

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

**IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE SOLO IMPACTADO
COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS E SELEÇÃO DE POTENCIAIS
DEGRADADORES DE MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL**

MARIANA WANDERLEY DUARTE
Bióloga - UFRGS

Porto Alegre, 2012

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

**IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE SOLO IMPACTADO
COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS E SELEÇÃO DE POTENCIAIS
DEGRADADORES DE MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL**

MARIANA WANDERLEY DUARTE
Bióloga - UFRGS

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

Porto Alegre, RS, Brasil
Abril de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Duarte, Mariana Wanderley

Identificação de actinomicetos isolados de solo impactado com resíduos petroquímicos e seleção de potenciais degradadores de misturas de diesel e biodiesel / Mariana Wanderley Duarte. -- 2012.
109 f.

Orientadora: Sueli T. Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Actinomicetos. 2. Biodegradação. 3. Diesel. 4. Biodiesel. I. Van Der Sand, Sueli T., orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Sueli Van Der Sand, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

À Prof^a. Fátima Menezes Bento, pela disponibilidade e por todo o aprendizado.

Ao Prof. Marco Ferrão, pelas análises realizadas no Centro de Combustíveis e Biocombustíveis (CECOM) do Instituto de Química da UFRGS.

À Francielle Bücker, pela paciência e enorme contribuição ao trabalho.

À Sabrina Salamoni, pelas idéias e sugestões, que foram muito importantes para o andamento deste trabalho.

À Vanessa Cerqueira e ao Gerônimo Prado, pelo fornecimento das amostras de solo contaminado.

À Michele Mann, por me ensinar a trabalhar com biologia molecular.

Às colegas Luisa Mercado, Juciana Cazarolli, Letícia Tramontini e Tiane Moura, pela ajuda quando precisei.

A todas as colegas e amigas dos laboratórios 164, 209 e 167, pelos bons momentos e trocas de conhecimento, em especial à Elisandra Minotto e Karina Heck.

À minha família, em especial aos meus pais, Larri e Sileda, pelo imenso apoio e incentivo, e à minha irmã, Juliana, pela grande amizade.

À Janaína De Nardin e Letícia Longoni, pela amizade.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante estes dois anos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE SOLO IMPACTADO COM RESÍDUOS PETROQUÍMICOS E SELEÇÃO DE POTENCIAIS DEGRADADORES DE MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL¹

Autor: Mariana Wanderley Duarte
Orientador: Sueli T. Van Der Sand

RESUMO

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas predominantemente filamentosas, encontradas principalmente no solo. Existem poucos estudos sobre sua capacidade em degradar combustíveis, embora alguns autores afirmem que são bons candidatos para aplicação na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os principais objetivos do presente trabalho foram a identificação de actinomicetos provenientes de solo impactado com hidrocarbonetos de petróleo e a seleção, dentre isolados de solo com e sem histórico de contaminação, de actinomicetos capazes de degradar misturas de diesel e biodiesel de soja (B0, B10 e B100) e de produzir as enzimas lipase e esterase. Através de análises morfológicas e moleculares, 94,5% dos isolados de *landfarming* foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Três isolados de *Streptomyces* sp. apresentaram o gene *alkB*, mas apenas um deles foi capaz de degradar diesel (B0). Os isolados de solo impactado e não impactado, quando comparados, apresentaram perfis de degradação muito semelhantes, pois todos que foram capazes de degradar combustíveis utilizaram preferencialmente o biodiesel. A seleção de potenciais degradadores foi realizada a partir da utilização do indicador-redox DCPIP, crescimento em meio sólido com óleo como única fonte de carbono e produção das enzimas lipase e esterase. Os dois isolados selecionados foram utilizados no ensaio de biodegradação do biodiesel (B100) em meio líquido. Através da análise das amostras de biodiesel pela espectroscopia de infravermelho no tempo final (28 dias) da curva de crescimento, pôde-se inferir que a formação de um produto de degradação não está necessariamente relacionada à degradação dos ésteres do biodiesel, podendo indicar a degradação de algum subproduto gerado na transesterificação do óleo de soja.

¹ Dissertação 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. (109 p.) Abril, 2012.

IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM SOIL CONTAMINATED WITH PETROCHEMICAL RESIDUES AND SELECTION OF MICROORGANISMS WITH POTENTIAL FOR DEGRADATION OF DIESEL/BIODIESEL BLENDS¹

Author: Mariana Wanderley Duarte
Adviser: Sueli T. Van Der Sand

ABSTRACT

Actinomycetes are Gram positive bacteria, predominantly filamentous, mainly found in soil. Few studies assess their ability for fuel degradation, although some authors state that they are good candidates for hydrocarbon bioremediation application. The main objectives of this study were to identify actinomycetes obtained from petroleum hydrocarbon contaminated soil, and to select actinomycetes that degrade diesel and soybean biodiesel blends (B0, B10 and B100) and produce lipases and esterases, among soil isolates with and without contamination history. Identification through morphological and molecular analysis showed that 94,5% of the *landfarming* isolates belong to the genus *Streptomyces*. Three *Streptomyces* sp. isolates showed the *alkB* gene, although only one of them was capable of degrading diesel (B0). The comparison between isolates from contaminated and not contaminated soil showed they have similar degradation profiles, since all isolates with ability for degrading fuel mainly used biodiesel as carbon source. The selection of microorganisms with potential for degradation was conducted using DCPIP redox indicator, growth in solid medium with oil as the sole carbon source, and production of lipases and esterases. Both selected isolates were used in the biodiesel biodegradation assay (B100) in liquid medium. The analysis of biodiesel samples through infrared spectroscopy in the end time (28 days) of the growth curve showed that the formation of a degradation product is not necessarily related to the degradation of biodiesel ester, but it may indicate the degradation of subproducts generated in the transesterification of soybean oil.

¹ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (109 p.) April, 2012.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Contaminação do solo por combustíveis.....	4
2.2 Óleo diesel e biodiesel.....	6
2.3 Biorremediação.....	7
2.4 Microrganismos: potencial enzimático e produção de biossurfactantes.....	9
2.5 Actinomicetos.....	12
2.5.1 Características gerais.....	12
2.5.2 Identificação.....	14
2.5.3 Presença de actinomicetos em solos impactados e seu potencial de degradação de hidrocarbonetos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Amostras.....	17
3.2 Isolamento de actinomicetos e recuperação de isolados da coleção de culturas.....	18
3.3 Identificação morfológica.....	19
3.4 Identificação molecular.....	20
3.4.1 Extração do DNA cromossomal.....	20
3.4.2 Quantificação do DNA em gel de agarose por comparação de intensidade de banda.....	22
3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	22
3.4.3.1 Oligonucleotídeos iniciadores.....	22
3.4.3.2 Condições de amplificação.....	25
3.4.3.3 Eletroforese em gel de agarose.....	26
3.4.3.4 Purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	27
3.5 Biodegradação de combustíveis e atividade enzimática.....	27
3.5.1 Combustíveis.....	27
3.5.2 Avaliação da capacidade de biodegradação pela utilização de indicadores redox.....	28
3.5.3 Avaliação da degradação em meio sólido através da comparação do crescimento.....	30
3.5.4 Determinação qualitativa da atividade da lipase e da esterase.....	31
3.5.5 Ensaio de biodegradabilidade do biodiesel (B100) em meio líquido.....	32
3.5.5.1 Ensaio preliminar.....	32
3.5.5.2 Curvas de crescimento.....	34
3.5.5.3 Medidas de tensão superficial.....	34
3.5.5.4 Índice de emulsificação (IE_{24}).....	34

3.5.5.5 Medidas de pH.....	35
3.5.5.6 Determinação da degradação do biodiesel (B100) através da análise por espectroscopia de infravermelho.....	35
3.5.5.7 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Isolamento de actinomicetos.....	37
4.2 Identificação dos actinomicetos em nível de gênero.....	40
4.3 Detecção do gene <i>alkB</i>	48
4.3.1 Caracterização molecular dos isolados que apresentaram o gene <i>alkB</i>	50
4.4 Biodegradação de combustíveis e atividade enzimática.....	51
4.4.1 Crescimento em diesel (B0) e relação com a presença do gene <i>alkB</i>	51
4.4.2 Comparação entre isolados de solo impactado e de solo não impactado.....	53
4.4.3 Seleção de potenciais degradadores.....	58
4.4.3.1 Pré-seleção pelo indicador redox DCPIP.....	58
4.4.3.2 Seleção pela avaliação do crescimento em meio sólido e avaliação da atividade enzimática.....	61
4.4.4 Ensaio de biodegradabilidade do biodiesel (B100) em meio líquido.....	62
4.4.4.1 Ensaio preliminar.....	62
4.4.4.2 Curvas de crescimento.....	64
4.4.4.3 Produção de biossurfactantes.....	66
4.4.4.4 Detecção de metabólitos.....	70
4.4.4.5 Determinação da degradação do biodiesel (B100) através da análise por espectroscopia de infravermelho.....	73
4.4.4.6 Caracterização molecular dos isolados selecionados.....	76
5. CONCLUSÕES.....	77
6. PERSPECTIVAS.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8. ANEXOS.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Etapas utilizadas para identificação dos actinomicetos provenientes de solo de <i>landfarming</i> em nível de gênero.....	42
TABELA 2: Isolados em que foi observado crescimento em meio sólido com diesel (B0) e isolados que apresentaram o gene <i>alkB</i> com a utilização dos primers ALK-F/ALK-R.....	51
TABELA 3: Isolados que obtiveram resultado positivo para a redução do DCPIP na presença de biodiesel (B100) em até 72 horas.....	59
TABELA 4: Crescimento em meio sólido com óleo e produção das enzimas lipase e esterase.....	61

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Acidentes envolvendo transporte de combustíveis, no período de março de 1994 a dezembro de 2011 (Fonte: FEPAM, 2012).....5
- FIGURA 2: Distribuição das áreas contaminadas por tipo de atividade no estado de São Paulo (Fonte: CETESB, 2010).....6
- FIGURA 3: Reação de transesterificação de óleos vegetais e/ou gorduras animais. (1) Triacilglicerídeo; (2) álcool (metanol ou etanol); (3) catalisador (ácido, base ou enzima lipolítica); (4) glicerol; (5) ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (biodiesel) (Fonte: Ramos et al., 2003; Macedo & Macedo, 2004).....7
- FIGURA 4: Rotas da degradação de alcanos por oxidação terminal, subterminal e biterminal (modificado de Fritsche & Hofrichter, 2000).....10
- FIGURA 5: Degradação do éster do ácido linoléico por hidrólise enzimática (modificado de Cooper, 2000).....11
- FIGURA 6: Filamentos de actinomicetos do gênero *Streptomyces*: colônias crescidas em meio sólido e microscopia eletrônica de varredura do micélio sobre o substrato (1) e micélio aéreo (2). Fonte: Willey et al. (2006).....13
- FIGURA 7: Células de *landfarming* do SICECORS (1) após recente aplicação de borra oleosa; (2) após duas semanas de realização do revolvimento do solo (Fonte: Vanessa S. Cerqueira, 2008). (3) Biopilha da empresa Ipiranga (Fonte: Mariana W. Duarte, 2011).....18
- FIGURA 8: Desenho esquemático da região 16S do DNAr de *Streptomyces* sp. As regiões variáveis V1-V8, os sítios de anelamento dos *primers* StrepB, StrepE e StrepF e os tamanhos dos fragmentos estão indicados acima (Fonte: Rintala et al., 2001).....23
- FIGURA 9: Demonstração da mudança de coloração dos indicadores redox DCPIP e TTC. (1) DCPIP: controle negativo (sem óleo); (2) DCPIP: redução devido à oxidação da fonte de carbono; (3) TTC: controle negativo (sem óleo); (4) TTC: redução devido à oxidação da fonte de carbono.....29
- FIGURA 10: Demonstração da comparação do crescimento de isolados de actinomicetos em meio sólido. (1) Controle negativo (sem óleo); (2) biodiesel (B100); (3) ACA.....31
- FIGURA 11: Demonstração da avaliação qualitativa da atividade enzimática pela hidrólise em placa. (1) Halos de hidrólise do biodiesel (B100) sob luz ultravioleta de 350 nm; (2) Halos de hidrólise do Tween 80.....32

FIGURA 12: Demonstração do crescimento de um isolado de actinomiceto em diferentes percentuais de biodiesel (B100), após 28 dias. (1) 1%; (2) 2%; (3) 5%; (4) 10%.....	33
FIGURA 13: Semeadura das diluições seriadas da amostra de solo de <i>landfarming</i> em diferentes meios de cultura. (1) Meio ACA, diluição 10^{-2} ; (2) meio ACA, diluição 10^{-3} ; (3) meio ACA com Anfotericina B, diluição 10^{-2} ; (4) meio ACA com Anfotericina B, diluição 10^{-3} ; (5) meio ACA com Anfotericina B, diluição 10^{-4} ; (6) ágar nutriente, diluição 10^{-3}	39
FIGURA 14: Demonstração de estruturas reprodutivas típicas de um isolado de <i>Streptomyces</i> sp., visualizadas em microscópio óptico (aumento de 400X).....	41
FIGURA 15: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela utilização dos <i>primers</i> F243 e R513. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; (2) branco (sem amostra); canaletas 3 a 6: isolados que apresentaram produto de amplificação (fragmento de 302 pb).....	44
FIGURA 16: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela utilização dos <i>primers</i> StrepB e StrepE. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; canaletas 2 a 5: isolados que apresentaram produto de amplificação (fragmento de 519 pb).....	45
FIGURA 17: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela utilização dos <i>primers</i> StrepB e StrepF. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; canaletas 2 a 5: isolados que apresentaram produto de amplificação (fragmento de 1074 pb).....	46
FIGURA 18: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; canaletas 2 a 6: produtos de amplificação pela utilização dos <i>primers</i> F243 e R513; (7) branco (sem amostra); canaletas 8, 9, 10 e 12: produtos de amplificação pela utilização dos <i>primers</i> StrepB/StrepE; (13) branco (sem amostra); canaletas 14 e 18: produtos de amplificação pela utilização dos <i>primers</i> StrepB/StrepF; (19) branco (sem amostra). Canaletas 3, 9 e 15: isolado L1.11; canaletas 4, 10 e 16: isolado L2.4; canaletas 5, 11 e 17: isolado L3.2.....	47
FIGURA 19: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela utilização dos <i>primers</i> ALK-F e ALK-R. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; (2) Controle positivo (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>); (3) isolado L2.8; (4) isolado L3.4; (5) isolado L1.17.....	49
FIGURA 20: Percentual de actinomicetos capazes de oxidar o biodiesel (B100) em MM1 com indicador redox DCPIP em até cinco dias.....	54
FIGURA 21: Percentual de actinomicetos que apresentaram crescimento em meio sólido com óleo (B0, B10 e B100) superior ao controle negativo (sem óleo).....	55

FIGURA 22: Percentual de actinomicetos que apresentaram resultado positivo para as enzimas lipase e esterase pelo método da hidrólise em placa.....	57
FIGURA 23: Avaliação da quantificação da biomassa dos isolados A3.3 e LB5.2 crescidos em diferentes percentuais de biodiesel (B100), sob incubação a 30°C na ausência de agitação, por 28 dias.....	63
FIGURA 24: Curva de crescimento dos isolados A3.3 (●), crescido em 2% de biodiesel, e LB5.2 (◆), crescido em 1% de biodiesel, sob incubação a 30°C na ausência de agitação, por 28 dias.....	65
FIGURA 25: Medidas da tensão superficial da fase aquosa do cultivo do isolado A3.3 em MM1 com 2% de biodiesel (B100), por 28 dias a 30°C. (●) Tensão superficial da fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto; (○) Tensão superficial da fase aquosa sem inóculo (controle negativo).....	67
FIGURA 26: Medidas da tensão superficial da fase aquosa do cultivo do isolado LB5.2 em MM1 com 1% de biodiesel (B100), por 28 dias a 30°C. (◆) Tensão superficial da fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto; (◇) Tensão superficial da fase aquosa sem inóculo (controle negativo).....	68
FIGURA 27: Medidas de pH da fase aquosa do cultivo do isolado A3.3 em MM1 com 2% de biodiesel (B100), por 28 dias a 30°C. (●) pH da fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto; (○) pH da fase aquosa sem inóculo (controle negativo).....	71
FIGURA 28: Medidas de pH da fase aquosa do cultivo do isolado LB5.2 em MM1 com 1% de biodiesel (B100), por 28 dias a 30°C. (◆) pH da fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto; (◇) pH da fase aquosa sem inóculo (controle negativo).....	72
FIGURA 29: Espectro de infravermelho do biodiesel (B100) na ausência de inóculo (controle negativo) e com crescimento dos isolados A3.3 (2% de óleo) e LB5.2 (1% de óleo) após incubação a 30°C na ausência de agitação, por 28 dias. CN: controle negativo; T0: tempo zero (antes de iniciado o experimento); T28: tempo 28 (após 28 dias de incubação). O pico na faixa de 1700 cm ⁻¹ , que indica a formação de um produto de degradação, está indicado pela flecha.....	74
FIGURA 30: Dendograma obtido pelo método aglomerativo, com a utilização do programa MatLab. Controle negativo (CN) no T0 (A, B, C); CN no T28, incubado com 2% de biodiesel (D); isolado A3.3 no T28, incubado com 2% de biodiesel (E, F, G); CN no T28, incubado com 1% de biodiesel (H); isolado LB5.2 no T28, incubado com 1% de biodiesel (I, J, K).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACA	Ágar amido caseína
B0	Diesel puro
B5	Mistura composta por 5% de biodiesel e 95% de diesel
B10	Mistura composta por 10% de biodiesel e 90% de diesel
B100	Biodiesel puro
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Grau Celsius
CECOM	Centro de Combustíveis e Biocombustíveis
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IE₂₄	Índice de emulsificação após 24 horas
µL	microlitro
µm	micrometro
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
MM1	Meio mínimo mineral
mN.m⁻¹	miliNewton por metro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanograma
nm	nanômetro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pb	pares de base
r.p.m.	rotações por minuto
SICECORS	Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Pólo Petroquímico do Sul
TTC	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

A indústria de petróleo, em suas diversas atividades (produção, refino, transporte e comercialização), apresenta risco ambiental inerente. Os vazamentos acidentais de petróleo e derivados em dutos, embarcações e unidades industriais são apenas alguns exemplos de possíveis impactos ambientais. A contaminação do solo ocorre principalmente devido a vazamentos de combustíveis armazenados em tanques subterrâneos, e com menor frequência em acidentes envolvendo transporte.

Atualmente, o combustível mais utilizado no Brasil é o óleo diesel, que desde 1º de janeiro de 2010 passou a ser comercializado com a adição de 5% de biodiesel (mistura B5). O diesel e o biodiesel, apesar de apresentarem a mesma função (combustível para caminhões, ônibus, tratores e transportes marítimos), têm origens e composições muito distintas. O diesel é composto por uma complexa mistura de hidrocarbonetos, enquanto que o biodiesel é composto por ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos longos de baixa complexidade estrutural. O biodiesel apresenta algumas vantagens em relação ao óleo diesel: é livre de enxofre e de compostos aromáticos, tem caráter não tóxico e é biodegradável.

Uma das alternativas para a descontaminação de áreas impactadas com misturas de diesel e biodiesel é a biorremediação, que consiste na aplicação de processos biológicos à conversão de contaminantes ambientais em substâncias inertes. Para que um microrganismo possa ser utilizado em tais processos, é fundamental que produzam enzimas capazes de degradar esses contaminantes. Lipases e esterases são capazes de catalisar a hidrólise dos ésteres que constituem o biodiesel, e as enzimas oxigenases são responsáveis pela degradação dos hidrocarbonetos do óleo diesel. A produção de biosurfactantes também é de grande importância na biorremediação, pois essas moléculas tornam o contaminante mais biodisponível.

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas predominantemente filamentosas encontradas principalmente no solo, onde desempenham um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica devido à sua capacidade de utilizar várias fontes de carbono e de degradar polímeros complexos. Existem poucos estudos sobre a presença de actinomicetos em ambientes impactados com hidrocarbonetos e sobre sua capacidade em degradar combustíveis, embora vários autores afirmem que são bons candidatos para aplicação na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.

Os principais objetivos do presente trabalho foram identificar actinomicetos isolados de solo impactado com resíduos petroquímicos e selecionar, entre isolados de solo impactado e não impactado, actinomicetos que apresentem potencial de biodegradação de misturas de diesel e biodiesel, tendo em vista a possibilidade de utilizá-los em processos de biorremediação.

Os objetivos específicos foram a detecção do gene *alkB*, que codifica uma enzima monoxigenase, sua relação com a capacidade de degradação do diesel (B0), e a comparação do potencial de degradação de misturas de diesel e biodiesel (B0, B10 e B100) e produção das enzimas lipase e esterase por actinomicetos isolados de solo com e sem histórico de contaminação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação do solo por combustíveis

No Estado do Rio Grande do Sul, no período de março de 1994 a dezembro de 2011, foram registrados pela FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler - RS) 529 acidentes relacionados ao transporte de cargas perigosas, com produtos químicos das mais diversas origens. Aproximadamente 26% do total de acidentes registrados estavam relacionados ao transporte de combustíveis, com maior prevalência de acidentes envolvendo derrame de óleo diesel (Figura 1).

