

RAFAEL DE JESUS SANCHES

**SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM  
POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE  
HIDROCARBONETOS E BIODIESEL**

*Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de  
Formatura do Curso de Graduação em Engenharia  
Ambiental do Instituto de Geociências e Ciências Exatas  
– Unesp, Campus de Rio Claro (SP), como parte das  
exigências para o cumprimento da disciplina Trabalho de  
Formatura no ano letivo de 2009.*

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis

Rio Claro (SP)  
2009

RAFAEL DE JESUS SANCHES

**SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM  
POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE  
HIDROCARBONETOS E BIODIESEL**

*Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Formatura do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – Unesp, Campus de Rio Claro (SP), como parte das exigências para o cumprimento da disciplina Trabalho de Formatura no ano letivo de 2009.*

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis

Rio Claro (SP)  
2009

576 Sanches, Rafael de Jesus  
S211s Seleção de micro-organismos com potencial de  
biodegradação de hidrocarbonetos e biodiesel / Rafael de  
Jesus Sanches. - Rio Claro : [s.n.], 2009  
66 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado -  
Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Geociências e Ciências Exatas  
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Microorganismos. 2. Biodegradação. 3.  
Biorremediação. 4. Petróleo. 5. Biodiesel. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

*Dedico este trabalho em memória a minha avó Joana Lourenço, a  
pessoa que me ensinou a sempre lutar pelos meus ideais e me foi  
um grande exemplo de vida, à minha mãe Maria Antonia, meu pai  
Pericles e meus amigos, os quais sempre me forneceram apoio  
incondicional e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis pela orientação, carinho, paciência e ensinamentos passados nesses dois anos de orientação.

Agradeço a Dr.<sup>a</sup> Dilza Nalin, Inês, Márcio, Márcio Ramos, Rodrigo, Junior, Angela e todos os outros companheiros do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, sempre dispostos a ajudar, ensinar e pelas conversas descontraídas.

Agradeço ao Programa de Recursos Humanos em Geologia e Ciências Ambientais Aplicadas ao Setor de Petróleo, Gás e Biocombustíveis – PRH 05, sob coordenação do Prof. Dr. Dimas Dias Brito com o apoio financeiro (bolsa PRH – ANP/MCT/CTPETRO) e intelectual, além da amizade que criei com os participantes do Programa dentro da Universidade, principalmente Lara, Renato (Bill) e Paulo (Shao), em eventos proferidos pelo mesmo.

Agradeço aos meus grandes amigos de turma, Matheus (Matuco), Isaac (Angolano), Fernanda e Emanuel (Tchaca) pelos momentos de conversas, cervejas, pastéis, apoio, diversão nas viagens, e, acima de tudo, por abrirem meus olhos aos fatos que ocorriam a minha volta e eu não enxergava, como também pela confiança que sempre tiveram comigo, por acreditarem que a minha real imagem é a que passo e não a foi tentada passar erroneamente por companheiros de turma.

Agradeço aos meus amigos de academia Guilherme (Japa), Brunão e Cadarço (da Matemática) pelas conversas, ajudas nos treinos, zoeiras, risadas e companheirismo em festas.

Agradeço a Damian, Bruno (Inútil), Valterlan, Gabriel, Samuel, Anderson, Luana, Sissi, Elisa e outros amigos que fiz participando do time de vôlei da Unesp – Rio Claro.

Agradeço a todos meus amigos de Guaíra e outras cidades que mesmo os vendo poucas vezes, a cada reencontro a amizade é sempre a mesma, como sempre foi.

## SUMÁRIO

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| ÍNDICE.....                        | i   |
| ÍNDICE DE TABELAS.....             | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....             | iv  |
| RESUMO.....                        | v   |
| ABSTRACT.....                      | vi  |
| 1. INTRODUÇÃO .....                | 1   |
| 2. OBJETIVOS .....                 | 5   |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....     | 6   |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....        | 27  |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....     | 35  |
| 6. CONCLUSÕES .....                | 46  |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 47  |

## ÍNDICE

|                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                        | <b>6</b>  |
| 3.1. Hidrocarbonetos e petróleo .....                                                                       | 6         |
| 3.2. Biodiesel .....                                                                                        | 7         |
| 3.3. Contaminações .....                                                                                    | 9         |
| 3.4. Biodegradação e biorremediação .....                                                                   | 11        |
| 3.5. Micro-organismos degradadores de petróleo e biodiesel e fatores que influenciam na biodegradação ..... | 14        |
| 3.6. Solos .....                                                                                            | 17        |
| 3.7. Áreas contaminadas.....                                                                                | 18        |
| 3.8. Formas de aplicação da biorremediação.....                                                             | 20        |
| 3.9. Testes de biodegradabilidade utilizando 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) .....                       | 23        |
| 3.10. Absorbância.....                                                                                      | 24        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                          | <b>27</b> |
| 4.1. Material.....                                                                                          | 27        |
| 4.1.1. Fontes de micro-organismos com potencial de biodegradação .....                                      | 27        |
| 4.1.2. Meios de isolamento .....                                                                            | 27        |
| 4.1.3. Equipamentos e vidraria .....                                                                        | 29        |
| 4.2. Métodos .....                                                                                          | 30        |
| 4.2.1. Coleta de amostras .....                                                                             | 30        |
| 4.2.2. Meios de cultura.....                                                                                | 31        |
| 4.2.3. Ativação dos micro-organismos das amostras e preparação dos inóculos .....                           | 31        |
| 4.2.4. Isolamento de micro-organismos.....                                                                  | 31        |
| 4.2.5. Isolamento e purificação das culturas .....                                                          | 32        |
| 4.2.6. Testes de biodegradação .....                                                                        | 32        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                      | <b>35</b> |
| 5.1. Preparação do material para cultivo dos micro-organismos.....                                          | 35        |
| 5.2. Resultado da agitação do meio lipolítico com petróleo / biodiesel e micro-organismos                   | 36        |
| 5.3. Resultado dos plaqueamentos em meios PCA e Sabouraud .....                                             | 36        |
| 5.4. Culturas isoladas e puras .....                                                                        | 37        |

|      |                                         |           |
|------|-----------------------------------------|-----------|
| 5.5. | Testes de biodegradação.....            | 38        |
| 6.   | <b>CONCLUSÕES .....</b>                 | <b>46</b> |
| 7.   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>47</b> |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Oleaginosas disponíveis por região para produção de biodiesel no Brasil.....                                                                                                                               | 8  |
| <b>Tabela 2:</b> Relação entre o composto de acordo com a sua cadeia e a taxa de biodegradabilidade.....                                                                                                                    | 13 |
| <b>Tabela 3:</b> Perigos associados à presença de diversos poluentes no solo.....                                                                                                                                           | 20 |
| <b>Tabela 4:</b> Relação entre transmitância e absorbância. ....                                                                                                                                                            | 25 |
| <b>Tabela 5:</b> Procedência das amostras analisadas. ....                                                                                                                                                                  | 35 |
| <b>Tabela 6.</b> Escala de degradação do biodiesel e petróleo bruto frente aos micro-organismos isolados de áreas contaminadas com hidrocarbonetos e cultivadas nos meios 4.1.2.1 e 4.1.2.2, durante 5 dias a 28°C. ....    | 36 |
| <b>Tabela 7.</b> Culturas microbianas isoladas e preservadas em tubos de culturas em meios PCA (bactérias) e Sabouraud (fungos). ....                                                                                       | 38 |
| <b>Tabela 8:</b> Absorbâncias dos líquidos metabólicos obtidos das culturas de fungos e leveduras cultivados em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel em estufa a 28°C, durante 5 dias..... | 39 |
| <b>Tabela 9:</b> Absorbâncias dos líquidos metabólicos obtidos das culturas bactérias cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel em estufa a 35°C, durante 5 dias. ....            | 40 |
| <b>Tabela 10:</b> Absorbâncias dos líquidos metabólicos obtidos das culturas de fungos e leveduras cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo.....                                  | 42 |
| <b>Tabela 11:</b> Absorbâncias dos líquidos metabólicos obtidos das culturas de bactérias cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo.....                                           | 43 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1:</b> Esquema de novas reservas petrolíferas do Brasil (O Globo, 2008 <i>apud</i> OLIVEIRA, 2008). .....                                                                                                                        | <b>4</b>  |
| <b>Figura 2:</b> Reação de transesterificação para produção de biodiesel (OLIVEIRA, 2008).....                                                                                                                                             | <b>9</b>  |
| <b>Figura 3:</b> Esquema da interação entre os fatores que influenciam na biodegradação. ....                                                                                                                                              | <b>15</b> |
| <b>Figura 4:</b> Procedimento de coleta de amostras de solos para análise microbiológica. ....                                                                                                                                             | <b>30</b> |
| <b>Figura 5:</b> Testes com meio BH e indicador redox DCPIP para a biodegradação de petróleo e biodiesel. ....                                                                                                                             | <b>34</b> |
| <b>Figura 6:</b> Representação gráfica da diminuição percentual média de absorbância para os líquidos metabólicos obtidos dos fungos e leveduras cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel. .... | <b>39</b> |
| <b>Figura 7:</b> Representação gráfica da diminuição percentual média de absorbância para bactérias cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel. ....                                              | <b>40</b> |
| <b>Figura 8:</b> Comparação gráfica da descoloração percentual média entre culturas de fungos e leveduras e culturas de bactérias em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel. ....                           | <b>41</b> |
| <b>Figura 9:</b> Comparação gráfica da descoloração percentual média entre as culturas de fungos e leveduras e culturas de bactérias em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol, frente ao petróleo. ....                        | <b>41</b> |
| <b>Figura 10:</b> Representação gráfica da diminuição percentual média de absorbância para fungos e leveduras cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo.....                                      | <b>42</b> |
| <b>Figura 11:</b> Representação gráfica da diminuição percentual média de absorbância para bactérias cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo. ....                                              | <b>43</b> |
| <b>Figura 12:</b> Comparação da descoloração percentual média resultante da atividade degradadora de bactérias em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo e biodiesel. ....                                   | <b>44</b> |
| <b>Figura 13:</b> Comparação da descoloração percentual média resultante da atividade degradadora de fungos e leveduras em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo e biodiesel. ....                          | <b>44</b> |

