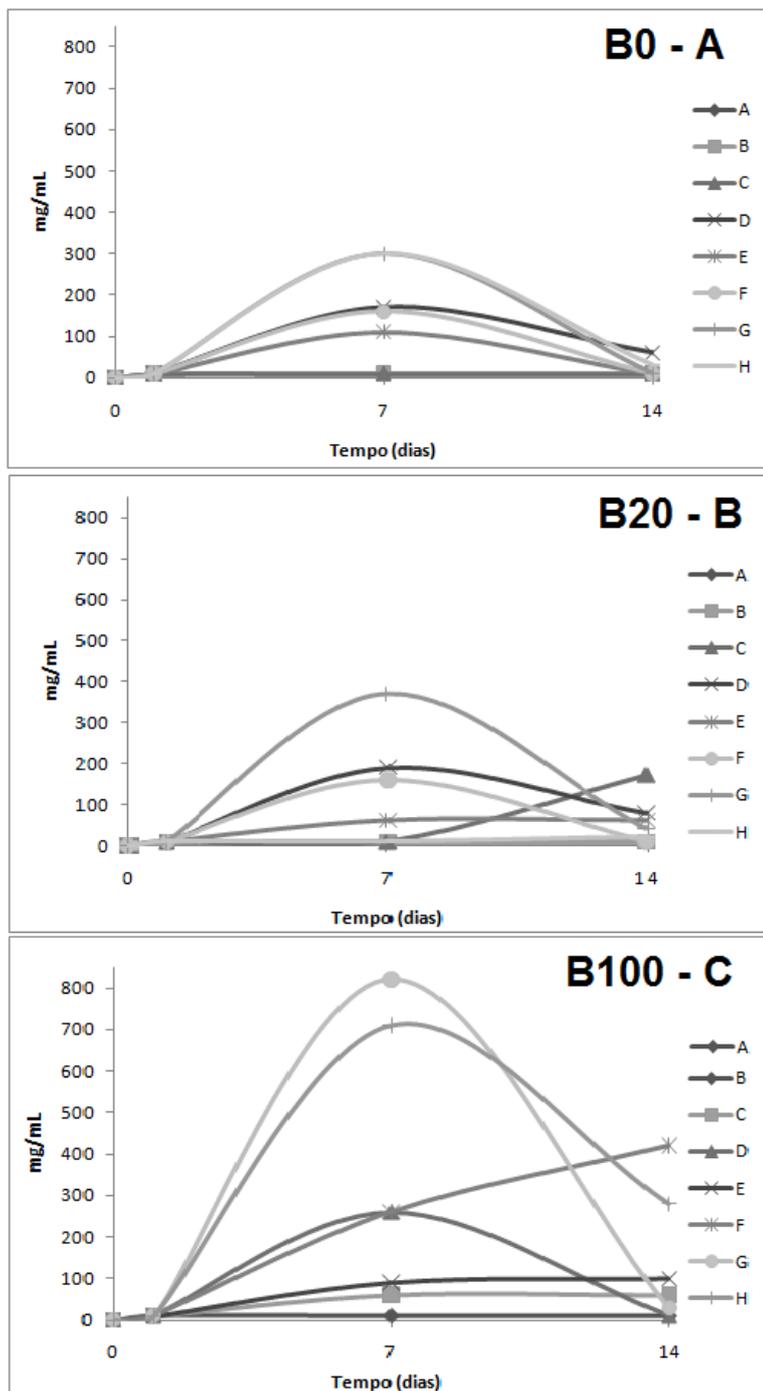


Figura 7 – Avaliação do crescimento dos oito isolados bacterianos pelo método de Bradford, crescendo a 180rpm e 30°C em meio mineral M1 com 1% de combustível, avaliado pelo período de 14 dias. (A) Valores encontrados para B0 (diesel puro). (B) Valores encontrados para B20 (20% de biodiesel em diesel). (C) Valores encontrados para B100 (biodiesel puro).

7.2.2 Biossurfactante

Os dados de índice de emulsificação, medida de tensão superficial, pH e conteúdo de proteínas totais para os oito isolados são apresentados na Tabela 3. Das amostras analisadas, 4 isolados apresentaram emulsificação entre 27,5 e 47,5% em B20 e em B100 entre 25 e 35% (tanto na presença quanto na ausência de células).

Os fungos *Candida silvícola* e *Rhodotorula* sp. foram avaliados por Bucker (2009) com crescimento em meio mineral nos tratamentos B0, B5, B10, B20 e B100 e não foi observado a formação de emulsão. Em contraposição aos resultados do presente estudo, Silva (2004) observou que a taxa no índice de emulsificação em gasolina no 15º dia do experimento demonstrou valores próximos a 95%, utilizando bactérias isoladas de ambiente marinho impactado por petróleo.

A medida de tensão superficial foi utilizada como um dos principais parâmetros de seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes. A propriedade de todo o surfactante é sua capacidade em reduzir a tensão superficial de um meio líquido (Zhang & Miller, 1995). Um surfatante efetivo produzido por microrganismos (biossurfactante), pode reduzir a tensão superficial da água destilada de 73mN/m para 30mN/m ou menos. Por esta razão, esta técnica tem sido muito utilizada em estudos que envolvem a detecção de biossurfactantes (Lee *et al.*, 2007; Bento *et al.*, 2008; Jacques *et al.*, 2008).

A medida de tensão superficial inicial do meio mineral foi 51mN/m, e as medidas obtidas para os controles no 1º dia alteraram em B0 para 52mN/m. No tempo 7 para B0, B20 e B100 os valores foram 53mN/m, 51mN/m e 52mN/m respectivamente. E finalmente em 14 dias os valores foram de 53 mN/m para B0 e 51,7mN/m para B100, não ocorrendo alteração no valor de B20.

Segundo Willumsem & Karlson (1997) um bom biossurfactante é capaz de reduzir a medida da tensão superficial do meio em 20 unidades, comparado com a água destilada. Neste estudo, foi utilizada uma metodologia adaptada na qual um isolado que reduzisse a medida da tensão para valores inferiores a 40 mN/m, seria considerado um microrganismo bom produtor de biossurfactantes. Este critério também foi utilizado por Haba *et al.* (2000) e Youssef *et al.* (2004). As análises em B0, constataram que apenas o isolado G atingiu o valor de 40,7mN/m no primeiro dia de cultivo, mas posteriormente este valor aumentou para 47,9mN/m ao final do 14º dia. Os demais isolados apresentaram valores entre 43,70 mN/m e 53,45 mN/m. Resultados semelhantes foram encontrados por Jesus (1998), onde nenhuma das bactérias incubadas na presença somente de óleo diesel foram eficientes em produzir compostos que reduzisse a medida de tensão superficial. Já para as amostras analisadas em B20, os isolados C, F, G e H demonstraram esta capacidade a partir do tempo 7 dias, e os isolados G e H obtiveram este resultado após 1 dia de incubação apresentando valores de 29 mN/m e 32 mN/m respectivamente. Os isolados que cresceram em B100

(C, D, E, F, G e H) conseguiram reduzir a tensão superficial a partir do 7^o dia de cultivo apresentando as seguintes medidas respectivamente: 31 mN/m, 32 mN/m, 30 mN/m, 30 mN/m, 30 mN/m e 29 mN/m.

Tabela 3 – Medidas de pH, tensão superficial, índice de emulsificação e proteínas totais (Bradford) dos oito isolados bacterianos em BO, B20 e B100 durante 14 dias de cultivo em MM1 com adição de 1% de combustível.

Isolado	Tempo (dias)	pH			Tensão Superficial			Índice de Emulsificação (IE ₂₄)						Proteínas Totais (Bradford)			
		BO	B20	B100	(mN/m)			com célula (%)			sem célula (%)			BO	B20	B100	
					BO	B20	B100	BO	B20	B100	BO	B20	B100				
A	0	7,20	7,20	7,20	51,10	51,10	51,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	4,62	4,65	4,63	50,40	42,90	38,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	7	4,36	4,10	3,80	43,26	46,75	42,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	14	4,60	4,10	4,28	46,06	39,23	41,06	0,00	2,50	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
B	0	7,20	7,20	7,20	51,10	51,10	51,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	4,62	4,62	4,60	46,65	44,90	40,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	7	4,35	3,91	3,72	47,50	47,90	42,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	14	5,12	4,08	4,54	44,13	44,83	41,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50	<0,01	<0,01	0,01	
C	0	7,20	7,20	7,20	51,10	51,10	51,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	6,96	6,99	6,97	50,76	54,26	43,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	7	6,69	6,58	6,53	51,26	31,88	31,03	0,00	0,00	2,50	0,00	32,50	0,00	<0,01	<0,01	0,06	
	14	7,20	6,90	6,74	43,70	33,85	29,60	0,00	27,50	7,50	0,00	30,00	0,00	<0,01	0,17	0,06	
D	0	7,20	7,20	7,20	51,10	51,10	51,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	6,96	6,97	6,98	57,80	55,60	47,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	7	6,60	6,69	6,56	62,23	49,70	32,16	0,00	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,17	0,19	0,26	
	14	7,00	7,20	6,71	48,50	42,33	29,86	0,00	30,00	30,00	0,00	0,00	25,00	0,06	0,08	<0,01	
E	0	7,20	7,20	7,20	51,10	51,10	51,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	7,04	7,17	6,86	45,03	49,50	42,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	7	6,68	6,61	6,54	55,40	45,20	30,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,06	0,09	
	14	6,88	7,00	6,82	45,56	40,00	30,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	<0,01	0,06	0,10	
F	0	7,20	7,20	7,20	51,10	51,10	51,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	6,79	6,97	6,95	55,20	44,50	40,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	7	6,67	6,75	6,81	49,70	36,03	29,86	0,00	22,50	17,50	0,00	47,50	22,50	0,16	0,16	0,26	
	14	7,30	7,50	6,98	45,33	33,30	29,70	0,00	30,00	35,00	22,50	0,00	35,00	<0,01	<0,01	0,42	
G	0	7,20	7,20	7,20	51,10	51,10	51,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	7,36	7,49	7,64	40,70	28,93	29,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	7	7,50	7,80	7,99	41,50	34,20	29,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,37	0,82	
	14	7,30	7,94	7,53	47,90	36,55	30,86	0,00	0,00	7,50	0,00	7,50	12,50	<0,01	0,04	0,30	
H	0	7,20	7,20	7,20	51,10	51,10	51,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	7,50	7,48	7,49	52,46	31,76	28,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,01	<0,01	<0,01
	7	7,60	8,34	7,39	42,00	33,86	28,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,01	0,71	
	14	7,50	7,88	7,30	52,45	39,33	30,20	0,00	2,50	12,50	0,00	5,00	7,50	0,03	0,02	0,28	
Controle	0	7,2	7,2	7,2	51,1	51,1	51,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	7,2	7,22	7,1	52,1	51,2	51,2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7	7,1	7,19	7,1	53	51	52	0,00	2,50	2,50	0,00	2,50	2,50	0,00	0,00	0,00	
	14	7	7,2	7,1	53	51,2	51,7	0,00	2,50	2,50	0,00	2,50	2,50	0,00	0,00	0,00	

* Controle: sem adição de inóculo

7.2.3 Detecção de ramnolipídios

Os isolados A e G após 72h de incubação apresentaram resultado positivo para a detecção de ramnolipídios indicando que estes isolados provavelmente produziram surfactantes do tipo aniônicos, sugerindo que possam ser ramnolipídeos. Isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de solo contaminado com biodiesel, apresentaram resultados positivo para a produção de ramnolipídeos quando inoculados no mesmo meio de cultura que foi proposto por Pinzon & Ju, 2009.

Whang *et al.*, 2008, demonstrou que o uso de ramnolipídios provindos de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram eficazes na biodegradação de diesel, pois foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio e aumentar a biomassa. Por fim, o uso deste biosurfactante potencializou a atividade dos microrganismos na biorremediação de solos contaminados com diesel (Whang, 2008).

