



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Degradação de óleo diesel e produção de biossurfactantes por  
microrganismos isolados de ambientes contaminados por petróleo**

**Thiago Claudino Mendes de Almeida**

**Orientadora: Krystyna Gorlach-Lira**

**João Pessoa**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Degradação de óleo diesel e produção de biossurfactantes por  
microrganismos isolados de ambientes contaminados por petróleo**

**Thiago Claudino Mendes de Almeida**

**Orientadora: Krystyna Gorlach-Lira**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas,  
como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas

**João Pessoa**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Thiago Claudino Mendes de Almeida**

**Degradação de óleo diesel e produção de biosurfactantes por  
microrganismos isolados de ambientes contaminados por petróleo**

**DATA:** \_\_\_\_\_

**RESULTADO:** \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

\_\_\_\_\_  
Orientadora

\_\_\_\_\_  
Avaliador 1

\_\_\_\_\_  
Avaliador 2

## Resumo

Estratégias de biorremediação por microorganismos com potencial biodegradativo são alternativas utilizadas para eliminar ou minimizar os efeitos de poluentes. O presente estudo buscou analisar a capacidade de 24 linhagens bacterianas isoladas do solo rizosférico de plantas *Calotropia procera*, *Cenchrus echinatus*, e *Dactyloctenium aegyptium* coletadas no aterro de resíduos sólidos da produção de petróleo localizado no campo de Fazenda Belém da PETROBRÁS, no município de Icapuí-CE, de degradar óleo diesel, e também avaliar a dinâmica populacional das linhagens mais ativas no solo contaminado com óleo diesel nas condições laboratoriais (experimento *microcosm*). O estudo procurou ainda selecionar as bactérias com capacidade de produzir biossurfactantes. A caracterização das bactérias consistiu nos testes de coloração Gram, de motilidade, de produção de endósporos e de produção de catalase. Testes de degradação de óleo diesel por bactérias foram realizados em microplacas, utilizando o indicador 2,6 diclorofenol-indofenol (2,6 DCPIP). No período de 72h de incubação de bactérias foi observado se houve mudança da cor azul (oxidado) do indicador 2,6 DCPIP, para sem coloração (reduzido), devido à ação das linhagens utilizadas separadamente ou em culturas mistas compostas de duas linhagens. Quanto ao teste de produção de biossurfactantes, foi empregado o teste de emulsificação para culturas em Caldo Nutriente e em meio de Bushnell-Haas, e o teste de hemólise. Foram realizados dois experimentos *microcosm*, sendo que no primeiro experimento foram utilizadas duas linhagens separadamente, e no segundo foram utilizadas duas culturas mistas compostas por três linhagens cada. Os resultados dos testes de degradação do óleo diesel em microplacas indicaram que 50 % das linhagens testadas foram capazes de degradar o óleo diesel no período de 72 horas. As culturas mistas das linhagens não foram mais eficientes na degradação do óleo diesel quando comparadas com culturas de uma linhagem. A emulsificação do óleo diesel foi observada em dezesseis linhagens no meio Caldo Nutriente, e apenas em uma linhagem cultivada no meio Bushnell-Haas. Os valores de índice de emulsificação (E24%) variaram entre 10 e 48,5%. Produção de biossurfactantes extracelulares foi observada em onze linhagens de bactérias. Das 19 linhagens testadas no teste de hemólise no meio Ágar Sangue, seis apresentaram atividade hemolítica. Os resultados do experimento *microcosm* com linhagens aplicadas separadamente mostraram que a presença de óleo diesel estimulou o crescimento das bactérias no solo, entretanto no experimento *microcosm* com culturas mistas ocorreu inibição do crescimento bacteriano no solo com adição de óleo diesel. Entre as linhagens bacterianas testadas, algumas exibiram potencial para ser explorado futuramente nas pesquisas sobre seu uso nos processos de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo.

*Palavras-Chave:* Biodegradação, Óleo diesel, Bactérias.

## Abstract

Bioremediation strategies that use microorganisms with biodegradation potential are alternatives applied to eliminate or minimize the effects of pollutants. This study investigated the ability of 24 bacterial strains, isolated from the rhizosphere of plants *Calotropia procera*, *Cenchrus echinatus*, e *Dactyloctenium aegyptium* collected in solid waste landfill of oil production, located in the Fazenda Belém of PETROBRAS, in the municipality Icapuí-CE, to degrade diesel oil, and also to evaluate the population dynamics of the most active strains in soil contaminated with diesel oil in laboratory conditions (*microcosm* experiment). The study also aimed to select the biosurfactant-producing bacteria. The characterization of the bacteria consisted in the tests of Gram stain, motility, endospores production and catalase production. Tests of diesel oil degradation by bacteria were performed in microplates, using the indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol (2,6-DCPIP). The change from blue (oxidized) indicator 2,6-DCPIP to colourless (reduced) in the bacterial cultures of one strain or in mixed cultures incubated for 72 hours was observed. The biosurfactants production was analysed by the emulsification test in the Nutrient Broth and Bushnell-Haas media, and the hemolysis test. Two microcosm experiments were conducted, while in the first experiment were used strains separately, in the second two mixed cultures composed of three strains each were applied. The results of the degradation tests of diesel in microplates indicated that 50% of strains tested were capable to degrade the diesel oil in the period of 72 hours. The mixed cultures not more efficient in the degradation of diesel oil when compared with cultures of one strain. The emulsification of diesel oil was observed in sixteen strains in Nutrient Broth medium, and only one strain grown in Bushnell-Haas medium. The values of emulsification index (E<sub>24</sub>%) ranged from 10 to 48.5%. Most strains produced biosurfactants from the cell culture. Of the 19 strains tested in the hemolysis test in the Blood Agar medium, six showed hemolytic activity. The results of the microcosm experiment with strains applied separately showed that the diesel oil presence stimulated the growth of bacteria in soil, however, in the microcosm experiment with mixed cultures occurred inhibition of bacterial growth the soil with addition of diesel oil. Among the bacterial strains tested, some exhibited potential to be explored in the future research about their application in the bioremediation processes in areas contaminated by petroleum.

*Palavras-Chave:* Biodegradation, Diesel Oil, Bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01-** Produtos comuns da oxidação de hidrocarbonetos aromáticos-----03
- FIGURA 02-** Alguns hidrocarbonetos monoaromáticos, poliaromáticos e alifáticos do petróleo-----05
- FIGURA 03-** Formas oxidada e reduzida do indicador 2,6- diclorofenol-indofenol-----08
- FIGURA 04-** Exemplar da planta *Calotropia procera*, e exemplar da gramínea *Dactyloctenium aegyptium*, no Campo de Fazenda Belém, Icapuí – CE -----14
- FIGURA 05-** Número de linhagens de bactérias positivas e negativas em testes morfológicos e fisiológicos -----20
- FIGURA 06-** Morfologia de bactérias pertencentes aos diferentes biótipos.-----20
- FIGURA 07-** Testes de degradação de óleo diesel, por bactérias (linhagem P1R21), realizados em tubos de ensaio -----21
- FIGURA 08-** Porcentagem de linhagens ativas na degradação do óleo diesel isoladas da rizosfera de *Calotropia procera*, *Cenchrus cf. echinatus*, e *Dactyloctenium aegyptium* -----24
- FIGURA 09-** Teste de redução de DCPIP em microplacas após um dia de incubação de bactérias.-----25

**FIGURA 10-** Teste de redução de 2,6 DCPIP em microplacas após dois dias de incubação por bactérias-25

**FIGURA 11-** Emulsificação de óleo diesel por sobrenadante livre de células da linhagem P1R16, crescida em meio Caldo Nutriente, com adição de óleo diesel, após 5 minutos e após 24 horas de repouso; e emulsificação de óleo diesel por cultura da linhagem P1R16, crescida em meio Bushnell-Hass, com adição de óleo diesel após 5 minutos e após 24 horas -----28

**FIGURA 12-** Atividade hemolítica das linhagens P1R16 e P1R13-----29

**FIGURA 13-** Contagem de bactérias introduzidas no solo com óleo diesel (teste) e sem óleo diesel (controle) ao longo de 60 dias no experimento *microcosm*.-----32

**FIGURA 14-** Análise comparativa do crescimento das duas linhagens introduzidas no solo com óleo em relação ao tratamento nos seus respectivos solos sem óleo (controle)-----33

**FIGURA 15-** Contagens de bactérias introduzidas no solo com óleo diesel (teste) e sem óleo diesel (controle) ao longo de 60 dias no experimento *microcosm*.-----35

**FIGURA 16-** Porcentagem de inibição de densidade de linhagens P2R18, AG4 e P1R16 introduzidas no solo com óleo em relação ao solo sem óleo (controle) no experimento *microcosm* -----35

**FIGURA 17-** Culturas de bactérias das linhagens P3R30, P2R11 e P1R21 obtidas do solo com óleo diesel, após um dia e após 60 dias de incubação do *microcosm* -----36

**FIGURA 18-** Culturas de bactérias das linhagens P1R16, P2R18 e AG4 obtidas do solo com óleo diesel, e em solo sem óleo diesel; e solo sem inoculo-----36

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 01-** Caracterização morfológica e fisiológica de bactérias isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera*, *Cenchrus cf. echinatus* e *Dactyloctenium aegyptium* -----19

**TABELA 02-** Testes preliminares de degradação do óleo Diesel em tubos de ensaio e em microplacas por bactérias isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera*, *Cenchrus cf. echinatus* e *Dactyloctenium aegyptium*-----21

**TABELA 03-** Testes de degradação do óleo Diesel em microplacas por bactérias isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera*, *Cenchrus cf. echinatus* e *Dactyloctenium aegyptium* -----23

**TABELA 04-** Testes de degradação do óleo Diesel por culturas mistas de bactérias-----24

**TABELA 05-** Índices de emulsificação de óleo diesel por linhagens cultivadas no meio caldo nutriente e no meio Bushnell e Haas, contendo 1% de óleo diesel -----27

**TABELA 06-** Atividade hemolítica de bactérias isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera*, *Cenchrus cf. echinatus* e *Dactyloctenium aegyptium*-----29

**TABELA 07-** Parâmetros físico-químicos do solo utilizado para o experimento *microcosm*-----30

**TABELA 08-** Caracterização do solo utilizado para o experimento *microcosm*, quanto à granulometria-----30

**TABELA 09-** Contagens das linhagens P1R21 e P3R30 no solo com óleo (teste) e sem óleo (controle), ao longo de 60 dias do experimento *microcosm* -----31

**TABELA 10-** Contagens de culturas mistas no solo com óleo (teste) e sem óleo (controle), ao longo de 60 dias do experimento *microcosm*----- 34

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	01
<b>OBJETIVOS</b>	13
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	14
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	19
<b>CONCLUSÕES</b>	37
<b>REFERÊNCIAS</b>	38
<b>ANEXO</b>	46

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

Diante da crescente estrutura logística da produção e comercialização do petróleo e de seus derivados, as preocupações referentes ao potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas vêm aumentando nos últimos anos.

Atualmente, propostas que tenham o intuito de resolver os problemas atinentes à contaminação ambiental, são de grande importância e têm despertado muito interesse devido às graves consequências que estes originam.

A biorremediação pode ser considerada como uma nova tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos.

Estratégias de biorremediação incluem a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação, a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes, e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (BENTO et al., 2003; MARIANO et al., 2007). O benefício desses processos é a mineralização do poluente, isto é, a transformação em gás carbônico, água e biomassa.

O potencial que representam as bactérias para processos de biorremediação de substâncias tóxicas no solo e nas águas, tem sido alvo de grande interesse na atualidade. Dentre os poluentes antropogênicos mais frequentes temos os plásticos, os pesticidas, e compostos relacionados, metais pesados, lixo radioativo, efluentes térmicos e hidrocarbonetos de petróleo.

Bactérias que degradam hidrocarbonetos podem ser localizadas em todos os ambientes naturais, embora apresentem enormes variações em suas densidades. Todavia, é importante destacar que apenas a constatação da presença desses microrganismos não significa que uma biorremediação efetiva esteja acontecendo no local contaminado (ROSENBERG, 2006).

Não existe uma regra geral que indique o melhor tratamento de uma área contaminada específica. Cada caso deve ser analisado de forma individualizada, a partir da avaliação de suas particularidades (MARIANO et al., 2007). Quando ocorre o derramamento de petróleo a ação inicial é a de remover a fase oleosa por meios mecânicos, como acontece

**ANEXO - Características morfológicas e fisiológicas de linhagens bacterianas**

<b>Linhagem</b>	<b>Forma</b>	<b>Reação de Gram</b>	<b>Catalase</b>	<b>Motilidade</b>	<b>Endósporos</b>
<b>P1R14</b>	bastonetes	+	+	+	+
<b>P1R16</b>	bastonetes	+	+	+	+
<b>P1R21</b>	bastonetes	+	+	+	+
<b>P2R1</b>	cocobacilos	+	+	-	-
<b>P2R11</b>	bastonetes irregulares	+	-	-	+
<b>P2R17</b>	cocos	+	+	-	-
<b>P2R18</b>	bastonetes irregulares	+	+	+	-
<b>P2R20</b>	bastonetes irregulares	+	+	-	-
<b>P2R23</b>	bastonetes irregulares	-	-	+	-
<b>P2R24</b>	bastonetes	-	-	+	-
<b>P2R29</b>	bastonetes	+	-	-	-
<b>P3R3</b>	bastonetes irregulares	+	-	+	-
<b>P3R9</b>	bastonetes irregulares	-	-	-	-
<b>P3R10</b>	bastonetes irregulares	+	+	-	-
<b>P3R21</b>	bastonetes irregulares	+	+	-	-
<b>P3R22</b>	bastonetes irregulares	+	+	+	-
<b>P3R24</b>	filamentos	+	+	-	-
<b>P3R25</b>	bastonetes irregulares	+	+	-	-
<b>P3R27</b>	bastonetes irregulares	-	+	+	-
<b>P3R28</b>	bastonetes irregulares	-	+	-	-

<b>P3R29</b>	filamentos	+	+	-	-
<b>P3R30</b>	bastonetes	v	+	+	-
<b>P3R31</b>	bastonetes	+	+	-	-
<b>P3R32</b>	bastonetes	+	+	-	-

---

V- gram-variável

no bombeamento, ou físico-químicos através da aplicação de surfactantes, moléculas anfipáticas que dispersam a camada de óleo (ATLAS, 1995). Os microrganismos que oxidam hidrocarbonetos crescem rapidamente sobre a superfície do petróleo (ou derivado), e a atividade é mais extensa quando as condições ambientais, como temperatura e nutrientes inorgânicos são adequadas. Dado que o petróleo e seus derivados são menos densos e insolúveis em água, flutuam e formam manchas em sua superfície. As bactérias que oxidam hidrocarbonetos podem atacar as gotículas insolúveis, e desenvolver-se em grande quantidade sobre elas. A ação destas bactérias leva à decomposição destes hidrocarbonetos e à dispersão da mancha.