## RESUMO

O petróleo e o biodiesel são substâncias oleaginosas cujos descartes no meio ambiente podem causar sérios problemas. Nesse contexto, podem-se utilizar técnicas de biorremediação para a recuperação de áreas degradadas com óleos minerais ou vegetais, dentre elas, a biodegradação. Para tanto, é necessário que se tenham linhagens de micro-organismos adaptados à degradação do contaminante, previamente selecionados para que a remediação seja rápida, eficaz e de menor impacto possível. O objetivo central deste trabalho foi isolar linhagens de micro-organismos provenientes de diferentes nichos ecológicos, e verificar também o potencial dos mesmos para biodegradação de petróleo e biodiesel. Foram isoladas linhagens de bactérias, fungos e leveduras provenientes de solos anteriormente contaminados com hidrocarbonetos (diesel, gasolina, graxas), por meio de estriamentos em placas de cultura. Nos testes de biodegradação empregou-se o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) e mediu-se a absorbância da suspensão obtida, após descoloração do indicador e centrifugação. Isolou-se 46 diferentes biótipos de micro-organismos, sendo que o petróleo, quando usado como fonte de carbono, foi degradado mais facilmente que o biodiesel. Os experimentos demonstraram que, a médio e longo prazo, a área impactada com derrame de óleos se auto recupera pela biodegradação, em condições aeróbias por meio da oxidação-redução.

**Palavras-chave:** Biodegradação, Biorremediação, Petróleo, Biodiesel

## ABSTRACT

The oil and biodiesel are oily substances which, if spilled or thrown out in the environment, can cause serious damages. In this context, bioremediation techniques can be used to the recovering of sites degraded by mineral or vegetable oil, besides them, the biodegradation. However, it is necessary that there are microorganism strains used to degradate the contaminant, previously selected for the fast, efficient and minimum impact remediation. The main objective of this study was to isolate microorganism strains coming from different ecological recesses and verify their potentiality on biodegradating oil and biodiesel. Strains of bacteria, fungi and yeasts were isolated from soils contaminated by hydrocarbons (diesel, gasoline, grease) before, by doing striations on culture plates. On the biodegradation tests, it was used the redox indicator, 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP), then, after the indicator's discoloration, the absorbance of the suspension obtained was measured. 46 different microorganism strains were isolated, and the oil, when it was used as a carbon resource, it was degradate easier than the biodiesel. The experiments showed that, in a period, the site impacted by oil spills recovers itself by the biodegradation, in aerobic conditions, by the redox activity.

**Key-words:** Biodegradation, Biorremediation, Oil, Biodiesel

## 1. INTRODUÇÃO

Registros históricos mostram utilizações do petróleo, recurso natural não renovável, em civilizações muito antigas a cerca de 5000 anos antes de Cristo, como o Egito e a Mesopotâmia. Existiam vários termos que designavam essa substância, e segundo Neiva (1986), o mais antigo seria “betume”. Este era muito usado para fabricação de esquifes, cisternas, esgotos, iluminação noturna, cremação de mortos e trabalhos de feitiçaria.

Essa utilização na antigüidade era restrita uma vez que não eram todos os povos que tinham conhecimento sobre a perfuração e prospecção de petróleo, embora haja registros de que Francisco Pizarro, quando conquistou o Peru, em 1527, notou uma pequena “refinaria” no local. Os índios da região sabiam como extrair e onde encontrar a fonte natural, além disso, conseguiam armazená-lo obtendo variados aproveitamentos.

Somente na segunda metade do século XIX, Edwin L. Drake deu início ao desenvolvimento de técnicas para a perfuração de poços. Posteriormente novas pesquisas contribuíram e estimularam o surgimento da indústria do petróleo.

Após o desenvolvimento dos motores de combustão interna, a utilização do petróleo cresceu de maneira vertiginosa no mundo. Juntamente a esse fato, ocorreu o aprimoramento de novas técnicas de refino do óleo, obtendo novos produtos, melhorando a qualidade de vida da população.

A partir do início do século XXI, o petróleo está intrinsecamente ligado ao desenvolvimento econômico. Assim países, como os Estados Unidos, têm sua matriz energética extremamente acoplada ao petróleo e são os maiores consumidores mundiais.

Entretanto, dada a eminência de sua escassez já sofrem efeitos, uma vez que o desenvolvimento econômico está ligado a energia. Todas as nações procuram por fontes alternativas de energia, muito embora, estudos mostram que as jazidas de petróleo ainda durem em torno de 50 a 80 anos, o que fará com que este ainda perdure na matriz energética mundial, mesmo que não seja o predominante.

A escassez das jazidas petrolíferas vem causando problemas sociais, econômicos e políticos no mundo. Neste início de século, duas guerras de grandes proporções marcam episódios da escassez do petróleo, a guerra do Afeganistão e a do Iraque.

Portanto, a busca por fontes alternativas e preferencialmente renováveis é uma nova realidade e fato. Há registros de um motor a diesel funcionando com óleo vegetal em uma exposição em Paris em 1900. Em outros episódios da história, em que ocorreu a utilização de óleos vegetais como combustíveis, por exemplo, na Segunda Guerra Mundial. Porém, somente num momento da crise do petróleo na década de 70 é que foi dada importância a utilização de óleos vegetais e gorduras animais, mas após normalizar a situação do petróleo, essa pesquisa deixou de apresentar prioridade.

Frente à alta demanda de energia no planeta e as perspectivas de falta de petróleo, a utilização desses óleos e gorduras vem tomando importância, uma vez que são recursos renováveis. Estes óleos seriam substitutos do diesel de petróleo, porém devido a sua maior viscosidade, eles podem causar problemas nos motores.

Com o aumento do interesse internacional nesse biocombustível, quatro alternativas foram investigadas para a solução do problema com a viscosidade: a transesterificação, a pirólise, a diluição com diesel de petróleo e a microemulsificação. A alternativa mais eficiente foi a transesterificação, resultando na obtenção de alquil monoésteres metílicos ou etílicos de óleos vegetais e gorduras animais, denominado de biodiesel.

No Brasil, a produção de biodiesel está apenas iniciando e demonstrando ser um mercado promissor. Segundo a Lei 11.097/05, preconiza-se a utilização de 2% de biodiesel adicionado ao diesel, diminuindo por diluição as emissões de enxofre provenientes do petróleo. O mercado encontra-se em desenvolvimento acelerado e há no Brasil numerosas espécies de vegetais oleaginosas com potencial de serem utilizadas como matéria-prima. A técnica de utilização dos vegetais será decidida de acordo com as adaptações das plantas ao solo e condições climáticas, além do lugar em que será cultivado e o óleo extraído.