7.2.4 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica é observada em microrganismos capazes de se desenvolver utilizando como fonte de ferro proteínas ligadas ao ferro. Desta forma, a hemoglobina torna-se importante fonte de ferro para estes microrganismos (Bueno, 2008). Para Plaza *et al.* (2006) a atividade hemolítica tem sido utilizada como um teste preliminar para a seleção de microrganismos produtores de biosurfactante por ser um teste simples e de baixo custo. Portanto, sugere-se que este teste seja utilizado juntamente com outros específicos, como a medida da tensão superficial, por exemplo.

No presente estudo realizou-se testes em Placas de Ágar Sangue para verificar a presença de hemólise nos 8 isolados bacterianos selecionados. Constatou-se que somente os isolados E e F apresentaram hemólise.

7.2.5 Hidrofobicidade

As análises de hidrofobicidade celular foram realizadas para monitorar possíveis mudanças na parede celular bacteriana, necessárias para a degradação de substratos. O objetivo deste teste foi avaliar o perfil hidrofóbico e as características ácido-básicas dos isolados bacterianos, a característica hidrofóbica significa que na presença do solvente em questão há maior tendência de ligação entre o microrganismo e o substrato. A Figura 6 indica os resultados do teste de hidrofobicidade da parede celular após 14 dias de inoculação expressos em porcentagem dos oito isolados bacterianos. Podemos observar que os isolados A, B, F, G e H apresentaram uma superfície celular mais hidrofóbica e mais ácida do que os demais, demonstrando afinidade com o solvente polar (clorofórmio). Os outros isolados bacterianos apresentaram uma superfície celular menos hidrofóbica e menos ácida. Destacamos os isolados F e G que atingiram valores de hidrofobicidade próximos a 100% na presença de clorofórmio, um solvente ácido polar. Os isolados A e G quando em contato com o solvente Xilol (apolar) atingiram valores próximos a 100% de hidrofobicidade, estas características hidrofóbicas demonstram que na presença deste solvente há maior tendência de ligação entre o microrganismo e o substrato. Estes

mesmos isolados apresentaram resultado positivo no teste de detecção de ramnolípideos, sugerindo que a modificação na parede celular provocada pelo ramnolípideo é provavelmente a responsável pelo aumento da hidrofobicidade celular (Al-tahhan *et al.*, 2000).

Al-tahhan *et al.* (2000) investigaram a interação entre ramnolípideo, células microbianas e substratos hidrofóbicos, os resultados demonstraram que a presença do biossurfactante aumentou a interação entre célula e o hidrocarboneto, devido à perda da camada lipopolissacarídica, que é o principal constituinte da parede celular de bactérias Gram negativas.

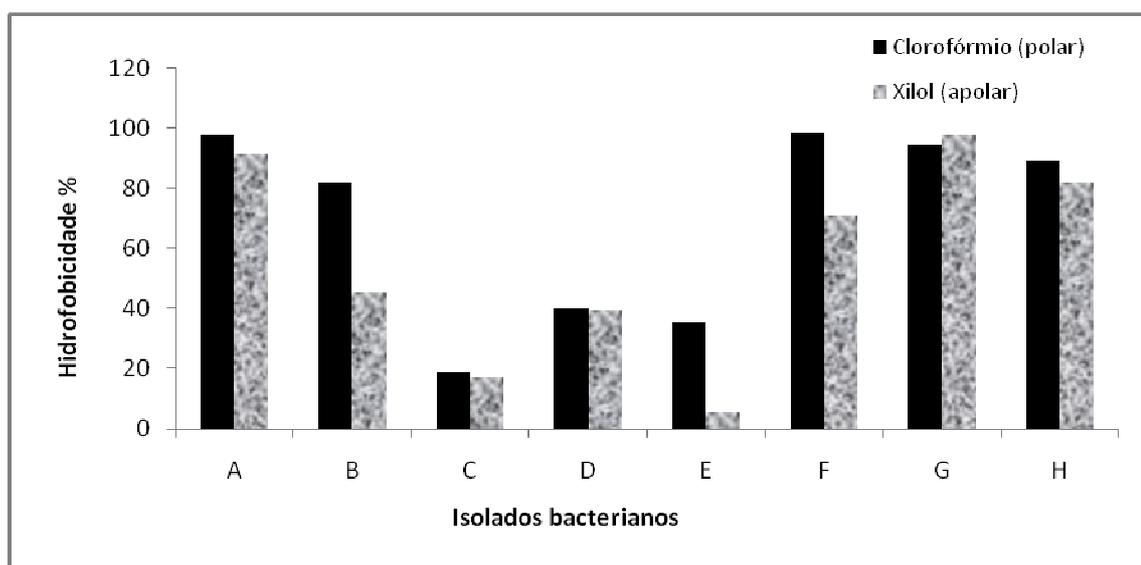


Figura 6 – Porcentagem de hidrofobicidade da parede celular dos oito isolados cultivados em meio mineral M1 com 1% combustível.

7.2.6 Medidas de condutividade

Os valores obtidos de condutividade são referentes ao consumo de sais minerais necessários para o crescimento dos microrganismos. Conforme pode-se observar na Tabela 4 os isolados A e B reduziram os valores de condutividade de $7,4\text{ms/cm}^2$, no tempo 0, para 3,6 e $4,2\text{ms/cm}^2$, respectivamente, no tempo 14 dias para o tratamento B20. Estas duas amostras também apresentaram redução significativa nos tratamentos B0 e B100, com relação ao controle, indicando assim que os nutrientes presentes no meio mineral (com adição de 1% de biodiesel) estavam sendo consumidos. A condutividade foi avaliada também para se ter uma idéia da produção de compostos oriundos da oxidação abiótica do biodiesel, que podem migrar para a fase aquosa.

Segundo Bento (2001), em estudo realizado com microrganismos deteriorogênicos de óleo diesel, cultivados em meio mineral com adição de óleo diesel observou a maior redução da medida de condutividade na fase aquosa ocorreu após 60 dias de incubação.

Tabela 4 – Medidas da condutividade da fase aquosa dos cultivos bacterianos em meio mineral e misturas de diesel/biodiesel.

Condutividade (ms/cm ²)	B0				B20				B100			
	T0	T1	T7	T14	T0	T1	T7	T14	T0	T1	T7	T14
Isolados												
Controle	7,4	7,3	7,3	7,3	7,4	7,3	7,3	7,3	7,4	7,4	7,4	7,4
A	7,4	5,9	5,8	4,8	7,4	5,8	5,8	3,6	7,4	5,5	5,7	4,8
B	7,4	5,6	6,0	5,0	7,4	5,6	5,7	4,2	7,4	5,5	5,7	5,4
C	7,4	7,2	7,6	7,7	7,4	6,8	7,3	7,2	7,4	6,6	7,4	7,1
D	7,4	7,4	7,4	7,6	7,4	7,1	7,3	7,3	7,4	7,1	7,3	7,2
E	7,4	7,2	7,4	7,3	7,4	7,2	7,3	7,2	7,4	7,0	7,1	6,8
F	7,4	7,2	7,5	7,0	7,4	6,8	7,2	7,1	7,4	6,6	7,0	6,7
G	7,4	6,8	7,0	6,9	7,4	7,0	6,8	6,6	7,4	6,7	6,2	6,1
H	7,4	6,7	7,0	6,4	7,4	6,7	6,3	6,7	7,4	5,9	6,0	6,0

* Tempo de avaliação: 0 (T0), 1 (T1), 7 (T7) e 14 dias (T14).

** Controle: meio mineral M1 com 1% de biodiesel.

7.2.7 Medidas de pH

A análise do pH, foi um dos parâmetros utilizados para acompanhar o crescimento dos microrganismos no meio óleo diesel, misturas de diesel e biodiesel e somente biodiesel, e também monitorada nos controles, a fim de se verificar alguma alteração no caráter ácido, básico ou neutro do meio aquoso. Durante a degradação de hidrocarbonetos há formação de ácidos orgânicos, que podem provocar a redução da medida do pH na fase aquosa (Bento & Gaylarde, 2001; Bento *et al.*, 2005). Além destes produtos, a redução do pH pode estar relacionada a lises celulares, produtos poliméricos e ácidos orgânicos. (Bücker, 2009).

Neste estudo foi observado que seis dos oito isolados reduziram

o pH até o tempo 7 dias, com aumento de pH em 14 dias. Dois isolados, A e B, mantiveram a diminuição do pH até 14 dias nos tratamentos B0, B20 e B100, onde o controle manteve os valores de $7,2 \pm 1,0$. Aos 14 dias, apresentaram pH mínimo de 4,1 no tratamento B20, e nos tratamentos B0 e B100 o pH aproximou-se de 5,1.

Bücker (2009) não observou alterações significativas entre as medidas de pH, durante o crescimento de microrganismos, em experimentos com uma fase aquosa de mesma composição da utilizada neste estudo e misturas de diesel e biodiesel (B5, B10 e B20), ou biodiesel puro (B100).

Foi realizado um experimento para avaliar o efeito de tamponamento do Meio Mineral M1, que também foi conduzido em estudo conduzido por Bento (2001). Este resultado pode ser visualizado no Anexo 7. Para ocorrer uma redução no pH do meio mínimo mineral de 7,22 para 5,26 foi necessário adicionar 4,0 mL de HCl a 0,1N, indicando assim que os isolados A e B que apresentaram valores de pH próximos a 5 na mistura B20 em 14 dias de experimento, podem estar produzindo metabólitos ácidos oriundos da degradação do combustível utilizado. De acordo com a concentração de fosfatos do Meio Mineral M1 que é de $4,45 \text{g.L}^{-1}$ a produção de ácidos pelos demais isolados pode ter sido mascarada pelo tamponamento dos fosfatos presentes no meio Mineral M1. No anexo 9 podemos observar a avaliação do efeito tampão do meio mineral M1.

7.2.8 Detecção de enzimas

7.2.8.1 Atividade Lipolítica

Os resultados da atividade lipolítica dos isolados testados pode ser observado na tabela 5. Para esta enzima foi feita análise somente em B20 e B100, nos tempos 1, 7 e 14 dias, pois a lipase não possui a capacidade de quebra de moléculas formadas por cadeias cíclicas, e o diesel (B0) é composto por diversos anéis benzênicos. O isolado B foi considerado como o maior produtor de lipase em B20 e B100, pois no 14º dia de cultivo atingiu seu índice de produção lipolítica elevada alcançando 93,6 unidades de lipase por hora (U/ml). O isolado F também demonstrou uma satisfatória atividade lipolítica, pois no 7º dia do cultivo em B20 e B100 apresentou 80,4 e 36,0 U/ml respectivamente, enquanto que no 14º dia em ambas concentrações as atividades expressadas foram por volta de 50,0 U/ml.

Tabela 5 - Atividade Lipolítica de oito isolados bacterianos utilizando o método titulométrico utilizando 20% de biodiesel no diesel e somente biodiesel.

Isolados	B20			B100		
	T 1	T 7	T14	T 1	T 7	T14
A	0,00	0,00	89,40	0,00	22,20	89,40
B	0,00	62,40	93,60	0,00	89,40	13,20
C	0,00	36,00	58,20	0,00	9,00	36,00
D	0,00	44,40	44,40	40,2	60,60	0,00
E	0,00	58,20	40,20	0,00	0,00	27,00
F	0,00	80,40	49,20	0,00	36,00	53,40
G	44,40	9,00	31,20	0,00	9,00	53,40
H	4,20	40,20	44,40	0,00	0,00	9,00

Os resultados são apresentados de acordo com a Atividade da lipase, expressa em U/ml(min.). O tempo de avaliação foi realizado em 1,7 e 14dias.

Kouker & Jaeger (1987) em estudo utilizando metodologia baseada na formação de precipitados em Ágar com Rodamina B, demonstraram que espécies de *Pseudomonas aeruginosa* são capazes de produzir lipase isoladamente ou em conjunto com esterases. O monitoramento da atividade lipolítica tem sido utilizado para avaliar a biodegradação de petróleo, por exemplo em solos contaminados. A atividade desta enzima tende a aumentar de acordo com o tempo, ou seja com a redução da concentração residual de hidrocarbonetos (Margesin, 1999). Segundo Khudary e Mroueh (2004) foi constatado uma atividade lipolítica máxima em 60h de incubação do experimento em 142,2U/ml por hora, em

isolados bacterianos, aeróbios e gram positivos, provenientes de solo contaminado com óleo de oliva.