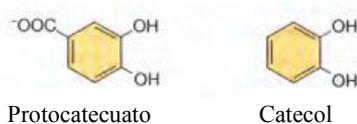
Quando ocorrem grandes derramamentos, as frações de hidrocarbonetos voláteis evaporam rapidamente, restando os componentes aromáticos e alifáticos de cadeia longa, os quais devem ser eliminados pelos microrganismos. Em alguns estudos foi visto que as bactérias que oxidam hidrocarbonetos têm aumentado seus números de  $10^3$ - $10^6$  vezes em pouco tempo após ocorrer o derramamento (MADIGAN et al., 2004). Alguns microrganismos degradam compostos alcanos (normal, ramificado, cíclico), outros degradam compostos aromáticos, e ainda outros degradam tanto hidrocarbonetos aromáticos quanto alcanos (PIRÔLLO, 2006).

Devido ao fato da degradação de hidrocarbonetos para  $\text{CO}_2$  envolver uma reação de oxidação, os organismos, em sua maioria, são aeróbios (ROSATO, 1997). Madigan et al. (2004) afirmam que a etapa inicial na oxidação de hidrocarbonetos alifáticos tem como reagente o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), um dos quais se incorpora ao hidrocarboneto oxidado resultando no produto final, que é a acetil-CoA. Nem sempre a oxidação inicial ocorre no carbono inicial, às vezes pode ocorrer no carbono secundário e então as reações posteriores são muito diferentes. Os hidrocarbonetos alifáticos insaturados que contêm uma dupla ligação terminal não são refratários à decomposição anóxica e podem ser oxidados por algumas bactérias sulfato redutoras e outras bactérias anaeróbicas.

O metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos, alguns dos quais são moléculas grandes, geralmente se inicia com a formação do protocatecuato, de catecol, ou de um composto relacionado estruturalmente (Figura 1). Estes compostos de um só anel são conhecidos como substratos de partida, pois o catabolismo oxidativo só continua após as moléculas aromáticas complexas se converterem nesta forma mais simples. O próprio protocatecuato e o catecol podem ser degradados depois a compostos que entram no ciclo do

ácido cítrico: succinato, acetilCoA e piruvato. Vários passos do catabolismo de hidrocarbonetos aromáticos geralmente requerem oxigenases.

Os compostos aromáticos podem também ser degradados anaerobicamente pela ação de bactérias aeróbias se o composto já dispõe de um átomo de oxigênio, como no caso do fenol (MADIGAN et al., 2004).



**FIGURA 1:** Produtos comuns da oxidação de hidrocarbonetos aromáticos. (Fonte: MADIGAN et al., 2004).

Microrganismos, como bactérias, cianobactérias, algas, leveduras, fungos filamentosos, e até mesmo protozoários são agentes capazes de degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias, entre os quais está o óleo diesel. Por assimilarem tais substâncias como fonte de carbono e/ou de energia, os microrganismos vêm se apresentando como poderosa alternativa aos métodos convencionais de tratamento, sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais (ROSATO, 1997; URURAHY, 1998).

ZoBell, em 1946, apresentou a capacidade de certos microrganismos utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono, e descreveu mais de 100 espécies, representando 30 gêneros diferentes (ROSATO, 1997).

Os gêneros *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Flavobacterium*, *Rhodotorula*, *Brevibacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, e *Rhodococcus*, são alguns dos mais comumente observados, e descritos como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo (BASTIAENS et al., 2000; BOONCHAN et al., 2000; ROSATO, 1997).

Bento et al. (2005) afirmam que bactérias isoladas e culturas microbianas mistas podem ser usadas em processos de biorremediação. Elevadas taxas de degradação de hidrocarbonetos são frequentemente alcançadas com o emprego de consórcios bacterianos isolados de ambientes que precisam do processo de biorrestauração (JUHASZ et al., 2000). Consórcios bacterianos dispõem de um amplo arranjo de mecanismos metabólicos na quebra

dos componentes do óleo diesel, incluindo a produção de agentes com capacidade emulsificante, conhecidos como biossurfactantes (WILLUMSEN; KARLSON, 1997).

Rosato (1997) observa que a maioria dos estudos de microbiologia da degradação de hidrocarbonetos inclui organismos mesofílicos, mas existem também alguns microrganismos degradadores encontrados em ambientes extremos, como por exemplo, na região Ártica, no entanto existe um número reduzido de microrganismos degradadores encontrados em ecossistemas com elevadas temperaturas.

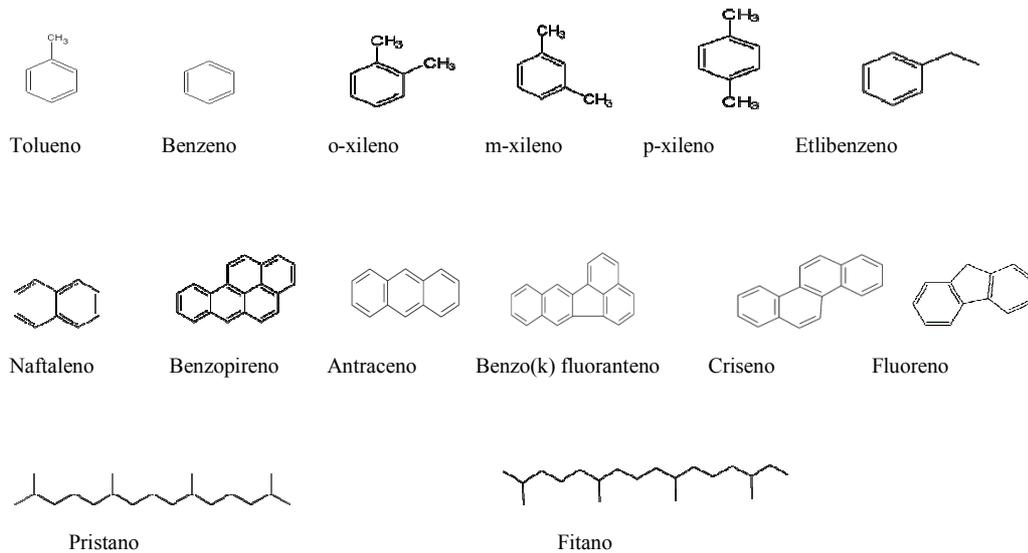
## 1.2 BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL

O petróleo consiste em uma mistura complexa de compostos orgânicos com elevado conteúdo energético. Ele se origina do betume das rochas-mãe, que determina as diferenças na sua composição básica. O petróleo, ou óleo cru, passa por mudanças em sua composição durante a migração primária. Apenas uma reduzida quantidade de betume total disperso é mobilizado e transferido para as rochas-reservatório e ainda uma menor quantidade é acumulada nos poços. A comparação entre betume na rocha-mãe e óleo no reservatório mostra que a drenagem é seletiva. Moléculas pesadas e polares, como o asfalteno, são adsorvidas fortemente na rocha-mãe e geralmente não são expelidas para o reservatório. Assim, a composição do petróleo depende da capacidade de adsorção de diferentes compostos, e desse modo os hidrocarbonetos saturados menos polares são mais encontrados, seguidos pelos compostos aromáticos e benzotiofenos, enquanto as resinas mais polares e os asfaltenos, menos solúveis, são menos abundantes. Nos reservatórios, o petróleo é bastante suscetível a alterações, causadas por vários fatores. Tais alterações resultam em mudanças na composição do óleo, consequentemente influenciando em sua qualidade e no seu valor econômico (ROSATO, 1997).

O processamento inicial de beneficiamento do petróleo envolve sua separação por destilação em uma série de frações caracterizadas pelos intervalos de temperatura e pressão. Além da destilação, numerosos processos de refinaria são utilizados para otimizar a obtenção de certos produtos desejados. As frações destiladas do petróleo podem ser classificadas em três grupos, de acordo com o número de átomos de carbono nas moléculas: as gasolinas (4 a 12 átomos de carbono), os destilados médios (9 a 20 átomos de carbono) e óleos combustíveis pesados (mais de 14 átomos de carbono) (MARIANO, 2006).

Segundo Seabra (2001) na composição do petróleo encontram-se várias centenas de compostos orgânicos, que podem ser divididos em hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alenos e cíclicos), hidrocarbonetos aromáticos, asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetanos, ésteres, etc.), resinas, e compostos polares (piridina, quinolinas, carbazóleo, amidas, tiofeno, etc.).

O óleo diesel é um destilado do petróleo que contém principalmente hidrocarbonetos de cadeias simples, não ramificadas, olefinas e, pequenas concentrações de componentes policíclicos aromáticos. Em relação à gasolina, o óleo diesel apresenta moléculas com tamanho maiores de cadeias, o que confere a este combustível maior massa específica, menor volatilidade e menor solubilidade em água (BAKER; HERSON, 1994).



**FIGURA 2:** Alguns hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX), poliaromáticos (HPA) e alifáticos do petróleo. Fontes: GUIMARÃES et al., 2010; LOURENÇO, 2006; MURPHY et al., 1972.

Catástrofes como a ocorrida na costa do Alasca em 1989, com o petroleiro Exxon Valdez, e o caso da Petrobras em janeiro de 2000, onde aconteceu um vazamento de milhares de litros no mar na baía de Guanabara, são casos que aumentam o debate relativo à necessidade de reduzir os impactos ambientais advindos da contaminação por petróleo (GALDINO et al., 2002).

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis registrou que no ano de 2012 um vazamento de petróleo ocorreu devido uma falha na tubulação, em uma

plataforma que opera no Campo de Barracuda, na Bacia de Campos dos Goytacazes, no Rio de Janeiro; na mesma bacia, no ano de 2011, danos foram causados ao meio ambiente com o vazamento de óleo no Campo de Frade. Em 2001 foi registrado um vazamento de óleo diesel no município de Morretes, no Paraná, pelo rompimento do oleoduto Araucária-Paranaguá (OLAPA), da Petrobras; já no ano de 2010, um vazamento ocorreu na plataforma Deepwater Horizon, no Golfo do México.

Valentin (2006), diz que no Brasil, as preocupações referentes ao potencial de contaminação de água subterrânea, pelos postos de combustíveis, vêm aumentando nos últimos anos, devido ao fato de que a maioria dos postos possui mais de dez anos. Segundo o mesmo autor, em caso de vazamento e/ou derramamento de combustíveis, a contaminação de aquíferos é a fonte das principais preocupações, pois estes são usados como fonte de abastecimento de água para consumo humano. A deterioração de tanques subterrâneos de estocagem, em postos de abastecimento, e o conseqüente vazamento do combustível para o meio ambiente é caracterizada como sendo a principal fonte deste poluente (JÚNIOR, 2008).

A susceptibilidade exibida pelos constituintes do petróleo à biodegradação se modifica conforme a concentração do poluente e o tamanho da molécula do hidrocarboneto (CHOSSON et al., 1991). De modo geral, um aumento no número de anéis eleva a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tornando-os menos susceptíveis à biodegradação (KANALY et al., 2000, YU et al., 2005).

Alguns compostos orgânicos presentes na composição do óleo diesel são cientificamente comprovados como carcinogênicos. Dentre os BTEX, como são chamados os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, o benzeno é considerado o mais tóxico, podendo em exposições crônicas causar danos à medula óssea, leucemia e câncer de fígado (MARIANO, 2006).

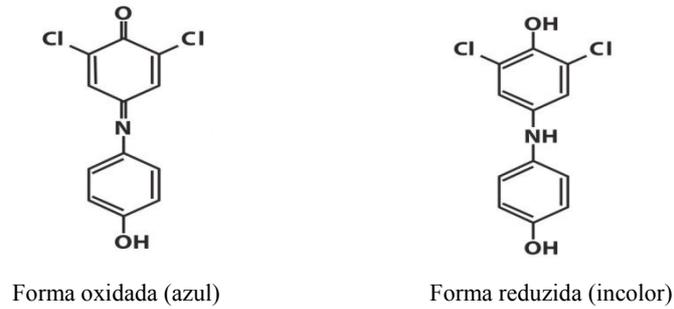
É esperado que a contaminação por óleo reduza a biodiversidade da microbiota presente no solo. Uma provável explicação para isto é que a adição de grandes quantidades de hidrocarbonetos seleciona um número limitado de organismos degradadores de hidrocarbonetos que exibem rápido crescimento, que são enriquecidos no ambiente (tipicamente oligotrófico) do solo sob estas condições. Contudo, existe uma falta de informação sobre como isso pode ser modulado por diferentes matrizes ambientais complexas, e, em particular, como diferentes tipos de solo podem afetar o desenvolvimento de populações de organismos que degradam hidrocarbonetos (BUNDY et al., 2002).