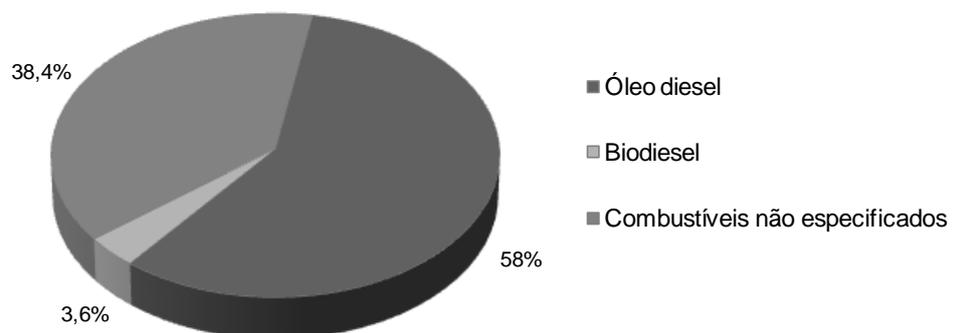


FIGURA 1: Acidentes envolvendo transporte de combustíveis, no período de março de 1994 a dezembro de 2011 (Fonte: FEPAM, 2012).

Os acidentes envolvendo transporte de biodiesel começaram a ser registrados a partir de 2008, quando a mistura obrigatória de 2% de biodiesel ao óleo diesel (B2) passou a ser comercializada em todo o território nacional. No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2011, do total de acidentes envolvendo transporte de combustíveis, 12,5% foram atribuídos a acidentes com biodiesel (ANP, 2012; FEPAM, 2012).

O número de acidentes envolvendo transporte, entretanto, representa um percentual muito pequeno se comparado aos vazamentos em tanques de armazenamento de combustível em postos de abastecimento. No estado de São Paulo, do total de 4131 registros de áreas contaminadas levantadas pela CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) no ano de 2011, 78% correspondem aos postos de combustível (Figura 2). Os principais contaminantes encontrados foram, portanto, os combustíveis líquidos.

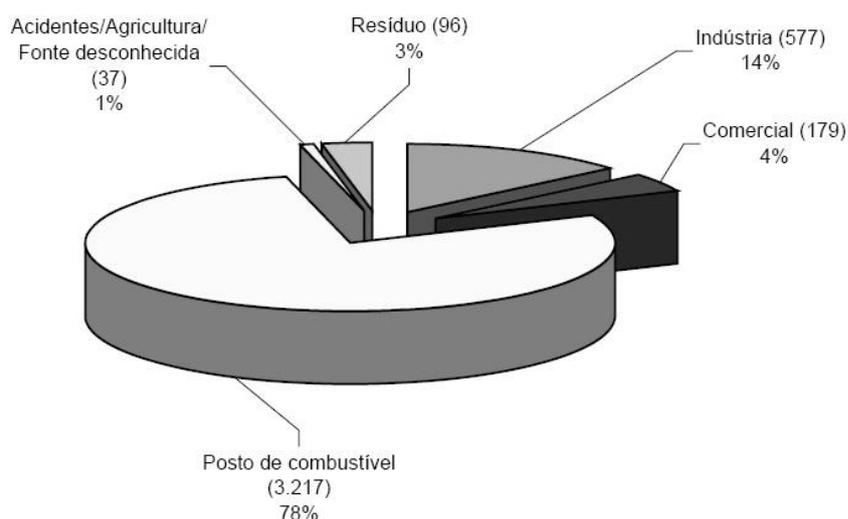


FIGURA 2: Distribuição das áreas contaminadas por tipo de atividade no estado de São Paulo (Fonte: CETESB, 2011).

2.2 Óleo diesel e biodiesel

O óleo diesel é um produto da destilação fracionada do petróleo que apresenta em sua composição principalmente hidrocarbonetos alifáticos de cadeia simples, não ramificados, que contêm de 9 a 28 átomos de carbono (C_9 - C_{28}), além de outros compostos que destilam na mesma faixa de temperatura, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados alquílicos. Também são encontrados altos teores de enxofre, que variam de 0,1 a 0,5%, e produtos da combustão, como CO , NO_x , SO_x e material particulado (Braun et al., 2003; ANP, 2012).

Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o território nacional contém 5% de biodiesel (mistura B5). O biodiesel é um biocombustível produzido a partir de óleos vegetais ou gorduras animais. Para diminuir sua viscosidade e torná-los compatíveis com motores a diesel, os óleos e gorduras precisam passar por um processo químico denominado transesterificação, no qual a reação entre os triacilglicerídeos e um álcool (metanol ou etanol) é catalisada por um ácido, uma base ou uma enzima lipolítica, resultando em ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e alguns subprodutos, cujo principal é o glicerol (Figura 3) (Ramos et al., 2003; Macedo & Macedo, 2004; ANP, 2012).

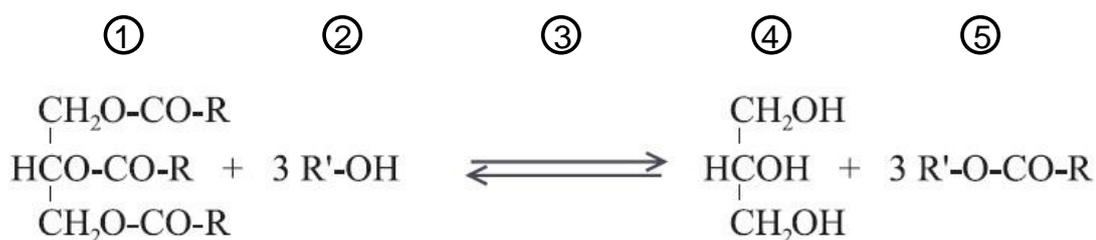


FIGURA 3: Reação de transesterificação de óleos vegetais e/ou gorduras animais. (1) Triacilglicerídeo; (2) álcool (metanol ou etanol); (3) catalisador (ácido, base ou enzima lipolítica); (4) glicerol; (5) ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (biodiesel) (Fonte: Ramos et al., 2003; Macedo & Macedo, 2004).

O biodiesel metílico de soja, amplamente utilizado no Brasil, é constituído por cinco ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (C₁₆-C₁₈): ácido linoléico (64%), oléico (20%), palmítico (11%), linolênico (3%) e esteárico (2%). Em algumas regiões do Brasil, como é o caso do Rio Grande do Sul, também é utilizado biodiesel de sebo bovino, que pode ser misturado ao biodiesel de soja (Ramos et al., 2003; ANP, 2012).

O biodiesel é um combustível não-tóxico, renovável e biodegradável. Sua biodegradabilidade está relacionada à ausência de compostos aromáticos, à grande capacidade de absorção de água e à disponibilidade de ligações éster de alta energia, que do ponto de vista ambiental apresenta uma enorme vantagem em relação ao diesel de petróleo (Macedo & Macedo, 2004; Passman & Dobranic, 2005).

2.3 Biorremediação

A biorremediação é definida como processo que emprega microrganismos ou suas enzimas para destoxificar contaminantes no solo ou

em outros ambientes. Consiste, basicamente, na transformação do contaminante a formas que não oferecem riscos ambientais. A biorremediação é de simples manutenção, é aplicável em grandes áreas e tem baixo custo.

Algumas estratégias para biorremediação de solos *in situ* (no local impactado) são a degradação intrínseca pelos microrganismos indígenas (atenuação natural), a adição de nutrientes e otimização de condições ambientais do solo, como pH, temperatura e umidade (bioestimulação) e a adição de microrganismos com capacidade de degradar contaminantes específicos (bioaumentação). Alguns processos de biorremediação *ex situ* são o *landfarming*, que consiste na aplicação do contaminante (líquido ou sólido) em células impermeabilizadas, cujo solo é homogeneizado periodicamente por meio de aragem, e o sistema de biopilha, uma variação da técnica de compostagem na qual o solo contaminado é escavado e disposto em pilhas, que são revolvidas mecanicamente para maior oxigenação (Frankenberger, 1992; Moreira & Siqueira, 2006; Seabra, 2008).

No estado do Rio Grande do Sul, foi sancionada pela FEPAM a Portaria nº 016 de abril de 2010, que dispõe sobre o controle da disposição final de resíduos Classe I (perigosos) com características de inflamabilidade. Tais resíduos (entre eles, solos contaminados com combustíveis) só serão passíveis de destinação em “aterros de resíduos classe I” ou “central de recebimento e destinação de resíduos classe I” após recuperação, reciclagem, tratamento biológico ou tratamento térmico. A criação dessa Portaria representa um marco à legislação ambiental do estado do Rio Grande do Sul, por estimular a prestação de serviços no campo da remediação pela iniciativa

privada com o objetivo de recuperar áreas impactadas por contaminantes (Meyer, 2011). Por isso, cada vez mais torna-se necessário o estudo de microrganismos que apresentem potencial para degradar combustíveis.

2.4 Microrganismos: potencial enzimático e produção de biossurfactantes

Em condições aeróbias, os primeiros passos da degradação do óleo diesel são realizados por enzimas oxigenases (Van Beilen et al., 2003). Uma classe de enzimas monoxigenases, conhecidas como alcano-hidroxilases, é responsável pela introdução de um átomo de oxigênio em alcanos, que pode ser terminal, subterminal ou biterminal (Figura 4). A enzima mais estudada é a alcano-hidroxilase codificada pelo gene *alkB*, responsável pela primeira etapa da degradação do óleo diesel (Belhaj et al., 2002; Mehdi & Giti, 2008).

As enzimas dioxigenases estão presentes em microrganismos capazes de degradar os compostos recalcitrantes do óleo diesel, e são responsáveis pela inserção de dois átomos de oxigênio nos anéis aromáticos. As reações de oxidação são baseadas principalmente em processos de hidroxilação, seguidos pela clivagem dos anéis aromáticos e epoxidação (reações que envolvem a transferência de oxigênio) (Golovleva et al., 1990).

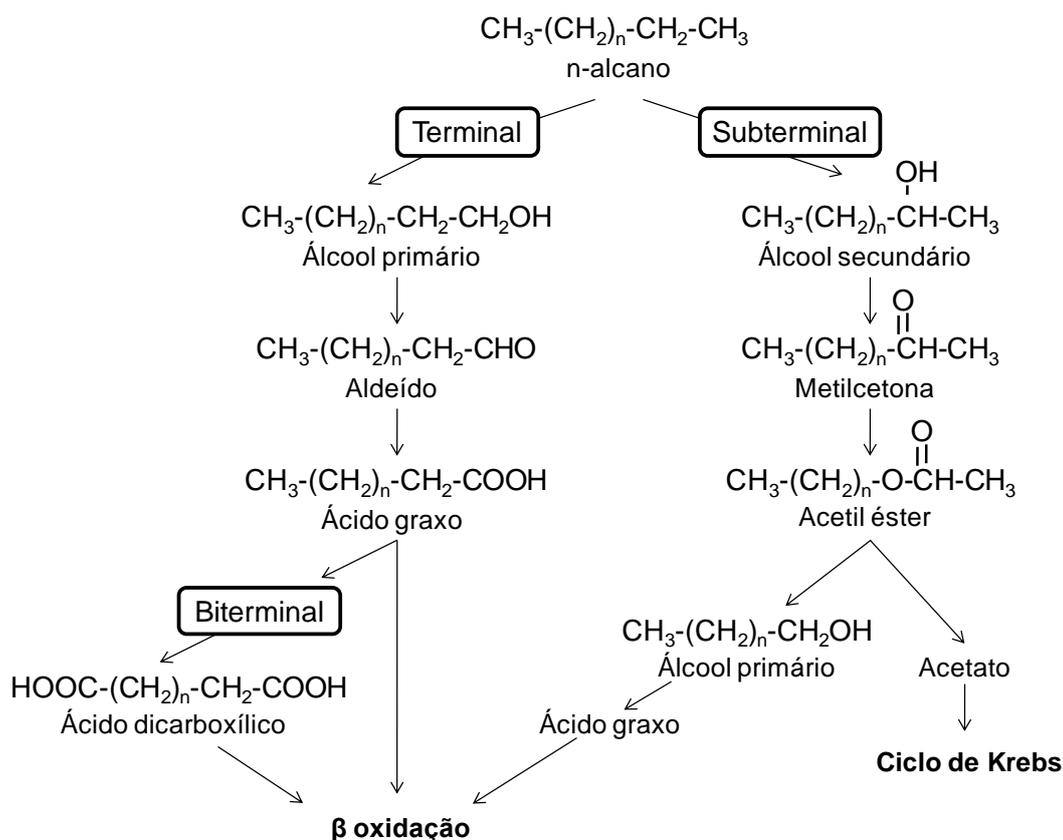


FIGURA 4: Rotas da degradação de alcanos por oxidação terminal, subterminal e biterminal (modificado de Fritsche & Hofrichter, 2000).

A biodegradação do biodiesel consiste na hidrólise do éster por uma lipase, resultando na produção de um ácido graxo e um álcool (Figura 5). Posteriormente, os ácidos graxos são hidrolisados em moléculas menores por lipases e esterases, e então oxidados via β -oxidação (Vieira et al., 2006).

Lipases e esterases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem sobre ésteres insolúveis em água, como os triacilglicerídeos. As esterases hidrolisam ésteres solúveis e de cadeias curtas, com no máximo seis carbonos. A maioria das lipases pode hidrolisar o substrato de esterases, mas o inverso não ocorre (Jaeger et al., 1999; Bornscheuer, 2002).

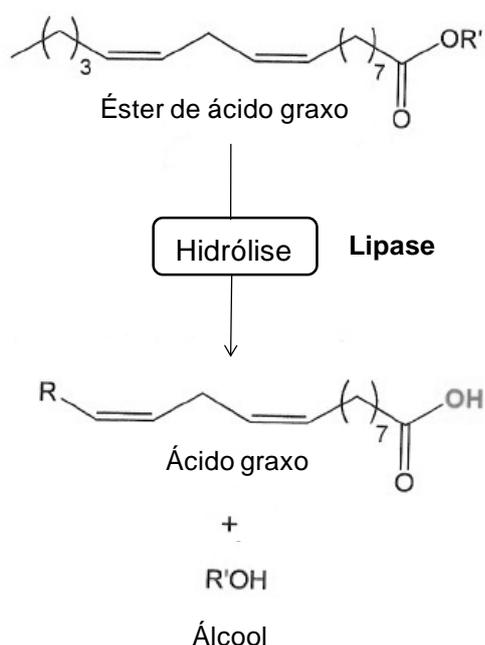


FIGURA 5: Degradação do éster do ácido linoléico por hidrólise enzimática (modificado de Cooper, 2000).

A presença das enzimas oxigenases, lipases e esterases é fundamental para que ocorra a biodegradação de misturas de diesel e biodiesel. Entretanto, o potencial enzimático nem sempre é suficiente para que a biodegradação ocorra, pois o contaminante precisa estar biodisponível aos microrganismos. Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas (apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica), e podem ser divididos em duas categorias em função do peso molecular. Os biossurfactantes de baixo peso molecular apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial de um meio aquoso, e os biossurfactantes de alto peso molecular (bioemulsificantes) são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão, e não necessariamente causam a redução da tensão superficial (Bento et al., 2008). Os biossurfactantes têm a capacidade de aumentar a solubilidade de

contaminantes hidrofóbicos e, portanto, de acelerar a degradação de vários óleos. Em processos de biorremediação de solos, os biossurfactantes podem ser utilizados diretamente ou podem ser adicionados microrganismos produtores (Nitschke & Pastore, 2002).

2.5 Actinomicetos

2.5.1 Características gerais

Os actinomicetos desempenham um papel crucial na decomposição de compostos orgânicos e poluentes ativos na natureza (Groth et al., 1999). São um grupo heterogêneo de bactérias Gram positivas com alto percentual de guanina e citosina no DNA, que pode exceder 70% do total de nucleotídeos (Araújo, 1998). Possuem genomas que contêm mais de 3300 genes, na sua maioria capazes de codificar proteínas utilizadas durante a complexa diferenciação morfológica e biossíntese de metabólitos secundários (Hopwood et al., 1985). Sua diversidade morfológica está baseada principalmente nas estratégias reprodutivas, que levam à formação de uma ampla variedade de estruturas de esporulação (Ensign, 1978). A maioria dos actinomicetos cresce com um aspecto filamentosso e ramificado, podendo apresentar formação de micélio sobre o substrato e micélio aéreo quando crescidos em meio sólido, como é característico do gênero *Streptomyces* (Figura 6) (Willey et al., 2006; Bervanakis, 2008). O micélio colorido é explicado pela produção de pigmentos, e a aparência pulverulenta é decorrente da formação de micélio aéreo (Rahman et al., 2000; Sathi et al., 2001). Os filamentos são semelhantes às

hifas dos fungos, porém apresentam diâmetros muito menores, que variam de 0,5 a 10 μm (Sultan et al., 2002). Actinomicetos pertencentes aos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Gordonia* produzem um micélio ramificado que se fragmenta em cocos ou bacilos, o que pode conferir aspecto mucóide às colônias (Holt et al., 1994).

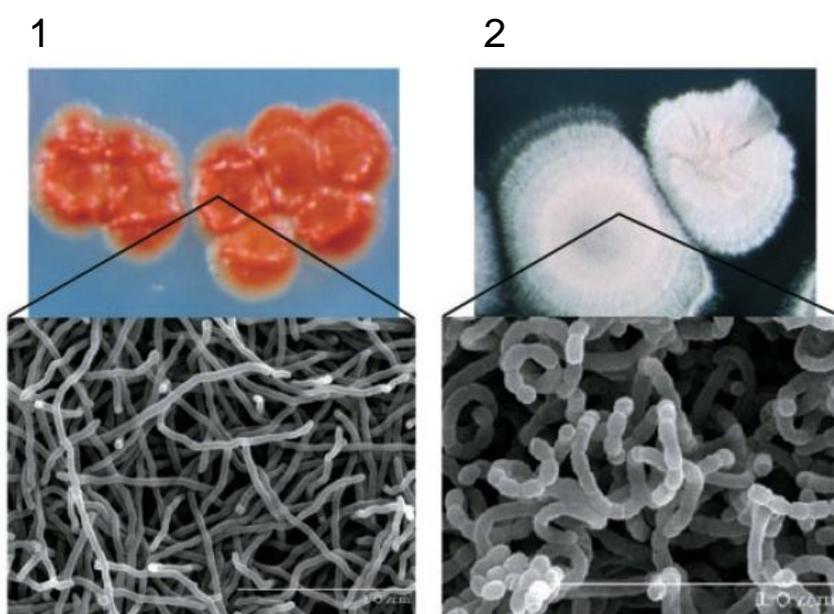


FIGURA 6: Filamentos de actinomicetos do gênero *Streptomyces*: colônias crescidas em meio sólido e microscopia eletrônica de varredura do micélio sobre o substrato (1) e micélio aéreo (2). Fonte: Willey et al. (2006).

Os actinomicetos são predominantemente aeróbios, mesofílicos e apresentam crescimento relativamente lento. Podem ocorrer em diversos ambientes, mas são encontrados principalmente no solo (Mccarthy & Williams, 1992). Kennedy (1999) afirmou que 30% da microbiota do solo corresponde aos actinomicetos, e os gêneros mais comumente isolados são *Streptomyces* e *Micromonospora* (Basilio et al., 2003). O gênero *Streptomyces* representa mais

de 90% do total de actinomicetos presentes no solo, e provavelmente desempenham as funções ecológicas mais importantes, como decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (Xu et al., 1996).

2.5.2 Identificação

A identificação de actinomicetos abrange análises das características morfológicas, testes bioquímicos e análises moleculares. As análises morfológicas incluem a observação da ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo e sua fragmentação ou esporulação, e tipo, número e arranjo de esporos. As características morfológicas desempenham um papel muito importante na distinção do gênero *Streptomyces* dos demais actinomicetos formadores de esporos (Holt et al., 1994). Os testes bioquímicos incluem a utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, produção de enzimas e de pigmentos.

As análises moleculares são baseadas na amplificação completa ou de fragmentos do DNAr 16S. Esta região é altamente conservada entre os procariotos, mas também contém regiões variáveis, adequadas para distinguir *taxa*. As mais empregadas para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) incluem as regiões V1-V9. A região variável V3 constitui uma ferramenta molecular crucial para a identificação de actinomicetos (Lewin, 2000; Heuer et al., 1997). Rintala et al. (2001) desenharam *primers* específicos para a identificação do gênero *Streptomyces* que amplificam as regiões variáveis V1-V8.

2.5.3 Presença de actinomicetos em solos impactados e seu potencial de degradação de hidrocarbonetos

Microrganismos que apresentam tolerância a hidrocarbonetos ou que sejam capazes de utilizá-los como fonte de carbono têm sido identificados em diversos tipos de solos contaminados (Juck et al., 2000, Nakatani et al., 2008). Segundo Pizzul et al. (2006), actinomicetos são bons candidatos para aplicação em biorremediação de solos. Muitos autores descrevem o potencial de biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes por isolados de *Rhodococcus* sp. (Bicca et al., 1999; Larkin et al., 2005; Lee et al., 2006; Pizzul et al., 2006; Martínková et al., 2009), além da presença de genes específicos que codificam enzimas envolvidas na degradação dos hidrocarbonetos, como o *alkB* (Vomberg & Klinner, 2000; Heiss-Blanquet et al., 2005; Quatrini et al., 2008). Porém há poucos trabalhos na literatura envolvendo degradação de derivados de petróleo por isolados de *Streptomyces* sp. Actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces* estão presentes em diferentes tipos de solo, e podem se adaptar a ambientes extremos. Sua versatilidade permite que sobrevivam em ambientes tóxicos, como solo contaminado com derivados de petróleo. Por isso, é surpreendente que existam tão poucos estudos utilizando *Streptomyces* sp. na biorremediação de áreas impactadas com hidrocarbonetos (Radwan et al., 1998; Barabás et al., 2001). Segundo Barabás et al. (2001), experimentos preliminares realizados em laboratório com amostras de solo contaminadas com hexadecano ou octadecano mostram que isolados selecionados de *Streptomyces* sp. podem degradar mais de 90% destes hidrocarbonetos em um período de quatro

meses. Nakatani et al. (2008) obtiveram um isolado de *Streptomyces* sp. oriundo de solo de *landfarming* de resíduos petroquímicos capaz de crescer em meio de cultura contendo antraceno como única fonte de carbono, além de isolados de *Nocardioides* sp. e *Arthrobacter* sp., também pertencentes à ordem Actinomycetales. Saadoun et al. (2008) isolaram espécies de *Streptomyces* de solo impactado com hidrocarbonetos, e além de obterem isolados capazes de degradar diesel, detectaram a presença do gene *alkB*. Balachandran et al. (2012) estudaram um isolado de *Streptomyces* sp. proveniente de solo contaminado com óleo, e constataram que o isolado foi capaz de degradar naftaleno, fenantreno e óleo diesel, além da capacidade de crescer em petróleo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e outros substratos, quando utilizados como única fonte de carbono. Thampayak et al. (2008) obtiveram isolados de *Streptomyces* sp. capazes de produzir biossurfactantes quando crescidos em óleo de gergelim.