7.2.8.2 Atividade das Monoxigenases e Dioxigenases

Durante o crescimento dos oito isolados bacterianos foi monitorada a atividade das enzimas monoxigenases e dioxigenases, catecol 1,2 dioxigenase (C1,20), catecol 2,3 dioxigenase (C2,30) e protocatecol 3,4 dioxigenase (P3,40), conforme podemos observar na Figura 8 e na Tabela 6. Estas enzimas são responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, sendo a enzima catecol 1,2 dioxigenase e a catecol 3,4 dioxigenase responsáveis pela clivagem dos anéis aromáticos se o intermediário central for o catecol a enzima protocatecol 3,4 dioxigenase cliva o anel aromático quando o intermediário central é o protocatecol (Silva, 2008).

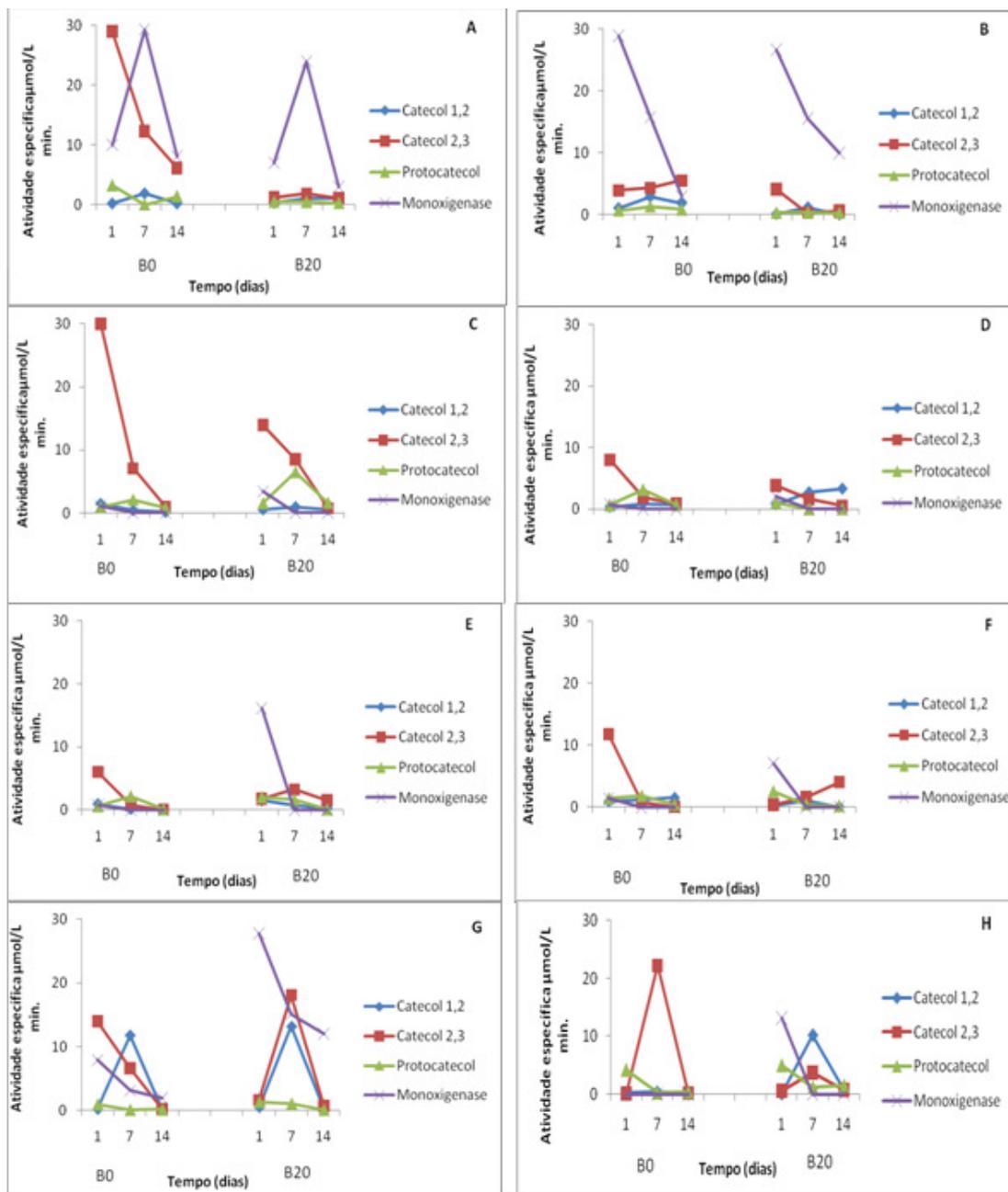


Figura 8 – Atividades das enzimas catecol 1,2, catecol 2,3, protocatecol 3,4 e monoxigenases em isolados bacterianos crescendo a 180rpm e 30°C, em meio mineral MM1 com 1% de combustível (B0 e B20), avaliados durante 14 dias.

Observou-se tendência de maior atividade enzimática para monoxigenase no 1º dia do experimento para os isolados A, B e G, onde este último apresentou atividade enzimática nos três intervalos de tempo testados (1, 7 e 14 dias), atingindo valores de 7,90, 3,11 e 1,93 $\mu\text{mol/L min.}$, respectivamente (B0) e 27,77, 15,15 e 11,99 $\mu\text{mol/L min.}$ (B20). Todos os demais isolados não apresentaram atividade enzimática de monoxigenase no tempo 14 dias, estes resultados podem ser relacionados ao fato de que no tempo 14 dias a curva de crescimento já estava em fase lag. Para os isolados A e B a atividade enzimática detectada nos tempo 1 e 7 dias apresentou valores de 400 e 80 $\mu\text{mol/L min.}$ (B0) e 666 e 120 $\mu\text{mol/L min.}$ (B20), respectivamente. Os isolados C e D apresentaram uma baixa atividade enzimática relativa no 1º dia de ensaio de 1,08 e 0,72 $\mu\text{mol/L min.}$ (B0) e 3,41 e 2,09 $\mu\text{mol/L min.}$ (B20), respectivamente. Para os isolados E e F os valores foram 1,39 e 0,73 $\mu\text{mol/L min.}$ (B0) e 16,12 e 7,09 $\mu\text{mol/L min.}$ (B20) no tempo 1 dia do experimento. Estes isolados no 7º dia não expressaram atividade enzimática. A atividade enzimática do isolado H foi de 13,15 $\mu\text{mol/L min.}$ constatada apenas em B20 e no dia 1 do teste.

Para a avaliação da enzima catecol 1,2 destacamos o isolado G que apresentou uma maior atividade no tempo 7 dias com valores de 11,81 e 13,19 $\mu\text{mol/L min.}$ para B0 e B20 respectivamente. Nos demais tempos este valor se aproximou de 0,5 $\mu\text{mol/L min.}$ O isolado H também no 7 dia do estudo em B20 apresentou 10,21 $\mu\text{mol/L min.}$ e nos outros tempos a máxima atividade foi de 0,75 $\mu\text{mol/L min.}$

Na avaliação da enzima catecol 2,3 para os isolados A e C observou-se uma tendência maior desta atividade enzimática no dia 1 alcançando 32,03 e 60 $\mu\text{mol/L min.}$ para B0 e 1,82 $\mu\text{mol/L min}$ no dia 7 e 13,92 $\mu\text{mol/L min.}$ no dia 1 para B20.

Para a enzima protocatecol os isolados C e H foram os mais expressivos. O isolado C demonstrou maior atividade enzimática no tempo 7 dias do experimento com valores de 6,5 $\mu\text{mol/L min.}$ em B20 e 2,11 $\mu\text{mol/L min.}$ em B0. Para o isolado H os valores foram maiores no dia 1 alcançando 4,94 e 4,15 $\mu\text{mol/L min.}$ em B20 e B0, respectivamente.

De acordo com Silva (2008), a baixa atividade enzimática (catecol 1,2, catecol 2,3 e protocatecol dioxigenase) dos isolados que estavam crescendo em meio mineral M1 pode ser conseqüência da baixa solubilidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos neste meio (HAPs), que interfere diretamente na taxa de crescimento dos microrganismos e assim, reduz a quantidade de enzimas expressas. Portanto, não seria metabolicamente viável para a célula expressar estas enzimas em quantidades elevadas na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos se a absorção celular destes compostos é reduzida. Além disso outro fator que poderia interferir a expressão das dioxigenases estaria relacionado a presença de sais de cálcio presentes na formulação do meio mineral M1(Cai *et al.*, 2007). Silva (2008) determinou a atividade enzimática das dioxigenases de isolados bacterianos em meio mineral M1, e verificou que somente foi detectada atividade a partir

do 5º dia incubação, resultados estes que concordam com o presente estudo onde a atividade foi detectada a partir do 7º dia de incubação.

Entre os componentes do óleo diesel pode-se citar a presença de alcanos (hidrocarbonetos cuja ligação ente os átomos de carbono e hidrogênio é feita por ligações simples). Os alcanos podem ser lineares, cíclicos ou ramificados. Por conterem ligações simples os alcanos são relativamente estáveis, difíceis de quebrar e apolares (Van Hame *et al.*, 2003). Alcanos, como o octano e o hexadecano, podem ser utilizados como fonte de carbono e energia por microrganismos, que possuem rotas de degradação para a utilização de tais compostos (Beilen *et al.*, 2003). Os alcanos são compostos quimicamente inertes, e para que sejam metabolizados, é necessário que ocorra a oxidação dos grupos metil terminais, na presença de oxigênio, a um álcool primário; e, esta reação pode ser catalizada por um sistema de enzimas, o como o sistema das alcano hidroxilases. Este grupo de enzimas já foi identificado em diversos grupos microbianos: *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* que apresentam uma monooxigenase ligada a membrana (a alcano hidroxilase) contendo dois átomos de Fe⁺⁺, utilizado como cofator para a atividade oxidativa (Belhaj *et al.*, 2002; Beilen & Funhoff, 2007; Pazmino *et al.*, 2010; Panicker *et al.*, 2010).

Tabela 6 - Atividade enzimática específica dos isolados bacterianos testados.

Isolado	Tempo	Catecol 1,2		Catecol 2,3		Protocatecol		Monoxigenase	
		B0	B20	B0	B20	B0	B20	B0	B20
C	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	14	ND	0,0034	ND	0,0044	ND	0,0096	ND	ND
D	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7	0,0053	0,0143	0,0111	0,0084	0,0185	ND	ND	ND
	14	0,0113	0,0412	0,0140	0,0064	0,0121	0,0005	ND	ND
E	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7	0,0015	0,0118	0,0062	0,0539	0,0197	0,0268	ND	ND
	14	ND	0,0042	ND	0,0250	ND	0,0021	ND	ND
F	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7	0,0058	0,0066	0,0738	0,0097	0,0086	0,0027	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7	0,0394	0,0357	0,0219	0,0489	0,0003	0,0028	0,0104	0,0410
	14	ND	0,0062	ND	0,0165	ND	0,0030	ND	0,2998
H	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7	0,0011	1,0210	0,0740	0,3678	0,0006	0,1151	0,0000	0,0000
	14	0,0006	0,0376	0,0049	0,0367	0,0108	0,0737	0,0000	0,0000

Unidade enzimática: $\mu\text{mol/L min.}$

Tempo: dias

ND: não detectável

Obs.: os isolados A e B não apresentaram atividade enzimática em nenhum dos tempos testados.

7.3 Análise de microrganismos pré-selecionados

Após os testes realizados na etapa de pré-seleção, foram selecionados 3 isolados bacterianos (C, E e F) e 2 isolados fúngicos (F e H), com base nos resultados de crescimento em biodiesel puro (B100).