Rosato (1997) diz que estratégias de remediação em ambiente aquático envolvem a queima do óleo *in situ*, aplicação de agentes que catalisam a fotoxidação, o uso de dispersantes, e a coleta física do material por meio de adsorventes e escumadeiras superficiais. Dentre as estratégias recentes, a biorremediação surge como a menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico.

Em ambientes terrestres as refinarias produzem uma elevada quantidade de derivados indesejáveis, que causam poluição ambiental. O *landfarming* é um método empregado por várias refinarias para eliminar estes compostos poluentes. Esse método consiste em promover a dispersão dos resíduos no solo e a biodegradação por microrganismos nativos; o uso de plantas com o fim de estimular a biodegradação foi também relatado. Há evidências de que raízes de plantas, juntamente com a comunidade microbiana, oferecem uma relevante estratégia para remediação de solos contaminados. As plantas podem absorver diretamente os contaminantes e subsequentemente acumular metabólitos não fitotóxicos nos tecidos, e podem liberar exsudatos e enzimas que estimulam a atividade microbiana, as transformações bioquímicas, e o aumento da mineralização na rizosfera (ROSATO, 1997).

A seleção de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo é uma etapa fundamental para o processo de biorremediação. O método do indicador redox DCPIP (2,6 diclorofenol-indofenol) é uma técnica desenvolvida por Hanson et al. (1993) que tem sido utilizada em vários trabalhos, como por exemplo, Cormack & Fraile (1997), Roy et al. (2002), Souza et al. (2004); e Peixoto & Vieira (2005).

O método do indicador redox DCPIP é empregado para avaliar o potencial que os microrganismos apresentam para degradar hidrocarbonetos, como por exemplo, aqueles que constituem o óleo diesel, usando-os como substrato (HANSON et al., 1993). Este método consiste em uma reação de oxi-redução que pode ser indicada pela mudança de cor do DCPIP de azul (forma oxidada) para incolor (forma reduzida) (Figura 3). A capacidade que certo microrganismo apresenta em degradar o óleo diesel é inversamente proporcional ao tempo de virada do DCPIP. Além do DCPIP, de acordo com Meyer (2011), o 2,3,5 trifeniltetrazólio cloreto (TTC), o qual atua como acceptor artificial da cadeia transportadora de elétrons, sofrendo redução do TTC a Trifenilformazan (de incolor a róseo), pode ser utilizado também para selecionar microrganismos com potencial de degradar o óleo diesel.



**FIGURA 3:** Formas oxidada e reduzida do indicador 2,6- diclorofenol-indofenol.  
 Fonte: Cabello et al., 2009.

Outra técnica empregada para avaliar o potencial que os microrganismos apresentam para degradar hidrocarbonetos, consiste em avaliar a biodegradabilidade de resíduos oleosos através do método respirométrico de Bartha e Pramer (MARIANO, 2006), utilizado para medir a produção microbiana de CO<sub>2</sub>. Neste método o CO<sub>2</sub> produzido é capturado por uma solução de hidróxido de potássio (KOH), e a quantidade de gás carbônico absorvida é medida pela titulação do KOH residual.

### 1.3 BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que têm duas regiões distintas, uma apolar localizada na cauda hidrofóbica, e outra polar que pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica, que se encontra na cabeça hidrofílica da molécula. Surfactantes são compostos caracterizados pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido diminuindo a tensão superficial. Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, sendo considerados surfactantes naturais ou biológicos (BICCA et al., 1999).

Uma cadeia hidrocarbonada representa freqüentemente a parte apolar dos biossurfactantes, por sua vez a porção polar, que pode ser composta, por exemplo, com aminoácidos, ou com sacarídeos, pode ser não-iônica, iônica, ou anfotérica. (FILHO, 2009).

Em função de sua massa molecular os biossurfactantes podem possuir baixa massa molecular, como é o caso dos biossurfactantes que exibem a propriedade de reduzir a tensão

superficial/interfacial quando presentes em meio aquoso, ou podem possuir alta massa molecular, sendo chamados de bioemulsificantes, que são responsáveis pela formação de gotículas e pela estabilidade da emulsão, aumentando, dessa maneira, a suspensão do contaminante na fase aquosa.

Os biossurfactantes que apresentam alta massa molar incluem um elevado número de compostos poliméricos extracelulares compostos de polissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros. Os biossurfactantes com baixa massa molar incluem ácidos graxos, fosfolipídeos, lipídeos neutros, lipopeptídeos e glicolipídeos. Entre os lipopeptídeos mais estudados estão a estreptofactina, a surfactina e polimixinas. Entre os glicolipídeos mais investigados estão os soforolipídeos, os trealolipídeos, e os ramnolipídeos (FILHO, 2009).

Fontes et al. (2008), afirmam que nas últimas décadas houve um aumento no interesse em identificar e isolar novos microrganismos produtores de moléculas tenso-ativas que exibem características surfactantes, como baixa concentração micelar crítica (CMC), baixa toxicidade, alta atividade de emulsificação, entre outras.

Diversos produtores de biossurfactantes conhecidos são também organismos degradadores de hidrocarbonetos. A habilidade dos produtores de biossurfactantes, cujo acúmulo em interfaces ou superfícies resulta na redução de forças repulsivas entre fases não similares, e permite que as duas fases interajam mais facilmente, para reduzir a tensão superficial e interfacial, tem relevante consequência na recuperação terciária do petróleo e na biorremediação (BANAT, 1995).

De acordo com Meyer (2011) os contaminantes orgânicos hidrofóbicos, como o óleo diesel, podem ter a sua biodisponibilidade elevada em solo devido a três mecanismos principais, que são a emulsificação da fase líquida não aquosa, que eleva a área em que há contato entre o contaminante e a célula; a elevação da solubilidade aparente do contaminante, onde os hidrocarbonetos são dissolvidos principalmente no núcleo das micelas e, o transporte facilitado do contaminante, por causa da redução da tensão superficial entre o meio aquoso e as partículas do solo.

Os biossurfactantes podem ser produzidos por leveduras, fungos e bactérias, a partir de substratos, como açúcares, óleos e ácidos graxos em geral. Fontes et al. (2008) afirmam que a maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura tem origem bacteriana. As bactérias que produzem biossurfactantes e que são mais relatadas são dos gêneros: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, e *Pseudomonas*. Os lipopeptídios

produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os biossurfactantes mais conhecidos e estudados (BUENO, 2010).

A produção de biossurfactantes por microrganismos é extensivamente relatada, principalmente os pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, a partir de fontes renováveis como óleo vegetal, e resíduos de indústria de óleo (FILHO, 2009).

O emprego de diferentes fontes de carbono modifica a estrutura dos biossurfactantes gerados e, em consequência disto, suas propriedades emulsificantes. Tais alterações podem ser benéficas quando se desejam propriedades específicas para uma aplicação direcionada.

A maior parte dos biossurfactantes é, de modo geral, produzida quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento. No entanto, determinadas espécies podem apresentar pequena produção durante a fase exponencial de crescimento.

Existem diferentes formas de produção de biossurfactantes. Estes podem ser produzidos associados ao crescimento celular pela indução da produção por substratos lipofílicos; pelo aumento da produção pela otimização da composição do meio, através do aumento da produção pela otimização das condições de pH, aeração, velocidade de agitação, etc.; ou por meio do aumento da produção por adição de reagentes, o que causa uma mudança na permeabilidade da parede celular. A produção de biossurfactantes pode ocorrer por crescimento celular em condições limitantes de nitrogênio, de cátions multivalentes, e por mudanças no ambiente do meio, como pH e temperatura. É possível produzir biossurfactantes por *resting cell* (forma de produção em que não há multiplicação celular), por meio da produção por células livres, pela produção por células imobilizadas, ou por meio da produção por células imobilizadas com remoção simultânea do produto. A produção de biossurfactantes pode ocorrer também por meio do crescimento associado e *resting cells* com adição de precursores (FONTES et al., 2008).

Biossurfactantes desempenham importantes atividades biológicas, incluindo atividades antibióticas, antifúngicas, antivirais, imunomoduladoras, e antitumorais. Os biossurfactantes apresentam potenciais de uso em setores farmacêutico e de alimentos. Uma grande parte da produção de biossurfactantes (400-500 toneladas/ano) é usada pela indústria de petróleo. Estas moléculas são incorporadas em óleos lubrificantes e usadas na produção de petróleo, na dispersão de óleo derramado, e na recuperação melhorada de óleo cru (BOGNOLO, 1999).

Para que seja possível sua aplicação é necessário que estes compostos apresentem estabilidade e manutenção de suas propriedades em condições extremas, que estão frequentemente associadas a esses processos. Piróllo et al. (2008) afirmam que os surfactantes microbianos exibem muitas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos tal como baixa toxicidade, fácil biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior capacidade espumante, alta seletividade e atividade específica em temperaturas, pH e salinidade extremas. A mais importante limitação para o emprego comercial dos biosurfactantes é o alto custo de produção, que tem limitado o desenvolvimento do seu uso em larga escala.

#### 1.4 APLICAÇÃO DO EXPERIMENTO *MICROCOSMO* NAS PESQUISAS SOBRE A BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO

A análise dinâmica de bactérias ativas na degradação de hidrocarbonetos, por exemplo, aqueles que estão presentes no óleo diesel pode ser conduzida em experimentos envolvendo *microcosmo*.

Os testes com *microcosmo* do solo abrangem tratamentos estéreis como controle apropriado, com o intuito de separar os efeitos abióticos da perda de hidrocarbonetos da biodegradação que realmente ocorre (SINGH, 2006). Estes testes são empregados para avaliar o potencial de biodegradação e desenvolvimento de modelos para prever o destino dos hidrocarbonetos. Entre as vantagens da utilização desses métodos está o fato de que a taxa de degradação e produtos metabólicos produzidos podem ser monitorados. Esses testes com *microcosmo* do solo podem ser conduzidos em frascos simples com solo contaminado e em sistemas altamente sofisticados.

Muitos designs de *microcosmo* são correntemente utilizados (BUNDY et al., 2002, MOLINA-BARAHONA et al., 2004, OKOH, 2003). *Microcosmos*, embora não representem a complexidade presente na natureza em sua totalidade, são ferramentas efetivas, realizáveis, rápidas e relativamente econômicas para a amostragem e identificação do efeito que compostos químicos potencialmente venham a ter na natureza. Kirk et al. (1991), destacam a importância de dados obtidos em *microcosmo* para confirmar ou não se determinados fungos

marinhos degradam hidrocarbonetos em seus ambientes naturais, ou tem potencial como agentes biorremediadores de petróleo em derrames marinhos.

Fatores ambientais que afetem a utilização de hidrocarbonetos do petróleo pelos microrganismos devem ser devidamente mensurados na preparação de um *microcosmo*. Entre estes fatores é possível citar: disponibilidade adequada de água, que resulte em uma atividade microbiana elevada, concentração de oxigênio dissolvido que não cause prejuízos diretos à atividade dos microrganismos aeróbios, tipos de solo, considerando partículas que propiciem ou não a sorção dos hidrocarbonetos, diminuindo sua biodisponibilidade aos microrganismos degradadores, além de fatores como temperatura, nível e teor de nutrientes inorgânicos, teor de matéria orgânica, e pH (WETLER-TONINI et al., 2010). Quanto à análise destes fatores, Angle et al. (1995), observaram que o estudo com utilização do *microcosmo* com solo que sofreu distúrbio, por secagem e peneiramento, exibiu um mais rápido declínio da população de bactérias recombinantes introduzidas no solo em relação ao *microcosmo* com solo intacto. Em trabalho de Ueno et al.(2007), foram realizados o isolamento e a caracterização de bactérias do solo contaminado com óleo diesel e foi verificado o possível uso destas no bioaumento autóctone. Bento et al. (2005), estudaram comparativamente a biorremediação de solos contaminados com óleo diesel por atenuação natural, bioestimulação e bioaumento, e avaliaram a capacidade de degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo no solo (HTP), o número de microrganismos que degradam óleo diesel presentes e a atividade microbiana. Após 12 semanas de incubação, o bioaumento realizado no primeiro solo exibiu uma grande degradação das frações leve e pesada de HTP, enquanto a atenuação natural foi mais efetiva que a bioestimulação, mais notadamente no segundo solo.