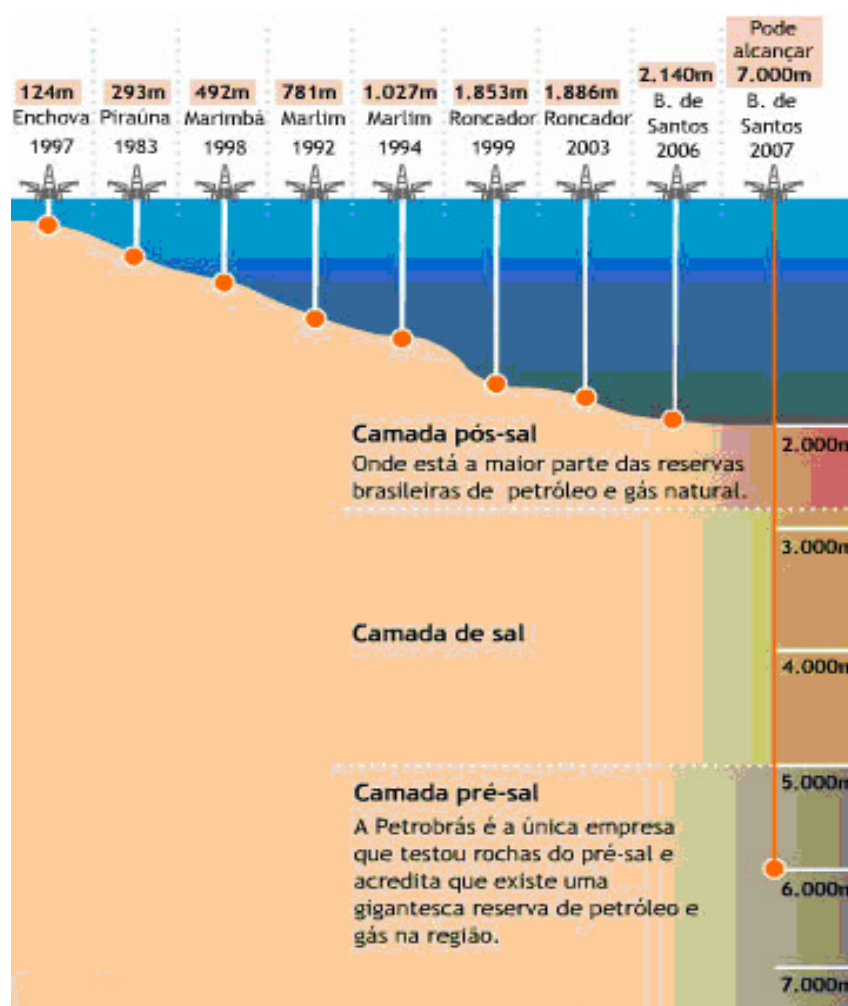
A partir do aumento da exploração de petróleo no mundo durante o início do século XX, catástrofes ambientais ocorreram em função do manejo deficiente deste produto. As

características físicas e químicas de cada substância integrante do petróleo é que determinam a gravidade do acidente quando ocorre derrame ou descarte indevido.

Em função de o petróleo apresentar menor densidade que a da água e maior viscosidade, os óleos quando derramados na água não se misturam e formam uma espécie de barreira que impede trocas gasosas entre os meios, afetando fauna e flora, além de impregnar-se no corpo de aves e mamíferos. Em casos de óleos vegetais, ocorre aumento na demanda bioquímica de oxigênio na água, quando há a degradação microbiana no local.

Devido a esses recursos serem indispensáveis à população, é necessário que haja planos para evitar os acidentes ambientais e, em caso de ocorrência, haver providências rápidas para recuperar o meio com o menor impacto possível e garantir a qualidade deste para as gerações futuras. Um exemplo deste fato é o que aconteceu na costa da Coreia com o acidente com o petroleiro no Parque Nacional Taean Haean, em dezembro de 2007.

Além dos acidentes internacionais, no cenário brasileiro, tem-se a perspectiva de aumento na exploração de petróleo com as recentes descobertas de jazidas do período pré-sal pela Petrobras, como demonstrado na Figura 1. Juntamente a isso, têm-se as construções e ampliações de refinarias por todo o país, demonstrando toda a expansão que a cadeia do petróleo terá futuramente.



**Figura 1:** Esquema de novas reservas petrolíferas do Brasil (O Globo, 2008 *apud* OLIVEIRA, 2008).

Apesar de todo o progresso e cuidados sistematizados, os riscos e problemas ambientais intrínsecos a cadeia produtiva podem acontecer tanto nas unidades industriais, como nas unidades de extração e transporte em alto mar ou em terra. Os derrames em diferentes graus, tanto do produto primário como dos seus derivados, ocorrem com certa frequência. Devido a isso, é necessário que se tenha planos e estratégias viáveis para ação imediata na ocorrência desses problemas, a fim de diminuir os danos ambientais e os riscos à saúde humana.

Esses fatos levam ao desenvolvimento de tecnologias que possam ser empregadas como métodos de correção nesses acidentes, dentre elas, a biorremediação. Esta técnica consiste na utilização de agentes biológicos com capacidade de recuperar o ambiente impactado. Neste trabalho, o princípio utilizado tem a finalidade de conhecer o potencial de linhagens de micro-organismos com capacidade de biodegradação de petróleo e derivados e de biodiesel.

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos centrais deste trabalho foram:

- isolar micro-organismos de solos contaminados com hidrocarbonetos visando biodegradação das moléculas de biodiesel e hidrocarbonetos de petróleo quando dissolvidos ou dispersos na água e no solo;
- testar a biodegradação das linhagens em culturas puras selecionadas frente ao biodiesel e petróleo.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Hidrocarbonetos e petróleo**

Hidrocarbonetos são compostos formados basicamente por átomos de carbono e hidrogênio, podendo ser classificados, segundo RUSSEL (1994), em:

- Alcanos: hidrocarbonetos que apresentam ligação simples entre seus átomos de carbonos, porém, quando apresentam alguns ou todos os átomos de carbono dispostos em anel são denominados cicloalcanos, também conhecidos como ciclo-parafinas e naftenos.

- Alcenos e alcinos: são hidrocarbonetos insaturados. Apresentam ligação múltipla entre átomos de carbono em sua molécula. Os alcenos apresentam ligação dupla entre carbonos enquanto os alcinos apresentam ligação tripla. Ambos são reativos quimicamente; pode tornar-se saturado ao reagir com moléculas de hidrogênio. Alcinos são obtidos industrialmente mediante o refino do petróleo.

- Hidrocarbonetos aromáticos: são hidrocarbonetos que apresentam um ou mais anéis de benzeno em sua molécula. O benzeno é um dos solventes orgânicos mais eficientes e utilizado, assim como seus derivados, em larga escala para produção de muitos produtos petroquímicos. Outros compostos aromáticos, como o estireno, são utilizados como matéria-prima para produção de isopor (poliestireno) e o isopropilbenzeno que serve de base para a produção de acetona, resinas fenólicas e combustíveis para aviões (GARRITZ; CHAMIZO, 2003).

Os compostos aromáticos quando entram em contato com organismos podem levar à morte por intoxicação. O benzeno, xileno e o tolueno, obtidos também do alcatrão da hulha ou a partir do fracionamento do petróleo, são altamente tóxicos (CETESB<sup>®</sup>, 2005). Estes produtos podem causar danos nas células sanguíneas, nos tecidos ósseos (medula óssea), no sistema nervoso, irritações, dermatite, danos nas mucosas e olhos. A acumulação destes compostos em tecidos adiposos induzem danos em órgãos como fígado e rins dos seres humanos e outros animais (Cole, 1994 *apud* CETESB<sup>®</sup>, 2005).

O petróleo é um composto complexo, considerado como fonte de energia não renovável, de origem fóssil, utilizado intensamente pela sociedade atual. O composto é formado de uma mistura de hidrocarbonetos de até 98% (Clark; Brown, 1970 *apud* CETESB<sup>®</sup>, 2005). Os outros 2% são de constituintes menores como enxofre, nitrogênio, oxigênio, além de metais traço como vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio (Posthuma, 1977 *apud* CETESB<sup>®</sup>, 2005).