Desta forma, foi conduzido experimentos envolvendo o

monitoramento de curvas de crescimento, e análises da produção de compostos biossurfactantes (índice de emulsificação e tensão superficial), medidas de pH; atividade lipolítica, produção de esterase. A avaliação cromatográfica da fase oleosa foi realizada com o objetivo de identificar as frações de ésteres de ácidos graxos consumidas pelos microrganismos após o tempo final definido para cada curva.

7.3.1 Identificação bioquímica dos isolados

Na Tabela 7 podemos observar os resultados encontrados para os testes bioquímicos referente aos três isolados bacterianos. Através dos resultados obtidos, foi possível identificar o isolado C como *Bacillus* sp., o isolado E como *Sphingomonas* sp. e o isolado F como *Pseudomonas* sp.

Tabela 7 – Resultados das provas bioquímicas realizadas para a identificação dos três isolados bacterianos.

Testes Bioquímicos	C	E	F
Motilidade	-	-	+
Catalase	+	+	+
Indol	-	-	-
Produção de gás sulfídrico	-	-	+
Citrato	+	+	+
TSI	+	-	+
Fermentador Glicose	-	-	-
Uréia	-	-	-
Vermelho de Metila	+	-	-
Voges Proskauer	-	-	-
Oxidase	+	+	+
Nitrato/Nitrito	-	-	+
Esporos	+	-	-
Fenilalanina	-	-	-
Mc Conkey	-	+	+

* Os resultados foram apresentados em positivo (+) e negativo (-).

(C) *Bacillus* sp.

(E) *Sphingomonas* sp.

(F) *Pseudomonas* sp.

7.3.2 Curvas de crescimento

Os resultados do crescimento, dos microrganismos selecionados, no meio mineral M1 com a presença de 1% de biodiesel foram expressos em: peso seco para os fungos filamentosos, e, para bactérias, por contagem do número de células (UFC), durante os tempos pré-determinados.

A coloração da fase aquosa dos meios cultivados com bactérias apresentou alteração conforme o aumento do tempo de imersão do biodiesel com os microrganismos, em contraste com o ensaio controle (sem presença

de inóculo), adquirindo coloração esbranquiçada. Para os fungos, a fase aquosa apresentou-se turva e amarelada.

Conforme podemos observar na Figura 9, os três isolados bacterianos demonstraram o pico de crescimento entre os tempo 0 e 1 dia, posteriormente houve estabilização deste crescimento. Para o *Bacillus* sp., o decréscimo do crescimento a partir do 5º dia de incubação mostrou valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), fato que não foi observado nos demais isolados. No 1º dia de incubação, quando comparado os resultados dos crescimentos entre os diferentes isolados, todos diferiram estatisticamente entre si. Para os tempos 3, 7, 10 e 14 dias, a maior população foi alcançada pelo isolado *Bacillus* sp., e estes valores diferiram significativamente de *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas* sp. ($p < 0,05$).

Para os isolados fúngicos (Figura 10) a fase lag ou fase de adaptação foi observada até o 10º dia de cultivo. Esta fase inicial poderia estar relacionada com a mudança de condições de cultivo dos esporos fúngicos, uma vez que o inóculo foi preparado a partir de culturas inoculadas em Ágar malte (meio rico), o que poderia induzir a uma fase de adaptação do metabolismo às novas condições de nutrientes e fonte de carbono (biodiesel com única fonte de carbono e energia). A fase log foi observada, para ambos os inóculos, com a formação de biomassa próxima à 1700mg aos 30 dias de incubação. Tanto para a amostra F quanto para a amostra H, o crescimento máximo se deu no tempo 30 dias apresentando resultados significativos quando comparados aos demais tempos ($p < 0,05$). Quando

comparado o crescimento das duas amostras, a amostra F apresentou maior crescimento em relação à amostra H no tempo 30 dias, sendo este valor significativo ($p < 0,05$), para os demais tempos não houve diferenças significativas entre os isolados.

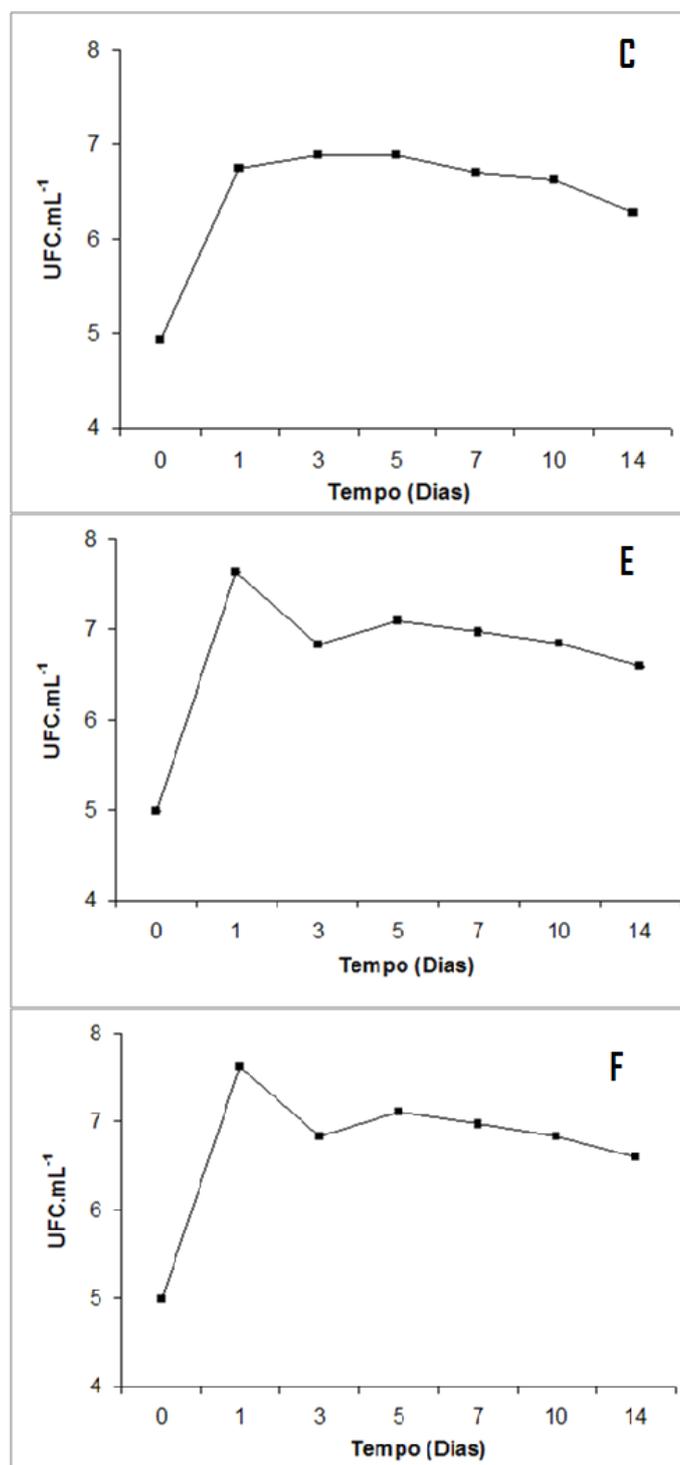


Figura 9 – Curva de crescimento dos três isolados bacterianos em meio mineral M1 com biodisel. (C) *Bacillus* sp. (E) *Sphingomonas* sp.. (F) *Pseudomonas* sp.

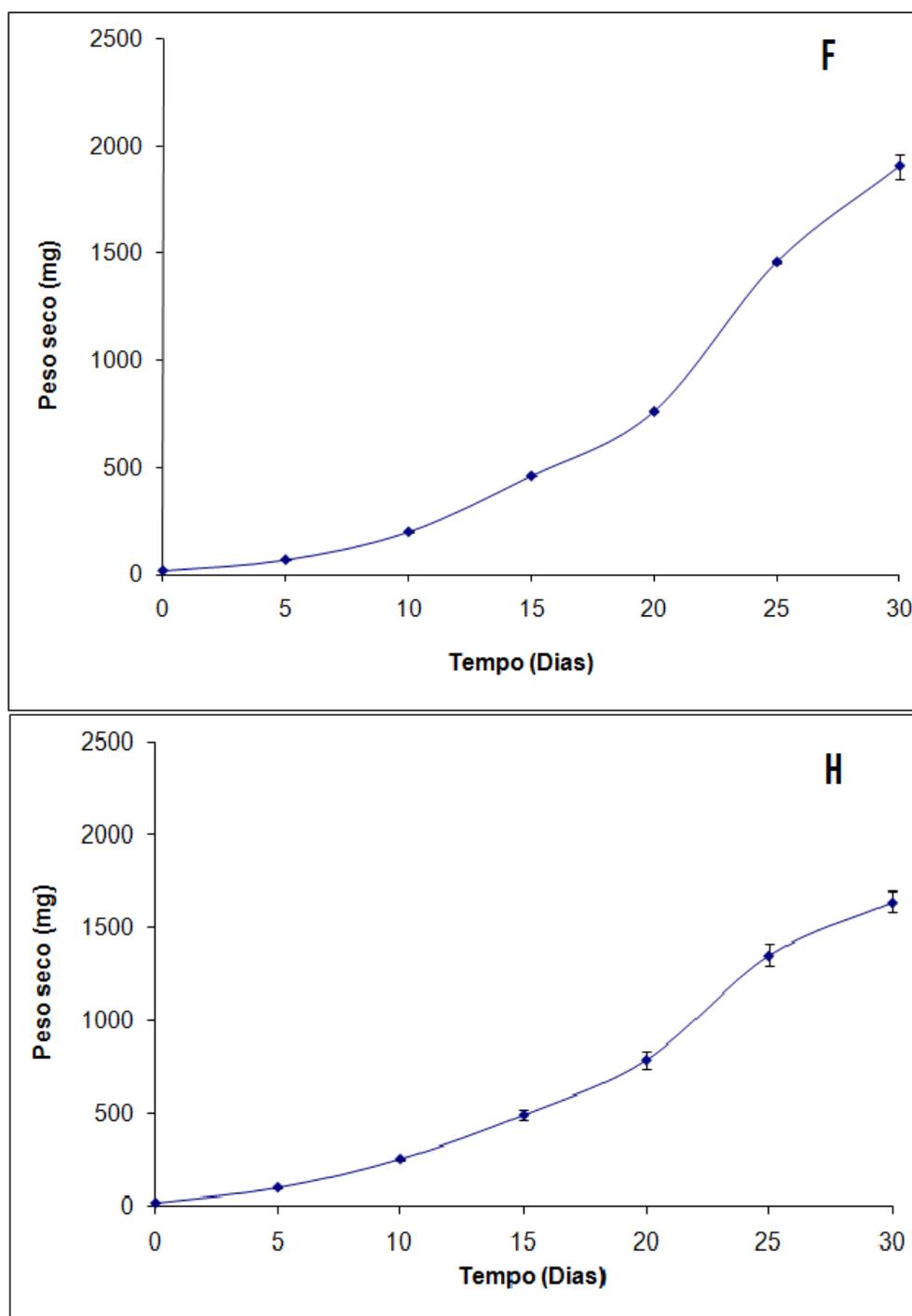


Figura 10 – Curva de crescimento dos dois isolados fúngicos em meio mineral M1 com biodisel, durante 30 dias à 28°C.

7.3.3 Análises de pH, tensão superficial, índice de emulsificação (IE24), lipase e esterase

7.3.3.1 Medidas de pH

Na tabela 10 podemos observar as medidas encontradas para os isolados, realizadas com a fase aquosa. A variação de pH de grande parte das amostras bacterianas, quando comparadas com o controle, apresentaram redução significativa em seus valores, o mesmo pode ser observado com relação aos isolados fúngicos,. Resultados semelhantes foram observados por Bento *et al*, 2005, em estudo realizado com isolados de *Hormoconis resinae* e *Candida silvícola*, cultivados em meio mineral com óleo diesel como fonte de carbono.