Nos ambientes naturais, o nutriente que geralmente é limitante para o crescimento microbiano é o carbono, sendo que os nutrientes inorgânicos são encontrados em quantidades que costumam exceder as demandas das comunidades microbianas (RHEINHEIMER et al., 2000). Em estudo de Purandare et al. (1999), a adição de nitrato e fosfato melhorou a degradação de óleo acima da taxa de atenuação natural.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo a análise do potencial de degradação do óleo diesel e da produção de biossurfactantes por bactérias isoladas do solo rizosférico de plantas *Calotropia procera* (P1), *Cenchrus cf. echinatus* (P2), e *Dactyloctenium aegyptium* (P3), no aterro de resíduos sólidos da produção de petróleo localizado no campo de Fazenda Belém da PETROBRÁS, no município de Icapuí-CE. Objetivou-se também avaliar a dinâmica populacional de linhagens de bactérias ativas na degradação de óleo diesel no solo contaminado com óleo diesel em condições laboratoriais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a capacidade de degradação do óleo diesel de linhagens bacterianas;
- b) Analisar a produção de biossurfactantes por linhagens bacterianas utilizando o teste de emulsificação do óleo diesel e o teste de hemólise;
- c) Selecionar as linhagens bacterianas mais ativas na degradação e emulsificação de óleo diesel e analisar sua dinâmica populacional no solo contaminado com óleo diesel no experimento *microcosmo*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LINHAGENS BACTERIANAS

No presente estudo foram utilizadas 24 linhagens de bactérias isoladas do solo rizosférico de plantas *Calotropia procera* (P1), *Cenchrus cf. echinatus* (P2), e *Dactyloctenium aegyptium* (P3), coletadas em aterro de resíduos sólidos da produção de petróleo (Figura 4) localizado no campo de Fazenda Belém da PETROBRÁS, no município Icapuí-CE (GORLACH-LIRA, 2003).

Uma linhagem (AG4), isolada de água contaminada por petróleo, no município de Guamaré-RN, foi utilizada como controle nos testes de degradação de óleo diesel, bem como no experimento *microcosmo*, por apresentar a capacidade de degradação e emulsificação do óleo diesel (DUARTE, 2004).



**FIGURA 4:** Exemplar da planta *Calotropia procera* (esquerda), e exemplar da gramínea *Dactyloctenium aegyptium* (direita), no Campo de Fazenda Belém, Icapuí – CE.

O estoque de linhagens bacterianas foi feito em água destilada esterilizada e no meio completo semi-sólido composto por 0,5g de glicose, 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de peptona, 0,5 g de casaminoácidos, 0,5 g de amido, 0,3 g de piruvato de sódio, 0,2 g de  $K_2HPO_4$ , 0,05 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 4,0 g de ágar, e 1000 ml de água destilada (ALEF, 1995).

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS

A caracterização consistiu nos testes de coloração Gram, de motilidade, de produção de endósporos e de produção de catalase.

Para realizar a coloração de Gram, o esfregaço de bactérias foi fixado a partir do aquecimento em chama, foi corado com violeta cristal por um minuto, e em seguida o preparado foi coberto com solução de Lugol por um minuto e lavado com álcool etílico 95%, até que o mesmo tornou-se incolor ao sair da lâmina; em seguida este foi corado com safranina por 15-20 segundos. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico (LEICA), na objetiva de imersão.

A determinação da produção de catalase foi realizada adicionando uma gota de água oxigenada 3% na superfície da colônia bacteriana cultivada em placa de Petri e examinando-a imediatamente e após 5 minutos para a evolução das bolhas, que indica um teste positivo (GERHARDT et al., 1994).

Com o intuito de observar a motilidade, as células da cultura de bactérias no meio sólido foram colocadas em uma gota de água destilada na lâmina histológica, que posteriormente foi coberta com lamínula. A seguir as lâminas foram observadas no microscópio óptico (LEICA), na objetiva de imersão.

Para a realização do teste de formação de endósporos, 1 ml de suspensão de bactérias em água destilada estéril, foi aquecida em banho-maria a 80 °C por 10 minutos e, em seguida, foi realizado o plaqueamento da suspensão em profundidade no meio completo. O crescimento de bactérias foi observado após 5 dias de incubação a 30 °C (SMIBERT; KRIEG, 1994).

### 3.3 DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR BACTÉRIAS

O potencial de degradação do petróleo foi analisado a partir da redução do corante 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP), pelo método desenvolvido por Hanson et al. (1993).

O teste de degradação de óleo diesel a partir da verificação da descoloração do corante 2,6 diclorofenol-indofenol foi realizado utilizando tubos de ensaio, e microplacas com 96 poços.

Para os testes de degradação de óleo diesel as bactérias foram cultivadas em meio líquido mineral de Bushnell e Haas (1g de  $K_2HPO_4$ , 1 g de  $KH_2PO_4$ , 1 g de  $NH_4NO_3$ , 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,05 g de  $FeCl_3$ , 0,02 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1000 ml de água destilada), pH 7,0, com adição de óleo diesel sem aditivos, em tubos de ensaio ou em placas com 96 poços.

Para estes testes, primeiramente as linhagens foram inoculadas em 10 ml de meio completo líquido e incubadas a 30° C sob agitação, por 24h. Em seguida as culturas foram centrifugadas por 10 minutos. As células foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% para obter um padrão de turbidez Mc Farland n° 3.

Para os testes em tubos de ensaio foram utilizados 3 ml de meio mineral Bushnell e Haas, 30 µl de óleo diesel, 40 µl de 2,6 DCPIP 0,05%, e 100 µl de suspensão de células (em duplicata). Foram utilizados dois tipos de controle negativo: controle sem inóculo (C1), e controle sem óleo diesel (C2). Os tubos foram incubados sob agitação (120 rpm), durante 72 horas, a 30° C. Diariamente todos os tubos foram observados, verificando se ocorreu mudança de cor do 2,6 DCPIP, de azul (oxidado) para sem coloração (reduzido).

Para os testes em microplacas, 172 µl de meio mineral Bushnell e Haas, 2µl de óleo diesel, 6 µl de 2,6 DCPIP 0,05%, e 20 µl da suspensão de células foram colocadas nos poços, em duplicata. As placas foram incubadas em estufa a 30° C por 72 horas.

Testes envolvendo a ação de culturas mistas compostas de duas linhagens foram realizados em placas com 96 poços e em tubos de ensaio. Nestes casos respectivamente 10 µl (microplacas), e 50 µl (tubos de ensaio), da suspensão de células padronizadas de cada linhagem bacteriana foram adicionados ao meio Bushnell e Hass, com 2,6 DCPIP (0,5%).

### 3.4 DETECÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Para analisar a produção de biossurfactantes foram empregados o teste de emulsificação (GAYLARDE, 2000), e o teste de hemólise.

As bactérias isoladas foram cultivadas individualmente em 10 ml de meio caldo nutriente (CN), ou em meio de Bushnell-Haas (BH) com adição de 0,1 ml de óleo diesel durante dez dias em temperatura de 30 °C, sob agitação. Após este período as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 6000 rpm, em temperatura ambiente. 2 ml da cultura de células ou 2 ml do sobrenadante foram adicionados à tubos de ensaio, que continham 2 ml de óleo diesel sem aditivos. Posteriormente os tubos foram agitados em agitador de tipo vórtex

durante dois minutos. Em seguida o material foi mantido em repouso durante 5 minutos, e foi realizada a medida da altura da camada emulsificada, medição esta que foi repetida após 24 horas de repouso.

O índice de emulsificação foi obtido após 5 minutos (E5) e 24 horas (E24), dividindo a altura da camada emulsificada pela altura total da coluna no tubo vezes 100, com resultado em porcentagem, através da fórmula descrita por Cooper e Goldenberg (1987). As linhagens foram consideradas positivas no teste de emulsificação quando os índices de emulsificação foram iguais ou maiores a 10%.

Para a realização do teste de hemólise, as bactérias foram inoculadas em meio completo em placas de Petri, e incubadas por 48 h, a 30 °C. Em seguida as bactérias foram inoculadas em meio Ágar Sangue (40 g de Blood Ágar Base, 1000ml de água destilada esterelizada, e 53 ml de sangue de coelho desfibrinado), e incubadas por 24 h/ 30 °C. Nesse teste a presença de zonas de hemólise indica a produção de biossurfactantes. O diâmetro de zonas de hemólise foi medido em milímetros.

### 3.5 ANÁLISE DA DINÂMICA POPULACIONAL DE BACTÉRIAS NO EXPERIMENTO *MICROCOSMO*

Para avaliar a dinâmica populacional de linhagens de bactérias ativas na degradação de óleo diesel, foi preparado o experimento *microcosmo*, com o solo com adição de óleo diesel.

O solo foi coletado no Campus I da UFPB em João Pessoa – PB (entre as coordenadas 7° 8' 30,3" S e 34° 50' 44,5" W). O solo foi peneirado através de uma malha com aberturas de 2 mm, e autoclavado duas vezes, por 30 minutos, em dois dias subsequentes. Posteriormente foi determinada 55% da capacidade de saturação do solo e o déficit de umidade do solo. Porções de 50 gramas de solo foram pesadas e colocadas em Beckers de 100ml.

Foram realizados dois experimentos *microcosmo*. No primeiro experimento foram utilizadas duas linhagens separadamente, onde havia dois *microcosmos* com uma linhagem cada (P1R21 ou P3R30). No segundo experimento foram utilizadas culturas mistas compostas por três linhagens separadamente, onde havia dois *microcosmos* com três linhagens cada.

Para o primeiro experimento foi adicionado 1 ml de óleo diesel não aditivado (2%) ao solo. Posteriormente foram adicionadas 5,4 ml de água destilada estéril, para atingir 55%

da capacidade de saturação do solo, 1 ml de solução padronizada de células de bactérias, e 100 µl de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2% (10 µl de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2% no segundo experimento). A partir de então foi feita a mistura com a espátula de metal, dos referidos compostos durante cinco minutos.

Os Beckers de ambos os experimentos foram incubados em caixa úmida a 30°C por um período de 60 dias.

Foram utilizados dois controles, o primeiro, sem adição de óleo diesel, com adição de 1 ml de solução de células de bactérias, 6,4 ml de água destilada estéril, 100 µl de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2% (10 µl de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2% no segundo experimento), e 50 gramas de solo, e o segundo, sem o inóculo, contendo 1 ml de óleo, 6,4 ml de água destilada estéril, 100 µl de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2% (10 µl de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2% no segundo experimento), e 50 gramas de solo.

A quantificação de bactérias foi realizada utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade. Foram feitas diluições decimais de cada amostra do solo analisado utilizando 5g do solo e solução salina (0,9% NaCl). Aliquotas de 0,1 ou 1 ml da diluição do solo foram adicionadas em uma placa estéril e posteriormente foi adicionado o meio completo, mantido a cerca de 40-45°C. Após a incubação das placas por 5 dias na estufa, a 30 °C, foi realizada a contagem de colônias, nas placas que continham de 25-30 a 250-300 colônias. O número de bactérias foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco, e as análises foram realizadas nos dias 0, 5, 10,15, 48 e 60.

Os parâmetros físico-químicos (pH, conteúdo de matéria orgânica, micronutrientes, e macronutrientes) e a granulometria do solo utilizado no experimento *microcosmo* foram determinados pelo Laboratório de Análise de Solos, no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa-MG.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 BIÓTIPOS DE LINHAGENS BACTERIANAS

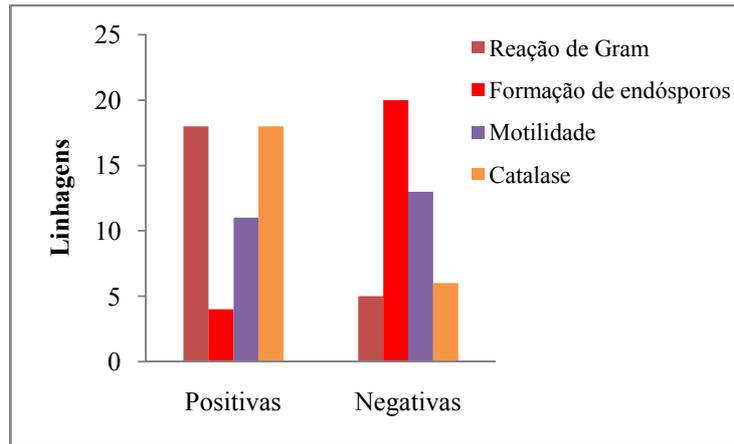
Na Tabela 1 se observa os biótipos das 24 linhagens bacterianas estudadas. Cinco biótipos foram estabelecidos na base da morfologia de células, reação de Gram, formação de endósporos, motilidade e produção de catalase (Tabela 1, Figura 5). Entre as bactérias analisadas, 18 foram gram-positivas, 5 gram-negativas e uma linhagem foi gram-variável. A maioria das linhagens pertencia aos biótipos A e B, correspondendo respectivamente a 50% e a 20,8% das linhagens. As bactérias gram-positivas exibiram formas de bastonetes, coco, e cocobacilo. As bactérias isoladas do solo rizosférico de *Cenchrus cf. echinatus* e *Dactyloctenium aegyptium* pertenciam aos biótipos A, B, D e E.

Três linhagens de bactérias formaram endósporos (biótipo C), todas isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera*. Duas linhagens obtidas do solo rizosférico de *Dactyloctenium aegyptium* (P3R24 e P3R29) foram identificadas como actinomicetos (biótipo D).

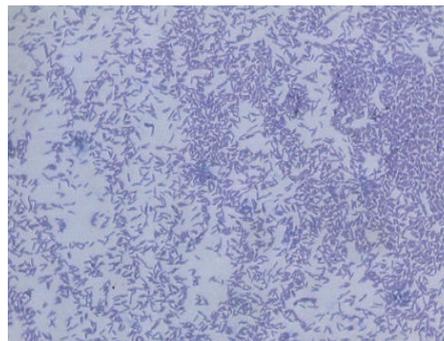
**TABELA 1:** Caracterização morfológica e fisiológica de bactérias isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera* (P1R\_), *Cenchrus cf. echinatus* (P2R\_) e *Dactyloctenium aegyptium* (P3R\_).