A maioria dos hidrocarbonetos é constituída por n-alcanos, isoalcanos, cicloalcanos e hidrocarbonetos aromáticos (SOLOMONS; FRYHLE, 2001). A partir do seu refino, são extraídos diversos produtos, como gasolina, diesel, querosene, gás de cozinha, óleo combustível e lubrificante, parafina e compostos químicos que são matérias-primas para as indústrias de tintas, ceras, vernizes, resinas, extração de óleos e gorduras vegetais, pneus, borrachas, fósforos, chicletes, filmes fotográficos, plásticos e fertilizantes (GARRITZ; CHAMIZO, 2003; CUNHA, 2004).

Apesar da importância econômica do petróleo, os processos de extração, transporte e refino, causam muitas vezes, danos ao meio ambiente. Vazamentos de petróleo têm ocorrido nas últimas décadas, poluindo o solo, água dos rios e mares. Além disso, durante o processo de refino, o ocorre também a produção de gases poluidores da atmosfera, constituídos de hidrocarbonetos como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX); e a geração de outros resíduos (PASCHOA, 2005; SILVA, 2002; FERREIRA, 2004).

### **3.2. Biodiesel**

Para que o biodiesel seja produzido, óleos vegetais e gorduras animais são submetidos a uma reação química denominada transesterificação. Nesta reação, óleos vegetais e gordura animal reagem na presença de um catalisador (usualmente uma base alcalina) com um álcool (usualmente o metanol ou etanol) para produzir os alquil ésteres correspondentes (para o caso

do metanol, formam-se os ésteres metílicos) da mistura de ácidos graxos que é encontrada no óleo vegetal ou na gordura de origem animal.

O biodiesel pode ser produzido a partir de uma grande variedade de matérias-primas. Estas incluem dos óleos vegetais, destacando-se, os de soja, semente do algodão, palmeiras, amendoim, girassol; e gorduras de origem animal (geralmente o sebo), bem como óleos descartados nas cozinhas. A escolha da matéria-prima para a produção de biodiesel depende da região, de condições agrícolas do solo e fatores climáticos. Dependendo da origem e da qualidade da matéria-prima, mudanças no processo de produção podem ser necessárias.

**Tabela 1:** Oleaginosas disponíveis por região para produção de biodiesel no Brasil.

Adaptado de Kucek (2004) *apud* SOARES JUNIOR (2008).

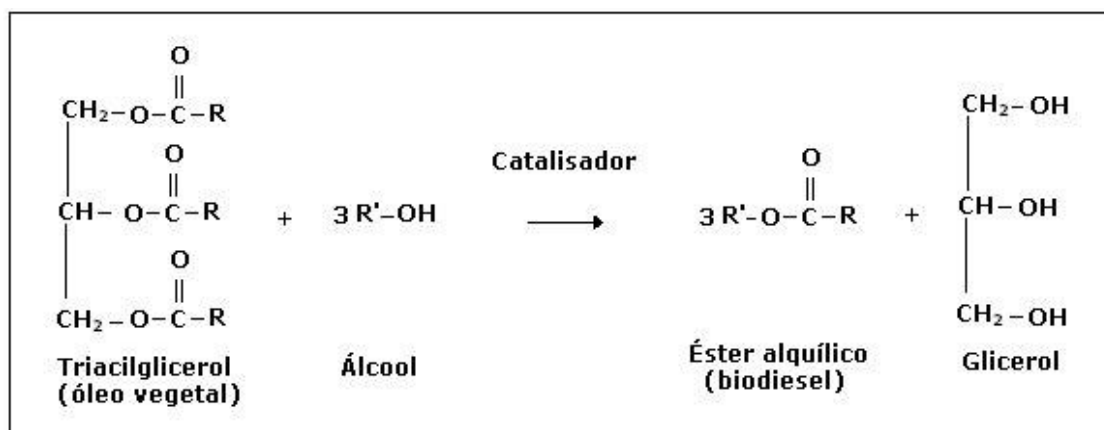
| <i><b>Região</b></i> | <i><b>Óleos vegetais disponíveis</b></i>                        |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Norte                | Dendê, babaçu e soja                                            |
| Nordeste             | Babaçu, soja, mamona, dendê, algodão, milho e coco              |
| Centro-Oeste         | Soja, mamona, algodão, girassol, dendê, milho e nabo forrageiro |
| Sudeste              | Soja, mamona, algodão, milho e girassol                         |
| Sul                  | Soja, canola, girassol, algodão, milho e nabo forrageiro        |

O biodiesel é miscível com o diesel de petróleo em qualquer proporção. Em muitos países, esta propriedade levou ao uso de misturas binárias diesel/biodiesel, ao invés do biodiesel puro. Neste sentido, é importante salientar que estas misturas binárias não podem ser caracterizadas como biodiesel. Muitas misturas deste tipo são designadas por acrônimos como B20, que representa a mistura de 20% de biodiesel no diesel de petróleo. Obviamente, óleos vegetais e gorduras de origem animal não transesterificadas também não podem ser denominadas biodiesel.

O metanol é um dos alcoois empregado para a produção de biodiesel, pois normalmente apresenta menor custo. No entanto, outros álcoois como o etanol ou isopropanol podem ser empregados para produzir biodiesel de qualidades superiores.

Além de ser totalmente compatível como o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais quando são efetuadas comparações:

- O biodiesel é derivado de matérias-primas renováveis de ocorrência natural, diminuindo a atual dependência sobre os derivados de petróleo e preservando-o em últimas reservas para o futuro.
- Trata-se de um composto biodegradável.
- Gera diminuição nas principais emissões presentes nos gases após combustão.
- Possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros.
- Apresenta excelente lubricidade, fato que vem ganhando importância com o advento do petrodiesel de baixo teor de enxofre, cuja lubricidade é parcialmente perdida durante o processo de produção. A lubricidade ideal deste combustível pode ser restaurada mediante a adição de baixos teores de biodiesel, 1-2% (KNOTHE, 2006).



**Figura 2:** Reação de transesterificação para produção de biodiesel (OLIVEIRA, 2008).

### 3.3. Contaminações

Em virtude do uso e manipulação inadequados, em especial pela disposição das matérias-primas e o descarte de resíduos industriais e domésticos, diversas áreas encontram-se contaminadas por substâncias nocivas ao ambiente e aos seres humanos, atingindo águas superficiais e subterrâneas, solo e ar dependendo da sua capacidade de reação com o meio.

A existência de uma área contaminada pode gerar problemas como danos à saúde e a manutenção das exigências para a vida humana e a qualidade ambiental, comprometimento da

qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, bem como a desvalorização das propriedades (MORAIS, 2005).

As frações de petróleo extraídas para sua aplicação no mercado possuem diferentes composições, contendo complexos hidrocarbonetos alicíclicos, que quando dispostos no meio são consideradas substâncias resistentes a atividade microbiana e, portanto, difíceis de serem degradadas (HIGGINS; BURNS, 1975).

Quando se considera todos os processos envolvidos desde a fabricação de produtos, transporte tanto dos produtos como dos resíduos, armazenamento e manipulação, a demanda de resíduos e os riscos com acidentes ou manipulações incorretas só aumentam, isso tanto no âmbito das indústrias como no caso de resíduos urbanos.

Quando um vazamento accidental ou descarte de óleos ou hidrocarbonetos ocorre, as propriedades físicas e químicas das substâncias que irão determinar qual a real gravidade do acidente. Deste modo, não é possível prever um impacto padrão para todos os incidentes, contendo substâncias oleosas, sua composição, toxicidade, o local do acidente, dispersão e volatilidade no meio também irão interferir diretamente na gravidade da contaminação (FOGAÇA, 2007).

Em virtude da insolubilidade e baixa densidade, os óleos formam um espelho sobre a superfície da água, impedindo as trocas gasosas, e conseqüentemente a demanda de diversos gases vitais à vida dentro de um corpo d'água começam a decrescer (CAMPO *et al.*, 2007; MONGKOLTHANARUK; DHARMISTHITI, 2002).

Como resultado, a água passa ao estado anoxico, sem oxigênio dissolvido, e a sua população aeróbia não adaptada a esta nova condição, como zooplâncton, fitoplâncton, plantas e animais aquáticos acabam morrendo por asfixia.

No caso de óleos vegetais, esta anoxia é acentuada em decorrência dos altos valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), quando a degradação microbiana ocorre naturalmente no local (GROENEWOLD *et al.*, 1982; CAMPO *et al.*, 2007).