7.3.3.2 Atividade lipolítica

Em relação a atividade lipolítica, realizada com a fase aquosa dos cultivos, os isolados bacterianos C, E e F apresentaram os maiores valores de produção enzimática no 1º dia de cultivo, atingindo valores, respectivamente, de 2,13 U/mL (min), 1,77 U/mL (min) e 1,58U/mL (min), estes resultados concordaram com o observado na curva de crescimento, onde o pico também foi observado no 1º dia. Posteriormente, as amostras C e E apresentaram redução nos seus valores e no tempo 14 dias apresentaram-se novamente elevados. Para a amostra F a redução ocorreu até o último dia de cultivo. Para os isolados fúngicos F e H, os valores de lipase apresentaram seu pico no tempo 15 dias de incubação, conforme podemos observar na tabela 9. Margesin *et al*. (1999) verificou a atividade

da lipase durante a descontaminação de um solo contaminado com óleo diesel, seus resultados demonstraram que a atividade desta continuou crescente até o último dia do experimento (120 dias), constatando, também, ligação inversamente proporcional com a concentração de hidrocarbonetos no solo.

7.3.3.3 Atividade da enzima esterase

A partir da fase aquosa dos cultivos, verificou-se a atividade da enzima esterase. Em relação ao isolado E, foi o que apresentou maiores valores de detecção (2,80 U/mL/min) no tempo 14 dias. O isolado C nos tempos 7 e 10 dias manteve o valor de 0,26 U/mL/min e em 14 dias esta produção decaiu para 0. Em relação ao isolado F seu pico de produção de esterase foi no terceiro dia de cultivo (0,37 U/mL/min), que conseqüentemente foi decrescendo até 0,02 U/mL/min no tempo 14 dias. Em relação aos isolados fúngicos, o F iniciou a detecção da esterase no quinto dia do tratamento com 0,47 U/mL/min, decaiu até o vigésimo dia do experimento voltando a aumentar a partir do vigésimo quinto dia, alcançando o maior valor no trigésimo dia de 1,2 U/mL/min. O isolado H apresentou maior valor para produção de esterase no vigésimo dia do experimento (0,8 U/mL/min).

7.3.3.4 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação, realizado com a fase aquosa do cultivo, conforme podemos observar na tabela 8, apresentou valores maiores a partir do 7º dia de cultivo, para as análises com célula e sem célula, em

relação aos isolados bacterianos C e F. Já para os isolados fúngicos não foi detectado índice de emulsificação em nenhum dos tempos avaliados. Estes resultados concordam com Bucker (2009), onde análises realizadas com *Candida silvícola* e *Rhodotorula* sp., crescendo em meio mineral com diesel e misturas de biodiesel, não apresentaram formação de emulsão em nenhum dos tratamentos verificados.

7.3.3.5 Medidas de tensão superficial

Com relação à tensão superficial, medida realizada somente com a fase aquosa dos isolados, quando analisados os isolados bacterianos pode-se observar redução significativa ($p < 0,05$) deste parâmetro quando comparado os valores encontrados no 1º dia e no 14º dia. A redução mais acentuada ocorreu com o isolado F que alterou o valor de 49,6 para $30,0 \text{mN.m}^{-1}$, indicando que estes microrganismos podem ser potenciais produtores de biossurfactantes. No tempo 3 dias, o isolado F apresentou redução significativa quando comparada aos demais isolados ($p < 0,05$), para o tempo 5 dias este mesmo isolado apresentou diferença estatística somente quando comparado à amostra E, fato que se repete no tempo 10 dias. Já com os isolados fúngicos não houve grandes alterações neste parâmetro, a pequena redução observada provavelmente deve-se à presença do biodiesel que por si só já reduz a tensão superficial. A amostra F apresentou redução significativa nos valores de tensão superficial do tempo 15 dias frente aos tempos 0 e 5 dias, já a amostra H apresentou diferença significativa na redução no tempo 25 dias quando comparada a

estes mesmos tempos ($p < 0,05$). Estes resultados concordam com Bucker (2009), que analisou a medida de tensão superficial do meio mineral com biodiesel utilizando *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces* sp. e verificou que ambos os isolados não apresentaram redução da tensão superficial quando comparado ao controle.

Tabela 8 – Resultados das análises de índice de emulsificação, produção de lipase e esterase dos três isolados bacterianos selecionados previamente.

ISOLADO	DIA	IE (24%)		LIPASE*	ESTERASE**
		C/Célula	S/Célula		
C	1	0,00	0,00	2,13	0,14
	3	0,00	0,00	0,62	0,07
	5	0,00	0,00	0,14	0,03
	7	53,33	59,62	0,42	0,26
	10	62,76	66,20	0,47	0,26
	14	55,76	63,02	1,12	0,00
E	1	ND	ND	1,77	0,17
	3	ND	ND	0,73	0,10
	5	ND	ND	1,04	0,06
	7	ND	ND	0,48	2,60
	10	ND	ND	0,76	1,11
	14	ND	ND	1,08	2,80
F	1	ND	ND	1,58	0,21
	3	25,00	20,83	1,53	0,37
	5	26,92	46,15	1,83	0,20
	7	58,33	71,16	0,88	0,11
	10	63,63	58,46	0,78	0,03
	14	59,97	54,54	0,32	0,02

* Atividade Lipolítica foi definida pela quantidade de enzima liberada de $1\mu\text{mol/min}$ de ácido graxo (U).

** Atividade da esterase foi definida pela quantidade de enzima liberada de $1\mu\text{mol/min}$ de p-nitrofenol (U).

*** (C) *Bacillus* sp. (E) *Sphingomonas* sp. (F) *Pseudomonas* sp.

Tabela 9 – Resultados obtidos das análises para os isolados fúngicos durante 30 dias de cultivo em meio mineral com biodisel.

ISOLADOS	DIA	pH	TENSÃO*	LIPASE**	ESTERASE***
Controle		7,22	46,20		
F	0	7,18	46,10	0,00	0,00
	5	6,76	44,30	0,21	0,47
	10	6,67	43,20	0,27	0,18
	15	6,62	41,20	0,45	0,25
	20	6,64	44,10	0,23	0,25
	25	6,49	41,80	0,28	1,11
	30	6,73	43,60	0,30	1,21
H	0	7,20	45,90	0,00	0,00
	5	6,73	44,30	0,22	0,57
	10	6,68	44,03	0,16	0,24
	15	6,60	42,30	0,73	0,43
	20	6,53	40,90	0,19	0,80
	25	6,46	40,80	0,10	0,18
	30	6,66	42,26	0,12	0,13

* Unidade: mN/m.

** Atividade Lipolítica foi definida pela quantidade de enzima liberada de 1 μ mol/min de ácido graxo (U).

*** Atividade da esterase foi definida pela quantidade de enzima liberada de 1 μ mol/min de p-nitrofenol (U).

Tabela 10 – Resultados obtidos da medida de pH e tensão superficial, em B100, dos três isolados bacterianos cultivados em meio mineral.

ISOLADO	DIA	pH		TENSÃO SUPERFICIAL*	
		Amostra	Controle	Amostra	Controle
C	0	7,24	7,12	46,30	45,50
	1	6,52	6,83	46,00	44,00
	3	6,30	6,80	44,20	42,00
	5	6,62	6,79	30,26	43,00
	7	6,93	6,81	30,26	41,00
	10	7,00	6,82	30,26	42,00
	14	6,45	6,80	30,00	43,00
	E	0	7,06	7,10	48,10
1		6,45	6,83	46,45	46,00
3		6,50	6,80	54,10	52,00
5		6,40	6,79	49,50	50,20
7		6,40	6,81	48,00	49,10
10		6,60	6,82	48,00	49,70
14		6,43	6,80	41,00	42,30
F		0	7,20	7,18	46,10
	1	6,35	6,83	49,60	45,30
	3	6,42	6,80	31,00	42,80
	5	6,85	6,79	29,80	43,70
	7	6,75	6,81	30,00	40,20
	10	6,73	6,82	29,50	41,50
	14	6,23	6,80	30,00	42,00

* Unidade: mN/m.

** Tratamento controle: não houve adição de inóculo.

*** (C) *Bacillus* sp. (E) *Sphingomonas* sp. (F) *Pseudomonas* sp.

7.3.4 Degradação dos ésteres totais no biodiesel

A avaliação da degradação do biodiesel (B100) foi realizada através da análise cromatográfica dos ésteres. As amostras utilizadas eram

provenientes do cultivo durante 30 dias, para os fungos, e 14 dias, para as bactérias. Esta análise, realizada com a fase oleosa dos cultivos, indica a presença de hidrocarbonetos com cadeias carbônicas entre 11 e 25 carbonos, porém, no presente estudo, identificou-se somente os picos de C_{16} , C_{18} , $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, e $C_{18:3}$ (Anexo 13).

Na tabela 11 são apresentados os resultados com os isolados fúngicos em percentagem de degradação de cada pico. Os cromatogramas demonstrando a degradação do biodiesel podem ser visualizados no Anexo 13. Observou-se que o isolado H apresentou percentuais de degradação superiores aos do isolado F em todos os ésteres analisados, sendo que para o isolado F os percentuais variaram entre 0 e 12,5% e para o isolado H entre 14,2 e 35,1% de degradação. O isolado F apresentou percentual de degradação do éster Linolenato de metila nulo, e o éster com maior degradação (12,5%) foi o oleato de metila. Já para o isolado H foi observada maior degradação para o éster linolenato de metila (35,1%) e menor para estearato de metila (14,2%).

As análises cromatográficas da fase oleosa extraída dos ensaios com as bactérias *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. e *Sphingomonas* sp. estão apresentadas na Tabela 12, e os cromatogramas destas análises podem ser visualizados no Anexo 15. Analisando os resultados obtidos podemos observar que o perfil de degradação de ésteres das bactérias *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. mostrou-se muito maior que o da bactéria *Sphingomonas* sp. para todos os ésteres analisados. Para a bactéria *Pseudomonas* sp. os

valores variam entre 91,31% (linolenato de metila) e 99,96% (palmitato de metila). Os resultados variaram entre 99,47% (estearato de metila) e 99,88% (linolenato de metila) para a bactéria *Bacillus* sp. Já para *Sphingomonas* sp. o perfil de degradação dos ésteres foi mais baixo, variando entre 0,83% (linoleato de metila) e 5,33% (palmitato de metila).

Ao se comparar o percentual de degradação dos ésteres de ácidos graxos com as curvas de crescimentos das três bactérias estudadas (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. e *Sphingomonas* sp.) verifica-se que a bactéria *Sphingomonas* sp. apresentou crescimento similar a *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. ao longo dos 14 dias de avaliação, no entanto a taxa de degradação dos ésteres foi significativamente inferior a taxa apresentada por *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. O baixo percentual de degradação de ésteres por *Sphingomonas* sp., quando comparada a de *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp., porém com formação de biomassa similar, pode ser explicado pela presença de outros compostos, além dos ésteres de ácidos graxos, que estão presentes no biodiesel, e que podem ser utilizados como fonte de carbono pelos microrganismos. Entre tais compostos, pode-se citar a presença de impurezas como álcool residual, glicerol e ácidos graxos livres (monoglicerídeos e diglicerídeos, por exemplo). Os ácidos graxos livres e o álcool residual são remanescentes do processo de produção (transesterificação) do biodiesel, em que não houve total conversão do óleo vegetal a metil ou etil ésteres de ácidos graxos (o biodiesel), e que o metanol ou etanol usado nesta etapa, não foi completamente consumido na reação.

A presença do glicerol está relacionada ao processo de purificação, em que não se consegue remover 100% do glicerol resultante da transesterificação (Macedo & Macedo, 2004; Marchetti *et al.*, 2007; Murugesan *et al.*, 2009 (a, b); Sharma *et al.*, 2008; López *et al.*, 2009; Rashid, *et al.*, 2009; Singh&Sinhg, 2010). Esta explanação pode ser aplicada ao fungos avaliados, que apresentaram uma grande formação de biomassa, mas baixas taxas de degradação.

Em estudo realizado por Bucker *et al.* (2009) também se observou maiores valores de biomassa formada resultado do crescimento dos dois fungos filamentosos (*Paecilomyces* sp. e *Aspergillus fumigatus*) foram as formulações que continham o maior teor de biodiesel, ou seja, B20 e B100, indicando que pode existir uma relação entre o teor de biodiesel e a produção de biomassa. No estudo de Bucker *et al.* (2009), como observado no presente trabalho, os fungos filamentosos apresentaram baixas taxas de degradação dos ésteres de ácidos graxos pelos, mesmo com formação de biomassa.