Biotipos	Características	Linhagens
A	Bastonetes, gram-positivos, ausência de endósporos, catalase +/-, móveis ou sem motilidade	P2R11, P2R18, P2R20, P2R29, P3R3, P3R10, P3R21, P3R22, P3R25, P3R30*, P3R31, P3R32
B	Bastonetes, gram-negativos, ausência de endósporos, catalase +/-, móveis ou sem motilidade	P2R23, P2R24, P3R9, P3R27, P3R28
C	Bastonetes, gram-positivos, presença de endósporos, catalase +, móveis ou sem motilidade	P1R14, P1R16, P1R21
D	Filamento	P3R24, P3R29
E	Cocobacilo/ Coco	P2R1/ P2R17

Legenda: \* : Gram-variável



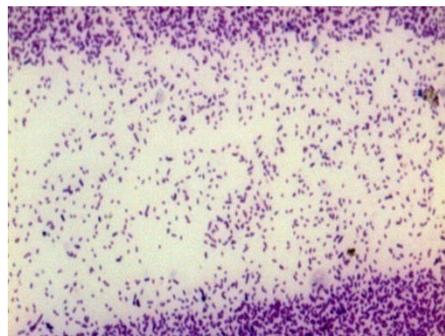
**FIGURA 5:** Número de linhagens de bactérias positivas e negativas em testes morfológicos e fisiológicos.



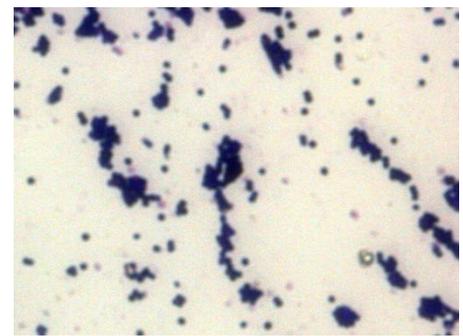
Linhagem P3R31 – Biotipo A (1000x)



Linhagem P3R24 – Biotipo D (1000x)



Linhagem P1R21 – Biotipo C (1000x)



Linhagem P2R1 – Biotipo E (1000x)

**FIGURA 6:** Morfologia de bactérias pertencentes aos diferentes biótipos analisados.

#### 4.2 DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR BACTÉRIAS

O método do indicador 2,6 DCPIP apresentou-se eficiente para avaliar o potencial dos microrganismos para degradar o óleo diesel, tanto em testes realizados em tubos de ensaio como em microplacas. As linhagens apresentaram capacidades distintas para degradar o óleo diesel, como é demonstrado nas Tabelas 2 e 3.

Os resultados dos testes preliminares de degradação do óleo diesel em tubos de ensaio são apresentados na Tabela 2. Foi observado que quatro das cinco linhagens testadas em tubos de ensaio apresentaram degradação do óleo diesel após 2 ou 3 dias de incubação, incluindo o controle positivo AG4. Como pode se observar na Tabela 2, houve diminuição do tempo de redução do 2,6 DCPIP para duas linhagens quando estas foram testadas em microplacas, sendo assim, esse teste foi escolhido para análise de todas as linhagens com relação à degradação do óleo diesel.

Nos tubos e poços das microplacas utilizados como controle não houve a descoloração do indicador que manteve sempre a cor azul (Figuras 7, 9, e 10).

**TABELA 2:** Testes preliminares de degradação do óleo Diesel em tubos de ensaio e em microplacas por bactérias isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera* (P1R\_), *Cenchrus cf. echinatus* (P2R\_) e *Dactyloctenium aegyptium* (P3R\_).

Linhagem	Tempo de descoloração de 2,6 DCPIP em dias	
	Tubo de ensaio	Microplaca
P1R14	2	2
P1R21	2	1
P2R1	-	-
P3R21	2	2
AG4*	3	2

(-) não houve descoloração de 2,6 DCPIP após 3 dias do experimento

\* AG4 (controle positivo) isolada de água contaminada por petróleo



**FIGURA 7:** Testes de degradação de óleo diesel, por bactérias isoladas do solo rizosférico de plantas *Calotropia procera* (linhagem P1R21), realizado em tubos de ensaio.

Entre as 24 linhagens testadas 12 foram positivas no teste de degradação do óleo diesel (Tabela 3). A maioria dos isolados positivos foi isolada de rizosfera de *Calotropia procera* e *Dactyloctenium aegyptium* (Figura 8).

A redução do corante DCPIP após as 24 horas de incubação foi observada para as duas linhagens (P1R14 e P1R21) e após 48 horas de incubação para quatro linhagens: P1R16, P3R21, P3R30, e P3R31, bem como para linhagem controle AG4 (Tabela 3).

Seis linhagens (P2R11, P3R9, P3R22, P3R24, P3R25, e P3R29) apresentaram capacidade em reduzir o corante em até três dias de incubação.

Souza et al. (2004), analisaram o potencial de degradação do óleo diesel de 86 linhagens: 40 bactérias, 23 leveduras e 23 fungos filamentosos. 5% das bactérias, 4% dos fungos e 17% das leveduras testadas apresentaram a redução do indicador DCPIP no meio de cultivo com até 24 horas.

Conforme estudo de Vaz (2010), 41 isolados bacterianos testados quanto ao potencial de degradação de biodiesel e óleo diesel promoveram redução do indicador 2,6 DCPIP no teste nas microplacas, contendo meio de cultura mínimo, apenas após 7 dias de incubação de bactérias.

Em estudo de Miranda et al. (2007), foi observado que entre 23 cepas de leveduras que degradaram óleo Diesel no teste com uso do corante 2,6 DCPIP, duas apresentaram descoloração do indicador após 16 e 24 horas de incubação a 30°C. As outras cepas tornaram o meio de cultura incolor após os períodos de 48 h (8%) e 72 h (84%).

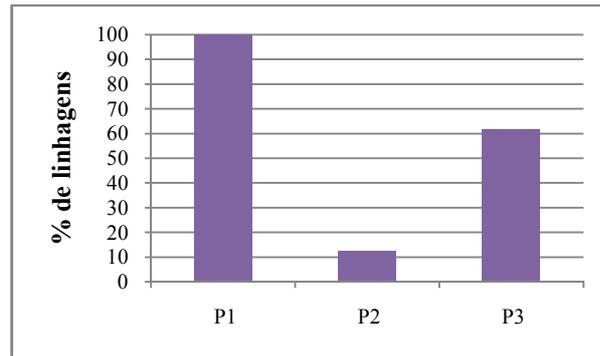
Em estudo de Mariano et al. (2007), no teste que utilizou o indicador 2,6- DCPIP, a descoloração do meio de cultivo aconteceu em 3 dias para ambos os óleos diesel testados (comercial e intemperizado). Foi observado neste estudo que na água subterrânea, de um poço de monitoramento, havia uma microbiota adaptada para degradar hidrocarbonetos recalcitrantes, onde cada espécie exercia uma função específica nas sequências de reações enzimáticas responsáveis pela quebra de cadeias complexas de hidrocarbonetos.

**TABELA 3:** Testes de degradação do óleo Diesel em microplacas por bactérias isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera* (P1R\_), *Cenchrus cf. echinatus* (P2R\_) e *Dactyloctenium aegyptium* (P3R\_).

Linhagem	Teste em microplacas
	Tempo de descoloração de 2,6 DCPIP em dias
P1R14	1
P1R16	2
P1R21	1
P2R1	-
P2R11	3
P2R17	-
P2R18	-
P2R20	-
P2R23	-
P2R24	-
P2R29	-
P3R3	-
P3R9	3
P3R10	-
P3R21	2
P3R22	3
P3R24	3
P3R25	3
P3R27	-
P3R28	-
P3R29	3
P3R30	2
P3R31	2
P3R32	-
AG4*	2

(-) não houve descoloração de 2,6 DCPIP após 3 dias do experimento

\* AG4 (controle positivo) isolada de água contaminada por petróleo.



**FIGURA 8:** Porcentagem de linhagens ativas na degradação do óleo diesel isoladas da rizosfera de *Calotropia procera* (P1), *Cenchrus cf. echinatus* (P2), e *Dactyloctenium aegyptium* (P3).

No presente trabalho foi observado que as culturas de bactérias compostas de duas linhagens (cultura mista) apresentaram eficiência inferior no teste de degradação de óleo diesel, em relação às suas respectivas culturas de bactérias compostas de uma linhagem (Tabela 4).

Richard e Vogel (1999), estudando um consórcio de bactérias capaz de degradar óleo diesel no solo, concluíram que, dos sete membros do consórcio, quatro não faziam uso direto do óleo como fonte de carbono e energia; contudo, a presença destas aumentava a produção de CO<sub>2</sub> pelo consumo de intermediários produzidos pelos demais membros.

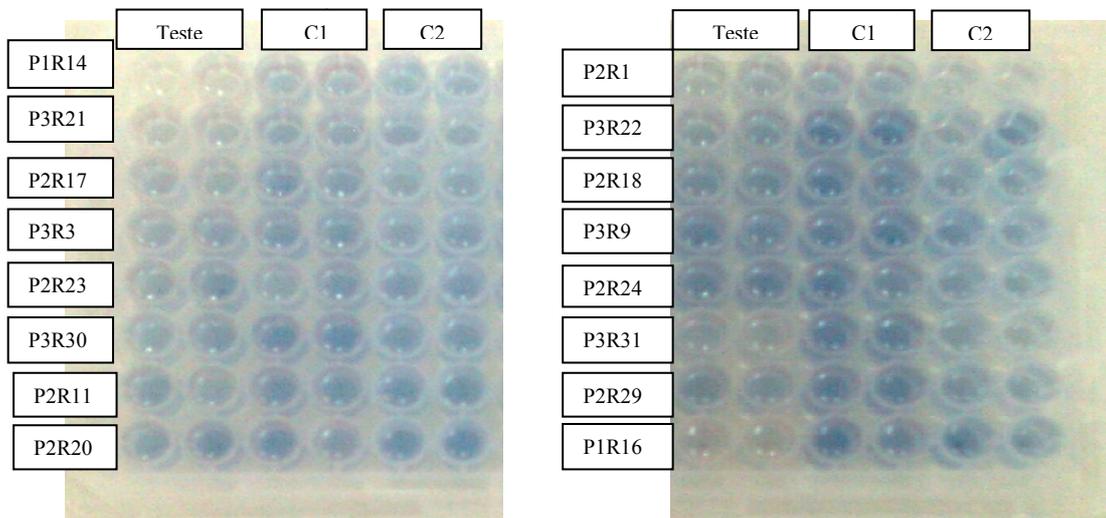
Mariano (2006) afirma que o melhor desempenho de consórcios microbianos demonstra a grande relevância de se considerar a função do cometabolismo no tratamento de poluentes como o óleo diesel, onde cada espécie tem uma função específica nas sequências de reações enzimáticas responsáveis pela quebra de cadeias complexas de hidrocarbonetos.

**TABELA 4:** Testes de degradação do óleo Diesel por culturas mistas de bactérias.

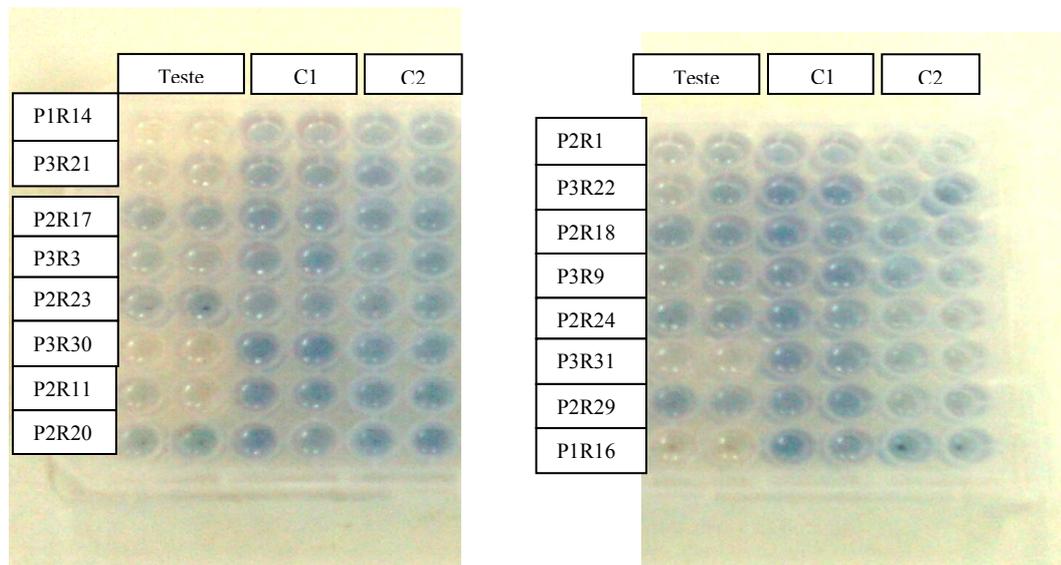
Linhagens	Teste
	Tempo de descoloração de 2,6 DCPIP em dias
P3R25+P3R29	2 (a)
P3R21+P3R31	3 (b)
P3R21+P3R32	- (b)
P3R31+P3R32	- (b)

\* (-) não houve descoloração após 3 dias do experimento

\*\*a- teste realizado em tubos de ensaio, b-teste realizado em microplacas



**FIGURA 9:** Teste de redução de DCPIP em microplacas após um dia de incubação de bactérias. Cada combinação foi realizada em dois poços. Controle: sem inóculo - C1; sem óleo diesel - C2.



**FIGURA 10:** Teste de redução de DCPIP em microplacas após dois dias de incubação por bactérias. Cada combinação foi realizada em dois poços. Controle: sem inóculo - C1; sem óleo diesel - C2.