Portanto, levando em consideração o impacto causado no ambiente pela contaminação por hidrocarbonetos, o potencial de biodegradação de diferentes compostos apresentado pelos actinomicetos e a carência de estudos sobre o assunto, a proposta deste trabalho é contribuir com informações referentes à presença deste grupo de microrganismos em solos impactados e sua capacidade de degradação de misturas de diesel e biodiesel.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

As coletas de solo foram realizadas em locais com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Inicialmente, foram obtidas amostras de solo proveniente de dois postos de combustível localizados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, coletadas a uma profundidade de aproximadamente quatro metros. Posteriormente, foram coletadas amostras de uma célula de *landfarming* do Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Pólo Petroquímico do Sul (SICECORS) (Figura 7), que desde 1986 recebe resíduos petroquímicos da Companhia Petroquímica do Sul, atual Braskem, localizada no município de Triunfo, Rio Grande do Sul. As amostras foram coletadas de uma camada superficial (0-15 cm) de uma das seis células de 30 m x 100 m. Por último, foram coletadas amostras de uma camada superficial (0-15 cm) de biopilhas na Base da Distribuidora da empresa Ipiranga Produtos de Petróleo (Figura 7), destinadas ao tratamento biológico de solos contaminados previamente removidos de postos de combustível. Todas as amostras foram armazenadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde

(ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e mantidas sob refrigeração a 4°C.



FIGURA 7: Células de *landfarming* do SICECORS (1) após recente aplicação de borra oleosa; (2) após duas semanas de realização do revolvimento do solo (Fonte: Cerqueira, 2011). (3) Biopilha da empresa Ipiranga (Fonte: Mariana W. Duarte, 2011).

3.2 Isolamento de actinomicetos e recuperação de isolados da coleção de culturas

Foram realizados dois procedimentos distintos para o isolamento dos actinomicetos: um no qual a amostra foi enriquecida com 1% de B5 e submetida a transferências sucessivas a cada sete dias, e outro no qual foi realizado isolamento direto.

Pelo procedimento de isolamento direto, dez gramas de cada amostra foram suspensos em 90 mL de meio mínimo mineral (MM1) (Anexo 8.1.1) em frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL e foram incubados a 30°C por 30 min, sob agitação de 150 r.p.m. Pelo procedimento de isolamento com enriquecimento, a suspensão da amostra foi enriquecida com 1% da mistura B5, com o objetivo de selecionar microrganismos capazes de degradar misturas de diesel e biodiesel. A suspensão foi incubada a 30°C por sete dias sob agitação de 150 r.p.m. A cada sete dias, foi realizada uma

transferência de 10 mL do inóculo para um novo frasco contendo 90 mL de MM1 e foi adicionado 1% de B5 a cada transferência, e o inóculo foi submetido às mesmas condições de crescimento. Este procedimento foi realizado por um período de três semanas. Para cada amostra, tanto do isolamento direto quanto do isolamento com enriquecimento, foram feitas diluições seriadas em MM1, até 10^{-5} . Uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi espalhada sobre a superfície do meio ágar amido caseína (ACA) (Anexo 8.1.2), em ACA contendo o antifúngico anfotericina B (Anexo 8.1.3) e em ágar nutriente (Anexo 8.1.4). Todas as sementeiras foram realizadas em triplicata. As placas foram incubadas a 30°C, e após cinco dias foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Os actinomicetos foram selecionados com base na frequência de cada morfotipo. Para a obtenção de colônias puras, foi realizada a técnica de esgotamento em meio ACA, a partir da qual os isolados foram inoculados em ACA inclinado para posterior estocagem a 4°C e a -20°C.

Também foram utilizados 35 isolados de actinomicetos provenientes de solos sem histórico de contaminação (sob cultura de acácia-negra e sob formação secundária de Mata Atlântica), previamente isolados por Damasceno et al. (2008). Após a realização do esgotamento para confirmação da pureza das colônias, estas foram transferidas para tubos de ACA inclinado e estocadas a 4°C.

3.3 Identificação morfológica

A análise morfológica dos actinomicetos foi realizada pela técnica do microcultivo (Holt et al., 1994). As lâminas foram incubadas a 30°C e

observadas em microscópio óptico com aumento de 400X, do terceiro ao sétimo dia de incubação. Foram analisadas características que possibilitam a identificação em nível de gênero, como ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo e sua fragmentação, estruturas de esporulação e arranjo de esporos.

3.4 Identificação molecular e detecção do gene *alkB*

A identificação molecular foi realizada com o objetivo de confirmar os gêneros obtidos através das análises morfológicas e de possibilitar a identificação em nível de gênero de isolados de difícil caracterização morfológica. Nos actinomicetos isolados de local impactado com hidrocarbonetos, foi realizada detecção do gene *alkB*, que codifica uma enzima monoxigenase responsável pela degradação de alcanos.

3.4.1 Extração do DNA cromossomal

O DNA cromossomal dos actinomicetos foi extraído segundo o protocolo descrito por Hopwood et al. (2000), com modificações. Os isolados foram inoculados em frascos Erlenmeyer com capacidade para 125 mL contendo 20 mL de caldo nutriente (Anexo 8.1.5), e incubados a 30°C por 48 h, sob agitação de 150 r.p.m. Alíquotas de 1 mL de cada isolado foram transferidas para microtubos, que foram centrifugados a 13.000 r.p.m. por quatro minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi lavado com água destilada estéril, com a finalidade de remover o excesso de caldo nutriente presente no material celular. As células foram ressuspensas em 500 µL de

tampão SET (Anexo 8.2.1) e lisozima (Anexo 8.2.2) a uma concentração final de 1 mg/mL. A mistura foi incubada em banho de água a 37°C durante uma hora. Foi adicionado SDS (Anexo 8.2.3) a uma concentração final de 1% e proteinase K (Anexo 8.2.4) a uma concentração final de 0,5 mg/mL, e a mistura foi incubada a 55°C durante duas horas. Posteriormente, adicionou-se NaCl 5 M a uma concentração final de 100 mM e homogeneizou-se por inversão por 10 segundos. Um volume de clorofórmio foi adicionado e a mistura foi novamente homogeneizada, durante 30 minutos. A solução foi centrifugada por 20 minutos, a 13.000 r.p.m. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e a extração foi realizada uma vez com fenol, duas vezes com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1) e duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Em cada etapa, a mistura (sobrenadante acrescido de um volume de solvente) foi centrifugada por 10 minutos a 13.000 r.p.m. para a separação das fases, e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. No final do processo, o DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol e incubado por 18 h a -20°C. Posteriormente, o material foi centrifugado por 20 minutos a 13.000 r.p.m., o sobrenadante desprezado e o DNA lavado com etanol 70% gelado e deixado secar em temperatura ambiente por 48 h. O DNA foi ressuscitado em 50 µL de TE (Anexo 8.2.5) e mantido a -20°C.

3.4.2 Quantificação do DNA em gel de agarose por comparação de intensidade de banda

A quantificação do DNA foi realizada pela comparação da intensidade de banda das amostras com concentrações conhecidas de DNA lambda (Promega). A partir da sua concentração inicial (502 ng/ μ L), foram realizadas diluições para obtenção das concentrações de aproximadamente 251, 125, 63 e 31 ng/ μ L. Após adição de 1 μ L do corante azul de bromofenol (Anexo 8.2.6), o DNA lambda e as amostras foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Anexo 8.2.7) 0,8% corado com brometo de etídeo (Anexo 8.2.8), à uma voltagem de 85 Volts em tampão TAE 1X (Anexo 8.2.9) por 45 minutos. O DNA foi visualizado sob transiluminador de luz ultravioleta.

3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em um aparelho termociclador da marca Amplitherm, sob condições específicas de amplificação para cada par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

3.4.3.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) F243 e R513 (Heuer et al., 1997) foram utilizados para a confirmação da ordem Actinomycetales.

F243 (226-243): 5' GGATGAGCCCGCGGCCTA 3'

R513 (513-528): 5' CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA 3'

O *primer* F243 é específico para a região 16S do DNA ribossomal dos actinomicetos, e o *primer* R513 anela a um domínio universalmente

conservado, mas a presença da base adenina na extremidade 3' permite que anele preferencialmente com bactérias Gram positivas e β -proteobactérias. Este par de *primers* anela na região V3 variável do DNAr 16S e produz um fragmento de 302 pares de base (pb).

Para a confirmação do gênero *Streptomyces*, foram utilizados os *primers* StrepB, StrepE e StrepF (Rintala et al., 2001).

StrepB (139-158): 5' ACAAGCCCTGGAAACGGGGT 3'

StrepE (640-657): 5' CACCAGGAATTCCGATCT 3'

StrepF (1194-1212): 5' ACGTGTGCAGCCCAAGACA 3'

Os *primers* StrepB/StrepF amplificam um fragmento de 1074 pb (região V1-V8 do DNAr 16S) e os *primers* StrepB/StrepE amplificam um fragmento interno, de 519 pb (região entre V1/V2 - V4/V5) (Figura 8).

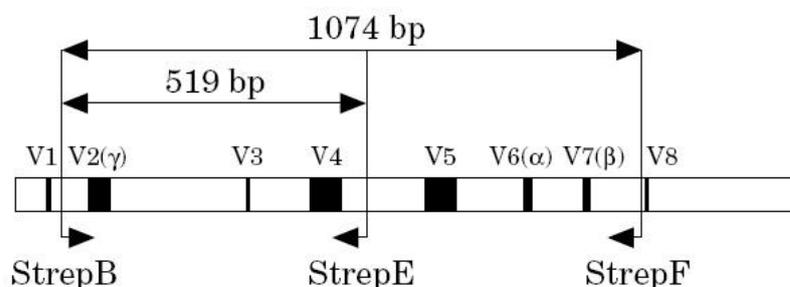


FIGURA 8: Desenho esquemático da região 16S do DNAr de *Streptomyces* sp. As regiões variáveis V1-V8, os sítios de anelamento dos *primers* StrepB, StrepE e StrepF e os tamanhos dos fragmentos estão indicados acima (Fonte: Rintala et al., 2001).

Para a detecção do gene *alkB* em actinomicetos, foram testados dois pares de *primers*. Os *primers* Rhose e Rhoas (Heiss-Blanquet et al., 2005) foram utilizados devido à sua alta especificidade com bactérias Gram positivas,

apesar de conterem algumas sequências dos genes *alkB* de *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia*. Estes *primers* anelam preferencialmente com espécies de *Rhodococcus*, produzindo um fragmento de 343 pb.

Rhose: 5' ACGGSCAYTTCTACRTCG 3'

Rhoas: 5' CCGTARTGYTCGAGRTAG 3'

Os *primers* ALK-F e ALK-R foram desenhados por Kohno et al. (2002). As sequências do gene *alkB* de sete cepas bacterianas (pertencentes aos gêneros *Amycolatopsis*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus*) foram submetidas a múltiplos alinhamentos, e regiões altamente homólogas foram selecionadas para desenhar os *primers*. A sequência do *primer* ALK-F foi modificada por Saadoun et al. (2008), para que aumentasse a probabilidade de anelamento com bactérias filogeneticamente semelhantes ao gênero *Rhodococcus*. O tamanho esperado do fragmento produzido é de 330 pb.

ALK-F: 5' TCGAGCACAACCGCGGCCACCA 3'

AKL-R: 5' CCGTAGTGCTCGACGTAGTT 3'

Os isolados que apresentaram o gene *alkB* e os isolados que foram selecionados para a realização do experimento de biodegradabilidade do biodiesel (B100) em meio líquido foram submetidos ao sequenciamento de uma região do DNAr 16S, com o objetivo de realizar a identificação em nível de espécie. Os *primers* A e H (Edwards et al., 1989) foram utilizados para amplificar parcialmente o DNAr 16S dos actinomicetos, produzindo um fragmento de 1030 pb.

A: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

H: 5' AGGAGGTGATCCAGCCGCAC 3'

3.4.3.2 Condições de amplificação

Para amplificação do fragmento que confirma a ordem Actinomycetales, foi utilizada a seguinte mistura de reação: DNA (20 ng), MgCl₂ (2,5 mM), tampão de reação 1X, *primers* (0,2 μM de cada), desoxinucleotídeos (0,3 mM de cada) (Anexo 8.2.10), uma unidade de Taq polimerase (Ludwig) e água Mili-Q estéril para completar o volume de 25 μL. As condições de amplificação foram adaptadas de Heuer et al. (1997): 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento a 63°C e 2 min de extensão a 72°C; e 2 min de extensão final a 72°C.

Para amplificação dos fragmentos específicos para o gênero *Streptomyces*, foi utilizada a mesma mistura de reação descrita acima, porém a concentração final dos *primers* StrepB/StrepF foi de 0,3 μM e dos *primers* StrepB/StrepE foi de 0,6 μM. As condições de amplificação foram descritas por Rintala et al. (2001): 5 minutos de desnaturação inicial a 98°C; 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 95°C, 1 min de anelamento a 58°C para StrepB/StrepF e a 54°C para StrepB/StrepE, 2 min de extensão a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C.

Para detecção do gene *alkB* foi utilizada a seguinte mistura de reação: DNA (20 ng), MgCl₂ (1,5 mM), tampão de reação 1X, *primers* (0,2 μM de cada), desoxinucleotídeos (0,3 mM de cada), albumina de soro bovino (200 ng), uma unidade de Taq polimerase (Ludwig) e água Mili-Q estéril para completar o volume de 25 μL. Como controle positivo da reação de PCR, foi utilizada uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* da coleção de culturas do

Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis do Departamento de Microbiologia do ICBS/UFRGS. Para os *primers* Rhose/Rhoas, as condições de amplificação foram descritas por Heiss-Blanquet et al. (2005): 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento a 52°C e 1 min de extensão a 72°C; e 5 min de extensão final a 72°C. Para os *primers* ALK-F/ALK-R, as condições de amplificação foram adaptadas de Saadoun et al. (2008): 2 minutos de desnaturação inicial a 94°C; 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento a 50°C e 1 min 30 s de extensão a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C.

Para o sequenciamento de um fragmento do DNAr 16S com a utilização dos *primers* A e H, foi utilizada a seguinte mistura de reação: DNA (10 ng), MgCl₂ (1,5 mM), tampão de reação 1X, *primers* (0,2 µM de cada), desoxinucleotídeos (0,3 mM de cada), uma unidade de Taq polimerase (Ludwig) e água Mili-Q estéril para completar o volume de 50 µL. As condições de amplificação foram adaptadas de Salamoni et al. (2010): 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento a 59°C e 2 min de extensão a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C.

3.4.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR, após adição de 1 µL do corante azul de bromofenol, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (5 µL/ 100 mL), à uma voltagem de 85 Volts em tampão

TAE 1X por 45 minutos. Os fragmentos foram visualizados através de transiluminador de luz ultravioleta.

3.4.3.4 Purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os produtos de PCR resultantes da amplificação com os *primers* A e H foram purificados com a utilização do kit GFX (GE Healthcare). As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), com os mesmos *primers* utilizados na reação de PCR (A e H). As sequências obtidas foram comparadas com sequências de referência provenientes do GenBank, através da utilização do NCBI/BLAST.

3.5 Biodegradação de combustíveis e atividade enzimática

As metodologias descritas a seguir foram utilizadas para comparar actinomicetos isolados de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo e isolados de solo sem histórico de contaminação e para selecionar potenciais degradadores de misturas de diesel e biodiesel, visando sua aplicação em processos de biorremediação. Nesta etapa, também foi estabelecida a relação do crescimento em diesel (B0) com a presença do gene *alkB*.

3.5.1 Combustíveis

Para a realização dos experimentos de biodegradação de combustíveis, foram utilizados diesel metropolitano S-50 (50 ppm de enxofre) e

biodiesel metílico de soja (Anexo 8.4), ambos fornecidos pela empresa Ipiranga Distribuidora de Petróleo. A esterilização dos combustíveis foi realizada por filtração a vácuo, com membranas de 0,22 µm de porosidade. Foram utilizados os seguintes combustíveis: diesel (B0), 90% diesel e 10% biodiesel (B10) e biodiesel (B100). Os combustíveis foram armazenados à temperatura ambiente, em frascos estéreis e protegidos da luz com papel alumínio, para evitar a foto-oxidação.

3.5.2 Avaliação da capacidade de biodegradação pela utilização de indicadores redox

Foram utilizados os indicadores redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) e 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (Anexo 8.3.1), que funcionam como aceptores artificiais da cadeia transportadora de elétrons, possibilitando a detecção da oxidação da fonte de carbono pela mudança de coloração do meio mineral. Quando a fonte de carbono é oxidada na presença de DCPIP, a coloração do meio sofre alteração de azul-escuro (oxidado) para marrom ou incolor (reduzido), e na presença de TTC a coloração é alterada de incolor (oxidado) para rosa (reduzido) (Figura 9).

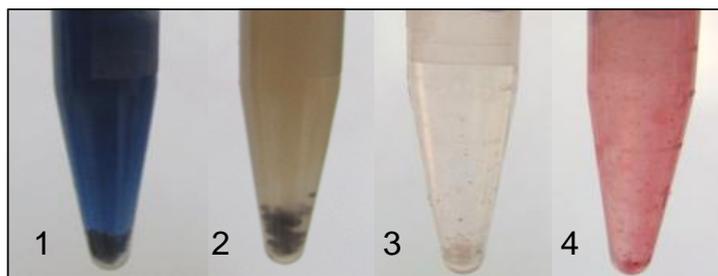


FIGURA 9: Demonstração da mudança de coloração dos indicadores redox DCPIP e TTC. (1) DCPIP: controle negativo (sem óleo); (2) DCPIP: redução devido à oxidação da fonte de carbono; (3) TTC: controle negativo (sem óleo); (4) TTC: redução devido à oxidação da fonte de carbono.

Anteriormente à utilização dos indicadores redox na presença de óleo, foi realizado um procedimento com a finalidade de esgotar as reservas de nutrientes do inóculo. Os isolados foram inoculados em 20 mL de caldo nutriente contido em frascos Erlenmeyer com capacidade para 125 mL, e incubados a 30°C por 48 h, sob agitação de 150 r.p.m. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos, que foram centrifugados a 13.000 r.p.m. por quatro minutos. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1 mL de MM1 ao microtubo, que foi submetido à agitação em vórtex por cinco segundos. Os microtubos foram novamente centrifugados e os procedimentos descritos anteriormente foram repetidos, com a finalidade de remover o excesso de caldo nutriente presente no material celular. Os microtubos contendo meio mineral e células foram incubados a 30°C por um período que variou de 24 horas a 10 dias, com o intuito de determinar o tempo necessário para esgotar completamente as reservas de fontes de carbono presentes nas células. Após, foi realizada centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1 mL do MM1 contendo indicador redox, sem adição de óleo. Os microtubos foram incubados a 30°C, e a leitura dos resultados foi realizada diariamente,

durante 10 dias, com a finalidade de padronizar o tempo necessário para o esgotamento total das reservas.

O experimento foi realizado em duplicata, adicionando-se 5% de óleo (B0, B10 e B100) como única fonte de carbono ao inóculo com MM1 contendo indicador redox. Foram utilizados dois controles negativos: sem inóculo (para avaliar a degradação abiótica do óleo) e sem óleo (para verificar se as reservas de fontes de carbono haviam sido esgotadas). Antes da incubação, os microtubos foram recobertos com papel alumínio para evitar a foto-oxidação dos indicadores redox e dos combustíveis.

3.5.3 Avaliação da degradação em meio sólido através da comparação do crescimento

A degradação do óleo em meio sólido foi avaliada através da visualização do crescimento dos actinomicetos em MM1 com 1,5% de ágar e 2,5% de combustível (B0, B10 e B100). O meio mineral com ágar foi esterilizado, e ao atingir uma temperatura de 60°C, foi adicionado o óleo. O percentual de óleo a ser utilizado no experimento foi determinado através da comparação visual do crescimento em diferentes percentuais (1 e 2,5%). Os actinomicetos foram inoculados com alça de platina, na forma de estrias, e as placas incubadas a 30°C por 14 dias. Foi realizada a comparação do crescimento em meio contendo óleo com controles negativo (sem óleo) e positivo (com glicose ou ACA) (Figura 10). O resultado foi considerado positivo quando o crescimento sobre o meio mineral com óleo foi maior do que sobre o controle negativo.