Em estudo sobre o comportamento de degradação em ambiente aquático Zhang *et al.* (1998) verificaram uma alta biodegradabilidade de biodiesel, as análises de degradação apontaram um percentual de degradação de ésteres acima de 90%, em 28 dias de avaliação, os microorganismos eram provenientes de uma solução de águas residuais (esgoto) e matéria orgânica de solo. Uma alta taxa de degradação de

ésteres de ácidos graxos também foi observada por Pasqualino *et al.* (2006). Estes autores observaram um percentual de 98% de degradação do biodiesel utilizando um inóculo proveniente de lodo ativado, de uma estação de tratamento de esgoto, em um período de avaliação de 4 semanas. Estas altas taxas de degradação do biodiesel podem estar relacionadas a constituição química do biodiesel, que apresenta basicamente ésteres de ácidos graxos. Estes podem ser incorporados ao metabolismo microbiano como fonte de carbono, na presença de enzimas como lípase e esterase, as quais foram detectadas durante o período de avaliação. Uma vez que a rota para a biodegradação do biodiesel consiste primeiramente da hidrólise do metil ou etil éster por uma esterase (ou lipase), produzindo um ácido graxo e um álcool; na segunda etapa os ácidos graxos são oxidados via β -oxidação e degradados a ácido acético e a um ácido graxo com dois carbonos a menos (Zhang *et al.*, 1998; Viera *et al.*, 2006).

Tabela 11 - Perfil dos ésteres totais da degradação do biodiesel proveniente de um ensaio de 30 dias em meio mineral M1 na presença de fungos.

Ésteres	Hidrocarbonetos	Degradação (%)	
		F	H
Palmitato de metila	C ₁₆	3,39	20,06
Estearato de metila	C ₁₈	6,88	14,18
Oleato de metila	C _{18:1}	12,48	17,00
Linoleato de metila	C _{18:2}	10,64	14,94
Linolenato de metila	C _{18:3}	0	35,13

Tabela 12 - Perfil dos ésteres totais da degradação do biodiesel proveniente de um ensaio de 14 dias em meio mineral M1 na presença de bactérias.

Ésteres	Hidrocarbonetos	Degradação (%)		
		<i>Bacillus sp.</i>	<i>Sphingomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
Palmitato de metila	C ₁₆	99,82	5,33	99,96
Estearato de metila	C ₁₈	99,47	2,86	99,82
Oleato de metila	C _{18:1}	99,59	2,57	99,95
Linoleato de metila	C _{18:2}	99,81	0,83	98,75
Linolenato de metila	C _{18:3}	99,88	3,01	91,31

8 Conclusões

Foi possível isolar, selecionar e caracterizar 8 isolados fúngicos e 8 isolados bacterianos quanto ao crescimento em Meio Mineral com diesel (B0), 20% de biodiesel no diesel (B20) e somente biodiesel (B100) com amostras de solo proveniente de área impactada com hidrocarbonetos e da borra biológica de uma centrífuga de biodiesel. Após seleção as bactérias foram caracterizados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas* sp.

durante o a produção de biomassa (UFC e peso seco), produção de enzimas monoxigenases, catecol 1,2 e 2,3 dioxigenase, protocatecol, lipase, esterase, biossurfactantes, medidas de pH, condutividade e degradação de ésteres totais por cromatografia.

Quanto ao crescimento dos microrganismos em meio mineral e 1% de biodiesel, foi monitorado a produção de biomassa tanto de fungos como para as bactérias, observando-se maior crescimento dos microrganismos em biodiesel (B100).

O crescimento em B100 foi maior quando comparado aos tratamentos de diesel puro (B0) e mistura de diesel e biodiesel (B20).

As enzimas dioxigenases e lipase foram detectadas somente a partir do 7^o dia de incubação, e apresentaram, em geral, valores maiores nos

testes utilizando mistura de diesel e biodiesel. A enzima monoxigenase não apresentou atividade para os microrganismos selecionados.

O gênero *Sphingomonas* sp. e os isolados fúngicos apresentaram baixo percentual de degradação de ésteres, baixa redução na tensão superficial e pH e não apresentaram índice de emulsificação.

Os gêneros *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. apresentaram valores de degradação de ésteres próximos a 100% enquanto que o fungo H foi observada maior degradação para o éster linolenato de metila (35,1%) e para estearato de metila (14,2%).

9 Agradecimentos

Os autores agradecem a Ipiranga Distribuidora de Petróleo, que gentilmente forneceu as amostras de combustíveis utilizadas neste estudo. A COPESUL que permitiu a coleta de solo para as análises, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS e a Rede Brasileira de Armazenamento de Biodiesel – FINEP pela estrutura e incentivo fornecidos para a realização deste estudo.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMOU, F.; PAQUOT, M.; JACQUES, P.; THORNART, P.; RHOUXET, P.G.; Influence of electrical properties on the evolution of the surface hydrofobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods*, 45: 119-126, 2001.

ALL-TAHHAN,R.A; SANDRIN,T.R.; BODOUR, A.A.; MAIER,R.M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:3262-3268, 2000.

ALTIPARMAK, D.; KESKIN, A.; KOCA, A.; GÜRÜ, M. Alternative fuel properties of tall oil fatty acid methyl ester–diesel fuel blends. **Bioresource Technology**, v.98, n.2, p.241-246,2007.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology - Fundamentals and Applications**. 3. ed.Redwood: Benjamin Cummings, 1992. 563p.

BAGGI, G. *et al.*; Isolation of *Pseudomonas struzeri* strain that derades o-xylene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n.10, p.2129-2132, 1987.

BALLAMINUT,N. & MTHEUS,R.D. Caracterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, V.38, p.248-252,

2007.

BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G.; Biodegradação de compostos aromáticos. In. Mello, I.S.; Azevedo, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.262-280. 2008.

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

BELHAJ, A.; DESNOUES,N.; ELMERICH,C. Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a polluted zone: identification of *alkB* and *alkB*-related genes. **Research in Microbiology**, v.153, p. 339 – 344, 2002.

BENTO,D.M. **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. Rio Grande: FURG, 2005, 112p. (Tese de Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande, 2005.

BENTO, F, M. **Biocorrosão do aço ASTM A283-93 em sistemas diesel água e o efeito de um biocida**. Porto Alegre: UFRGS, 2001, 192p. (Tese de Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BENTO, F.M.; ENGLERT,G.E.; GAYLARDE,C.C.; MULLER, I.L. 1999
Microrganismos e o Armazenamento de Óleo Diesel **Revista Petro &
Química**, N° 211, p.70-77.

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

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

BENTO,F. M.; CAMARGO,F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER,W.T.
Comparative Bioremediation of soil by Natural Atenuation, Bioestimulation and
Bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v.96, p:1049-1055, 2005.

BENTO, F.M.; VISCARDI, S. L.C DARODA, R3.; MENENDEZ, A.G; GAYLARDE,C.C.;
CAMARGO, F.A.O. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5 % de Biodiesel à
contaminação microbiana durante a estocagem **.Revista Biodiesel**, N°4; p: 24-26
2006.

BENTO, F.M.; GAYLARDE,C.C.; CAMARGO, F.A.O. Biossurfactantes. **Livro
de Microbiologia Ambiental**, Eds J.I.A Embrapa.

BRADDOCK, J.F.; CATTERALL, P.H. **A Simple Method for Enumerating Gasoline- and Diesel-Degrading Microorganisms**. University of Alaska Fairbanks, 1999.

BUCKER, F. **BIODETERIORAÇÃO DE MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL E SEU CONTROLE COM BIOCIDAS**. Porto Alegre: UFRGS, 2009, 147p. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. São José do Rio Preto: USP, 2008, 99p. (Tese de doutorado) – Programa de pós-graduação Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, letras e Ciências exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2008.

BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, p. 77-84, 2004.

BUSSAMARA, R., FUENTEFRIA, A.M., OLIVEIRA, E.S., BROETTO, L., SIMCIKOVA, M., VALENTE, P., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v.101, p:268 – 275, 2010.

CASABURI, A.; VILLANI, F.; TOLDRÁ, F.; SANZ, Y. Protease and esterase activity of staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 223-229, 2006.

CAVALCANTI, E.H.S. Estabilidade do Biodiesel e misturas – Abrangência, Limitações dos métodos de avaliação e alternativas futuras. *Biodieselbr*, p. 71-73, 2009.

CLEMENTE, T.E.; KINNEY, A.J. Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. **Fuel Processing Technology**, v.86, n.10, p. 1137-1147, 2005.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M.D. Contaminação de Águas Subterrâneas por Derramamentos de Gasolina: O Problema é Grave? **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.2, n.2, p.50-54, 1997.

CORSEUIL, H.X., FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.4, n.1, p.71-75, 1999.

CUNHA, M.E. **Caracterização de biodiesel produzido com misturas binárias de sebo bovino, óleo de frango e óleo de soja**. Porto Alegre: UFRGS, 2008, 86p. (Dissertação de mestrado) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto

Alegre, 2008.

DALLA-VECCHIA, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, Itajaí, Vol. 27, No. 4, 623-630, 2004

DEMELLO, J.A *et al.* Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 54, n. 7, p. 894–904, 2007.

D.E. TORRES PAZMIÑO, M. WINKLER, A. GLIEDER, M.W. FRAAIJE. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. **Journal of Biotechnology**, v.146, p. 9 – 24, 2010.

FUJISAWA,H.; HAYAISHI,O. Protochatechuate 3,4-Dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n.10, p. 2673-2681, 1968.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.M.; KELLEY, J. Microbial Contamination of Stored Hydrocarbon fuels and its control. Mini-review. **Revista de Microbiologia**, 30, p: 1-10, 1999.

GAZIM,Z.C.; REZENDE, C.M.; FRAGA,S.R.; FILHO,B.P.D.; NAKAMURA,C.V.; CORTEZ,D.A.G. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44 (3),p. 391-395, 2008.

GOMES,A.P.N. **BIODEGRADAÇÃO DE BODIESEL SOJA, MAMOMA E HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS**. Florianópolis: UFSC, 2008, 102p. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GUO,C., DANG,Z., WONG,Y., TAM,N.F. Biodegradation ability and dioxygenase genes of PAH-degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.30, p.1 – 8, 2010.

HEGMAN, G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.91, n.3, p.1140-1154, 1966.

IQBAL,S.;KHALID,Z.M.;MALLK,K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p. 176-179, 1995.

Jacques,R.J.S.; Benedict C. Okeke, Bento, F.M.; Teixeira,A.S.; Peralba,M.C.R.; Camargo,F.A.O. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. **Bioresource Technology**, V. 99, n. 7, p. 2637 – 2643, 2008.

JAIN,S.; SHARMA,M.P. Stability of biodiesel and its blends: A review.

Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 667-678, 2010.

JAIN,S.; SHARMA,M.P. Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1937-1947, 2010.

JESUS,H.S. **Isolamento e caracterização de bactérias biodegradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biosurfactant**. Porto Alegre: UFRGS, 1998, 120p. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

JUNIOR,J.S.; MARIANO, A.P.; ANGELIS,D.F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, v.8 (12), p. 2774-2778, 2009.

KALBITZ,K.; SCHWESIG,D.; SCHMERWITZ,J.; KAISER,K.; HAUMAIER,L.; GLASER,B.; ELLERBROCK,R.; LEINWEBER,P. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation, **Soil Biol. Biochem**, 35, 1129-1142, 2003.

KHUDARY,R.;HASHWA,F.;MROUEH,M. A NOVEL OLIVE OIL DEGRADING THERMOACTINOMYCES SPECIES WITH A HIGH EXTREMELY THERMOSTABLE LIPASE **ACTIVITY**. **ENG.LIFE sCI**, V.4 (1), P. 78-2, 2004.

KOUKER. G.;JAEGER,K.E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lípases. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 53, p. 211-213, 1987.