#### 4.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR BACTÉRIAS

Os dados referentes à emulsificação do óleo diesel por culturas e por sobrenadante livre de células das bactérias são exibidos na Tabela 5.

O meio Caldo Nutriente com óleo diesel mostrou-se eficiente na indução da capacidade de emulsificação do óleo diesel por bactérias, sendo que 16 linhagens foram positivas com índices de emulsificação E24 variando de 10 a 48,5%. A produção de biossurfactantes extracelulares avaliada pelo teste de emulsificação do óleo diesel por sobrenadante livre de células foi observada em 11 linhagens (Tabela 5). A maioria das linhagens apresentou boa estabilidade de emulsão (0,7 – 1,0).

No meio Bushnell e Hass com óleo diesel apenas uma linhagem (P1R16) apresentou a capacidade de emulsificar o óleo diesel (Tabela 5). Essa linhagem não produziu biossurfactantes extracelulares.

Meyer (2011), no que diz respeito à localização celular dos biossurfactantes, afirma que os mesmos podem ser encontrados intracelularmente, permanecendo ligados à superfície celular ou podem ser translocados para o meio extracelular. A maioria das linhagens analisadas neste trabalho apresentou biossurfactantes obtidos a partir da cultura de células.

Bueno (2008) afirma que uma melhor concentração e fonte de carbono permitem uma produção de biossurfactante melhor e por sua vez, sua presença e quantificação se relaciona a reduzidas leituras de tensão superficial, índices de emulsificação elevados e estáveis e elevada atividade emulsificante. O mesmo autor diz ainda que índices de emulsificações estáveis podem caracterizar um ótimo emulsificante. Conforme afirmam Willumsen e Karlson (1997) a capacidade de manter ao menos 50% do volume original, 24 horas após a formação, é um critério empregado para avaliar a capacidade de estabilização da emulsão. No nosso trabalho a estabilidade da emulsão de muitas das linhagens bacterianas testadas foi alta, indicando o potencial das bactérias no processo de emulsificação do óleo diesel.

No meio Caldo Nutriente, elevados valores de índice de emulsificação (E 24) das culturas foram obtidos pelas bactérias P2R1, P2R18, P2R29, P3R28, e P3R31 (Tabela 5).

As linhagens P2R1, P2R18, P2R29 e P3R31 exibiram altos índices de emulsificação E24 (30,3 – 43,3%) tanto para o sobrenadante livre de células, como para a cultura de células.

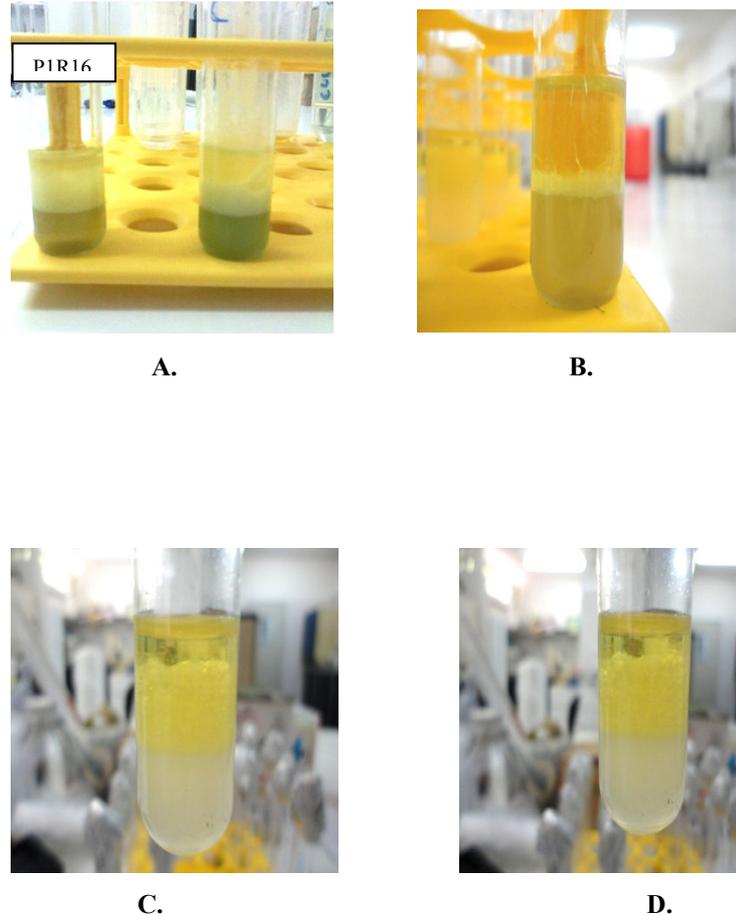
**TABELA 5:** Índices de emulsificação de óleo diesel por linhagens cultivadas no meio caldo nutriente (CN) e no meio Bushnell e Haas (BH), contendo 1% de óleo diesel.

Linhagem	Meio CN						Meio BH					
	Sobrenadante			Cultura			Sobrenadante			Cultura		
	E5* %	E24* %	ES**	E5 %	E24 %	ES	E5 %	E24 %	ES	E5 %	E24 %	ES
P1R14	100,0	-	-	66,6	16,6	0,2	-	-	-	-	-	-
P1R16	60,0	33,3	0,6	33,3	-	-	-	-	-	41,9	41,9	1,0
P1R21	56,6	10,0	0,2	56,6	10,0	0,2	-	-	-	-	-	-
P2R1	40,0	40,0	1,0	42,0	42,0	1,0	10,0	-	-	-	-	-
P2R11	-	-	-	56,6	-	-	-	-	-	-	-	-
P2R17	23,3	23,3	1,0	26,6	26,6	1,0	-	-	-	-	-	-
P2R18	30,3	30,3	1,0	34,2	34,2	1,0	-	-	-	-	-	-
P2R20	30,0	16,0	0,5	28,0	25,0	0,9	-	-	-	-	-	-
P2R23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2R24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2R29	39,0	39,0	1,0	36,0	36,0	1,0	-	-	-	-	-	-
P3R3	21,4	21,4	1,0	16,6	16,6	1,0	-	-	-	-	-	-
P3R9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P3R10	30,3	-	-	60,0	33,3	0,5	-	-	-	-	-	-
P3R21	13,3	13,3	1,0	16,6	-	-	-	-	-	-	-	-
P3R22	26,6	-	-	40,0	-	-	-	-	-	-	-	-
P3R24	46,6	-	-	46,6	-	-	-	-	-	-	-	-
P3R25	13,3	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-
P3R27	64,2	-	-	53,5	17,8	0,3	-	-	-	-	-	-
P3R28	14,2	14,2	1,0	48,5	48,5	1,0	-	-	-	-	-	-
P3R29	33,3	-	-	16,6	16,6	1,0	-	-	-	-	-	-
P3R30	13,3	-	-	40,0	33,3	0,8	-	-	-	-	-	-
P3R31	53,3	43,3	0,8	53,3	36,6	0,7	-	-	-	-	-	-
P3R32	41,1	-	-	29,4	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) ausência de emulsão,

\* E5% e E24%= índices de emulsificação após 5 min, e após 24h, respectivamente

\*\* ES= estabilidade



**FIGURA 11:** Emulsificação de óleo diesel por sobrenadante livre de células da linhagem P1R16, crescida em meio CN, com adição de óleo diesel, após 5 minutos (A) e após 24 horas de repouso (B); emulsificação de óleo diesel por cultura da linhagem P1R16, crescida em meio BH, com adição de óleo diesel, após 5 minutos (C) e após 24 horas (D).

Das 19 linhagens testadas no teste de hemólise, seis apresentaram atividade hemolítica, sendo 3 linhagens isoladas de *Calotropia procera*, e 3 isoladas de *Dactyloctenium aegyptium* (Tabela 6).

Em trabalho de Bueno (2008), de vinte e oito cepas bacterianas apenas treze apresentaram hemólise em placas de Agar sangue.

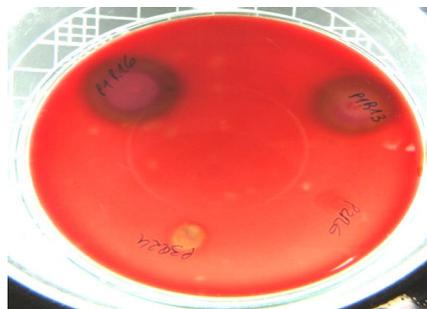
Os resultados apresentados por Araújo (2002) mostraram melhora na atividade hemolítica a 37°C em comparação com a atividade hemolítica à 30 °C, sendo que 35 isolados incubados a 37 °C exibiram halos variando de 1 a 7mm.

O teste de hemólise pode exibir resultados falso-positivos na detecção de biosurfactantes, devido à secreção por bactérias de outros fatores hemolíticos, como as proteases (SIEGMUND; WAGNER, 1991).

**TABELA 6:** Atividade hemolítica de bactérias isoladas do solo rizosférico de *Calotropia procera* (P1R\_), *Cenchrus cf. echinatus* (P2R\_) e *Dactyloctenium aegyptium* (P3R\_).

Linagem	Diâmetro do halo (mm)
P1R14	20
P1R16	22
P1R21	20
P2R1	-
P2R11	-
P2R17	-
P2R18	-
P2R23	-
P2R24	-
P2R29	-
P3R3	-
P3R10	10
P3R22	-
P3R24	-
P3R28	12
P3R29	-
P3R30	20
P3R31	-
P3R32	-

(-) sem formação de halo



**FIGURA 12:** Atividade hemolítica das linhagens P1R16 e P1R13.

#### 4.3 DINÂMICA POPULACIONAL DE BACTÉRIAS NO SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL

As características do solo utilizado para a realização do experimento *microcosmo* são exibidas nas Tabelas 7 e 8. A classe textural do solo foi definida como areia-franca, com alta concentração de areia grossa, e uma baixa concentração de silte. O solo exibiu pH levemente ácido, e apresentou uma elevada concentração de potássio e ferro em comparação ao conteúdo de fósforo e de sódio (Tabelas 8).

**TABELA 7:** Parâmetros físico-químicos do solo utilizado para o experimento *microcosmo*.

pH	P	K	Na	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S	MO	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>
H <sub>2</sub> O	(mg/dm <sup>3</sup> )									(dag/kg)	(cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )		
6,20	8,9	50	18,6	1,18	52,6	1,6	0,01	0,95	4,5	1,86	2,34	0,34	0,00

$$*Matéria\ orgânica\ (MO) = C.Org.\ x\ 1,724$$

**TABELA 8:** Caracterização do solo utilizado para o experimento *microcosmo*, quanto à granulometria.

Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Classe textural
(dag/Kg)				
60	27	2	11	Areia-franca

A densidade de bactérias no solo depende de vários fatores como quantidade e qualidade de nutrientes, temperatura, umidade, pH e interações entre os microrganismos. Esses e outros fatores influenciam na sobrevivência e reprodução de bactérias, provocando geralmente as oscilações do número de bactérias ao longo do tempo.

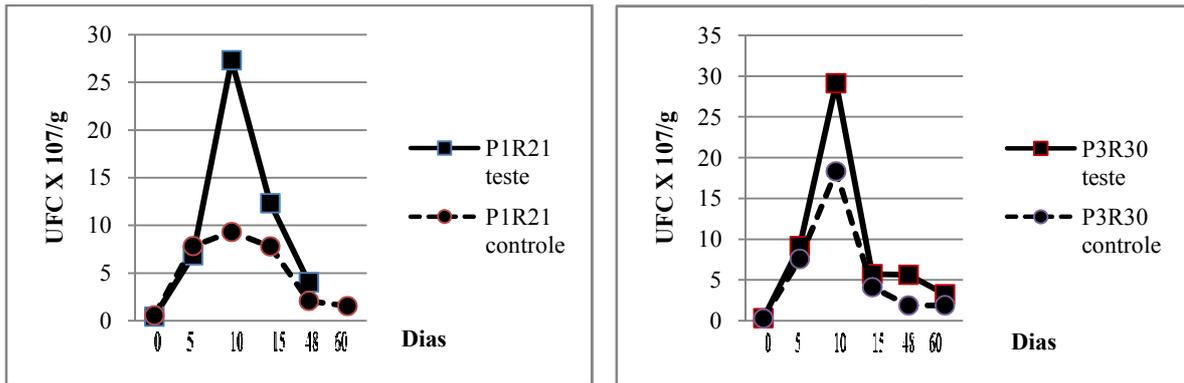
Os dados referentes às contagens de linhagens P1R21 e P3R30 introduzidas separadamente (dois *microcosmos* independentes) no solo contaminado com óleo diesel estão exibidos na Tabela 9 e nas Figuras 13 e 14. Nos primeiros cinco dias as contagens das linhagens no solo sem óleo diesel foram similares àquelas feitas no solo com óleo diesel. O aumento de contagens de ambas as linhagens no solo com e sem óleo diesel foi observado até o décimo dia do experimento e posteriormente houve diminuição da densidade de bactérias (Tabela 9, Figuras 13 e 14).

**TABELA 9:** Contagens (U.F.C./ grama de solo seco) das linhagens P1R21 e P3R30 no solo com óleo (teste) e sem óleo (controle), ao longo de 60 dias do experimento *microcosmo*.