Pela sua aderência às superfícies biológicas, as contaminações por óleos, muitas vezes, prejudicam diretamente a fauna, quando se aderem à pele ou mesmo as penas de aves, causando hipotermia, perda da capacidade de flutuação ou de vôo, e alterações metabólicas.

### 3.4. Biodegradação e biorremediação

A biorremediação é um processo que visa a diminuição da toxicidade de um poluente e é empregada desde 1988. Utiliza micro-organismos para atenuar ou remover poluentes, agrotóxicos e lixos tóxicos produzidos por vários processos industriais, mediante a biodegradação objetivando a mineralização do composto ou diminuição da toxicidade a níveis aceitáveis (TORTORA *et al.*, 2005; FURTADO, 2004).

Para que esta técnica seja aplicada, alguns aspectos devem ser considerados tais como: identificação e caracterização do poluente; a existência de micro-organismos com capacidade metabólica para degradar o composto; disponibilidade e acessibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático; condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade dos micro-organismos quando estes forem alóctones; tempo requerido para que ocorra todo o processo; taxa de transporte do contaminante para conter o seu alastramento; por fim, porém não menos importante: os fatores econômicos (MARTINS *et al.*, 2005; AMBIENTE BRASIL, 2005).

Segundo Rosato (1997), o petróleo apresenta-se composto por três frações principais quando a biodegradação é considerada:

- Fração saturada: os n-alcanos são os mais fáceis de serem degradados, sendo possível a degradação de até n-C44. Os alcanos ramificados têm sua resistência a degradação microbiana aumentada à medida que os grupos metil são acrescentados.
- Fração aromática: quanto menor o número de anéis aromáticos do composto, mais fácil sua degradação.
- Fração asfáltica: são compostos com estrutura molecular mais complexa e pouco se sabe sobre a sua degradabilidade, supõe-se que sejam altamente recalcitrantes ou inertes à biodegradação.

Segundo Milanelli (2003), com o passar do tempo, o óleo perde sua toxicidade e torna mais denso e insolúvel. Isto faz com que as características do óleo sejam fundamentais na determinação do grau de impacto que pode ser causado no meio.

Sendo os micro-organismos os principais responsáveis pela ciclagem de nutrientes na natureza, em muitos ecossistemas já existe uma comunidade microbiana autóctone capaz de degradar produtos químicos entre os quais óleos e gorduras (FOGAÇA, 2007).

Bactérias, fungos e leveduras são agentes transformadores devido a sua habilidade em degradar uma ampla variedade de substâncias recalcitrantes, normalmente encontradas em resíduos industriais de óleo (URURAHY *et al.*, 1998).

Os fungos representam importante papel na degradação de hidrocarbonetos no solo, suas enzimas extracelulares podem proporcionar substratos para o crescimento de bactérias mediante hidrólise de polímeros e também importantes metabólitos secundários (KATAOKA, 2001).

Algumas generalizações podem ser feitas quanto à susceptibilidade dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano, segundo Seabra (1997):

- Os hidrocarbonetos presentes em uma mistura complexa como o petróleo, são em sua maioria, biodegradados por culturas microbianas mistas, de maneira simultânea, mas à diferentes taxas. A taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo varia em função do desaparecimento de certos componentes e da mudança da biota;
- A presença de um dado hidrocarboneto em uma mistura como substrato, pode ter uma influência positiva (pelo processo de cometabolização) ou negativa (pela sua toxicidade) na biodegradação desta mistura;
- A utilização de alcanos C1-C4 é restrita a poucas espécies. Os alcanos na faixa de C5-C9 são tóxicos a muitos micro-organismos, devido ao seu efeito solvente, isto é, tendem a romper a estrutura da membrana lipídica dos micro-organismos. Os n-alcanos C10-C22, normalmente são facilmente metabolizados. Os alcanos com pesos moleculares superiores, como as graxas sólidas, não são facilmente biodegradados, por serem sólidos hidrófobos a temperatura fisiológica. Contudo, já foi observada uma lenta biodegradação em n-alcanos com mais de 44 átomos de carbono;
- Os iso-alcanos são menos prontamente utilizáveis comparando-se com os n-alcanos correspondentes. O radical metila pode retardar ou bloquear completamente a biodegradação;
- Alcenos (olefinas) tendem a ser mais tóxicos, ao menos em condições aeróbias, são menos facilmente degradáveis, comparando-se com os n-alcanos análogos;
- Os hidrocarbonetos monoaromáticos podem ser tóxicos, mas em baixas concentrações, diversos micro-organismos podem utilizá-los rapidamente. Poliaromáticos, contendo de 2 a 4 anéis, podem ser biodegradados à taxas que decrescem com o número de anéis aromáticos. Naftalenos, compostos com dois anéis aromáticos, tendem a degradar mais lentamente que os compostos

monoaromáticos. Contudo, vários trabalhos mostraram uma degradação mais rápida do naftaleno e metilnaftaleno, em relação ao benzeno e n-hexadecano, em sedimentos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Em sedimentos contaminados com óleo cru, os monoaromáticos se degradam mais rápido que a fração de alcanos. A variação nos processos de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos pode ser atribuída ao tipo de combustível e a fatores ambientais presentes, já que a biodegradabilidade é quase sempre ligada a viabilidade dos micro-organismos. Poliaromáticos com 5 ou mais anéis são de biodegradação difícil e lenta;

- Os cicloalcanos de baixo peso molecular raramente servem como substrato, sendo degradados lentamente e em baixas concentrações. Os cicloalcanos altamente condensados são refratários;
- Os compostos heterocíclicos que contém nitrogênio, enxofre e/ou oxigênio, quando não muito condensados, podem sofrer degradação limitada. Asfaltenos altamente condensados são muito resistentes a biodegradação.

**Tabela 2:** Relação entre o composto de acordo com a sua cadeia e a taxa de biodegradabilidade.

| Composto       |                     | Taxa de biodegradabilidade     |
|----------------|---------------------|--------------------------------|
| ALCANOS        | C1 – C4             | Restrita a poucas espécies     |
|                | C10 – C22           | Alta degradabilidade           |
|                | Alto PM             | Difícil degradação             |
|                | Cíclicos            |                                |
|                | Cíclicos de alto PM | Recalcitrantes – refratários   |
| AROMÁTICOS     | Monoaromáticos      | Média degradação               |
|                | 2 – 4 anéis         | Difícil metabolização          |
| Heterocíclicos |                     | Degradação limitada            |
| Asfaltenos     |                     | Muito resistentes a degradação |

### **3.5. Micro-organismos degradadores de petróleo e biodiesel e fatores que influenciam na biodegradação**

Na década de 60, micro-organismos degradadores de petróleo e seus hidrocarbonetos foram isolados de reservatórios de refinarias e em tanques combustíveis de aviões a jato (LACAZ *et al.*, 1970; CAMPBELL, 1977).

A degradação nos óleos manifestava-se induzindo alterações na viscosidade, estabilidade das emulsões, entupimento de válvulas e canos quando ocorria o crescimento do micélio; mau funcionamento dos motores e corrosão do tanque combustível (CAMPBELL, 1977; STOLP, 1988).

ZoBell em 1946, observou que a degradação dos hidrocarbonetos dependia da composição química da mistura do petróleo e das condições ambientais em que se encontravam, tanto composto quanto os micro-organismos (ZoBell, 1946 *apud* ROSATO, 1997).

Sabe-se, entretanto, que os micro-organismos são capazes de metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente. Portanto faz-se necessária a presença de uma cultura mista com capacidade enzimática ampla para a degradação dos hidrocarbonetos encontrados no petróleo e eventualmente transferidos para o solo, mar e água poluídos (ROSATO, 1997; KATAOKA, 2001).

Na cultura mista ocorre a existência de micro-organismos capazes de degradar metabólitos secundários produzidos por outras espécies (KATAOKA, 2001).

A biodegradação dos hidrocarbonetos também é influenciada por fatores que alteram as propriedades físicas e químicas destes compostos promovendo crescimento diferenciado nas comunidades microbianas presentes. Segundo Rosato (1997) e Milanelli (2003), os principais fatores que favorecem a biodegradação são:

- Temperatura: a temperatura ideal a biodegradação é entre 30 e 40°C. Temperaturas abaixo podem aumentar a viscosidade e diminuir a solubilidade e a atividade enzimática, retardando o processo. Em temperaturas superiores a 40°C, ocorre aumento da solubilidade, volatilidade, da permeabilidade das membranas celulares e da toxicidade, também deixando mais vagarosa a biodegradação.