LEE,N.; HWANG,M., 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**, v. 218, p. 17-21, 1996.

LÓPEZ,M.E, GARCÍA,E.F, GOMEZ.C, VAZQUEZ,R.R, CASTANEDA,S.G, CORTES,B.J. Biorremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, V. 61, p. 151-160, 2008.

MACEDO,G.A; MACEDO,J.A. Biodiesel- Produção de biodiesel por transesterificação de óleo vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Edição Nº 32 , pg: 38-46, 2004.

MAC-FADIN. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importância clínica. 2.ed. São Paulo: **Panamericana**, 1993

MAIER,R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances Applied Microbiology** – v.52, Cap.4, p. 101-121, 2003.

MANCERA-LOPEZ,M.E.; ESPARZA-GARCIA,B.; CHAVEZ-GOMEZ,R.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, G.;SAUCEDO-CASTANEDA,J.; BARRERA-

CORTE. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.61, p.151-160, 2008.

MAKI, H.; HIRAYAMA, N.; HIWATARI, T.; KOHATA, K.; UCHIYAMA, H.; WATANABE, M.; YAMASAKI, F.; FURUKI, M.; Crude Oil bioremediation field experiment in the sea of Japan. **Marine Pollution Bulletin**, v.47, p.74-77, 2003.

MARGESIN, R & SCHINNER,R. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulfate. **Chemosphere**, v.38, n.15, p: 3463-3472, 1999.

MARGESIN, R & SCHINNER,R. Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. **Biotechnology Techniques**, v.13, p: 859-863, 1999.

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

MARIANO,P.A.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS,D.F; PIRÔLLO,M.P.S. BIODEGRADABILITY OF COMMERCIAL AND WEATHERED DIESEL OILS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 133-142, 2008.

MIRANDA, R.C. *et al.* Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco –Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v. 50, n. 1, p.147-152, 2007.

MOHANTY,G.; MUKHERJI.S. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.61, p. 240-250, 2008.

MORALES,D. **Biodegradação da fração BTX e etanol da gasolina comercial e da gasolina pura por microrganismos isolados de locais impactados**. Porto Alegre: UFRGS, 2008, 132p. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MOREIRA,F.M.S. & SIQUEIRA,J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. **Editora UFLN**, 2 edição, p. 729, 2006.

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

NASCIMENTO,A.M.S. **Estudo de fatores que afetam o índice de hidrofobicidade de bactérias redutoras de sulfato**. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. Departamento de Química e Bioquímica. Relatório do Projeto de Licenciamento em Química, 2007.

NIEBOER, E.; FLETCHER, G.; THOMASSEN, Y. Relevance of reactivity determinants to exposure assessment and biological monitoring of the elements. **Crit. Rev. J. Environ. Monit.** 1:1-14, 1999.

NWAOGU, L. A.; ONYEZE, G.O.C.; NWABUEZE, R.N. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. **African Journal of Biotechnology** Vol. 7 (12), pp. 1939-1943, 17 June, 2008.

OLSON, J.J.; MILLS, G.L.; HERBERT, B.E.; MORRIS, P.J. Biodegradation rates of separated diesel components. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, n.11, p:2448-2453, 1999.

OSTBERG, T.L, JONSSON, A.P, BYLUND, D, LUNDSTRO, U.S. **The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil**, v.60, p.334-341, 2007.

OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; SCHMIDT-OLEJNIK, A.K.; HEIPIEPER, H.J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, 2008.

PANICKER, G.; MOJIB, N.; AISLABIE, J.; BEJ, K. Detection, expression and quantitation of the biodegradative genes in Antarctic microorganisms using PCR. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.97, n.3, p. 275 – 287, 2010.

PASQUALINO,J.C.; MONTANE,D.; SALVADO,J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, v. 30,p. 874-879, 2006.

PASSMAN, F.; DOBRANIC, J. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: **IASH 2005 9th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, Spain. Setembro,18-22, 2005.

PINZON,N.M.; JU,L.K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 975-981, 2009.

PLAZA,G.A; ZJAWIONY.I; BANAT.I.M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactantproducing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 50,p. 71-77, 2006.

RAMÍREZ,M.E.; ZAPIÉN,B.; ZEGARRA,H.G.;ROJAS,N.G.;FÉRNANDEZ,L.C. Assessment of hydrocarbon biodegradability in clayed and weathered polluted soils. International **Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 347-353, 2009.

RAMOS, *et al.*, Biodiesel. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Edição Nº 31, pg: 38-46, 2003.

REZENDE,M.J.C; PERRUSO,C.R.; AZEVEDO,D.A.; PINTO,A.C.

Characterization of lubricity improver additive in diesel by gás chromatography-mass spectrometry. **Journal Chromatography**. V. 1063, n.1 p.211-215, 2005.

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

ROS. M, I. RODRÍGUEZ, C. GARCÍA, T. HERMÁNDEZ. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. **Bioresource Technology**, V.101, p: 6916 – 6923, 2010.

ROSENBERG, M. Bacterial adgerance to hydrocarbons: a useful technique for studying hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 22, p. 289-95, 1984.

SCHLEICHER,T.; WERKMEISTER,R.; RUSS,W.; PITROFF-MEYER,R. Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures. **Bioresource Technology**, 2008.

SILVA, A.S. **Caracterização de enzimas bacteriana de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. Porto Alegre: UFRGS, 2008, 74p.(dissertação de mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SINGH,R.P.; GUPTA,N.; SINGH,S.; SING,A.; SUMAN,R.; ANNEI,K. Toxicity of ionic and nonionic surfactants to six microbes found in Angra. **Bull Environmente contam. Toxicol.** V. 69, PP.265-270, 2007.

SPINELLI, L.F., SCHNAID, F., SELBACH, P.A., BENTO, P.A., OLIVEIRA, J.A. Enhancing diesel and gasoline bioremediation in soil amended with an agroindustry sludge. **Journal of the Air and Waste Management Association.** V.54. N.9, 2004.

THIELE, S.; BRUMMER, G.W.; Bioformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil under oxygen deficient conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.733-735, 2002.

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

UENO,A. ITO.Y, YUMOTO,I.,OKUYUAMA,H. Isolation and characterization of bacteria from soil cpntaminated with diesel oil and possible use of these in autochthonous bioaugmentation. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.23, p. 1739-1745, 2007.

ULLER,L. A Natureza Corrosiva dos Solos e Avanços na Prevenção da Corrosão de Tanques de Armazenamento Subterrâneos. In: **2ND NACE LATIN AMERICAN REGION CORROSION CONGRSS**, Rio de Janeiro, Plenary Lecture C-2, 1996.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 24, p. 604-620, 2006.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; SÁ, M.H.B. Bacteriologia Geral. **Guanabara**, Rio de Janeiro, p. 582, 2007.

VIEIRA, T. M. *et al.* Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Artigos técnico-científico**. Brasília: Estação Gráfica, v.1. p. 218-223, 2006. Disponível em: <
[http //www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamento.html](http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamento.html)> Acesso em: 20 jul. 2010.

VIEIRA, T. M. *et al.* Utilização de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em Teste Rápido de Caracterização de Potenciais Biodegradadores de Biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Artigo técnico-científico**.... Brasília: Estação Gráfica, v.2. p. 127-158, 2006. Disponível em: <
[http //www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamento.html](http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamento.html)> Acesso em: 20 jul. 2010.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production

by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339 – 347, 2004.

WHANG,L.M; LIU,P.W.G.; CHIH-CHUNG M.; CHENG, S.S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v.151, p. 155-163, 2008.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, 7: 415-423, 1997.

ZAZUETA-SANDOVAL, R.; ZAZUETA NOVOA, V.; JIMÉNEZ, H.S.; ORTIZ, R.C.; A different method of measuring and detecting mono and dioxygenases activities. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Guanajuato, v. 105-108, 2003.

ZHANG,H. *et al.* Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 65, n.1, p. 124-131, 2004.

11 ANEXOS

Anexo 1: Meio Mineral MM1, pH = 7,2 (Richard & Vogel, 1999).

Solução de Macronutrientes			
Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
KCl	0,7		
KH ₂ PO ₄	2,0	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	2,9
Na ₂ HPO ₄	3,0		
NH ₄ NO ₃	1,0		

Solução de Micronutrientes (1mL/L)			
Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
MgSO ₄	4,0	MgSO ₄ .7H ₂ O	8,20
FeSO ₄	0,2	FeSO ₄ .7SO ₄	0,36
MnCl ₂	0,2	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,31
CaCl ₂	0,2	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,26

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 121 °C.

Anexo 2: Meio Ágar Nutriente, pH = 7,0.

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Carne	3,0

Peptona Bacteriológica	5,0
Ágar Bacteriológico	15,0

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 121 °C.

Anexo 3: Caldo Nutriente, pH = 7,0.

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Carne	3,0
Peptona Bacteriológica	5,0

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 120 °C.

Anexo 4: Mineral Mineral MM1 + TTC ou DCPIP, pH = 7,2 (Richard & Vogel, 1999).

Preparar o meio mineral M1, conforme descrito no Anexo 1, adicionando 0,25% de TTC ou DCPIP.

Anexo 5: Meio de cultura Agar Diesel

Solução de Macronutrientes

Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
Ágar	15		

Diesel	10*		
KCl	0,7		
KH ₂ PO ₄	2,0	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	2,9
Na ₂ HPO ₄	3,0		
NH ₄ NO ₃	1,0		

Solução de Micronutrientes (1mL/L)

Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
MgSO ₄	4,0	MgSO ₄ .7H ₂ O	8,20
FeSO ₄	0,2	FeSO ₄ .7SO ₄	0,36
MnCl ₂	0,2	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,31
CaCl ₂	0,2	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,26
Reagentes	g L ⁻¹		
TTC ou DCPIP	0,25		

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 121 °C. Proteger o meio da luz, cobrindo o frasco com papel-alumínio. O Diesel deve ser esterilizado previamente por filtração e adicionado após a autoclavagem quando o meio atingir a temperatura de 50°C. *mL/L.

Anexo 6: Meio de cultura Ágar Biodiesel

Solução de Macronutrientes

Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
Ágar	15		
Biodiesel	10*		
KCl	0,7		
KH ₂ PO ₄	2,0	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	2,9
Na ₂ HPO ₄	3,0		
NH ₄ NO ₃	1,0		

Solução de Micronutrientes (1mL/L)

Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
MgSO ₄	4,0	MgSO ₄ .7H ₂ O	8,20
FeSO ₄	0,2	FeSO ₄ .7SO ₄	0,36
MnCl ₂	0,2	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,31

CaCl ₂	0,2	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,26
Reagentes	g L ⁻¹		
TTC ou DCPIP	0,25		

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 121 °C. Proteger o meio da luz, cobrindo o frasco com papel-alumínio. O Biodiesel deve ser esterilizado previamente por filtração e adicionado após a autoclavagem quando o meio atingir a temperatura de 50°C. *mL/L.

Anexo 7: Agar Malte

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Malte	30,0
Peptona Bacteriológica	5,0
Ágar	15,0

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 120 °C, o pH deve ser ajustado para 5,4.

Anexo 8: Análise Físico- Química do solo

Laudo de Análise de Solo			
Exedição: 31.12.2009			
Argila (%)	20,0	% SAT da CTC - BASES	95,0
pH (H ₂ O)	6,9	% SAT da CTC - Al	0,0
Índice SMP	6,9	Ca/Mg	17,0
P (mg/dm ³)	>100	Ca/K	63,0
K (mg/dm ³)	181,0	Mg/K	3,7
M.O. (%)	8,6	S (mg/dm ³)	22,0
Al _{troc} (cmol _c /dm ³)	0,0	Zn (mg/dm ³)	11,0
Ca _{troc} (cmol _c /dm ³)	29,2	Cu (mg/dm ³)	0,4
Mg _{troc} (cmol _c /dm ³)	1,7	B (mg/dm ³)	0,9

Al+H (cmol _c /dm ³)	1,6	Mn (mg/dm ³)	62,0
CTC (cmol _c /dm ³)	33,0		

Anexo 9: Avaliação do efeito tampão do meio mineral M1 devido a presença de fosfatos na concentração de 4,45 g.L⁻¹, com quantidades crescentes de NaOH 0,1 N e HCl 0,1 N, em 25 mL do meio Mineral M1.