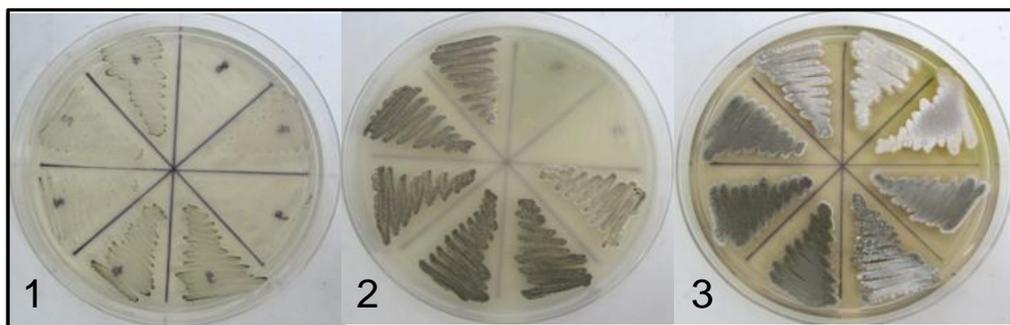


FIGURA 10: Demonstração da comparação do crescimento de isolados de actinomicetos em meio sólido. (1) Controle negativo (sem óleo); (2) biodiesel (B100); (3) ACA.

3.5.4 Determinação qualitativa da atividade da lipase e da esterase

A atividade da lipase foi avaliada em meio de cultura proposto por Kouker & Jaeger (1987), com modificações (Anexo 8.3.2). A inoculação foi realizada com a utilização de agulha de platina, e as placas foram incubadas a 30°C por 21 dias. A hidrólise do biodiesel (B100) foi visualizada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 350 nm. Foram observados halos de cor laranja ao redor das colônias que apresentaram atividade lipolítica (Figura 11) devido à presença de rodamina B no meio de cultura, que emite fluorescência laranja na presença de ácidos graxos.

A atividade da esterase foi avaliada em meio de cultura descrito por Sierra (1957) (Anexo 8.3.3). A inoculação foi realizada com a utilização da agulha de platina, e as placas foram incubadas a 30°C por 14 dias. Com o objetivo de precipitar os sais de cálcio para a realização da leitura, as placas foram mantidas por 48 h em geladeira, a 4°C. Foram observados halos opacos ao redor das colônias que produziram esterases (Figura 11) devido à

precipitação de sais de cálcio na presença de ácidos graxos, liberados pela ação esterásica envolvida na hidrólise do Tween 80.

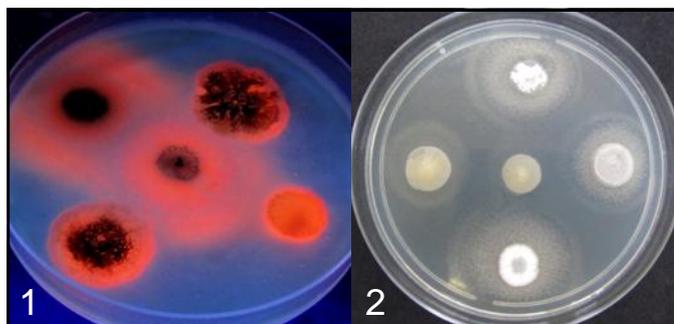


FIGURA 11: Demonstração da avaliação qualitativa da atividade enzimática pela hidrólise em placa. (1) Halos de hidrólise do biodiesel (B100) sob luz ultravioleta de 350 nm; (2) Halos de hidrólise do Tween 80.

3.5.5 Ensaio de biodegradabilidade do biodiesel (B100) em meio líquido

Os actinomicetos que obtiveram resultado positivo nos experimentos descritos anteriormente foram selecionados para o ensaio de biodegradação do biodiesel em meio líquido. O objetivo do experimento foi relacionar produção de biomassa, produção de biossurfactantes, produção de metabólitos e biodegradação do biodiesel.

3.5.5.1 Ensaio preliminar

O ensaio preliminar foi realizado com o objetivo de determinar, através da quantificação da biomassa, o percentual de biodiesel (1, 2, 5 e 10%) (Figura 12) a ser utilizado nas curvas de crescimento. O pré-inóculo foi preparado pela raspagem do micélio aéreo e esporos do actinomiceto crescido em ACA por sete dias e sua inoculação em 25 mL de MM1 com a utilização da

alça de platina, seguida de homogeneização em vórtex por cinco segundos. Após este procedimento, alíquotas de 1 mL do MM1 com microrganismo foram inoculadas em 49 mL de MM1 contidos em frascos de vidro com capacidade para 150 mL. Foram realizadas quatro repetições para cada percentual de óleo testado. Após incubação por 28 dias a 30°C, realizada sem agitação para evitar a emulsificação do biodiesel, a biomassa foi quantificada pela técnica de peso seco. Foi realizada filtração a vácuo do conteúdo total dos frascos por meio de discos de papel filtro previamente pesados em balança de precisão, e o excesso de óleo foi removido com a utilização de aproximadamente 5 mL de hexano. Os discos de papel filtro, com retenção de biomassa, foram colocados para secar em temperatura de 60°C. Após 24h, os discos foram transferidos para um dessecador, onde permaneceram até o momento da pesagem. Os valores de biomassa (mg) foram calculados subtraindo-se o peso inicial (P_i) do peso final (P_f).

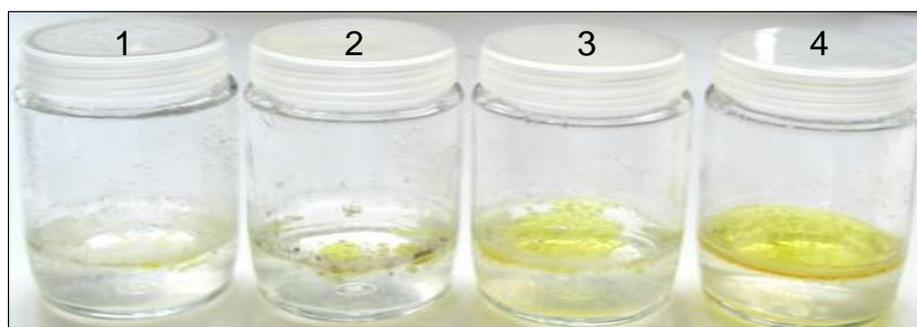


FIGURA 12: Demonstração do crescimento de um isolado de actinomiceto em diferentes percentuais de biodiesel (B100), após 28 dias. (1) 1%; (2) 2%; (3) 5%; (4) 10%.

3.5.5.2 Curvas de crescimento

Para realização das curvas de crescimento, foi selecionado o percentual de óleo em que ocorreu maior formação de biomassa. O pré-inóculo e a quantificação da biomassa pela técnica do peso seco foram realizados como descrito anteriormente. A fase aquosa foi separada da fase oleosa com a utilização de um funil de separação, e foram mantidas em geladeira (4°C) para posterior análise. O crescimento foi monitorado em quatro diferentes períodos (7, 14, 21 e 28 dias), com três repetições para cada tempo (amostras destrutivas).

3.5.5.3 Medidas de tensão superficial

As medidas de tensão superficial de amostras de aproximadamente 30 mL da fase aquosa foram determinadas em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália), com a utilização do método da placa de Wilhelmy. Foram utilizados água destilada (72 mN.m^{-1}) e etanol 98% ($22,5 \text{ mN.m}^{-1}$) como padrões para a calibração do aparelho. A medida da tensão superficial é uma das formas de avaliar a produção de biossurfactantes de baixo peso molecular.

3.5.5.4 Índice de emulsificação (IE₂₄)

O índice de emulsificação foi determinado pela adição de 2 mL da fase aquosa a 2 mL de biodiesel em tubos de ensaio de fundo chato (100 mm x 15 mm). Os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos e deixados em repouso por 24 h. O índice de emulsificação (%) foi obtido pela relação entre a

altura da emulsão (camada entre a fase aquosa e o biodiesel) e a altura total da coluna (4 mL) multiplicada por 100. Este método é uma forma de avaliar a produção de biossurfactantes de alto peso molecular.

3.5.5.5 Medidas de pH

As medidas de pH da fase aquosa foram realizadas nos quatro períodos de monitoramento da curva de crescimento, com a utilização de um pHmetro digital (ION PHB500).

3.5.5.6 Determinação da degradação do biodiesel (B100) através da análise por espectroscopia de infravermelho

A fase oleosa foi analisada no final da curva de crescimento (28^o dia), com o objetivo de avaliar a degradação dos grupos químicos presentes no biodiesel. As amostras de biodiesel que sofreram biodegradação foram comparadas com amostras em que não foi realizada inoculação de actinomicetos. A análise das amostras (aproximadamente 1 mL) foi realizada no Centro de Combustíveis e Biocombustíveis (CECOM) do Instituto de Química da UFRGS, com a utilização de um espectrofotômetro de infravermelho (Perkin Elmer, FT-IR/FT-NIR 400).

3.5.5.7 Análise estatística

Os dados referentes aos valores de biomassa, medidas da tensão superficial e medidas de pH foram interpretados pela análise da variância (ANOVA) e pelo teste t de Tukey com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), com a utilização do programa Statistica (versão 7.1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de actinomicetos

No presente trabalho, foram isolados 55 actinomicetos de amostras provenientes de uma célula de *landfarming* do SICECORS, na qual o último descarte de borra oleosa de resíduo petroquímico havia ocorrido aproximadamente três meses antes da coleta, realizada em outubro de 2010. Foram realizados dois procedimentos distintos: isolamento direto e isolamento com enriquecimento.

Pelo procedimento de isolamento direto, foram realizadas semeaduras em meio ACA (com e sem adição de anfotericina B) e em ágar nutriente. Após o período de incubação, foram isolados 47 actinomicetos a partir da semeadura da diluição 10^{-3} em meio ACA com e sem antifúngico (Figura 13). Os isolados foram selecionados com base nas características morfológicas das colônias, o que possibilitou seu agrupamento em cinco morfotipos distintos. A adição de anfotericina B ao meio ACA resultou em uma perceptível redução do crescimento de colônias fúngicas, o que facilitou a contagem e isolamento de actinomicetos (Figura 13).

A contagem de UFC de actinomicetos foi realizada em meio ACA nas diluições 10^{-2} e 10^{-3} , na qual foi observada uma média de $3,0 \times 10^5$ UFC por grama de solo. Nakatani et al. (2008) realizaram a contagem de actinomicetos totais em meio ACA e obtiveram uma média de $7,3 \times 10^5$ UFC por grama de solo de sistema de *landfarming* em operação há mais de 15 anos, utilizadas para tratamento de rejeitos de indústria petroquímica. Os valores obtidos foram semelhantes aos encontrados em solos de cerrado não contaminados (Pereira et al., 1999). Saadoun et al. (2008) realizaram a contagem de colônias que apresentaram morfologia semelhante a colônias de *Streptomyces* spp. em meio ágar amido caseína nitrato, e obtiveram valores médios de $2,0 \times 10^4$ UFC por grama de solo com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, e $4,0 \times 10^4$ UFC por grama de solo não contaminado. Estes resultados demonstram a ampla ocorrência de actinomicetos em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, devido à sua versatilidade catabólica e capacidade de sobreviver em ambientes adversos.

Na semeadura da diluição 10^{-3} em ágar nutriente (Figura 13), foram observadas aproximadamente 15 colônias de actinomicetos, que não foram selecionadas para isolamento. Para otimizar o crescimento dos actinomicetos em ágar nutriente, poderia ser utilizado algum antibacteriano, com a finalidade de reduzir o crescimento das bactérias unicelulares no meio de cultura. Uma opção é a utilização do corante Rosa Bengala (Ottow & Glathe, 1968), que além de ser bacteriostático inibe o crescimento e espalhamento de colônias fúngicas.

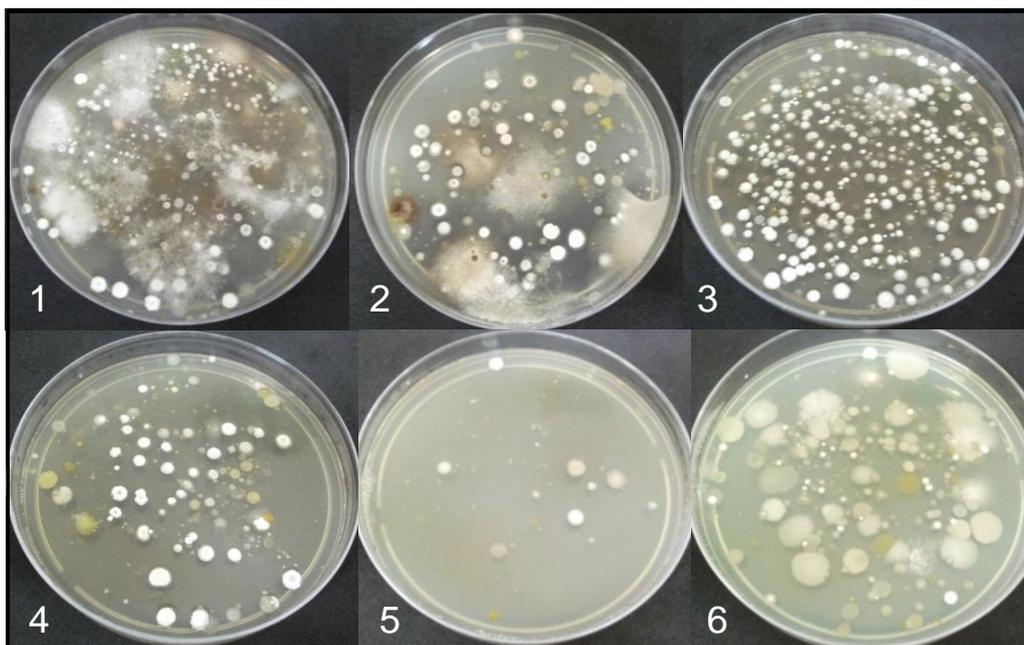


FIGURA 13: Semeadura das diluições seriadas da amostra de solo de *landfarming* em diferentes meios de cultura. (1) Meio ACA, diluição 10^{-2} ; (2) meio ACA, diluição 10^{-3} ; (3) meio ACA com Anfotericina B, diluição 10^{-2} ; (4) meio ACA com Anfotericina B, diluição 10^{-3} ; (5) meio ACA com Anfotericina B, diluição 10^{-4} ; (6) ágar nutriente, diluição 10^{-3} .

Pelo procedimento em que foram realizadas transferências sucessivas do inóculo e enriquecimento com B5, as sementeiras em ACA foram realizadas a cada sete dias de incubação. Houve crescimento de actinomicetos somente na amostragem anterior à primeira transferência, e devido ao acentuado número de colônias bacterianas, foram isolados somente oito actinomicetos. Este baixo número de colônias de actinomicetos pode ter resultado do acelerado crescimento de bactérias heterotróficas, uma vez que os actinomicetos apresentam um crescimento mais lento e podem não ter sido capazes de competir com as bactérias pela fonte de carbono disponível. Para otimizar o crescimento dos actinomicetos, poderia ser adicionado algum bacteriostático ao meio de cultura.

Balachandran et al. (2012) obtiveram um isolado de *Streptomyces* sp. após realização de sucessivas transferências de uma amostra de solo contaminado em meio nutriente enriquecido com 0,1% de naftaleno, fenantreno e óleo diesel. Com a finalidade de selecionar somente actinomicetos, as alíquotas das diluições foram semeadas em meio ágar amido caseína acrescido de dois antibióticos: actidiona, para inibir o crescimento de fungos, e ácido nalidíxico, para inibir o crescimento de bactérias.

No presente trabalho não foi possível isolar actinomicetos de solos oriundos de postos de combustível com histórico de contaminação, provavelmente devido à elevada profundidade (aproximadamente quatro metros) de onde foram coletadas as amostras. Segundo Iwai & Takahashi (1992), 80% dos actinomicetos de solo ocorrem na camada mais superficial (0-10 cm), diminuindo progressivamente com a profundidade.

As biopilhas são formadas com solo contaminado removido de postos de combustível, originalmente encontrado em profundidades de aproximadamente quatro metros. Portanto, apesar de as amostras terem sido coletadas de uma camada superficial das biopilhas, as poucas colônias de actinomicetos observadas em placas de ACA após diluição seriada das amostras provavelmente correspondem a actinomicetos de origem exógena, e por isso não foram utilizadas neste trabalho.

4.2 Identificação dos actinomicetos em nível de gênero

Os actinomicetos da coleção de culturas foram previamente identificados morfológicamente por Duarte et al. (2009), através de microcultivo.

Dos 35 isolados utilizados, 32 foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces* (Figura 14), considerando as características morfológicas das estruturas reprodutivas. Os demais isolados foram identificados como *Micromonospora* sp., *Nocardia* sp., e um não foi possível identificar com base nas características morfológicas.

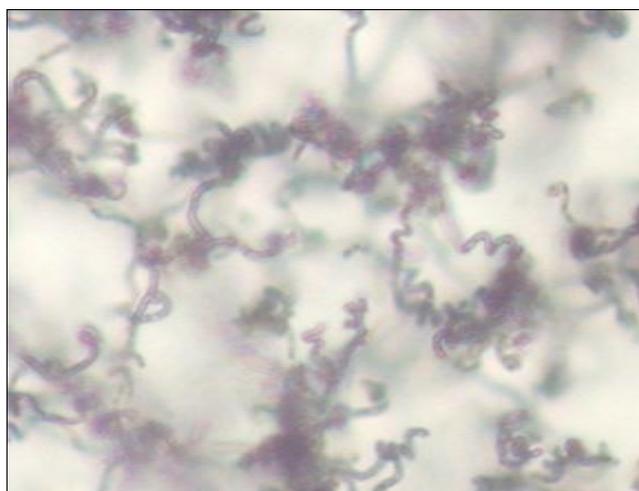


FIGURA 14: Demonstração de estruturas reprodutivas típicas de um isolado de *Streptomyces* sp., visualizadas em microscópio óptico (aumento de 400X).

A análise das características morfológicas dos 55 actinomicetos isolados de solo de *landfarming* possibilitou a identificação de 15 isolados como pertencentes ao gênero *Streptomyces* (Tabela 1). Os demais isolados apresentaram micélio aéreo, mas não foram observadas estruturas de esporulação características, o que tornou necessária a utilização de técnicas moleculares para permitir sua identificação em nível de gênero. As mesmas técnicas foram utilizadas para a confirmação da identificação morfológica dos 15 isolados de *Streptomyces* sp.

TABELA 1: Resultados das etapas utilizadas para identificação em nível de gênero dos actinomicetos provenientes de solo de *landfarming*.

Isolado	Identificação morfológica	Pares de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR			Identificação molecular
	Gênero	F243/R513	StrepB/StrepE	StrepB/StrepF	Gênero
L1.1	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.2	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.3	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.4	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.5	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.6	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.7	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.8	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.9	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.10	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.11	N.I.	+	+	-	N.I.
L1.12	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.13	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.14	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.15	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.16	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.17	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.18	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.19	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.20	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.21	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L1.22	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.1	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.2	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.3	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.4	N.I.	+	+	-	N.I.
L2.5	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.6	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.7	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.8	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.10	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.11	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.12	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L2.13	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L3.2	N.I.	+	-	-	N.I.
L3.3	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L3.4	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L3.5	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L3.7	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L4.1	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>

TABELA 1 (continuação): Etapas utilizadas para identificação dos actinomicetos provenientes de solo de *landfarming* em nível de gênero.

L4.2	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L4.4	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L5.1	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L5.2	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L5.3	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L5.4	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
L5.5	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
LB5.1	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
LB5.2	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
LB5.3	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
LB5.4	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
LB5.5	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
LB5.6	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
LB5.7	<i>Streptomyces</i>	+	+	+	<i>Streptomyces</i>
LB5.8	N.I.	+	+	+	<i>Streptomyces</i>

Em destaque, os isolados que não foram identificados em nível de gênero. N.I.: não identificado; (+) ocorreu amplificação; (-) não ocorreu amplificação; L1, L2, L3, L4 e L5: isolados na ausência de transferências e enriquecimento; LB5: isolados pelo procedimento em que foram realizadas transferências sucessivas do inóculo e enriquecimento com B5.

Antes da utilização de *primers* específicos para a confirmação e identificação do gênero *Streptomyces*, foi realizada a confirmação da ordem Actinomycetales. Os 55 isolados de solo de *landfarming* apresentaram produto de amplificação do tamanho esperado (302 pb) com a utilização dos *primers* F243 e R513 (Figura 15, Tabela 1), confirmando que todos são isolados de actinomicetos.

Oliveira (2003) testou espécies de bactérias Gram negativas e Gram positivas com a finalidade de avaliar a especificidade da reação em diferentes temperaturas de anelamento para os *primers* F243 e R513. Na temperatura de anelamento de 63°C, que foi utilizada neste trabalho, apenas o isolado pertencente à ordem Actinomycetales apresentou produto de amplificação,

confirmando que as condições de amplificação foram específicas para actinomicetos. Heuer et al. (1997) empregaram os *primers* F243 e R513 para detecção de actinomicetos no ambiente, e constataram que todos os actinomicetos testados apresentaram produto de amplificação.

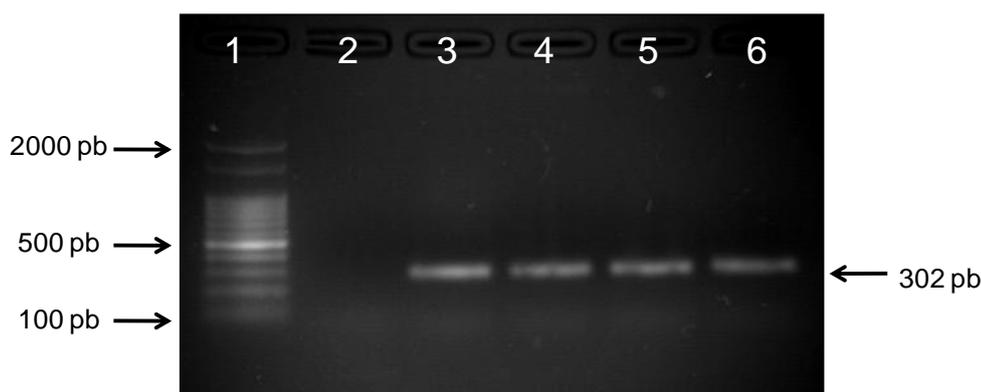


FIGURA 15: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela utilização dos *primers* F243 e R513. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; (2) branco (sem amostra); canaletas 3 a 6: isolados que apresentaram produto de amplificação (fragmento de 302 pb).