- Nutrientes: o petróleo serve como fonte de carbono, porém os micro-organismos necessitam de outros nutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre e alguns micronutrientes.

- Oxigênio: a maioria dos micro-organismos degradadores de petróleo são aeróbios, degradando os hidrocarbonetos iniciando-se normalmente pela introdução de oxigênio na

molécula pela ação das enzimas oxigenases. A degradação completa conduz a formação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Pode ocorrer degradação anaeróbia, porém a decomposição não é completa como no caso anterior.

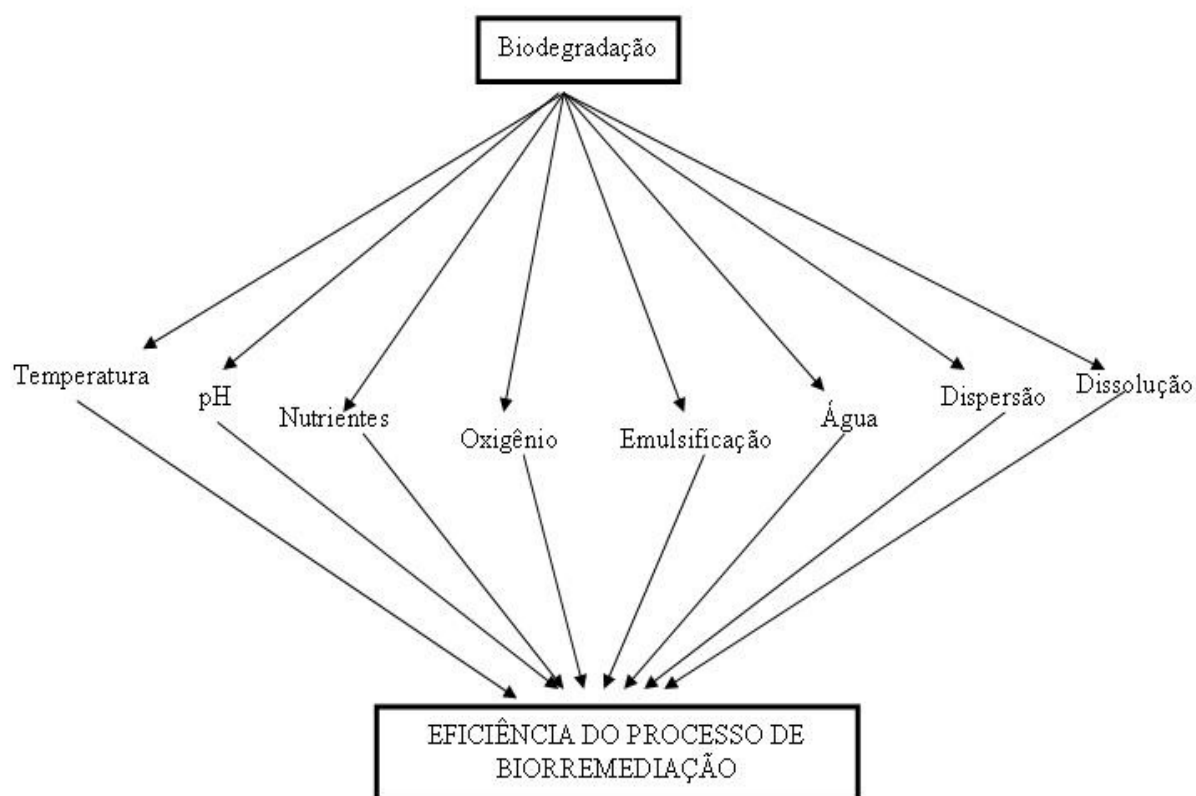
- Água: no ambiente terrestre, o crescimento e o metabolismo dependem da água e a quantidade de água depende da condição dos micro-organismos, pois alguns são xerofíticos, outros halófilos.

- pH: o maior crescimento acontece em pH neutro, muito embora os fungos prefiram ambientes levemente ácidos.

- Dissolução: depende da quantidade de água do meio, contudo apenas as frações mais leves do petróleo apresentem solubilidade, porém a taxa de dissolução facilita a assimilação da molécula através da membrana celular.

- Dispersão: processo consiste na formação de pequenas gotículas de óleo, este aumenta a área de contato com os micro-organismos. Um dos meios que propiciam agitação e a movimentação são as ondas das águas do mar.

- Emulsificação: em certas condições ambientais pode ocorrer a formação de emulsão de água+óleo. As emulsões têm a viscosidade aumentada e em alguns casos facilita o contato com as células microbianas e outros processos de intemperismo.



**Figura 3:** Esquema da interação entre os fatores que influenciam na biodegradação.

Para que macromoléculas sejam degradadas é necessário a quebra dessas moléculas e este processo é realizado fora das células, portanto é indispensável que os micro-organismos possuam a capacidade de produzir enzimas que tenham a propriedade de hidrolisar as moléculas em frações que sejam facilmente assimiláveis pelas células (FOGAÇA, 2007).

Mudanças nas condições ambientais podem favorecer o desenvolvimento e o uso de um sistema enzimático específico num determinado micro-organismo ou ainda promovem o crescimento e atividade metabólica de outra espécie que existia em estado dormente no solo. (HOEPPEL; HINCHEE, 1994).

Considerando-se a constituição química do biodiesel, pode-se inferir que se trata de um produto com possibilidades de sofrer deterioração durante seu armazenamento. A biodeterioração poderá ocorrer pela ação de bactérias, fungos e leveduras.

Os caminhos metabólicos que envolvem a deterioração das moléculas de biodiesel iniciam-se pela hidrólise da ligação éster formando ácido graxo e álcool etílico. Para verificar a capacidade dos micro-organismos deteriorarem a molécula de éster existem vários métodos químicos, físicos, e microbiológicos.

Os métodos químicos envolvem a detecção dos compostos resultantes da hidrólise. Dentre os métodos, a cromatografia gasosa é a mais utilizada, dada a sua possibilidade de quantificar diferentes ácidos graxos e alcoóis. Pode-se verificar ainda a ação de deterioração empregando métodos físicos dos quais a viscosidade é uma referência.

Para avaliar a deterioração quando micro-organismos estão presentes, pode-se elaborar ensaios microbiológicos onde é possível verificar a ação hidrolítica de uma cultura produtora de esterase ou capacidade lipolítica (MAITAN *et al.*, 2006 *apud* SOARES JUNIOR, 2008).

Segundo Soares Junior (2008), em termos bioquímicos, a biodegradação do biodiesel é mais favorável frente ao petróleo e seus derivados devido as cadeias carbônicas do biocombustível serem lineares e frequentemente com número par de átomos de carbono. Soares Junior *et al.* (2008) relata a influência das substâncias antioxidantes no biodiesel para o processo de biodegradação. Em estudo realizado constatou que em processo de bioaumentação no solo contaminado com o biodiesel, a degradação é dificultada pela presença do antioxidante terc-buti-hidroquinona (TBHQ). Enquanto no solo com os resíduos, os micro-organismos autóctones promoveram mais facilmente a biodegradação.

### 3.6. Solos

A estrutura do solo depende da associação entre as partículas minerais como areia, silte, argila e a matéria orgânica. A origem e formação dos solos envolvem 5 fatores entre eles: a biota, o clima, a geomorfologia, a geologia e o tempo (PAUL; CLARK, 1989; METTING, 1993) e uma das sua classificações é recomendada por Silva (2002) e Mancini (2002). Agregados que resistem a processos mecânicos envolvem interações entre as partículas primárias com micro-organismos, raízes de plantas, hifas de fungos, polissacarídeos e matéria húmica (SESSITSCH *et al.*, 2001).

As bactérias são os micro-organismos presentes em maior número no solo, mas também são encontrados: fungos, protozoários e algas (PAUL; CLARK(1989); METTING, 1993). Um quilograma de solo pode conter 500 bilhões de bactérias, 10 milhões de actinomicetos e quase 1 bilhão de fungos (SPOSITO, 1989). Esses organismos mineralizam a matéria orgânica que pode resultar na formação de humo ou compostos secundários. Em solos tropicais, as altas temperaturas facilitam esse processo, sendo necessária uma reposição do carbono oxidado, para que o solo não perca a fertilidade (LYON; BUCKMAN, 1943).