Linhagem	Dias de incubação					
	0	5	10	15	48	60
P1R21						
Teste	$4,3 \times 10^6$	$6,9 \times 10^7$	$2,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	N.D.
Controle	$5,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$	$7,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
P3R30						
Teste	$3,1 \times 10^6$	$9,1 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$	$5,7 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
Controle	$2,7 \times 10^6$	$7,6 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
N.D. – Não determinado						

A densidade de bactérias foi geralmente maior no solo com óleo diesel, em comparação com o solo sem adição do óleo (Figura 13 e 14). A linhagem P1R21 exibiu um aumento de sua densidade populacional maior após 48 dias no solo com óleo diesel em relação ao solo sem adição do óleo (Figuras 13 e 14). Essa linhagem apresentou aumento de densidade após 60 dias, sendo que a diluição utilizada não permitiu realização das contagens. As maiores diferenças, onde foi possível observar o aumento nas contagens da linhagem P3R30, no solo com óleo diesel em relação ao solo sem óleo, ocorreram no décimo dia do experimento (Figuras 13 e 14).

Os resultados mostraram que a presença de óleo diesel estimulou o crescimento das bactérias no solo indicando seus potenciais para uso na biorremediação de solos contaminado por petróleo.

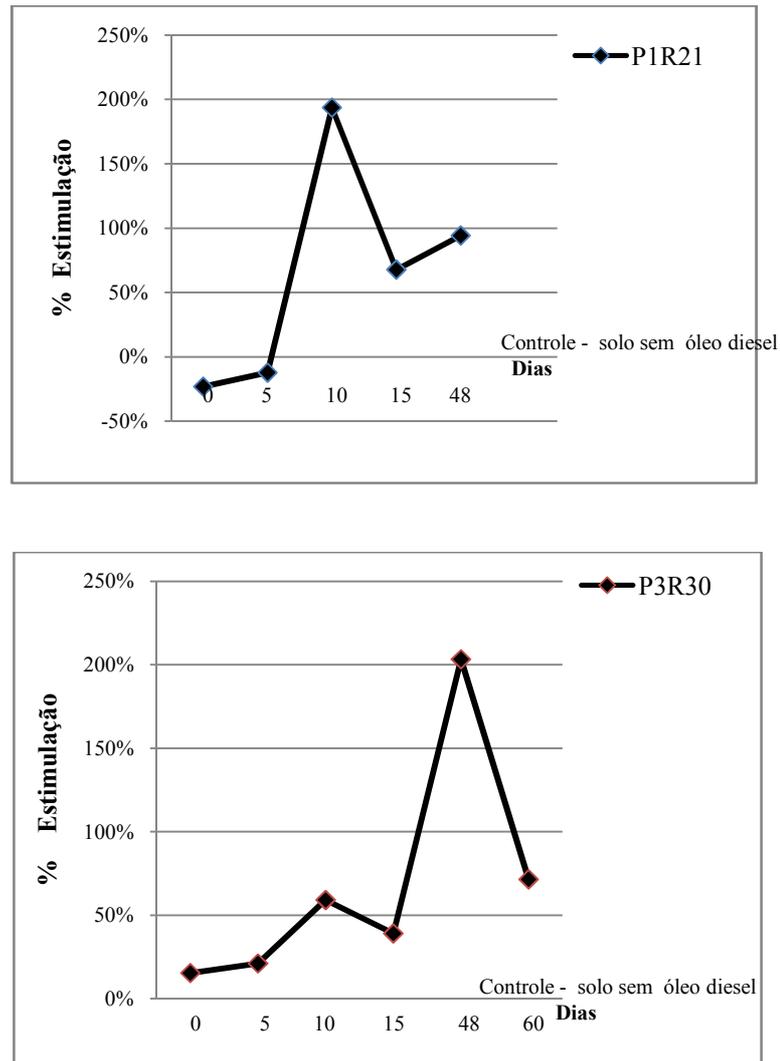


**FIGURA 13:** Contagem de bactérias introduzidas no solo com óleo diesel (teste) e sem óleo diesel (controle) ao longo de 60 dias no experimento *microcosmo*.

Ueno et. al.(2006), verificaram a degradação de n-alcenos, presentes em óleo diesel, por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* no solo, em experimentos com *microcosmos*, e sugeriram que a degradação de n-alcenos presentes no óleo diesel em solos nos experimentos *microcosmos* deve ser facilitada pelo bioaumento, com a produção de dirhamnolipídios, e também pelo bioestímulo no solo que abriga os microrganismos autóctones.

Conforme trabalho de Bento et al. (2005), no *microcosmo* de solo contaminado com óleo diesel a maior taxa de degradação da fração leve de hidrocarbonetos totais do petróleo (C<sub>12</sub>–C<sub>23</sub>) foi observada nas primeiras duas semanas de incubação de um dos solos. Durante este período, mais que 50% destes hidrocarbonetos foi degradado, com uma pequena e contínua diminuição até o fim do experimento (12 semanas). No princípio, os microrganismos que degradaram o óleo diesel foram estimulados por hidrocarbonetos de fontes instáveis (provavelmente hidrocarbonetos de cadeia linear e aberta) que induziram a alta porcentagem de degradação. Como aquelas formas diminuíram, populações microbianas tiveram que usar hidrocarbonetos mais recalcitrantes (provavelmente hidrocarbonetos aromáticos com alto peso molecular) menos eficientemente.

A diminuição de disponibilidade de nutrientes pode limitar o crescimento microbiano. Também é possível que a degradação de hidrocarbonetos de maior peso molecular possa ter produzido intermediários tóxicos que inibiram a ação de microrganismos que degradam o óleo diesel (BENTO et al., 2005).



**FIGURA 14:** Análise comparativa do crescimento das duas linhagens introduzidas no solo com óleo em relação ao tratamento nos seus respectivos solos sem óleo (controle).

Para o segundo experimento *microcosmo* os dados das contagens das culturas mistas compostas de 3 linhagens podem ser observadas na Tabela 10 e nas Figuras 15 e 16.

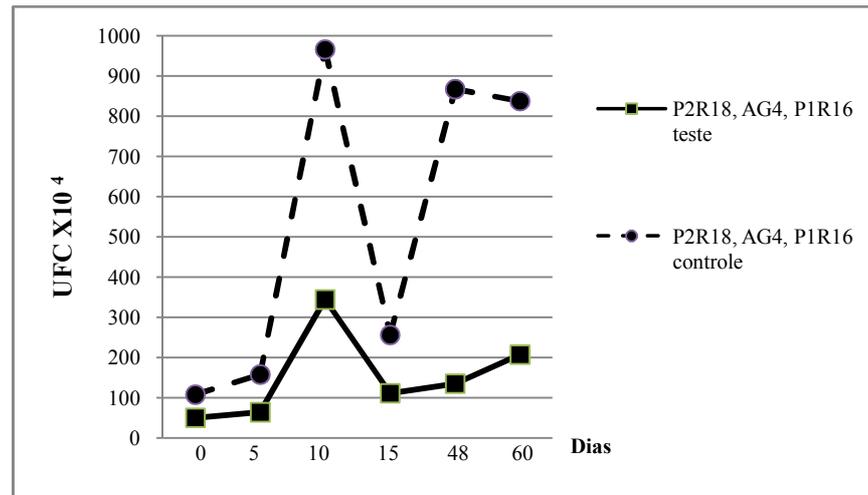
Os resultados do experimento mostraram que na presença de óleo diesel, ocorreu inibição do crescimento bacteriano. Seabra (2001) diz que a presença de um dado hidrocarboneto em uma mistura com o substrato, pode ter uma influência positiva (devido ao processo de cometabolização) ou negativa (devido a sua toxicidade) no processo de biodegradação. Na cultura mista ocorre a existência de microrganismos capazes de degradar

metabólitos secundários produzidos por outras espécies além de competirem entre si por uma fonte de carbono, como o óleo diesel.

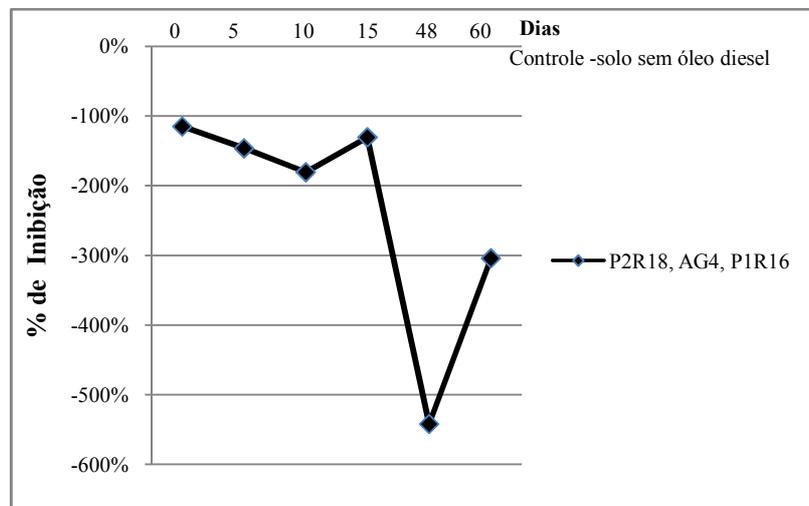
No nosso trabalho foi observado que o crescimento das duas linhagens de bactérias, P1R21 e P3R30 no solo, no experimento *microcosmo*, foi atingido a partir da adição de óleo diesel. Esse resultado foi obtido apenas quando as linhagens foram inoculadas separadamente. A inibição do crescimento das mesmas linhagens aplicadas em cultura mista ocorreu provavelmente devido as ações antagonistas entre as linhagens analisadas.

**TABELA 10:** Contagens (U.F.C./ grama de solo seco) de culturas mistas no solo com óleo (teste) e sem óleo (controle), ao longo de 60 dias do experimento *microcosmo*.

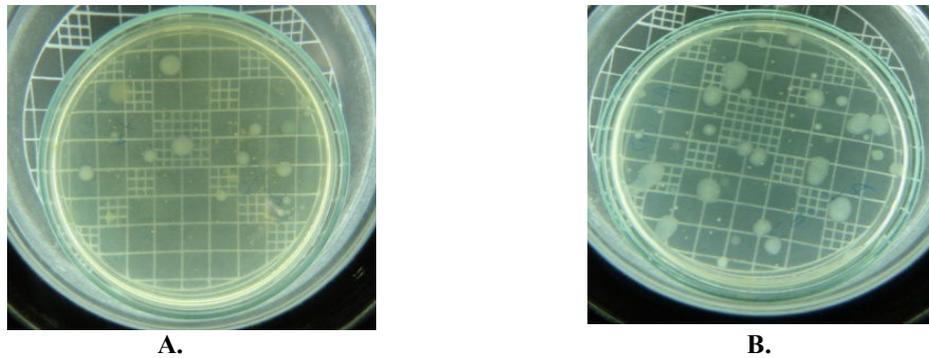
Linhagem	Dias de incubação					
	0	5	10	15	48	60
P1R21, P2R11, P3R30						
Teste	$7,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$>1 \times 10^4$	$>1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
Controle	$2,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$
AG4, P1R16, P2R18						
Teste	$5,0 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
Controle	$1,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$



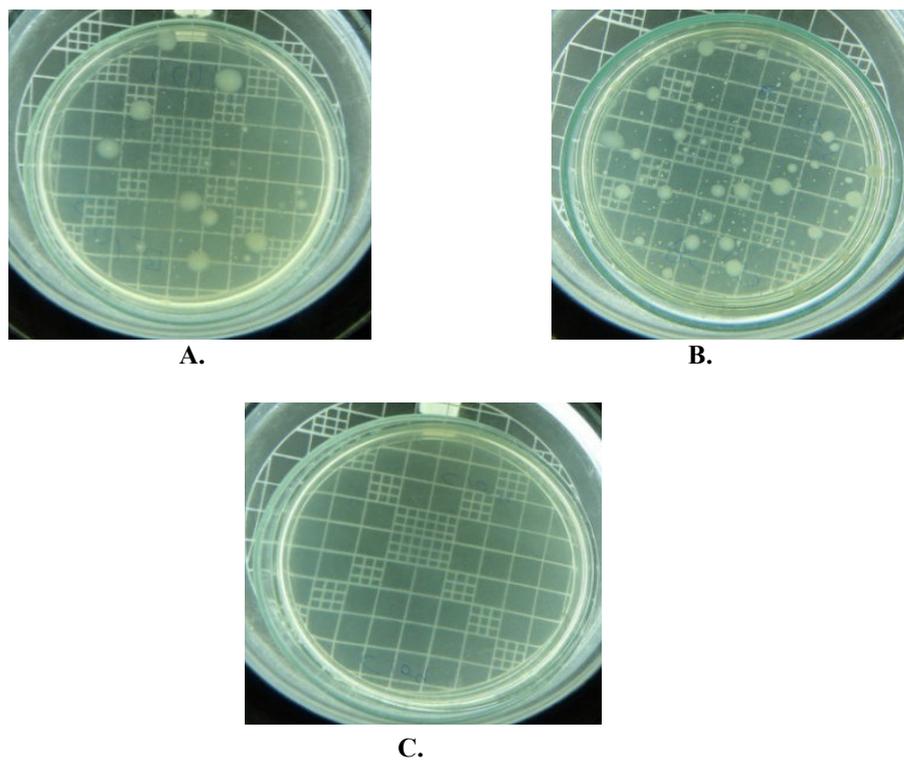
**FIGURA 15:** Contagens de bactérias introduzidas no solo com óleo diesel (teste) e sem óleo diesel (controle) ao longo de 60 dias no experimento *microcosmo*.



**FIGURA 16:** Porcentagem de inibição de densidade de linhagens P2R18, AG4 e P1R16 introduzidas no solo com óleo em relação ao solo sem óleo (controle) no experimento *microcosmo*.



**FIGURA 17:** Culturas de bactérias das linhagens P3R30, P2R11 e P1R21 obtidas do solo com óleo diesel, após um dia (A) e após 60 dias (B) de incubação do *microcosmo*. Diluição do solo utilizada:  $10^{-5}$ .