A utilização de *primers* específicos para a identificação do gênero *Streptomyces* possibilitou a confirmação do gênero dos 15 isolados identificados pela visualização das características morfológicas, e também a identificação de 37 isolados. Os 52 isolados mencionados apresentaram produtos de amplificação para os *primers* StrepB/StrepE (519 pb) (Figura 16) e para StrepB/StrepF (1074 pb) (Figura 17) (Tabela 1).

Rintala et al. (2001) constataram que as sequências dos *primers* StrepB, StrepE e StrepF alinharam perfeitamente com 96,5% de 229 sequências do DNAr 16S de *Streptomyces* disponíveis no banco de dados do GenBank e EMBL até fevereiro de 2001, e não apresentaram nenhum

alinhamento perfeito com sequências de bactérias que não fossem pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Quando testaram várias bactérias experimentalmente, somente as cepas de *Streptomyces* sp. apresentaram produtos de amplificação com a utilização dos *primers* StrepB/StrepE e StrepB/StrepF. Portanto, pode-se afirmar que os 52 isolados de *landfarming* que apresentaram produtos de amplificação com a utilização de ambos os pares de *primers* pertencem ao gênero *Streptomyces*. Salamoni (2005) utilizou estes mesmos pares de *primers* para confirmar a identificação morfológica de sete isolados de *Streptomyces* sp., e todos apresentaram produtos de amplificação. As bactérias utilizadas como controle negativo (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e o actinomiceto *Rhodococcus equi*) não apresentaram produto de amplificação.

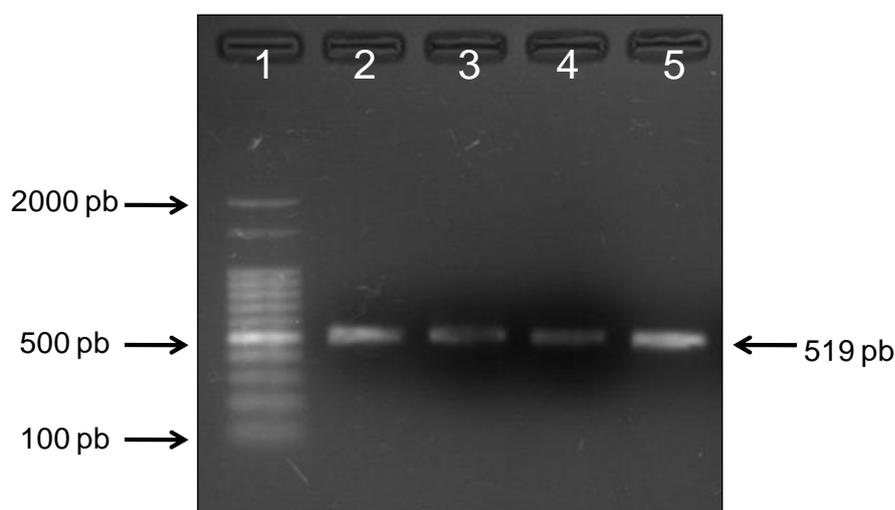


FIGURA 16: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela utilização dos *primers* StrepB e StrepE. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; canaletas 2 a 5: isolados que apresentaram produto de amplificação (fragmento de 519 pb).

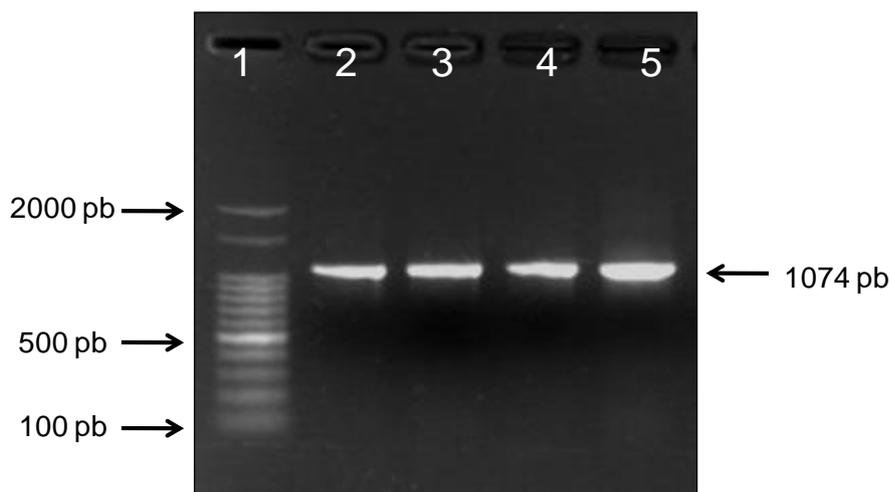


FIGURA 17: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela utilização dos *primers* StrepB e StrepF. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; canaletas 2 a 5: isolados que apresentaram produto de amplificação (fragmento de 1074 pb).

Dois isolados (L1.11 e L2.4) apresentaram produto de amplificação do tamanho esperado (519 pb) com a utilização dos *primers* StrepB/StrepE, mas o mesmo não ocorreu com a utilização dos *primers* StrepB/StrepF (Figura 18), e apenas um isolado (L3.2) não apresentou nenhum produto de amplificação com a utilização de ambos os pares de *primers* (Figura 18). Estes três isolados não foram identificados até o momento (Tabela 1).

Os resultados obtidos não permitem afirmar que os três isolados não identificados não pertencem ao gênero *Streptomyces*. Todas as cepas de *Streptomyces* sp. testadas experimentalmente por Rintala et al. (2001) apresentaram produto de amplificação com a utilização dos *primers* StrepB/StrepE e StrepB/StrepF, embora existam três espécies de *Streptomyces* (*S. megasporus*, *S. thermolineatus* e *S. macrosporus*) que muito provavelmente não apresentariam produto de amplificação com a utilização do *primer* StrepB devido à incompatibilidades entre as sequências de bases dos

primers com as sequências obtidas no GenBank. Uma cepa de *Kitasatospora setae* (família Streptomycetaceae) apresentou produto de amplificação do tamanho esperado (519 pb) com a utilização dos *primers* StrepB/StrepE, mas não houve amplificação com a utilização dos *primers* StrepB/StrepF (Rintala et al., 2001). Não é possível afirmar que os dois isolados de *landfarming* que apresentaram produto de amplificação somente com a utilização dos *primers* StrepB/StrepE pertencem ao gênero *Kitasatospora*, pois poderiam pertencer a outro gênero da família Streptomycetaceae.



FIGURA 18: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; canaletas 2 a 6: produtos de amplificação pela utilização dos *primers* F243 e R513; (7) branco (sem amostra); canaletas 8, 9, 10 e 12: produtos de amplificação pela utilização dos *primers* StrepB/StrepE; (13) branco (sem amostra); canaletas 14 e 18: produtos de amplificação pela utilização dos *primers* StrepB/StrepF; (19) branco (sem amostra). Canaletas 3, 9 e 15: isolado L1.11; canaletas 4, 10 e 16: isolado L2.4; canaletas 5, 11 e 17: isolado L3.2.

Do total de actinomicetos isolados de solo de *landfarming*, 94,5% foram identificados como *Streptomyces* sp. Neste trabalho, foram selecionadas para isolamento somente colônias crescidas em meio de cultura ACA e com aspecto pulverulento, características de bactérias que apresentam crescimento

filamentoso. Em decorrência da metodologia utilizada, obteve-se um predomínio do gênero *Streptomyces*, que além de ser mais comumente isolado de solos, apresenta um tempo de geração mais curto que outros actinomicetos quando crescidos em condições de laboratório.

Alguns gêneros de actinomicetos comumente isolados de solos impactados com hidrocarbonetos, como *Rhodococcus* e *Gordonia*, apresentam como uma das características colônias mucóides quando crescidas em meio sólido, semelhantes a colônias de bactérias heterotróficas, e por isso não foram selecionados para isolamento. Portanto, pode-se afirmar que as técnicas de cultivo subestimam a diversidade presente nos diferentes ambientes. Somente uma porção mínima, cerca de 1% dos microrganismos presentes no meio ambiente, podem ser cultivados através de técnicas padrão de cultivo e plaqueamento. Existem inúmeras razões para que isso ocorra, como, por exemplo, o uso de condições de crescimento ou nutrientes desfavoráveis e também a interdependência intrínseca de outros microrganismos (Pace, 1996; Rosado & Duarte, 2002).

4.3 Detecção do gene *alkB*

O gene *alkB* codifica uma enzima monoxigenase (alcano-hidroxilase) responsável pelo primeiro passo da degradação de alcanos. A presença deste gene foi avaliada nos 55 actinomicetos isolados de solo de *landfarming*, com a utilização de dois pares de *primers* distintos: Rhose/Rhoas e ALK-F/ALK-R.

Nenhum isolado apresentou produto de amplificação com a utilização dos *primers* Rhose/Rhoas, mesmo quando testadas temperaturas de

anelamento inferiores a 52°C. Estes *primers* foram desenhados para anelar preferencialmente com actinomicetos do gênero *Rhodococcus*, mas também anelam com espécies de *Gordonia* e *Mycobacterium* (Heiss-Blanquet et al., 2005). Os resultados obtidos indicam que este par de *primers* é altamente específico para *Rhodococcus* sp. e gêneros intimamente relacionados.

Três isolados identificados como *Streptomyces* sp. (L1.17, L2.8 e L3.4) apresentaram produto de amplificação com a utilização dos *primers* ALK-F e ALK-R, embora o isolado L1.17 tenha apresentado um fragmento de 500-550 pb, cujo tamanho é maior que o esperado (330 pb) (Figura 19).

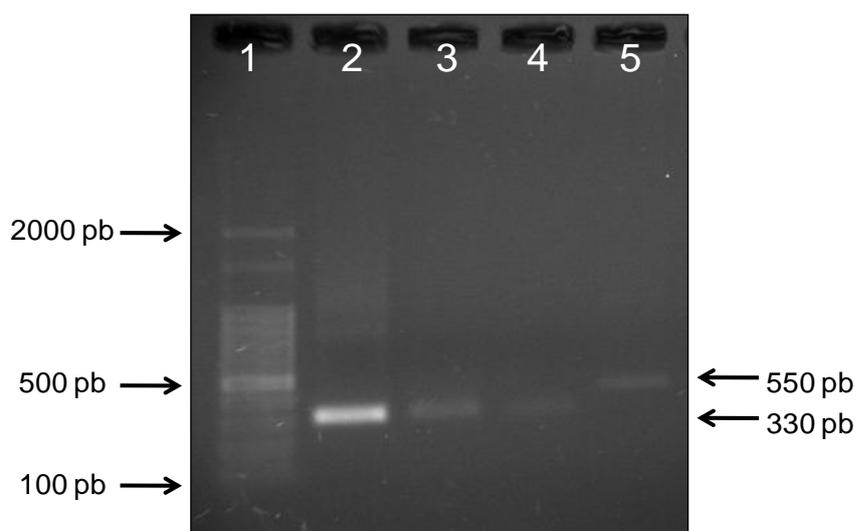


FIGURA 19: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação pela utilização dos *primers* ALK-F e ALK-R (gene *alkB*) (1) Marcador molecular Ladder 100 pb; (2) Controle positivo (*Pseudomonas aeruginosa*); (3) isolado L2.8; (4) isolado L3.4; (5) isolado L1.17.

Saadoun et al. (2008) testaram 16 *Streptomyces* sp. isolados de solo impactado com hidrocarbonetos, e constataram que seis isolados apresentaram produto de amplificação com a utilização dos *primers* ALK-F e

ALK-R. Os produtos de PCR foram divididos em dois grupos: fragmentos de 320-330 pb, como relatado por Kohno et al. (2002) e fragmentos de 460-550 pb, obtidos por Saadoun et al. (2008). Os fragmentos maiores podem indicar um anelamento inespecífico dos *primers*, ou então uma diferente forma do gene *alkB*.

Quatrini et al. (2007) utilizaram pares de *primers* altamente degenerados, com o objetivo de detectar diferentes genes *alkB* em bactérias Gram positivas capazes de degradar n-alcanos. Múltiplas formas do gene *alkB* foram detectadas no isolado de *Nocardia* sp., e apenas um gene *alkB* foi encontrado em isolados de *Rhodococcus* sp. e *Gordonia* sp. Heiss-Blanquet et al. (2005) detectaram a presença de quatro diferentes genes *alkB* em uma cepa de *Rhodococcus* sp. e de dois diferentes genes *alkB* em uma cepa de *Rhodococcus opacus*. A presença de múltiplos genes *alkB* é bastante frequente, principalmente em bactérias Gram positivas (Van Beilen et al., 2002).

4.3.1 Caracterização molecular dos isolados que apresentaram o gene *alkB*

As sequências de uma região do DNAr 16S dos três isolados de *Streptomyces* sp. que apresentaram o gene *alkB* foram comparadas com sequências de referência encontradas no GenBank até abril de 2011, através da realização de um alinhamento direcionado com alta similaridade ao gênero *Streptomyces* pela utilização do NCBI/BLAST.

Os isolados L1.17, L2.8 e L3.4 foram identificados como *Streptomyces* sp., pois foram encontrados valores similares de identidade com

várias espécies de *Streptomyces*, impossibilitando a identificação em nível de espécie.

4.4 Biodegradação de combustíveis e atividade enzimática

4.4.1 Crescimento em diesel (B0) e relação com a presença do gene *alkB*

Os actinomicetos que apresentaram crescimento em meio sólido com diesel (B0), mesmo que não tenha sido muito superior quando visualmente comparado com o crescimento no controle negativo (sem óleo), e aqueles que apresentaram o gene *alkB* com a utilização dos *primers* ALK-F e ALK-R estão demonstrados na Tabela 2.

TABELA 2: Isolados em que foi observado crescimento em meio sólido com diesel (B0) e isolados que apresentaram o gene *alkB* com a utilização dos *primers* ALK-F/ALK-R.

Isolados	Crescimento em diesel (B0)	Presença do gene <i>alkB</i>
L1.17	-	+
L1.21	+	-
L1.22	+	-
L2.8	-	+
L3.4	+	+

Apenas um isolado (L3.4, identificado como *Streptomyces* sp.) que apresentou o gene *alkB* foi capaz de crescer no diesel (B0). Dois isolados (L1.21 e L1.22) que cresceram no diesel não apresentaram o gene *alkB*, e dois isolados (L1.17 e L2.8) que apresentaram o gene não foram capazes de expressá-lo.

Saadoun et al. (2008) detectaram a presença do gene *alkB* em seis isolados, mas somente três foram capazes de degradar diesel. Os autores sugerem que os isolados que têm o gene *alkB* mas que não cresceram no diesel podem apresentar um gene similar ao *alkB* mas não funcional, ou que pode ter ocorrido um anelamento inespecífico dos *primers* ALK-F e ALK-R. Dos três isolados capazes de crescer no diesel, dois apresentaram fragmentos de 320 pb, e um apresentou um fragmento de 550 pb, o que indica que fragmentos de diferentes tamanhos podem corresponder a diferentes genes funcionais.

Os mesmos autores também obtiveram um isolado capaz de crescer no diesel que não apresentou o gene *alkB*, da mesma forma que os isolados L1.21 e L1.22 (Tabela 2). O gene *alkB* codifica enzimas responsáveis pela degradação da fração alifática do diesel, portanto poderia estar ocorrendo degradação da fração aromática. Entretanto, não é possível afirmar que estes isolados não apresentam o gene *alkB*. Espécies distintas podem apresentar diferentes formas do gene (Smits et al., 1999) e existem diferentes tipos de alcano-hidroxilases, de acordo com o tamanho da cadeia carbônica do alcano degradado e do tipo de degradação (terminal, subterminal ou biterminal) (Figura 4). Portanto, poderiam ser obtidos produtos de amplificação com a utilização de *primers* diferentes dos utilizados.

Vomberg & Klinner (2000) demonstraram, pela utilização de quatro pares de *primers* distintos em bactérias Gram negativas e Gram positivas capazes de degradar n-alcanos, que os resultados obtidos podem diferir conforme os *primers* utilizados. Alguns isolados testados apresentaram produto

de amplificação com a utilização de apenas um dos quatro pares de *primers*. Portanto, dependendo da escolha dos *primers*, poderiam ser obtidos resultados falso-negativos, indicando ausência do gene *alkB* em microrganismos que o possuem.

4.4.2 Comparação entre isolados de solo impactado e de solo não impactado

Com a finalidade de verificar se há alguma diferença entre o potencial de degradação de combustíveis por actinomicetos provenientes de solo sem histórico de contaminação e provenientes de solo impactado com hidrocarbonetos de petróleo, foram realizadas comparações entre os resultados das avaliações com o indicador redox DCPIP (Figura 20), crescimento em meio sólido com misturas de diesel e biodiesel (Figura 21) e atividade das enzimas lipase e esterase pela formação de halos de hidrólise (Figura 22). Os experimentos foram realizados com todos os isolados de actinomicetos utilizados neste trabalho.

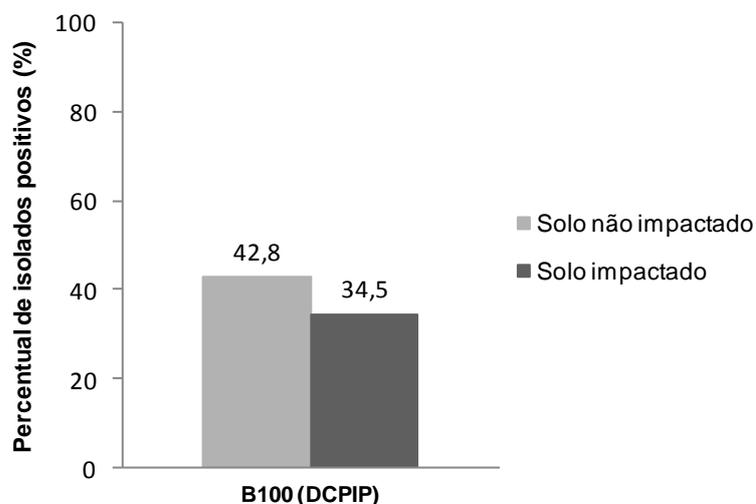


FIGURA 20: Percentual de actinomicetos capazes de oxidar o biodiesel (B100) em MM1 com indicador redox DCPIP em até cinco dias.

Com a utilização do indicador redox DCPIP, não foi possível detectar nenhum isolado capaz de degradar diesel (B0) nem a mistura B10. Mesmo os isolados provenientes de solo de *landfarming*, que recebe resíduos petroquímicos há 26 anos, apresentaram resultados positivos apenas na presença de biodiesel (B100) (Figura 20). Portanto, pela utilização deste método, o perfil dos actinomicetos de solo não impactado foi bastante semelhante ao de actinomicetos de solo impactado.

Mariano et al. (2008) constataram que dois consórcios microbianos, um proveniente de amostra de solo de posto de combustível e outro de uma área não contaminada, apresentaram um perfil semelhante quanto ao tempo necessário para degradação de misturas de diesel e biodiesel, pois para ambos os consórcios o tempo necessário para que ocorresse a mudança de coloração do DCPIP diminuiu conforme o aumento do percentual de biodiesel adicionado ao diesel. Junior et al. (2009), em um estudo com *Candida viswanathii* isolada de sistema de tratamento de efluentes de uma refinaria de petróleo, também

constataram que quanto maior a concentração de biodiesel na mistura, menor o tempo necessário para que ocorra a mudança de coloração do DCPIP. Estes resultados indicam que os microrganismos estudados, mesmo que isolados de ambientes com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, degradam preferencialmente o biodiesel.

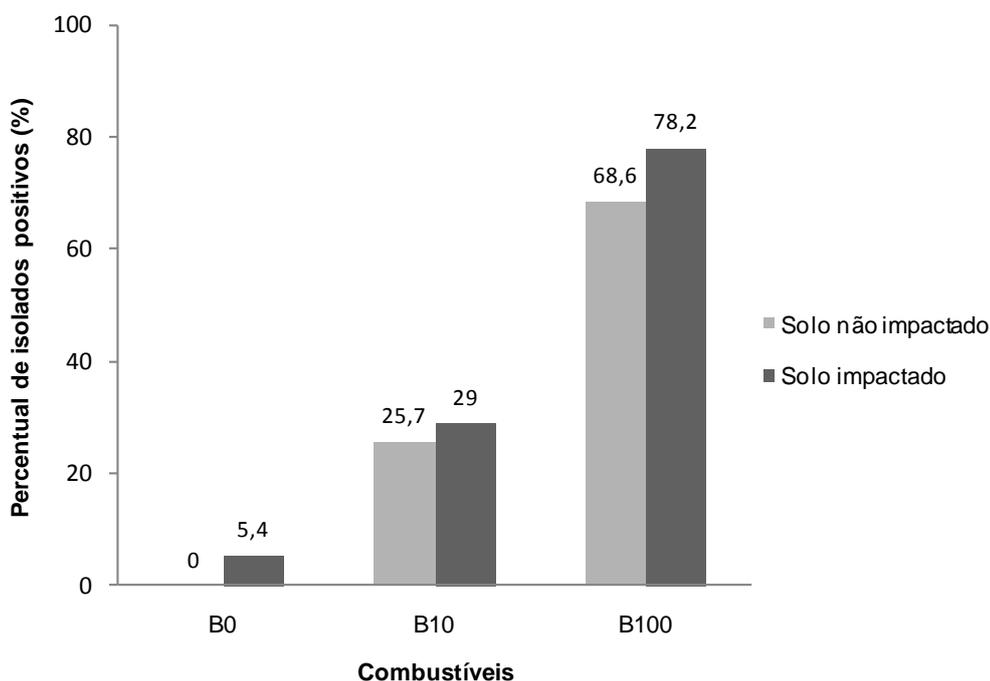


FIGURA 21: Percentual de actinomicetos que apresentaram crescimento em meio sólido com óleo (B0, B10 e B100) superior ao controle negativo (sem óleo).