A estrutura organizacional das partículas do solo provê um habitat heterogêneo para os micro-organismos, caracterizado por diferentes substratos, nutrientes e concentrações de oxigênio e água, assim como pH variável (SESSITSCH *et al.*, 2001). Coletivamente os micro-organismos possuem a maior diversidade enzimática encontrada na Terra e são capazes de metabolizar milhões de compostos orgânicos, adquirindo energia para o seu crescimento. Esse metabolismo, chamado de catabolismo ou biodegradação é o principal guia do ciclo de degradação do carbono (WACKETT; ELLIS, 1999).

A vegetação gera vários benefícios, pois as plantas estabilizam o solo, prevenindo as erosões causadas pelas chuvas e pelo vento e minimiza a exposição deste a contaminantes. Durante a biorremediação natural existe a possibilidade de se enriquecer o tratamento com a microbiota presente na rizosfera, pois as raízes possuem exudados e outras substâncias que podem ajudar na biodegradação de hidrocarbonetos recalcitrantes, tornando-os disponíveis (BROWN; NADEAU, 2002).

Gray *et al.* (2000) observaram um lento estágio de degradação na transformação de contaminantes no solo e essa fase lenta de biodegradação foi atribuída a fatores físicos como difusão de partículas ou forte atração destas à matéria orgânica.

Algumas espécies de bactérias estão mais adaptadas às condições de limitação de nutrientes ou possuem a capacidade de utilizar maior amplitude de substâncias podendo

degradar grandes e pesadas moléculas orgânicas (SESSITSCH *et al.*, 2001), porém o comportamento bifásico dos compostos no solo deve ser considerado, pois pelo modelo de seqüestro a proporção inicial de poluentes livres introduzidos no solo é fixada em nanoporos, tornando-os inacessíveis aos micro-organismos. O enriquecimento da atividade biológica durante as primeiras semanas de tratamento pode influenciar os níveis de resíduos no solo, evitando o seqüestro dos compostos que podem ser realmente degradados (ADMON *et al.*, 2001).

Sabaté *et al.* (2004) observaram que os solos possuem diferenças nas atividades metabólicas dos micro-organismos autóctones, pois a determinação da evolução na produção acumulada de CO<sub>2</sub>, o solo da área abandonada de indústria e contaminado com óleo mineral indicou um progressivo aumento na atividade respiratória, especialmente quando os nutrientes ou a glicose foram adicionados. No solo provindo de uma área abandonada e contaminado com produtos desconhecidos do petróleo houve uma resposta nula nos primeiros cinco dias seguida de um ligeiro aumento quando a glicose foi adicionada.

A estrutura e composição do solo afetam as características e o comportamento coligativo, desta forma, a cinética de todo o processo de biodegradação será diferente em cada tipo de solo (HENCKLEIN, 2005).

### **3.7. Áreas contaminadas**

Os processos industriais, que introduzem no mercado novos produtos a cada dia, lançam diversos poluentes na água, no ar e no solo. Esses poluentes alteram as características desses meios, restringindo seus usos e oferecendo riscos ao meio ambiente e à saúde da população (MELLO, 2007).

A consideração do solo como um componente importante no ecossistema é ainda mais recente, merecendo atenção e proteção assim como o ar e água. A contaminação do solo é resultado de inúmeras atividades antrópicas, incluindo processos industriais e estocagem, transporte, uso de petróleo e os efeitos de hidrocarbonetos na ecologia e fertilidade do solo induziu o desenvolvimento de técnicas eficientes para remediação de áreas contaminadas, visando sua recuperação para uso futuro (KATAOKA, 2001).

Áreas contaminadas podem ser tratadas pelo processo de biorremediação, isto é, usando atividade metabólica de organismos vivos como alternativa para remediação química. Diversos sistemas de biotratamento são usados com a finalidade de promover a degradação

dos resíduos do petróleo, um dos mais conhecidos é o sistema de *landfarming*, que consiste na biodegradação de resíduos que são aplicados ao solo e incorporados nas camadas superficiais (GAYLARDE, 1998).

Segundo Cortez (2009), em reportagem publicada no dia 3 de março de 2009, o número de áreas contaminadas no Estado de São Paulo aumentou em 10%. Um estudo divulgado pela CETESB identificou 2.514 locais contaminados pelos mais diversos tipos de poluentes, contra 2.272 áreas em 2007. Os postos de combustíveis lideram a lista elaborada pela Cetesb e representam 78% dos locais contaminados no Estado, com um total de 1.953 registros. As atividades industriais estão em segundo lugar, com 13% de participação e 337 registros.

O dado positivo, segundo a companhia, é que do total de áreas cadastradas, 182 foram descontaminadas e podem ser consideradas aptas para o uso declarado, como industrial, comercial, habitacional ou de lazer, de acordo com avaliação feita pelo órgão ambiental. Este número representa a soma das áreas reabilitadas, num total de 87, e, em processo de monitoramento para reabilitação, num total de 95 locais (CORTEZ, 2009).

O lançamento de resíduos sólidos industriais nos solos pode acarretar diversos problemas ao meio ambiente, que, de um modo geral, incluem:

- Aspecto estético desagradável e comprometimento paisagístico;
- Produção de maus odores;
- Poluição da água, pelo carreamento superficial ou pela infiltração dos detritos para os corpos hídricos;
- Liberação de gases tóxicos;
- Poluição do ar.

As alterações nas características químicas do solo repercutem sobre os organismos vivos que habitam o solo, ocasionando impactos na biota do mesmo, podendo até mesmo eliminar muitos organismos úteis (MARIANO, 2005).

**Tabela 3:** Perigos associados à presença de diversos poluentes no solo.  
Alloway, 1996 *apud* MARIANO, 2005.

| Perigo                                                                                                 | Poluente                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ingestão direta de solo contaminado (jardineiros, crianças, animais ou através do consumo de vegetais) | As, Cd, Pb, $\text{CN}^-$ , $\text{Cr}^{+6}$ , Hg, HPAs, BPCs, dioxinas, fenóis                         |
| Inalação de poeiras e substâncias voláteis presentes no solo                                           | Solventes orgânicos (tolueno, benzeno e xilenos), Hg, partículas ricas em metais (finos de catalisador) |
| Consumo de colheitas contaminadas e consumo de animais contaminados ao longo da cadeia alimentar       | As, Cd, Hg, Pb, Sr, HPAs                                                                                |
| Fitotoxicidade                                                                                         | $\text{SO}_4^{-2}$ , Cu, Ni, Zn, $\text{CH}_4$ , Cr, B                                                  |
| Toxicidade para a biota do solo                                                                        | Cd, Cu, Ni, Zn                                                                                          |
| Incêndios e explosões                                                                                  | $\text{CH}_4$ , S, carvão e poeira de coque, petróleo cru                                               |
| Contato das pessoas com os contaminantes durante demolições e preparação de terrenos                   | HPAs, fenóis, BPCs                                                                                      |
| Contaminação da água                                                                                   | $\text{CN}^-$ , $\text{SO}_4^{-2}$ , sais metálicos, hidrocarbonetos, solventes, surfactantes, esgotos  |

### 3.8. Formas de aplicação da biorremediação

Existe, atualmente, uma preocupação e conscientização da sociedade em relação à qualidade ambiental. A população vem tornando-se mais crítica e participativa, exigindo legislações específicas e atuações cada vez mais exigentes das autoridades. Desta forma, em função da crescente demanda em relação ao gerenciamento de áreas contaminadas, avanços significativos ocorreram nas últimas décadas nos estudos que visavam à recuperação ambiental (SPIBORGH, 1997).

Desta forma, a CETESB, o órgão que gerência os problemas da poluição no Estado de São Paulo, tem desenvolvido manuais e adaptado a legislação, tomando como referência principalmente as normas ambientais alemãs, com vistas ao controle das áreas suspeitas de contaminação e comprovadamente contaminadas. Neste sentido, destaca-se o Manual de

Gerenciamento de Áreas Contaminadas (2001), que tem por função fornecer informações e metodologias a serem utilizadas na solução dos problemas gerados por áreas contaminadas, desde a investigação preliminar até a proposição de técnicas de remediação (MARIANO, 2006).

A biorremediação *in situ* é realizada no próprio local, sem que haja remoção de material contaminado. Isto evita custos e distúrbios ambientais associados com o movimento de solos e águas que estão contaminados para outros locais destinados ao tratamento. Os produtos finais de uma biorremediação efetiva são água e gás carbônico, que não apresentam toxicidade e podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos (MARIANO, 2006).