**FIGURA 18:** Culturas de bactérias das linhagens P1R16, P2R18 e AG4 obtidas do solo com óleo diesel (A), e em solo sem óleo diesel, (B); e solo sem inóculo (C). Diluição do solo utilizada:  $10^{-5}$ .

## 5. CONCLUSÕES

- 1) A degradação do óleo diesel foi observada para 50% das linhagens de bactérias isoladas do solo rizosférico de plantas *Calotropia procera*, *Cenchrus cf. echinatus*, e *Dactyloctenium aegyptium*, coletadas em aterro de resíduos sólidos da produção de petróleo localizado no campo de Fazenda Belém da PETROBRÁS, no município Icapuí-CE.
- 2) As culturas de bactérias compostas de duas linhagens (culturas mistas) apresentaram eficiência inferior no teste de degradação de óleo diesel, em relação às suas respectivas culturas de bactérias compostas de uma linhagem.
- 3) A maioria das linhagens de bactérias apresentou emulsificação do óleo diesel e produção de biossurfactantes.
- 4) A adição do óleo diesel estimulou o crescimento de linhagens bacterianas no solo (experimento *microcosmo*), quando as mesmas foram inoculadas isoladamente. Entretanto, em uma cultura mista foi observada a inibição do crescimento, que ocorreu provavelmente devido a ações antagonistas existentes entre as bactérias testadas.
- 5) Algumas linhagens de bactérias apresentaram um potencial que pode ser explorado futuramente nas pesquisas sobre biorremediação de áreas contaminadas por petróleo.

## 6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS.

Site: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em junho/2012.

ALEF, K. **Soil respiration**. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (eds.). *Methods in Applied Soil Biology and Biochemistry*. London: Academic Press. p 214-219. 1995.

ANGLE J. S. et al.. **Validation of Microcosms for Examining the Survival of *Pseudomonas aureofaciens (lacZY)* in Soil**. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2835–2839. 1995.

ARAÚJO, M.M.S.. **Estudo de vias biotecnológicas aplicadas à tecnologia de petróleo**. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal-RN. 2002.

ATLAS, R. M.. **Bioremediation of Petroleum Pollutants**. *International Biodeterioration and Biodegradation*, p 317- 327. 1995.

BAKER, K.H.; HERSON, D.S.. **Microbiology and Biodegradation**, In: Baker, K. H.; Herson, D. S. (Ed). *Bioremediation*, McGraw Hill, Inc: USA. cap.2, p. 11-60. 1994.

BANAT, I.M. **Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review**. *Bioresource Technology*. v. 51, p.1-12, 1995.

BASTIAENS, L. et al. **Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) –Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers**. *Applied Environmental Microbiology*. v. 66, p.1834-1843. 2000.

BENTO, F. M. et al. **Bioremediation of soil contaminated by diesel oil**, *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34 (Suppl.1), p. 65-68. São Paulo-SP. 2003.

BENTO F. M. et al. **Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation.** Bioresource Technology. v. 96, ed. 9, p. 1049-1055. 2005.

BICCA F.C.; FLECK L.C.; AYUB A.Z.. **Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*.** Revista de Microbiologia v. 30 n°3 São Paulo-SP. 1999.

BOGNOLO, G. **Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons.** Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects. v 152, p. 41–52. 1999.

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

BUENO, S.M.. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São José do Rio Preto-SP. 2008.

BUENO, S. M.; SILVA, A.N.; GARCIA-CRUZ, C.H.. **Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação.** Química Nova, v. 33, n°. 7, p. 1572-1577. 2010.

BUNDY, J. G., PATON, G.I., CAMPBELL, C.D.. **Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination.** Journal of Applied Microbiology. v. 92, p. 276-288. 2002.

CABELLO, C.M. et al.. **Antimelanoma activity of the redox dye DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol) is antagonized by NQO1.** Biochemical Pharmacology, p. 344–354. 2009.

CHOSSON, P. et al.. **Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions.** Nature, 351. p. 640-642. 1991.

COOPER D. G.; GOLDENBERG B.G.. **Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species.** American Society for Microbiology.1987.

CORMACK, W. P. M.; FRAILE, E. R. **Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic *Antarctic bacterium*.** Antarctic Science, v.9, n° 2, p.150-155, 1997.

DUARTE, M. D. C. **Caracterização Microbiológica de uma Lagoa Contaminada por Resíduos de Petróleo (Lagoa de Baixo, Guamaré - RN) e seu Potencial de Biorremediação.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa PB, 2004.

FILHO, A.P.S.. **Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: Estudos de produção e de variação da composição de homólogos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2009.

FONTES, G.C.; P AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z.. **Produção de biossurfactante por levedura.** Química Nova v.31 n° 8. São Paulo. 2008.

GALDINO, C.A.B. et al. . **Passivo ambiental das organizações: uma abordagem sobre avaliação de custos e danos ambientais no setor de exploração de petróleo.** Associação Brasileira de Engenharia de Produção. XXII Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Curitiba – PR. 2002.

GAYLARDE, C. C.. **Seleção de microorganismos produtores de surfactantes e avaliação da base fisiológica da produção.** IN: Microbiologia Ambiental: Manual de Laboratório. Eds. C.M.M.S. Silva, M.R. de <sup>a</sup> Roque, I. S. de Melo. Embrapa Meio Ambiente, Jaquarúna/SP. 98p.. 2000.

GERHARDT, P. et al.. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1994.

GORLACH-LIRA, K.. **Avaliação do potencial de remediação dos solos contaminados com petróleo e seus derivados na região de Mossoró-RN, através de análises microbiológicas**. Relatório, Processo 49.4791/00-6 CNPq-CIPTERO. 68 p.. 2003.

GUIMARÃES E. F. et al.. **Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Solução**. Produto & Produção, Edição Metrologia. v. 11, n° 1, p. 113 – 123. 2010.

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

JUHASZ, A., STANLEY, G.A., BRITZ, M.L.. **Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacterial consortium: Effects on Microtox and mutagenicity bioassays**. Bioremediation Journal. v. 4, p. 271–283. 2000.

JÚNIOR, J.J.. **Contaminação ambiental movida por postos retalhistas de combustíveis**. Trabalho de conclusão de curso de graduação. Universidade Católica de Goiás – Departamento de Engenharia - Engenharia Ambiental. Goiânia/GO. 2008.

KANALY, R.A. et al.. **Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel**. Applied and Environmental Microbiology, 66 (10), p. 4205-4211. 2000.

KIRK, P.W.; DYER, B.J.; NOE, J.. **Hydrocarbon Utilization by Higher Marine Fungi from Diverse Habitats and Localities**. Mycologia. v. 83, n° 2. p. 227 – 230. 1991.

LOURENÇO, E.S.O.. **Avaliação Físico-Química da Remediação de Solos Contaminados por BTEX**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel-PR. 2006.

- LUZ. C. et al.. **Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho-RO, Amazônia.** Química Nova, v. 34, nº 5, 775-779. 2011.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.. **Microbiologia de Brock**, 10ª edição, Prentice Hall. 2004.
- MARIANO A. P.. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Campus de Rio Claro, Rio Claro (SP). 2006.
- MARIANO A. P., DE ANGELIS D. F, BONOTTO D. M.. **Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel.** Engenharia Sanitária Ambiental. v.12 - nº 3 p. 296-304. Rio de Janeiro-RJ. 2007.
- MEYER, D.D.. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B1-00) em dois solos com diferentes granulometrias.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. 2011.
- MIRANDA R.C. et al.. **Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco –Brazil.** Brazilian Archives of Biology and Technology. v.50, nº 1. p. 147-152. 2007.
- MOLINA-BARAHONA, L. et al.. **Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues.** Applied Soil Ecology. v. 27, p. 165-175. 2004.
- MURPHY M. E., et al.. **Organic Geochemistry of Some Upper Pennsylvanian and Lower Permian Kansas Shales: Hydrocarbons.** Kansas Geological Survey, Bulletin 204, pt. 1. 1972.

OKOH, A.I. **Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria.** African Journal of Biotechnology. v. 2 (5), p. 104-108. 2003.

PEIXOTO, R. M.; VIEIRA, J. D. G. **Determination of the degrading potential of bacteria isolated from an environment impacted by petroleum and derivatives using 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP).** In: First Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology, Natal – RN, Brasil. 2005.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências. – Rio Claro-SP. 2006.

PIRÔLLO, M.P.S. et al., **Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site.** Journal of Applied Microbiology. Volume 105, Issue 5, p.1484–1490. 2008.

PURANDARE et al.. **Microcosm study of biorremediation of oil- contaminated freshwater wetlands.** International Oil Spill Conference. 1999.

RHEINHEIMER, D.S.; ANGHINONI, I.; CONTE, E.. **Fósforo da biomassa microbiana em solos sob diferentes sistemas de manejo.** Revista Brasileira de Ciência do Solo. v. 24, nº 3, p. 589-597. Viçosa-MG. 2000.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M.. **Characterization of Soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel.** International Biodeterioration and Biodegradation. v. 44, p. 93-100.1999.

ROSATO, Y.B.. **Biodegradação do petróleo.** Microbiologia ambiental. Embrapa. p. 307-334. 1997.

ROSENBERG, E. **Hydrocarbon-oxidizing bacteria.** The prokaryotes. v. 2. p. 564-577. Springer. 2006.

ROY, S.; et al.. **Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 18, p. 575-581. 2002.

SEABRA, P.N.C., **Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo.** Biodegradação. Embrapa Meio Ambiente. II Workshop sobre biodegradação. p. 41-59 Campinas-SP. 2001.

SIEGMUND, I., WAGNER, F.. **New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species grown on mineral agar.** Biotechnology Technology. v. 5. p. 265–268. 1991.

SINGH, H.. **Mycoremediation : fungal bioremediation.** John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 617 p. 2006.

SMIBERT, R. M. ; KRIEG, N. R. . **General characterization. In: Methods for General and Molecular Bacteriology.** American Society for Microbiology, p. 607±654. 1994.

SOUZA C.S. et al.. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo.** In: 3º Congresso Brasileiro de P & D em petróleo e gás. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Campus Universitário. 2004.

UENO A., et al.. **Verification of Degradation of n-Alkanes in Diesel Oil by *Pseudomonas aeruginosa* Strain WatG in Soil Microcosms.** Current Microbiology. v. 52, n° 3, p. 182–185. 2006.

UENO A.; Ito Y. ; YUMOTO I. ; OKUYAMA H.. **Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation.** World Journal Microbiology Biotechnology. v. 23, n° 12, p. 1739–1745. 2007.

URURAHY, A.F.P.; PEREIRA Jr, N.; MARINS, M. D. M. **Desempenho de um Biorreator do Tipo CSTR no Processo de Degradação de Borra Oleosa**. Boletim Técnico PETROBRÁS, Rio de Janeiro, 41 (3/4): 125-132. 1998.

VALENTIN, L.A. **Boas práticas de laboratório: aplicação para avaliar o impacto ambiental causado pelo derrame de derivados de petróleo**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Paulo. Instituto de Química de São Carlos. São Carlos-SP. 2006.

VAZ, F. S.. **Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de Armazenamento**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás. Instituto de patologia tropical e saúde pública. Programa de pós-graduação em medicina tropical. Goiânia/GO. 2010.

WETLER-TONINI R. M. C.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D.. **Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Departamento de Biociências e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Laboratório de Ciências Ambientais. Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. Oecologia Australis. v.14(4). p.1010-1020. 2010.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U.. **Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soil, for production of biosurfactants and bioemulsifiers**. Earth and Environmental Science. Biodegradation. v. 7. n<sup>o</sup> 5. p. 415–423. 1997.

YU, S.H. et al.. **Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments**. Environment International, v 31: 149-154. 2005.

**7. ANEXO**

**ANEXO - Características morfológicas e fisiológicas de linhagens bacterianas**

<b>Linhagem</b>	<b>Forma</b>	<b>Reação de Gram</b>	<b>Catalase</b>	<b>Motilidade</b>	<b>Endósporos</b>
<b>P1R14</b>	bastonetes	+	+	+	+
<b>P1R16</b>	bastonetes	+	+	+	+
<b>P1R21</b>	bastonetes	+	+	+	+
<b>P2R1</b>	cocobacilos	+	+	-	-
<b>P2R11</b>	bastonetes irregulares	+	-	-	+
<b>P2R17</b>	cocos	+	+	-	-
<b>P2R18</b>	bastonetes irregulares	+	+	+	-
<b>P2R20</b>	bastonetes irregulares	+	+	-	-
<b>P2R23</b>	bastonetes irregulares	-	-	+	-
<b>P2R24</b>	bastonetes	-	-	+	-
<b>P2R29</b>	bastonetes	+	-	-	-
<b>P3R3</b>	bastonetes irregulares	+	-	+	-
<b>P3R9</b>	bastonetes irregulares	-	-	-	-
<b>P3R10</b>	bastonetes irregulares	+	+	-	-
<b>P3R21</b>	bastonetes irregulares	+	+	-	-
<b>P3R22</b>	bastonetes irregulares	+	+	+	-
<b>P3R24</b>	filamentos	+	+	-	-
<b>P3R25</b>	bastonetes irregulares	+	+	-	-
<b>P3R27</b>	bastonetes irregulares	-	+	+	-
<b>P3R28</b>	bastonetes irregulares	-	+	-	-

<b>P3R29</b>	filamentos	+	+	-	-
<b>P3R30</b>	bastonetes	v	+	+	-
<b>P3R31</b>	bastonetes	+	+	-	-
<b>P3R32</b>	bastonetes	+	+	-	-

---

V- gram-variável