Pela visualização do crescimento em meio sólido e comparação do crescimento com um controle negativo (sem óleo), os isolados de solo não impactado novamente apresentaram um perfil semelhante aos de solo impactado, com um maior número de isolados capazes de degradar biodiesel (B100) em comparação à mistura B10 e ao diesel puro (B0). A degradação de diesel (B0) foi observada apenas em isolados de solo de *landfarming* (Figura

21), apesar de pouco crescimento quando visualizado em placa. Quatrini et al. (2007) afirmaram que o método por comparação visual do crescimento pode superestimar a quantidade de microrganismos degradadores devido ao crescimento semelhante em meio sem fonte de carbono (controle negativo). Microrganismos não degradadores podem crescer em meio com diesel porque pode haver a presença de traços de carbono até mesmo em ágar purificado (Van Hamme et al., 2003).

Com a utilização deste método, além da determinação da quantidade de isolados capazes de degradar os combustíveis, foi possível observar pela comparação visual do crescimento que tanto os actinomicetos isolados de *landfarming* quanto os isolados de solo sem histórico de contaminação apresentaram um maior crescimento em biodiesel (B100), seguido pela mistura B10 e pelo diesel puro (B0). Zhang et al. (1998) e Pasqualino et al. (2006) demonstraram que o biodiesel e as misturas de diesel e biodiesel são degradadas mais facilmente e mais rapidamente que o óleo diesel. Isto ocorre porque o biodiesel apresenta dois átomos de oxigênio no final das cadeias carbônicas dos ácidos graxos, o que torna mais fácil o reconhecimento por enzimas comumente produzidas pelos microrganismos, como lipases e esterases. As cadeias carbônicas do óleo diesel não apresentam átomos de oxigênio, portanto sua degradação depende de microrganismos capazes de produzir enzimas específicas que reconheçam essas moléculas.

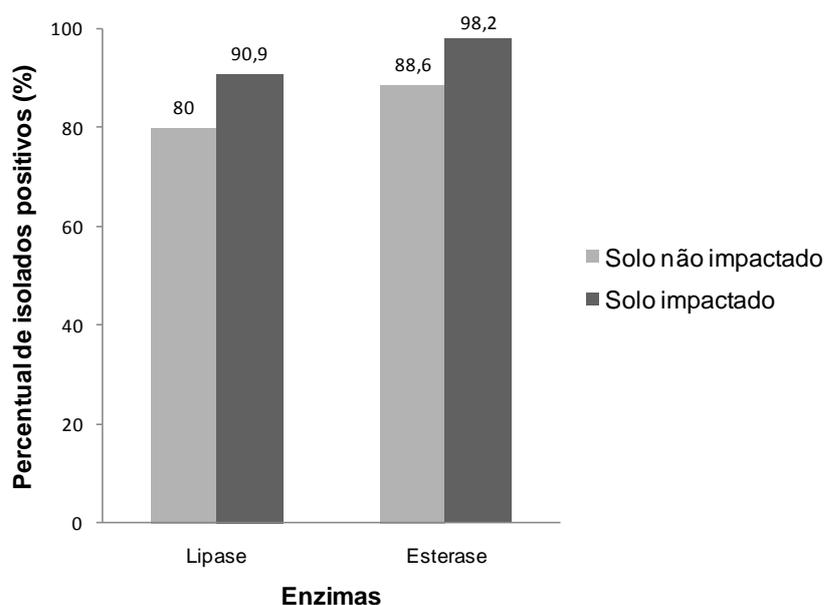


FIGURA 22: Percentual de actinomicetos que apresentaram resultado positivo para as enzimas lipase e esterase pelo método da hidrólise em placa.

A produção das enzimas lipase e esterase foi observada para a maioria dos isolados testados, tanto de solo não impactado quanto de solo de *landfarming* (Figura 22). Este resultado corrobora com o alto percentual de isolados capazes de degradar biodiesel (B100) quando adicionado ao meio de cultura como única fonte de carbono. Entretanto, alguns isolados capazes de degradar biodiesel não produziram lipases (Tabela 4), provavelmente devido à baixa sensibilidade do método utilizado (Singh et al., 2006). É possível que nos casos em que não foi observada geração de fluorescência tenha ocorrido a degradação do substrato, mas com uma atividade tão baixa que impossibilitou sua detecção (Hartmann, 2007).

4.4.3 Seleção de potenciais degradadores

4.4.3.1 Pré-seleção pelo indicador redox DCPIP

A pré-seleção de actinomicetos capazes de degradar misturas de diesel e biodiesel foi realizada com a utilização do indicador redox DCPIP. O tempo necessário para o esgotamento total das reservas foi padronizado em cinco dias, para garantir que a mudança de coloração do MM1 com o indicador redox ocorresse somente pela utilização do óleo. Foram testados os 35 isolados da coleção de culturas, provenientes de solo sem histórico de contaminação, e os 55 isolados de solo de *landfarming*. Os isolados capazes de oxidar o óleo em MM1 com DCPIP em até 72 horas estão demonstrados na Tabela 3. A mudança de coloração do MM1 ocorreu apenas em biodiesel (B100). Em um período de cinco dias, nenhum dos isolados testados foi capaz de oxidar o diesel (B0) nem a mistura B10. Portanto, a utilização deste método possibilitou a seleção de isolados pelo tempo necessário para a mudança de coloração do MM1 com B100. Foram selecionados para posteriores análises cinco isolados da coleção de culturas e quatro isolados de solo de *landfarming*, todos capazes de oxidar o B100 em 24 h (Tabela 3).

TABELA 3: Isolados que obtiveram resultado positivo para a redução do DCPIP na presença de biodiesel (B100) em até 72 horas.

Solo não impactado			
Isolado	DCPIP (B100)		
	24h	48h	72h
A3.1	+		
A3.3	+		
A3.4			+
A3.5			+
A3.6		+	
A3.7		+	
A3.8			+
A3.20	+		
A3.23	+		
A3.31			+
MS.2	+		
Solo impactado			
Isolado	DCPIP (B100)		
	24h	48h	72h
L1.1		+	
L1.2		+	
L1.3			+
L1.4	+		
L1.5			+
L1.7	+		
L1.10		+	
L1.16		+	
L1.18		+	
L1.22		+	
L2.2		+	
L2.6			+
L3.7		+	
L4.2			+
LB5.1	+		
LB5.2	+		
LB5.3			+
LB5.4			+

Em destaque, os isolados pré-selecionados, que foram capazes de oxidar o biodiesel (B100) em 24 horas.

Saadoun et al. (2008) obtiveram três isolados de *Streptomyces* sp. capazes de oxidar diesel em meio mineral com DCPIP em um período de 6 horas. Junior et al. (2009) observaram, em estudo com a levedura *C. viswanathii*, que ocorreu mudança de coloração do DCPIP em 8 horas na

presença de biodiesel (B100), e este tempo aumentou para 29 horas na presença de diesel (B0). Meyer (2011), em estudo com 10 bactérias heterotróficas em meio mineral com os indicadores redox DCPIP e TTC na presença de biodiesel (B100), verificou que cinco isolados causaram mudança de coloração do meio mineral com DCPIP em 48 horas, e nove isolados causaram mudança de coloração do meio mineral com TTC em 24 horas. Este resultado demonstra uma maior sensibilidade do TTC em comparação com o DCPIP, pois os mesmos cinco isolados em que foram necessárias 48 horas para observar a oxidação do biodiesel em DCPIP apresentaram resultado positivo em 24 horas quando utilizado o TTC nas mesmas condições de crescimento.

No presente trabalho, o indicador redox TTC não foi eficiente para a seleção de potenciais degradadores, provavelmente devido ao crescimento lento dos actinomicetos quando comparados com bactérias heterotróficas. Por apresentar maior sensibilidade que o indicador redox DCPIP, seriam necessários pelo menos 10 dias de incubação dos isolados de actinomicetos em meio mineral sem óleo para que ocorresse o esgotamento total das reservas, sendo que o tempo normalmente utilizado para o esgotamento das reservas de bactérias é de 24 horas (Schultz, 2010; Meyer, 2011). Transcorridos 10 dias, há uma considerável diminuição do número de células viáveis, o que dificultaria a oxidação da fonte de carbono disponível. Quando realizada a adição de TTC em um período inferior a 10 dias, foi possível observar a mudança de coloração do meio mineral para rosa mesmo sem a adição de fonte de carbono (controle negativo sem óleo). Portanto, caso o

tempo para esgotamento das reservas fosse inferior a 10 dias, a mudança de coloração do MM1 com a fonte de carbono não seria um resultado positivo confiável. Uma alternativa ao método utilizado seria a substituição do MM1 por água destilada, que poderia resultar em uma redução do tempo necessário para o esgotamento total das reservas.

4.4.3.2 Seleção pela avaliação do crescimento em meio sólido e avaliação da atividade enzimática

Os isolados previamente selecionados foram avaliados quanto à sua capacidade de degradação de misturas de diesel e biodiesel em meio sólido e quanto à produção das enzimas lipase e esterase pelo método da hidrólise em placa. Os resultados estão demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4: Crescimento em meio sólido com óleo e produção das enzimas lipase e esterase.

Solo não impactado					
Isolado	Crescimento em meio sólido			Enzimas	
	B0	B10	B100	Lipase	Esterase
A3.1	-	-	+	+	+
A3.3*	-	+	+	+	+
A3.20	-	-	+	-	+
A3.23	-	-	+	-	+
MS.2	-	-	-	-	+
Solo impactado					
Isolado	Crescimento em meio sólido			Enzimas	
	B0	B10	B100	Lipase	Esterase
L1.4	-	+	+	+	+
L1.7	-	-	+	+	+
LB5.1	-	-	+	+	+
LB5.2*	-	+	+	+	+

Em destaque, os isolados que foram capazes de crescer em B10 e B100, e que produziram as enzimas lipase e esterase. *Isolados selecionados para o ensaio de biodegradabilidade de B100 em meio líquido.

Três isolados foram capazes de crescer na presença de B10 e B100 em meio sólido e apresentaram resultado positivo para as enzimas lipase e esterase. Entretanto, apenas dois isolados foram escolhidos para a realização do ensaio de biodegradabilidade de óleo em meio líquido: A3.3, proveniente de solo não impactado, e LB5.2, proveniente de solo de *landfarming* (Tabela 4), devido ao maior crescimento destes isolados em meio sólido quando realizada a comparação visual com o crescimento do isolado L1.4. Os dois isolados selecionados foram identificados como *Streptomyces* sp.

O ensaio em meio líquido foi realizado somente com biodiesel (B100) devido à impossibilidade de oxidação do diesel (B0) e da mistura B10 pelos isolados em MM1 com DCPIP (Tabela 3), e além disso devido ao crescimento em meio sólido ter sido muito superior em B100 quando feita a comparação visual com a mistura B10.

4.4.4 Ensaio de biodegradabilidade do biodiesel (B100) em meio líquido

4.4.4.1 Ensaio preliminar

Através da realização do ensaio preliminar foi possível determinar o percentual de biodiesel mais adequado a ser utilizado nas curvas de crescimento, com a finalidade de otimizar o crescimento dos isolados de actinomicetos. Os resultados da quantificação da biomassa dos isolados A3.3 e LB5.2 (*Streptomyces* sp.) em diferentes percentuais de óleo estão representados na Figura 23.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os percentuais de óleo testados. Portanto, o critério para seleção dos percentuais a serem utilizados nas curvas de crescimento foi a escolha, para cada isolado, do percentual no qual foi obtida a maior média. O isolado A3.3 apresentou maior formação de biomassa (média de 37,2 mg) quando crescido com 2% de biodiesel, e o isolado LB5.2 apresentou maior formação de biomassa (média de 35,2 mg) quando foi utilizado 1% de biodiesel. Estes foram os percentuais selecionados para a realização das curvas de crescimento, com o objetivo de obter os maiores valores de biomassa possíveis para cada isolado.

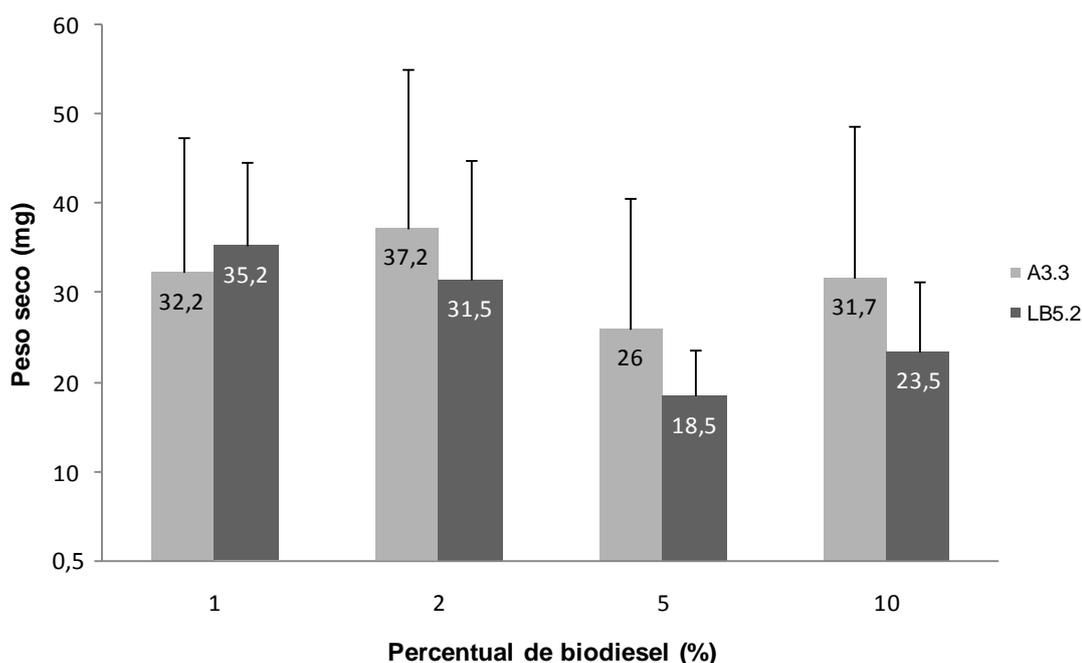


FIGURA 23: Avaliação da quantificação da biomassa dos isolados A3.3 e LB5.2 (*Streptomyces* sp.) crescidos em diferentes percentuais de biodiesel (B100), sob incubação a 30°C na ausência de agitação, após 28 dias.

Em ensaios de biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel em meio líquido por bactérias isoladas de solo de *landfarming*, Schultz (2010) e

Meyer (2011) utilizaram 1% de óleo. Saadoun et al. (2008) trabalharam com o percentual de 0,05% de diesel em meio mineral para a determinação de biomassa de *Streptomyces* spp. isolados de solo impactado.

Bücker (2009) utilizou MM1 e óleo na proporção de 1:1 para avaliar o crescimento de fungos filamentosos provenientes de tanque de armazenamento de óleo diesel e de amostra de biodiesel de soja. Condições semelhantes poderiam inibir o crescimento de actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces*, pois todas as espécies são aeróbias estritas (Holt et al., 1994). A utilização de um alto percentual de óleo poderia impedir a difusão de oxigênio, causando inibição do crescimento dos isolados.

4.4.4.2 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento dos isolados A3.3 (crescido em 2% de biodiesel) e LB5.2 (crescido em 1% de biodiesel) estão representadas na Figura 24. Observa-se que o isolado A3.3 obteve maiores valores de biomassa em todos os tempos avaliados, e após 28 dias de incubação o valor médio de biomassa foi de 27 mg. O isolado LB5.2 apresentou um crescimento mais lento, e após 28 dias o valor médio de biomassa foi de 14,7 mg. Os resultados não foram comparados através de análise estatística devido às diferentes condições de incubação (utilização de percentuais de óleo distintos) às quais foram submetidos os dois isolados.

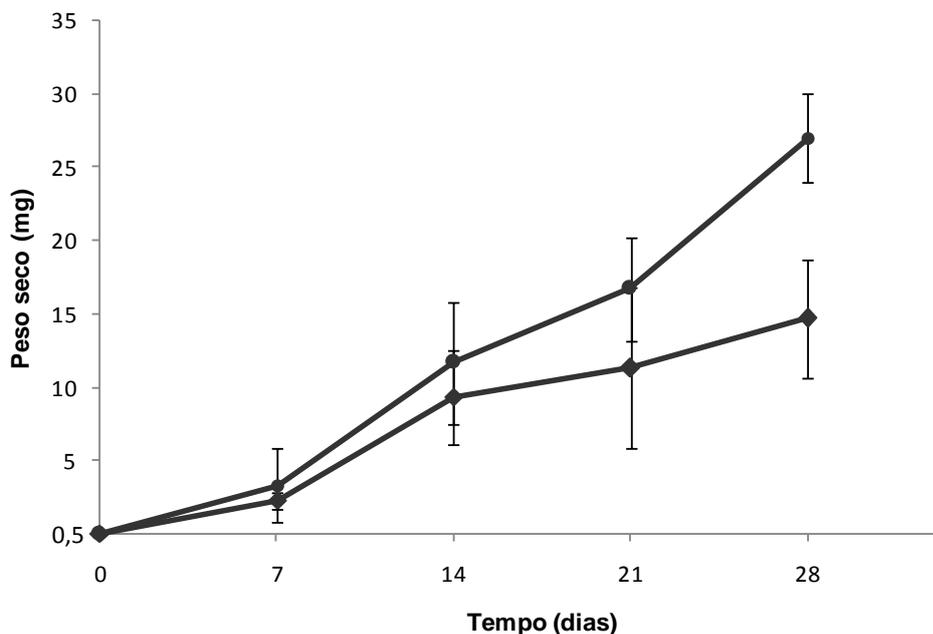


FIGURA 24: Curva de crescimento dos isolados A3.3 (●), crescido em 2% de biodiesel, e LB5.2 (◆), crescido em 1% de biodiesel, sob incubação a 30°C na ausência de agitação, por 28 dias.

Saadoun et al. (2008) quantificaram a biomassa de três isolados de *Streptomyces* sp. capazes de crescer em meio mineral suplementado com 0,05% de óleo diesel como única fonte de carbono. Utilizaram um pré-inóculo de 3 mg de células, e no 28º dia do experimento os valores de biomassa não superaram 4 mg, para nenhum dos isolados testados.

Bücker (2009), em ensaio de biodegradação de diesel (B0) em meio líquido, obteve valores médios de biomassa de aproximadamente 35 mg para o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* e por volta de 30 mg para o fungo filamentoso *Paecilomyces* sp., após incubação por um período de 28 dias. Nas mesmas condições de crescimento, mas substituindo-se o diesel pelo biodiesel (B100), os valores médios de biomassa aumentaram para aproximadamente 90 mg para *A. fumigatus* e 85 mg para *Paecilomyces* sp. Foi possível verificar,

portanto, que o biodiesel favoreceu a formação de biomassa dos fungos testados.

4.4.4.3 Produção de biossurfactantes

As variações das medidas de tensão superficial da fase aquosa do cultivo dos isolados A3.3 e LB5.2 estão representadas nas Figuras 25 e 26. Devido ao fato do crescimento dos isolados ter ocorrido em percentuais de óleo diferentes, cada isolado foi comparado com seu respectivo controle negativo.

Até o 14^o dia de incubação, ocorreu redução da tensão superficial tanto na fase aquosa em que houve crescimento do isolado A3.3 quanto na fase aquosa do controle negativo, em que não houve adição de inóculo. Nos subsequentes períodos de monitoramento, a tensão superficial da fase aquosa do isolado A3.3 continuou diminuindo, enquanto que a fase aquosa do controle negativo obteve medidas superiores à medida do 14^o dia. Os valores de tensão superficial nos tempos 21 e 28 diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre a fase aquosa do cultivo do isolado A3.3 e o controle negativo. No 28^o dia de incubação, os valores médios de tensão superficial foram de 42,4 mN.m⁻¹ para o controle negativo e de 33,6 mN.m⁻¹ para o isolado A3.3, o que demonstra que no final do experimento a tensão superficial da fase aquosa do cultivo do isolado A3.3 foi reduzida em 8,8 unidades em relação ao controle negativo.

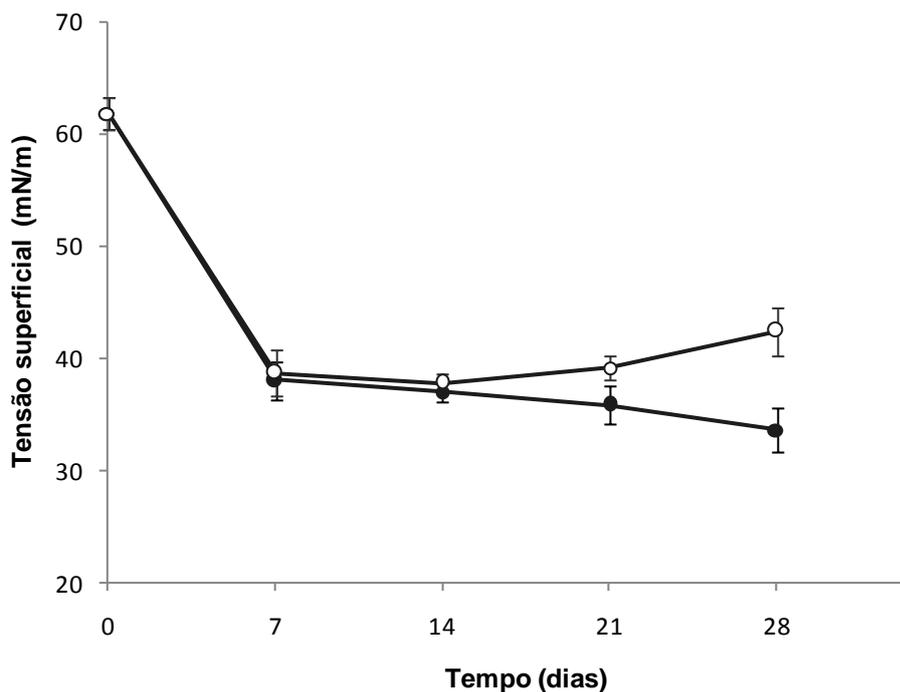


FIGURA 25: Medidas da tensão superficial da fase aquosa do cultivo do isolado A3.3 em MM1 com 2% de biodiesel (B100), por 28 dias a 30°C. (●) Tensão superficial da fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto; (○) Tensão superficial da fase aquosa sem inóculo (controle negativo).