Volume adicionado (mL)	pH final	
	HCl 0,1N	NaOH 0,1N
0,50	7,04	7,27
1,00	6,87	7,34
1,50	6,71	7,41
2,00	6,55	7,48
2,50	6,35	7,55
3,00	6,15	7,66
3,50	6,86	7,77
4,00	5,26	7,91
4,50	3,55	8,06
5,00	3,26	8,22

* O valor inicial do pH do meio mineral (MM1) era de 7,22.

Anexo 10: Emulsão de azeite de oliva

Adicionar 25mL de azeite de oliva extra virgem à 75mL de goma arábica 7%, misturar até completa dissolução e posteriormente

centrifugar durante 5 min. à 500rpm. Para o experimento deverá ser utilizada a fase oleosa (1º fase).

Anexo 11: Ágar Azul de Metileno

Reagentes	g L ⁻¹
Lactose	10,0
Fosfato de potássio	2,0
Azul de metileno	0,005
CTAB	0,2
Peptona Bacteriológica	10,0
Ágar	15,0

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 120 °C.

Anexo 12: Solução com substrato para teste da esterase

Inicialmente prepara-se uma solução de p-nitrofenil-acetato 0,8mM em isopropanol. Adiciona-se esta solução na proporção de 1:10 em tampão fosfato 0,1mM pH 7,0, e a esta solução final acrescenta-se 2% de

Triton X-100. Esta solução deve ser preparada na hora do uso, pois é fotossensível.

Anexo 13: Degradação de ésteres de ácidos graxos

Cálculo para a obtenção da percentagem de degradação do biodiesel(B100), submetido aos ensaios de imersão com os microrganismos testados, com a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa.

Os dados obtidos como tempo de retenção, área de cada pico e percentual da área de cada pico foram calculadas através de um programa específico de um computador (em interface com o cromatógrafo), que utiliza métodos padrões utilizados na cromatografia gasosa para o cálculo das áreas dos picos (integração das áreas).

O percentual de degradação de cada pico C16; C18; C18:1;C18:2; C18:3; para cada microrganismo testado, foi calculado com base nos dados fornecidos pelo programa de computador, em termos de % de área de cada pico apresentado pelo controle. O controle corresponde ao biodiesel (B100) submetido as mesmas condições de incubação que os demais tratamentos,

mas sem contato com microrganismo.

Exemplo: % de degradação do pico C11 aos 60 dias

* % da área do pico do C16 para o controle: 884826,50

* % da área do pico do C16 para o fungo X: 749671,73

Temos: 884826,50---100%

749671,73-----x

$x = 84,72\%$

* Para saber o percentual de degradação do pico Cx:

$100-84,72= 15,27 \%$

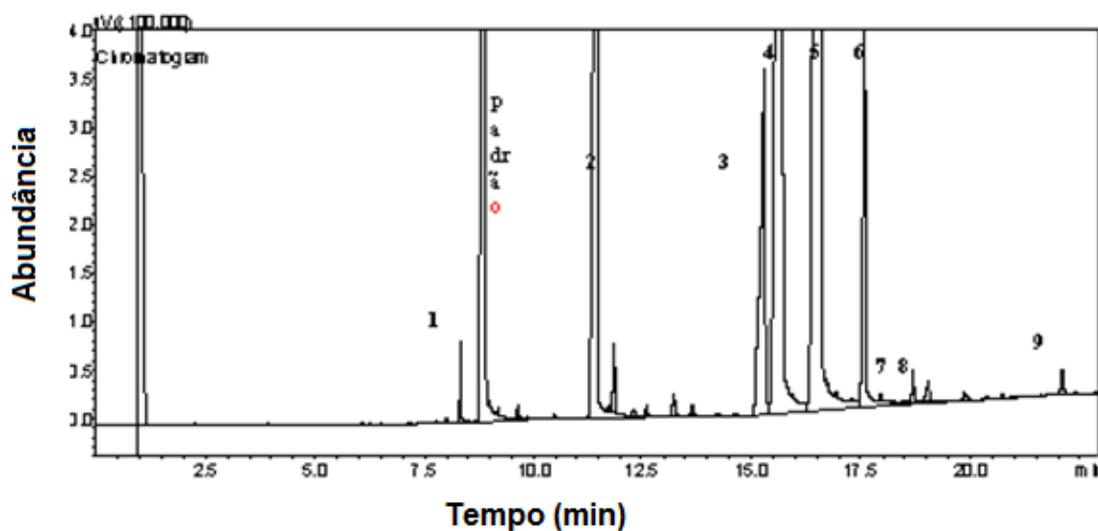
Considerações sobre o Ensaio Controle: A importância de se realizar a análise cromatográfica, com o hidrocarboneto que foi submetido as mesmas condições da incubação com os microrganismos, consiste no fato de que perdas decorrentes de evaporações, de cadeias carbônicas durante o período de incubação ou ainda pela adsorção nas paredes dos frascos. A autoxidação e a fotoxidação pode modificar a natureza do hidrocarboneto, embora a amplitude estimada de perda devido a esses processos varia mais rápido que a biodegradação. Deste modo, poderão ocorrer interpretações falsas a cerca do potencial de degradação das espécies microbianas em avaliação (Bücker, 2009).

14.1 Cromatogramas

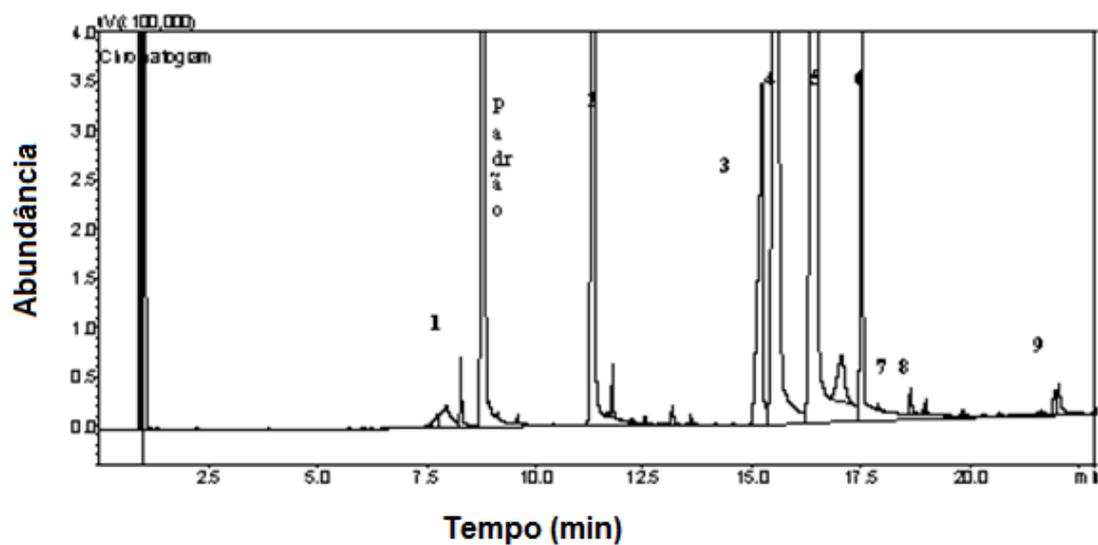
Legenda dos Ésteres analisados:

- 1- Palmitato de metila
- 2- Estearato de metila
- 3- Oleatode metila
- 4- Heptadecanoato de etila
- 5- Linoleato de metila
- 6- Linolenato de metila
- 7- Aracdato de matila Tr 18.545
- 8- Eicosenato de metila Tr 19.106
- 9- Behenato de metila Tr 21.802

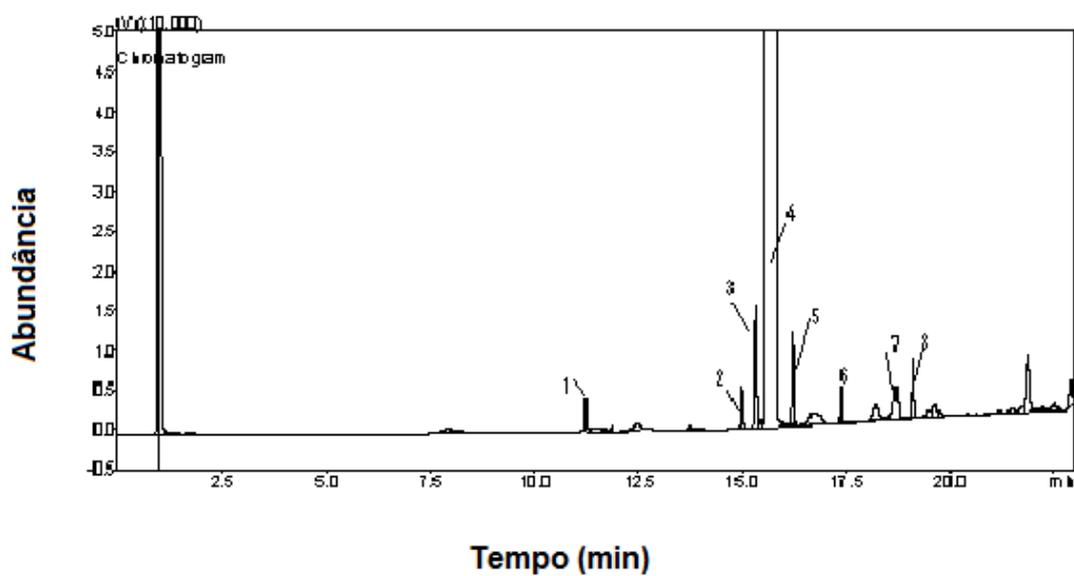
14.1.1 Cromatograma obtido para avaliação da degradação pelo isolado fúngico F



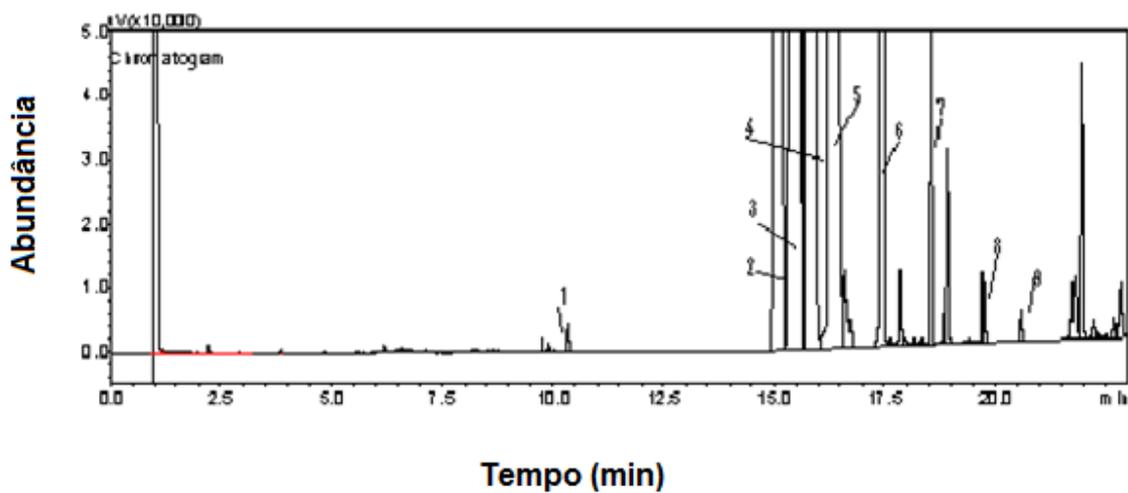
14.1.2 Cromatograma obtido para avaliação da degradação pelo isolado fúngico H



14.1.3 Cromatograma obtido para avaliação da degradação pelo isolado *Bacillus* sp.



14.1.4 Cromatograma obtido para avaliação da degradação pelo isolado *Sphingomonas* sp.



14.1.5 Cromatograma obtido para avaliação da degradação pelo isolado *Pseudomonas* sp.