Os valores médios de tensão superficial da fase aquosa do isolado LB5.2 e de seu controle negativo foram bastante semelhantes aos obtidos para o isolado A3.3. Houve diferença significativa entre a fase aquosa do cultivo do isolado LB5.2 e o controle negativo nos mesmos períodos de monitoramento em que houve diferença para o isolado A3.3 (T21 e T28). No 28º dia de incubação, os valores de tensão superficial foram de 38,9 mN.m⁻¹ para o controle negativo e de 33,5 mN.m⁻¹ para o isolado LB5.2, com uma redução de 5,4 unidades em relação ao controle negativo.

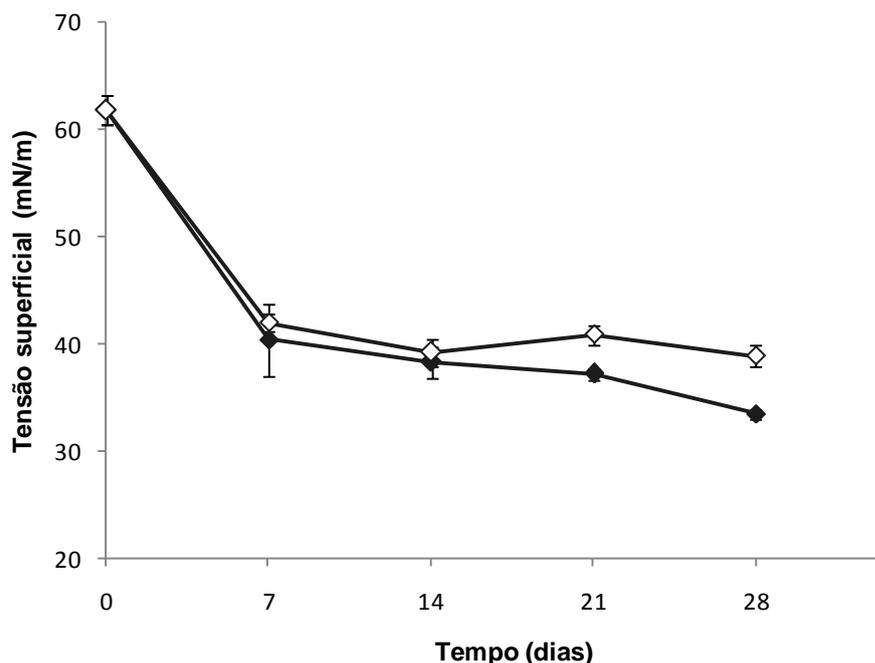


FIGURA 26: Medidas da tensão superficial da fase aquosa do cultivo do isolado LB5.2 em MM1 com 1% de biodiesel (B100), por 28 dias a 30°C. (◆) Tensão superficial da fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto; (◇) Tensão superficial da fase aquosa sem inóculo (controle negativo).

Provavelmente, a redução da tensão superficial da fase aquosa dos isolados A3.3 e LB5.2 em comparação aos controles negativos tem relação com o aumento dos valores de biomassa durante o período de incubação (Figura 24).

Segundo Silva & Alvarez (2002), os microrganismos capazes de reduzir a tensão superficial de 72 mN.m^{-1} (medida de tensão superficial da água) para a faixa de 35 mN.m^{-1} a 40 mN.m^{-1} podem ser considerados bons produtores de biossurfactantes, e valores abaixo de 35 mN.m^{-1} indicam que o microrganismo pode ser considerado um eficiente produtor. Entretanto, os ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel podem formar associações ordenadas na interface óleo-água e reduzirem a tensão superficial tal qual um

surfactante (Nitschke & Pastore, 2002). Para os controles negativos dos isolados A3.3 e LB5.2, em que não houve adição de microrganismo, foi constatada diferença significativa entre os valores médios de tensão superficial do início do experimento (T0) e após uma semana de incubação (T7). Estes valores foram muito próximos aos obtidos nas fases aquosas em que houve crescimento dos isolados (Figuras 25 e 26). Portanto, pode-se afirmar que nas duas primeiras semanas de incubação, em que não houve diferença significativa entre os valores obtidos com crescimento de microrganismo e sem inóculo, a redução da tensão superficial está sendo causada apenas pelo biodiesel.

Segundo Willumsem & Karlson (1997), um bom biossurfactante é capaz de reduzir a medida da tensão superficial do meio em 20 unidades. Nos tempos 21 e 28, nos quais a redução da tensão superficial foi causada pela presença dos actinomicetos, houve redução de um número inferior a 10 unidades das medidas de tensão superficial em comparação com os controles negativos, o que indica que os isolados não produziram biossurfactantes de baixo peso molecular. Thampayak et al. (2008) constataram que três actinomicetos isolados de solo, pertencentes ao gênero *Streptomyces*, foram capazes de reduzir a tensão superficial após cinco dias de crescimento em meio contendo 3% de óleo de gergelim. Os valores obtidos foram de 41, 42 e 55 mN.m⁻¹.

Não foi observada formação de emulsificação da fase oleosa adicionada à fase aquosa dos cultivos dos isolados A3.3 e LB5.2 nem dos controles negativos em que não houve adição de inóculo. Portanto, não foi

possível calcular o índice de emulsificação (IE_{24}), o que indica que os actinomicetos testados não são produtores de moléculas bioemulsificantes. Thampayak et al. (2008), em estudo com três isolados de *Streptomyces* sp., obtiveram valores de emulsificação de 66, 55 e 48% a partir da emulsão da querosene em meio de cultura livre de células, indicando que houve produção de moléculas bioemulsificantes extracelulares.

4.4.4.4 Detecção de metabólitos

As variações das medidas de pH da fase aquosa do cultivo dos isolados A3.3 e LB5.2 estão representadas nas Figuras 27 e 28. Para ambos os isolados e seus controles negativos (sem inóculo), os valores de pH durante todos os tempos de monitoramento foram superiores ao valor de pH inicial de 7,3.

Foi constatada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos T0 e T7, T0 e T14 e T0 e T21 do controle negativo (sem inóculo) do isolado A3.3. Os valores de pH da fase aquosa na qual ocorreu crescimento deste mesmo isolado diferiram significativamente do controle negativo nos tempos T21 e T28, o que indica que o aumento do pH do meio mineral foi influenciada pela presença de crescimento microbiano apenas nas duas últimas semanas do experimento. Os valores médios de pH após 28 dias de incubação foram de 7,43 para a fase aquosa do isolado A3.3 e 7,32 para o seu controle negativo (Figura 27).

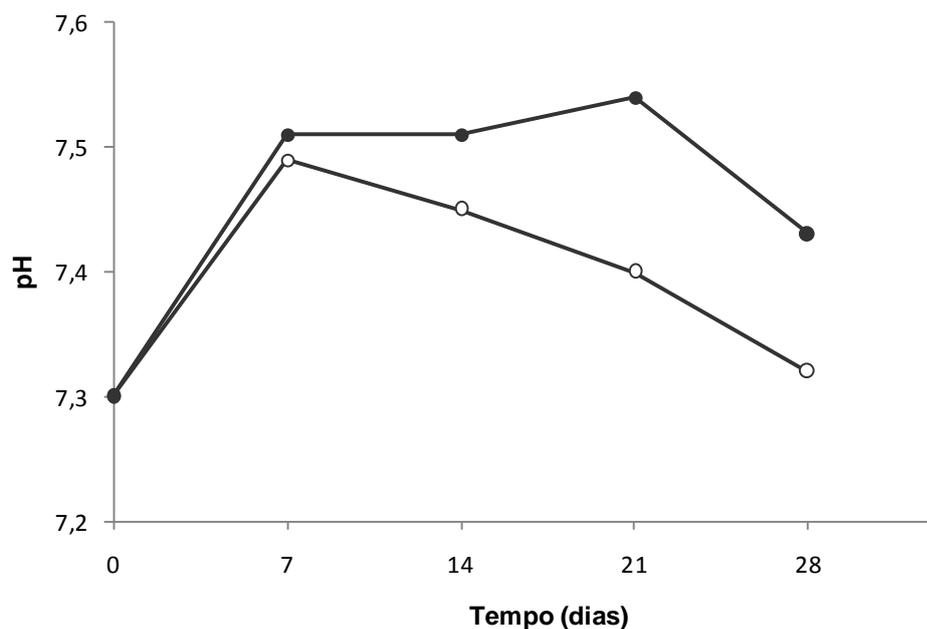


FIGURA 27: Medidas de pH da fase aquosa do cultivo do isolado A3.3 em MM1 com 2% de biodiesel (B100), por 28 dias a 30°C. (●) pH da fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto; (○) pH da fase aquosa sem inóculo (controle negativo).

Os valores de pH da fase aquosa do cultivo do isolado LB5.2 não diferiram significativamente em comparação com seu controle negativo. Os valores médios de pH no tempo T28 foram de 7,44 para a fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto e 7,41 para seu controle negativo (Figura 28).

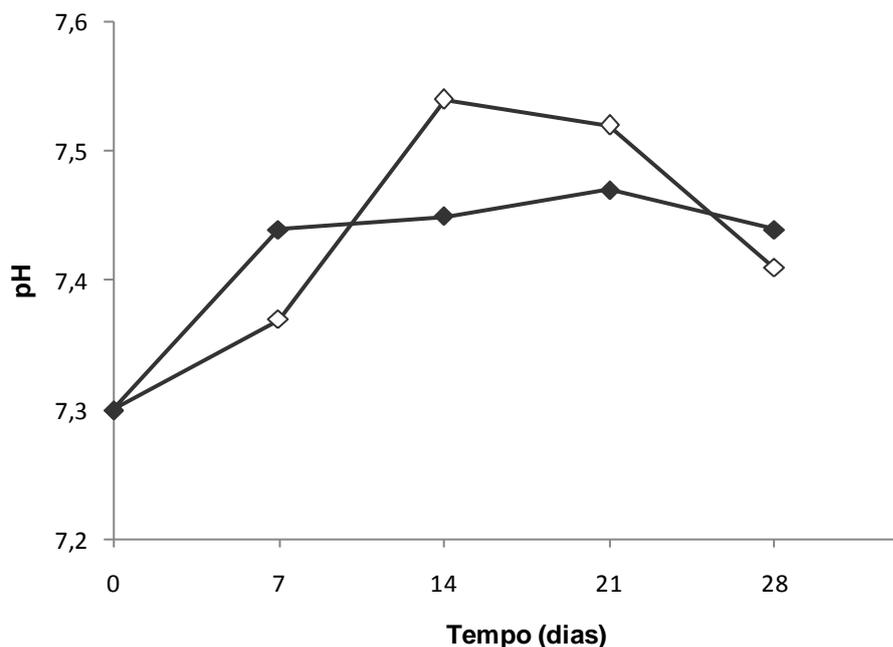


FIGURA 28: Medidas de pH da fase aquosa do cultivo do isolado LB5.2 em MM1 com 1% de biodiesel (B100), por 28 dias a 30°C. (◆) pH da fase aquosa em que ocorreu crescimento do actinomiceto; (◇) pH da fase aquosa sem inóculo (controle negativo).

Em estudo realizado por Bucker (2009), concluiu-se que a produção de metabólitos ácidos pode não ter sido suficiente para reduzir o pH, ou então a produção de ácidos pelos microrganismos pode ser mascarada pelo efeito tamponante do meio mineral MM1, que contém 5 g/L de fosfato.

Beker (2011) observou aumento dos valores de pH do meio mineral em relação ao controle negativo por isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* crescidos na mistura B7 (7% de biodiesel e 93% de diesel) por um período de 14 dias. Segundo Lima (1996), à medida que o crescimento microbiano é desacelerado, ocorre redução das atividades metabólicas e morte celular, o que resulta em aumento do pH. Então, valores

de pH superiores ao controle negativo poderiam corresponder ao final da fase exponencial e início da fase estacionária da curva de crescimento.

4.4.4.5 Determinação da degradação do biodiesel (B100) através da análise por espectroscopia de infravermelho

Os grupos carbonila e C-O, contidos nos ésteres do biodiesel, são absorvidos nas faixas de 1745 e 1168 cm^{-1} , respectivamente. Quando o biodiesel é degradado, os picos apresentados no espectro de infravermelho nestas faixas de leitura tendem a desaparecer, como foi observado por Beker (2011) em estudo com isolados de *Bacillus megaterium*, *B. pumillus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Os resultados do presente trabalho, apresentados na Figura 29, não evidenciam degradação dos grupos contidos no biodiesel. Os picos de carbonila e C-O não apresentaram diferença em relação ao controle negativo, pois não ocorreu redução do sinal (pico de ésteres). Foi possível determinar a formação de um produto de degradação, representado na Figura 29 pelos picos na faixa de 1700 cm^{-1} , correspondentes às amostras de biodiesel em que ocorreu crescimento dos isolados A3.3 e LB5.2 por 28 dias. Isto pode ser explicado devido à formação de subprodutos no processo de transesterificação (utilizado para produção do biodiesel), como glicerol e mono, di e triacilglicerídeos (Fangrui & Milford, 1999; Atadashi et al., 2010) (Anexo 8.4).

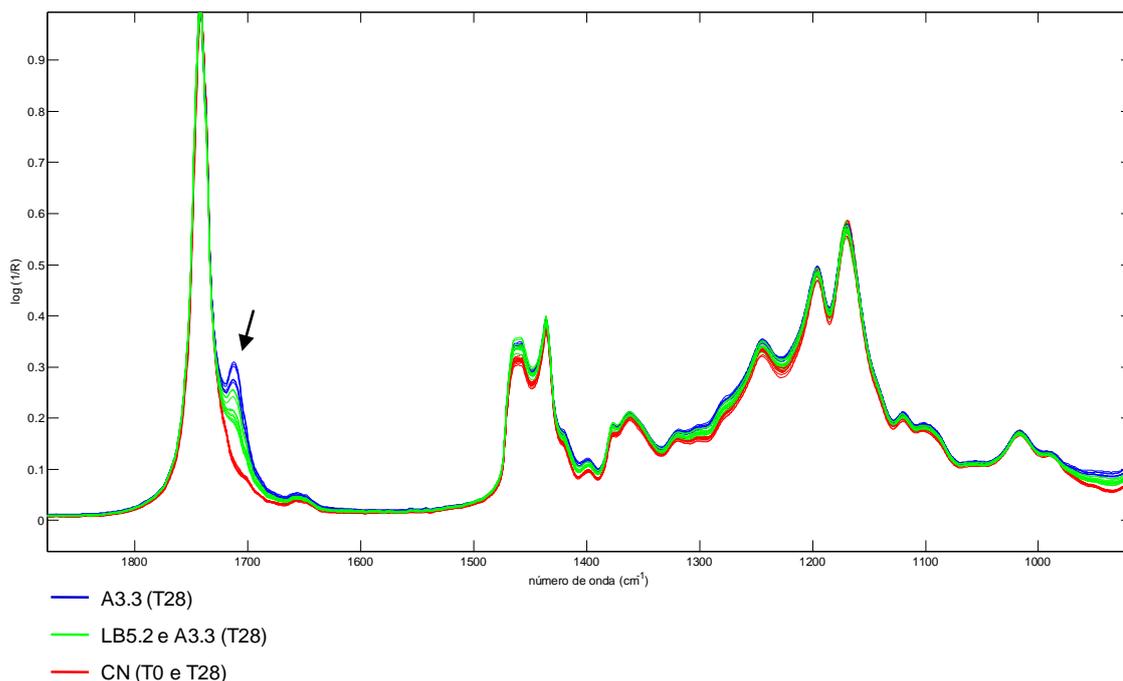


FIGURA 29: Espectro de infravermelho do biodiesel (B100) na ausência de inóculo (controle negativo) e com crescimento dos isolados A3.3 (2% de óleo) e LB5.2 (1% de óleo) após incubação a 30°C na ausência de agitação, por 28 dias. CN: controle negativo; T0: tempo zero (antes de iniciado o experimento); T28: tempo 28 (após 28 dias de incubação). O pico na faixa de 1700 cm^{-1} , que indica a formação de um produto de degradação, está indicado pela flecha.

Com a finalidade de agrupar as amostras pelas suas semelhanças, foi construído um dendograma (Figura 30), no qual foi possível observar quais amostras obtiveram similares capacidades de degradação.

As análises foram realizadas em triplicata. Duas amostras correspondentes ao isolado A3.3 (F e G), representadas pela cor azul, apresentaram os maiores picos na faixa de 1700 cm^{-1} , e portanto foram as que mais evoluíram quanto à formação de um produto de degradação. A triplicata do isolado LB5.2 (I, J e K) e uma amostra do isolado A3.3 (E) estão representadas pela cor verde. Também foi observada a formação de um produto de degradação, porém em menor quantidade. Nas amostras

correspondentes aos controles negativos (A, B, C, D e H), representadas pela cor vermelha, não ocorreu formação de produto de degradação, devido à ausência de crescimento microbiano.

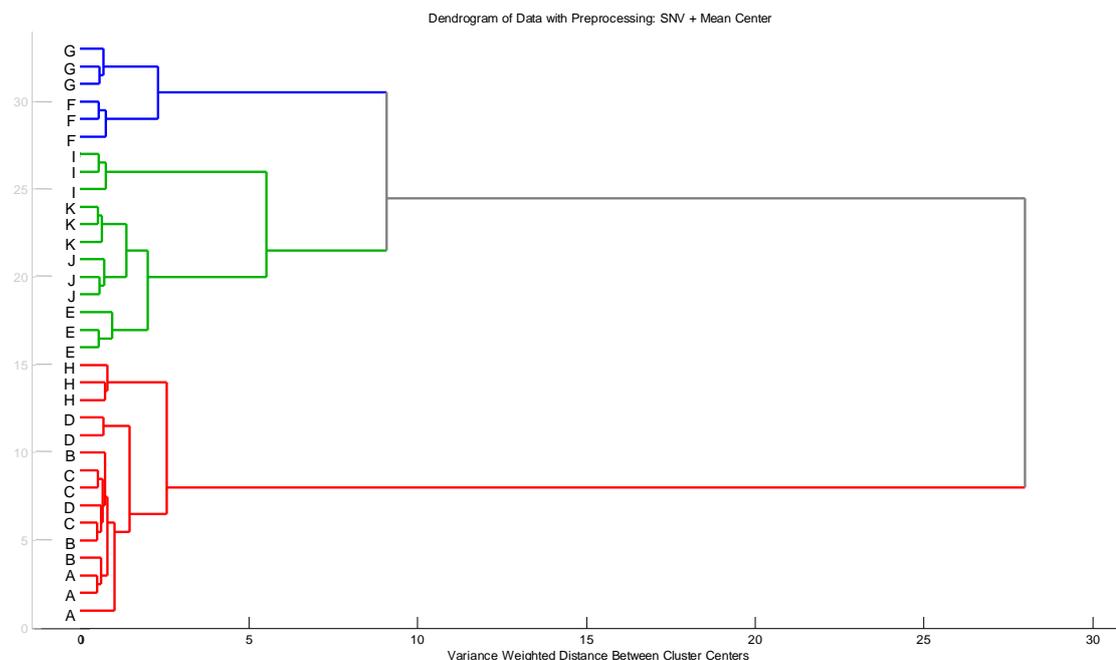


FIGURA 30: Dendrograma obtido pelo método aglomerativo, com a utilização do programa MatLab. Controle negativo (CN) no T0 (A, B, C); CN no T28, incubado com 2% de biodiesel (D); isolado A3.3 no T28, incubado com 2% de biodiesel (E, F, G); CN no T28, incubado com 1% de biodiesel (H); isolado LB5.2 no T28, incubado com 1% de biodiesel (I, J, K).

Não é possível afirmar que o isolado A3.3 apresenta uma maior capacidade de degradação que o isolado LB5.2, pois as condições de crescimento não foram as mesmas. O isolado A3.3 foi crescido em maior quantidade de óleo (2%) que o isolado LB5.2 (1%), o que pode ter favorecido a formação de maior quantidade de produto de degradação.

A formação de um produto de degradação pelos isolados A3.3 e LB5.2 pode não estar relacionada à degradação dos ésteres do biodiesel, e sim

à degradação de algum subproduto gerado na transesterificação do óleo de soja. Schultz (2010) constatou que um isolado de *Sphingomonas* sp., capaz de crescer em biodiesel e de produzir as enzimas lipase e esterase, apresentou um percentual muito baixo de degradação de ésteres pela avaliação cromatográfica, resultado que também pode indicar a degradação de outros compostos presentes no biodiesel.

4.4.4.6 Caracterização molecular dos isolados selecionados

As análises das sequências obtidas para os isolados A3.3 e LB5.2 foram realizadas conforme descrito no Item 4.3.1. Não foi possível realizar a identificação dos isolados em nível de espécie, pois foram encontrados valores similares de identidade com várias espécies de *Streptomyces*. Ambos os isolados foram identificados como *Streptomyces* sp.

5. CONCLUSÕES

Houve um predomínio do gênero *Streptomyces* (94,5%) dentre os actinomicetos isolados de solo de *landfarming* de resíduos petroquímicos.

Apesar da alta probabilidade de encontrar actinomicetos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos em solos impactados, poucos isolados foram capazes de crescer no diesel (B0) e/ou apresentaram o gene *alkB*. É possível inferir que a maioria dos isolados estudados neste trabalho apresentam resistência ou tolerância aos hidrocarbonetos, mas não são capazes de degradá-los. No sistema de *landfarming*, estes actinomicetos provavelmente utilizam subprodutos do metabolismo de outros microrganismos como fonte de carbono.

Todos os isolados de actinomicetos utilizados neste trabalho, independente do local de isolamento, apresentam maior crescimento em biodiesel (B100) quando comparado ao crescimento na mistura B10 e em diesel (B0). Portanto, para estudo da degradação em meio líquido, foram selecionados actinomicetos com potencial para degradar biodiesel (B100).

As análises das amostras de biodiesel (B100) pela espectroscopia de infravermelho sugerem que a formação de biomassa pelos dois isolados de

Streptomyces sp. selecionados para o ensaio de biodegradação em meio líquido pode não ter relação com a degradação dos ésteres, pois os picos dos grupos carbonila e C-O não foram alterados. É possível que a formação de um produto de degradação tenha relação com a metabolização de outros compostos presentes no biodiesel (glicerol, mono, di e triacilglicerídeos), que são subprodutos da transesterificação.

6. PERSPECTIVAS

Realizar a identificação em nível de espécie dos isolados L1.17, L2.8 e L3.4, que apresentaram o gene *alkB*, e dos isolados A3.3 e LB5.2, que foram selecionados para o ensaio de biodegradação de biodiesel (B100) em meio líquido.

Realizar uma curva de crescimento de no mínimo 60 dias com os isolados A3.3 e LB5.2, para verificar se ocorre a degradação dos ésteres do biodiesel. Posteriormente, avaliar a biodegradação do biodiesel em microcosmos, para que as condições sejam mais próximas da biorremediação *in situ*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Disponível em: < <http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: março. 2012.

ARAÚJO, J. M. Estratégias para o isolamento de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, 1998. p. 351-367.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. A. High quality biodiesel and its diesel engine application: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Malásia, v. 14, n. 1, p. 1999-2008, 2010.

BALACHANDRAN, C.; DURAI PANDIYAN, V.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. **Bioresource Technology**, Índia, v. 112, n. 1, p. 83-90, 2012.

BARABÁS, G.; VARGHA, G.; SZABÓ, I. M.; PENYIGE, A.; DAMJANOVICH, S.; SZÖLLÖSI, J.; MATKÓ, J.; HIRANO, T.; MÁTYUS, A.; SZABÓ, I. *n*-alkane uptake and utilization by *Streptomyces* strains. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Hungria, v. 79, n. 1, p. 269-276, 2001.

BASILIO, A.; GONZÁLEZ, I.; VICENTE, M. F.; GORROCHATEGUI, J.; CABELLO, A.; GONZÁLEZ, A.; GENILLOUD, O. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. **Journal of Applied Microbiology**, Espanha, v. 95, n. 1, p. 814-823, 2003.

BEKER, S. A. **Avaliação da biodegradabilidade da mistura B7 em meio líquido por bactérias isoladas de locais impactados**. 2011. 79 f. Trabalho de Conclusão (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) -

Unidade em Bento Gonçalves, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2011.

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**, Marrocos, v. 153, n. 1, p. 339-344, 2002.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. Biosurfactantes. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, p. 151-184.

BERVANAKIS, G. **Detection and expression of biosynthetic genes in Actinobacteria**. 2008. 209 f. Masters thesis (Masters of Science) - Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Health Sciences, Flinders University of South Australia, Adelaide, 2008.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, p. 231-236, 1999.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Alemanha, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

BRAUN, S.; APPEL, L. G.; SCHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, p. 472-482, 2003.

BÜCKER, F. **Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas**. 2009. 147 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CERQUEIRA, V. S. **Biorremediação de borra oleosa proveniente de indústria petroquímica em microcosmos**. 2011. Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-

Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). Relação de áreas contaminadas - Dezembro de 2011. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas>>. Acesso em: junho. 2012.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. 2. ed. ASM Press, Washington, 2000. 713p.

DAMASCENO, R. G.; DUARTE, M. W.; SALAMONI, S. P.; OLIVEIRA, M. F.; VAN DER SAND, S. T. **Propriedades químicas e microbiológicas de solo sob cultivo de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) e formação secundária de Mata Atlântica**. 2008. 23 f. Trabalho de Conclusão (Graduação em Ciências Biológicas) - Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DUARTE, M. W.; DAMASCENO, R. G.; SALAMONI, S. P.; OLIVEIRA, M. F.; VAN DER SAND, S. T. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo**. 2009. 33 f. Trabalho de Conclusão (Graduação em Ciências Biológicas) - Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLÖCKER, H.; EMDE, M.; BÖTTGER, E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Alemanha, v. 17, n. 19, p. 7843-7853, 1989.

ENSIGN, J. C. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. **Annual Review of Microbiology**, Wisconsin, v. 32, n. 1, p. 185-219, 1978.

FANGRUI, M.; MILFORD, A. H. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Nebraska, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.

FRANKENBERGER, W. T. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In: CALABRESE, E. J., KOSTECKI, P. T. **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater**. Lewis: Boca Raton, FL, 1992. p. 237-293.

FRITSCH, W.; HOFRICHTER, M. Aerobic degradation by microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Alemanha, v. 11, n. 1, p. 145-157, 2000.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER - RS (FEPAM). Acidentes de transporte de cargas perigosas. Disponível em: < http://www.fepam.rs.gov.br/emergencia/rel_acidentes.asp>. Acesso em: março. 2012.

GOLOVLEVA, L. A.; AHARONSON, N.; GREENHALGH, R.; SETHUNATHAN, N.; VONK, J. W. The role and limitatons of microorganisms in the conversion of xenobiotics. **Pure and Applied Chemistry**, Rússia, v. 62, n. 1, p. 351-364, 1990.

GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SAIZ-JIMENEZ, C. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of Microbiological Methods**, Alemanha, v. 36, n. 1, p. 115-122, 1999.

HARTMANN, D. O. **Seleção de actinomicetos com atividade lipolítica isolados de processo de compostagem para estudos de produção de lipases**. 2007. 38 f. Trabalho de Conclusão (Graduação em Ciências Biológicas) - Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HEISS-BLANQUET, S.; BENOIT, Y.; MARÉCHAUX, C.; MONOT, F. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. **Journal of Applied Microbiology**, França, v. 99, n. 1, p. 1392-1403, 2005.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-eletrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Alemanha, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 816p.

HOPWOOD, D. A.; KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F. **Practical *Streptomyces* genetics**. Baltimore: The John Innes Foundation, 2000. 613p.

IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: OMURA, S. **The search for bioactive compounds from microorganisms**. Nova York: Spring-Verlag. 1992. p. 281-302.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, Alemanha, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.

JUCK, D.; CHARLES, T.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Canadá, v. 33, n. 1, p. 241-249, 2000.

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

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Washington, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.

KOHNO, T.; SUGIMOTO, Y.; SEI, K.; MORI, K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. **Microbes and Environments**, Japão, v. 17, n. 3, p. 114-121, 2002.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, Alemanha, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

LARKIN, M. J.; KULAKOV, L. A.; ALLEN, C. C. R. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. **Current Opinion in Biotechnology**, Irlanda do Norte, v. 16, n. 1, p. 282-290, 2005.

LEE, M.; KIM, M. K.; SINGLETON, I.; GOODFELLOW, M.; LEE, S. T. Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus*

baikonurensis EN3 in the presence of mycolic acid. **Journal of Applied Microbiology**, Coréia do Sul, v. 100, n. 1, p. 325-333, 2006.

LEWIN, B. **Genes VII**. New York: Oxford University, 2000. 980p.

LIMA, A. S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica***. 1996. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Campinas, v. 1, n. 32, p. 38-46, 2004.

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

MARTÍNKOVÁ, L.; UHNÁKOVÁ, B.; PÁTEK, M.; NEŠVERA, J.; KŘEN, V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. **Environment International**, República Tcheca, v. 35, n. 1, p. 162-177, 2009.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. **Gene**, Inglaterra, v. 115, n. 1, p. 189-192, 1992.

MEHDI, H.; GITI, E. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Irã, v. 62, n. 1, p. 170-178, 2008.

MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. 2011. 161 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras, 2006. 729p.

NAKATANI, A. S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; LAMBAIS, M. R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de "landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 1501-1512, 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, Campinas, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003. 110 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

OTTOW, J. C. G.; GLATHE, H. Rose bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. **Applied Microbiology**, Alemanha, v. 16, n. 1, p. 170-171, 1968.

PACE, N. R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, Califórnia, v. 62, n. 9, p. 463-470, 1996.

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, Espanha, v. 30, n. 1, p. 874-879, 2006.

PASSMAN, F.; DOBRANICK, J. K. Relative biodegradability of B100-biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 2005. **Proceedings...** Espanha, Setembro, 2005.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 5, p. 801-811, 1999.

PIZZUL, L.; CASTILLO, M. P.; STENSTRÖM, J. Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spiked soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Suécia, v. 22, n. 1, p. 745-752, 2006.

QUATRINI, P.; SCAGLIONE, G.; PASQUALE, C.; RIELA, S.; PUGLIA, A. M. Isolation of Gram-positive *n*-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. **Journal of Applied Microbiology**, Itália, v. 104, n. 1, p. 251-259, 2008.

RADWAN, S. S.; BARABÁS, G.; SORKHOH, N. A.; DAMJANOVICH, S.; SZABÓ, I.; SZÖLLOSI, J.; MATKÓ, J.; PENYIGE, A.; HIRANO, T.; SZABÓ, I. M. Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, Kuwait, v. 169, n. 1, p. 87-94, 1998.

RAHMAN, M. A. A.; AZAM, A. T. M. Z.; GAFUR, M. A. *In vitro* antibacterial principles of two flavonoids and extracts from *Clerodendrum indicum* Linn. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Bangladesh, v. 3, n. 10, p. 1769-1771, 2000.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, Curitiba, v. 1, n. 31, p. 28-37, 2003.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, França, v. 44, n. 2-3, p. 93-100, 1999.

RINTALA, H.; NEVALAINEN, A.; RÖNKÄ, E.; SUUTARI, M. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomyces. **Molecular and Cellular Probes**, Finlândia, v. 15, n. 1, p. 337-347, 2001.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Microrganismos**. São Paulo: Embrapa, 2002. p. 97-128.

SAADOUN, I.; ALAWAWDEH, M.; JARADAT, Z.; ABABNEH, Q. Growth of *Streptomyces* spp. from hydrocarbon-polluted soil on diesel and their analysis for the presence of alkane hydroxylase gene (*alkB*) by PCR. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Jordânia, v. 24, n. 1, p. 2191-2198, 2008.

SALAMONI, S. P. **Produção e caracterização de celulases secretadas por *Streptomyces* sp. isolado de processo de compostagem**. 2005. 96 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SALAMONI, S. P.; MANN, M. B.; CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; GERMANI, J. C.; VAN DER SAND, S. T. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 1847-1856, 2010.

SATHI, Z. S.; RAHMAN, M. A. A.; GAFUR, M. A. Identification and *In vitro* antimicrobial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Bangladesh, v. 4, n. 12, p. 1523-1525, 2001.

SCHULTZ, F. M. **Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel**. 2010. 100 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SEABRA, P. N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, p. 547-570.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns. **Journal of Environmental Engineering**, Iowa, v. 128, n. 9, p. 862-867, 2002.

SINGH, R.; GUPTA, N.; GOSWAMI, V. K.; GUPTA, R. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Índia, v. 70, n. 6, p. 679-682, 2006.

SMITS, T. H. M.; RÖTHLISBERGER, M.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J. B. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. **Environmental Microbiology**, Suíça, v. 1, n. 4, p. 307-317, 1999.

SULTAN, M. Z.; KHATUNE, N. A.; SATHI, Z. S.; BHUIYAN, M. S. A.; SADIK, M. G.; CHOUDURY, M. A.; GAFUR, M. A.; RAHMAN, M. A. A. *In vitro* antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. **Biotechnology**, Bangladesh, v. 1, n. 2-4, p. 100-106, 2002.

THAMPAYAK, I.; CHEEPHAM, N.; PATHOM-AREE, W.; LEELAPORNPID, P.; LUMYONG, S. Isolation and identification of biosurfactant producing actinomycetes from soil. **Research Journal of Microbiology**, Tailândia, v. 3, n. 7, p. 499-507, 2008.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z.; DUETZ, W. A.; SMITS, T. H. M.; WITHOLT, B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. **Oil & Gas Science and Technology**, Suíça, v. 58, n. 4, p. 427-440, 2003.

VAN BEILEN, J. B.; SMITS, T. H. M.; WHYTE, L. G.; SCHORCHT, S.; RÖTHLISBERGER, M.; PLAGGEMEIER, T.; ENGESSER, K. H.; WITHOLT, B. Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. **Environmental Microbiology**, Suíça, v. 4, n. 11, p. 676-682, 2002.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Canadá, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VIEIRA, T. M.; SILVA, E. P.; FILHO, N. R. A.; VIEIRA, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL. Brasília, 2006. **Artigo técnico-científico...** Brasília: Estação Gráfica, p. 218-223, 2006.

VOMBERG, A.; KLINNER, U. Distribution of *alkB* genes within n-alkane-degrading bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Alemanha, v. 89, n. 1, p. 339-348, 2000.

WILLEY, J. M.; WILLEMS, A.; KODANI, S.; NODWELL, J. R. Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. **Molecular Microbiology**, New York, v. 59, n. 3, p. 731-742, 2006.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. **Biodegradation**, Dinamarca, v. 7, n. 5, p. 415-423, 1997.

XU, L. H.; LI, Q. R.; JIANG, C. L. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. **Applied and Environmental Microbiology**, China, v. 62, n. 1, p. 244-248, 1996.

ZHANG, X.; PETERSON, C. L.; REECE, D.; MÖLLER, G.; HAWS, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of American Society of Agricultural Engineers**, Idaho, v. 41, n. 1, p. 1423-1430, 1998.

8. ANEXOS

8.1 Meios de cultura utilizados para isolamento, seleção e crescimento de actinomicetos

8.1.1 Meio mínimo mineral (MM1), pH 7,2

Adaptado de Richard & Vogel (1999)

Solução de macronutrientes g/L

KCl	0,7 g			
KH ₂ PO ₄	2,0 g	ou	K ₂ HPO ₄	1,55 g
Na ₂ HPO ₄	3,0 g	ou	NaH ₂ PO ₄	2,9 g
KNO ₃	2,0 g			

Solução de micronutrientes g/L

MgSO ₄	4,0 g	ou	MgSO ₄ .7H ₂ O	8,2 g
FeSO ₄	0,2 g	ou	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,36 g
MnCl ₂	0,2 g	ou	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,31 g
CaCl ₂	0,2 g	ou	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,26 g

*A solução de micronutrientes deve ser adicionada à solução de macronutrientes na proporção de 0,1%.

8.1.2 Meio ágar amido caseína (ACA) g/L

Amido	10 g
Caseína	0,3 g
NaCl	2,0 g
KNO ₃	2,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
FeSO ₄	0,01 g
MgSO ₄	0,05 g
CaCO ₃	0,02 g
Ágar	15 g

8.1.3 Anfotericina B (5 mg/mL)

Anfotericina B	400 µL
ACA	1000 mL

*Adicionar a solução de anfotericina B após a esterilização do ACA em autoclave por 15 min à 121°C, quando o meio de cultura tiver atingido a temperatura de 60°C.

8.1.4 Ágar nutriente g/L

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Ágar	15,0 g

8.1.5 Caldo nutriente g/L

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g

8.2 Soluções utilizadas para extração do DNA cromossomal, quantificação e PCR

8.2.1 Tampão SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7,5)

Solução NaCl 1 M	7,5 mL
Solução EDTA 0,5 M	5,0 mL
Solução Tris 1 M	2,0 mL
Água	85,5 mL

8.2.2 Lisozima (10 mg/mL)

Lisozima	0,01 g
Água	1,0 mL

8.2.3 SDS (10%)

SDS	10 g
Água	100 mL

8.2.4 Proteinase K (10 mg/mL)

Proteinase K	0,01 g
Água	1,0 mL

8.2.5 TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)

Solução Tris 1 M	1,0 mL
Solução EDTA 0,5 M	0,2 mL
Água	98,8 mL

8.2.6 Azul de bromofenol

Azul de bromofenol	0,0025 g
Glicerol	0,3 mL
Água	1,0 mL

8.2.7 Gel de agarose

*O percentual de agarose a ser utilizado deve ser dissolvido em TAE 1X. O brometo de etídeo (5 μ L/100 mL) deve ser adicionado quando o gel atingir uma temperatura de 45°C.

8.2.8 Brometo de etídeo

Brometo de etídeo	0,5 mg
Álcool etílico	1000 mL

8.2.9 TAE 1X

TAE 50X	20 mL
Água	980 mL

*TAE 50X

Tris	42 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
Solução EDTA 0,5 M	100 mL
Água	1000 mL

8.2.10 Desoxinucleotídeos

dATP	5,0 μ L
dTTP	5,0 μ L
dCTP	5,0 μ L
dGTP	5,0 μ L
Água Mili-Q	180 μ L

8.3 Meios de cultura utilizados para avaliação do crescimento em combustíveis e atividade enzimática

8.3.1 Solução mineral com Indicador redox (DCPIP ou TTC)

DCPIP ou TTC 0,025 g

MM1 100 mL

*A solução deve ser protegida da luz, para evitar a foto-oxidação dos indicadores redox.

8.3.2 Meio para atividade da lipase g/L

Peptona 5,0 g

Extrato de levedura 1,0 g

NaCl 4,0 g

Ágar 10 g

Solução de rodamina B (0,1%) 10 mL

*O meio de cultura deve ser esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C. Ao atingir uma temperatura de 60°C, deve ser adicionado 2,5% de biodiesel previamente esterilizado por filtração. Homogeneizar em vórtex por 5 segundos.

8.3.3 Meio para atividade da esterase g/L

Peptona 5,0 g

Extrato de levedura 1,0 g

NaCl 5,0 g

CaCl₂ 0,1 g

Ágar 15 g

*O meio de cultura deve ser esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C. Ao atingir uma temperatura de 60°C, deve ser adicionado 1% de Tween 80 (não é necessária esterilização). Homogeneizar em vórtex por 5 segundos.

8.4 Laudo de análises do biodiesel (B100)



OLEOPLAN S/A – ÓLEOS VEGETAIS PLANALTO

CERTIFICADO DE QUALIDADE

PRODUTO: BIODIESEL - B100

FABRICAÇÃO: 23/2/2011

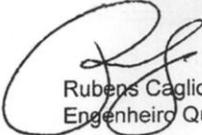
LOTE:353

CERTIFICADO Nº: 353

MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS: ÓLEO DE SOJA (70%), GORDURA ANIMAL (30%) E METANOL

DATA DE ENSAIO: 24/02/2011

Característica	Unidade	Resultado	Especificações	Métodos
Aspecto/Temperatura lida em °C	-	Límpido e Isento de Impurezas/20	Límpido e Isento de Impurezas	Visual
Massa Específica a 20 °C	Kg/m ³	879,1	850-900	ASTM D 1298
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	4,299	3,0-6,0	ASTM D 445
Teor de água	mg/kg	326	500 (máx.)	ASTMD 6304
Contaminação Total	mg/kg	19,8	24 (máx.)	EN 12662
Ponto de Fulgor Vaso fechado Pensky – Martens	°C	132	100,00 (mín.)	ASTM D 93
Teor de éster	% massa	98,4	96,5 (mín.)	EN 14103
Resíduo de Carbono	% massa	0,02	0,05 (máx.)	ASTM D 4530
Cinzas Sulfatadas	% massa	0,007	0,020 (máx.)	ASTM D 874
Enxofre total	mg/kg	2,9	50 (máx.)	ASTM D 5453
Sódio + Potássio	mg/kg	3,3	5 (máx.)	NBR 15553
Cálcio + Magnésio	mg/kg	2,6	5 (máx.)	NBR 15553
Fósforo	mg/kg	1,7	10 (máx.)	NBR 15553
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C	-	1	1 (máx.)	ASTM D 130
Ponto de entupimento de filtro a frio	°C	6	19 (máx.)	ASTMD 6371
Índice de acidez	mgKOH/g	0,4	0,50 (máx.)	ASTMD 664
Glicerina Livre	% massa	0,013	0,02 (máx.)	ASTMD 6584
Glicerina total	% massa	0,185	0,25 (máx.)	ASTM D 6584
Monoglicerol	% massa	0,469	ANOTAR	ASTM D 6584
Diglicerol	% massa	0,217	ANOTAR	ASTM D 6584
Triglicerol	% massa	0,172	ANOTAR	ASTM D 6584
Metanol	% massa	0,06	0,20 (máx.)	EN 14115
Estabilidade à oxidação a 110°C	h	7,9	6 (mín.)	EN 14112


 Rubens Cagliani
 Engenheiro Químico – CRQ 05302824

RST 470 – KM 109 – Nº. 3482 – CEP: 95330 – 000 – VERANÓPOLIS – RS

FONE: (54) 3441 3300 – FAX: (54) 3441 3300

E-mail: laboratorio_biodiesel@oleoplanver.com.br, atendimento@oleoplanver.com.br

Site: www.oleoplanver.com.br