A remediação natural é uma estratégia de gerenciamento baseada nos processos naturais de atenuação para remover ou conter os contaminantes dissolvidos na água. A atenuação natural refere-se aos processos físicos, químicos e biológicos que facilitam o processo de remediação de maneira global (WIEDEMEIR, 1996).

A bioestimulação de populações de micro-organismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é frequentemente empregada em projetos de biorremediação (ATLAS, 1997). Para se utilizar o processo de bioestimulação deve-se demonstrar que existe no local contaminado uma população natural de micro-organismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais são insuficientes para se obter altas taxas de atividade microbiológica dessa população (RAMASWAMI; LUTHY, 1997).

Algumas limitações naturais comuns à biodegradação de poluentes são: altos níveis de concentração de poluentes, falta de oxigênio, pH desfavorável, falta de nutrientes minerais, baixa umidade e temperaturas desfavoráveis. Os métodos que modificam as condições ambientais podem ser utilizados para melhorar as taxas de biodegradação da população microbiológica autóctone. Uma vez que as condições naturais limitantes são corrigidas, a destruição natural existente de micro-organismos permite, em muitos casos, um enriquecimento espontâneo de micro-organismos apropriados (MARIANO, 2006).

O bioaumento é um processo de biorremediação que utiliza micro-organismos alóctones muitas vezes encontrados em produtos biotecnológicos comercializados. Esse processo é necessário quando um local contaminado possui ou não, em quantidades suficientes os requisitos necessários para que o processo de degradação ocorra. Assim, essa técnica tem como objetivo acelerar ou estimular a biodegradação mediante a intensificação do

crescimento microbiano considerando também a otimização do ambiente em questão (MARIANO, 2006).

O bioaumento, quando bem utilizado, pode acelerar a biodegradação do contaminante, devendo, entretanto, serem considerados os seguintes aspectos:

- Aprovação do órgão ambiental: o produto biotecnológico antes de sua utilização deve ser identificado, caracterizado e testado em sua toxicidade e ecotoxicidade, bem como comprovada a sua eficiência e inocuidade ao ambiente.

- Os micro-organismos aplicados devem atuar em sinergismo com as espécies autóctones, sem interferir nos processos biogeoquímicos naturais.

Porém, uma das grandes ressalvas ao emprego desta técnica está no possível impacto ecológico que espécies exóticas tenham sobre o ecossistema. Daí que em muitos casos se procedia o isolamento de cepas ou o enriquecimento de cultivos mistos da zona afetada, que fazendo seu cultivo em biorreatores em condições controladas permitem reintroduzir grandes quantidades de biomassa autóctone que diminuem consideravelmente o tempo de tratamento (LEAHY; COLWELL, 1990).

O *landfarming* é uma técnica de biorremediação utilizada com certa frequência para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os micro-organismos heterotróficos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os contaminantes ali presentes, transformando-os em substâncias inertes como o material orgânico estabilizado, água e CO<sub>2</sub>. Esta estimulação ocorre mediante o revolvimento do solo por operações de aração e gradeamento (visando aerar e homogeneizar as camadas com diferentes concentrações de contaminantes), além da adição de corretivos, fertilizantes e, se necessário, de água na irrigação. Pode-se ainda enriquecer o solo com micro-organismos de reconhecida capacidade de degradação dos contaminantes e adicionar substâncias, visando aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes. Esta técnica pode ser realizada *in situ* e visa descontaminar o solo no local onde este foi contaminado, ou pode ser realizada *ex situ*, se o solo contaminado foi removido para outro local onde o *landfarming* será operado (DOELMAN; BREEDVELK, 1999).

A compostagem é uma técnica *ex situ* que pode ser utilizada para o tratamento do solo contaminado com HPAs, sendo este normalmente removido do local de origem e colocado na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas. Neste solo, será desencadeado um processo em que os micro-organismos aeróbios irão degradar os contaminantes orgânicos, transformando-os em material orgânico estabilizado, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (JACQUES *et al*, 2007).

A biorremediação de solos contaminados com altas concentrações de HPAs pode ser realizada por uma técnica *ex situ* que se utiliza de biorreatores. Existe uma infinidade de tipos e configurações de biorreatores que ilustrativamente podem ser comparados a tanques aéreos fechados. O solo contaminado é misturado com água, de modo a formar uma suspensão com 10 a 40% de sólidos, que é mecanicamente aerada aplicando-se rotações. A formação desta suspensão no interior do biorreator possibilita o aumento da disponibilidade dos contaminantes aos micro-organismos degradadores e a eliminação da heterogeneidade da distribuição dos contaminantes no solo, duas grandes limitações da biorremediação *in situ* (MACLEOD; DAUGULIS, 2005).

Além disso, no interior do biorretatos, as condições ambientais de pH, a disponibilidade de nutrientes, a aeração e a temperatura são otimizadas para o máximo crescimento microbiano, sendo possível também a inoculação de micro-organismos comprovadamente degradadores dos contaminantes.

Em geral, as taxas e a extensão da biodegradação nesta técnica são muito altas, em vista do controle sobre fatores abióticos, e até bióticos, no interior do biorreator, o que resulta no tratamento do solo num curto período de tempo. Concomitantemente a isso, algumas desvantagens estão relacionadas a está técnica, como a limitação da quantidade de solo tratado devido ao tamanho dos biorreatores e a necessidade, em alguns casos, de pré-tratamento do solo para remoção de compostos tóxicos aos micro-organismos (como metais pesados) e para diminuir o tamanho dos agregados do solo.

Porém, o fator que normalmente limita a utilização desta técnica é o elevado custo de remediação do solo, em vista da alta tecnologia utilizada nos biorreatores. Assim, o uso dessa técnica restringe-se aos casos em que o solo está contaminado com altas concentrações de poluente e há necessidade de se realizar a biorremediação em curto período de tempo. Sob essas exigências, a utilização de outras técnicas de biorremediação provavelmente não traria resultados satisfatórios (DOELMAN; BREEDVELK, 1999).

### **3.9. Testes de biodegradabilidade utilizando 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)**

Para demonstrar que uma tecnologia de biorremediação é potencialmente útil, é importante verificar a biodegradação dos poluentes sob condições controladas. Isto geralmente não é possível de se obter *in situ*, assim, esta verificação deve ser obtida mediante experimentos laboratoriais, os quais demonstram o potencial que um determinado tratamento

pode ter em estimular a remoção de xenobióticos de um local contaminado (BAILEY *et al.*, 1973 *apud* MARIANO, 2006).

O princípio deste teste é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um aceptor de elétron, como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato, quando estes constituem a única fonte de carbono, pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido) (MARIANO, 2007).

### 3.10. Absorbância

Se um feixe de luz branca passar através de uma cubeta de vidro contendo um líquido, a radiação emergente será menos intensa que a incidente. A diminuição da intensidade pode ser aproximadamente igual em todo o intervalo de comprimento de onda ou pode apresentar diferente amplitude para diferentes cores. Essa perda é devida, em parte, a reflexões nas superfícies e em parte à dispersão por qualquer partícula em suspensão, mas, acima de tudo, é devida à absorção da energia radiante pelo líquido.

A amplitude com que a energia é absorvida pelo líquido é geralmente maior para algumas cores, que constituem a luz branca, que para outras, com o resultado de que o feixe emergente é colorido. A cor aparente da solução é sempre o complemento da cor absorvida. Referindo-se a cor, restringe-se a discussão à região visível do espectro, mas vários conceitos e métodos analíticos seguem o mesmo princípio tanto na região da luz ultravioleta ou da infravermelha.

A importância das soluções coloridas consiste no fato de que a radiação absorvida é característica da substância. Esta, sendo solúvel e colorida, pode ser determinada quantitativamente dessa maneira. Além disso, muitas substâncias que são incolores ou fracamente coloridas podem ser analisadas por adição de uma substância que reaja com elas formando um composto intensamente colorido. A designação geral para análises químicas mediante medidas de absorção da radiação é a absorbância (EWING, 1960).

A lei de Beer, que fundamenta a espectrofotometria, estabelece que a absorbância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente. A fração de luz que passa por uma amostra (transmitância) está relacionada logaritmicamente com a concentração da amostra (HARRIS, 1999).

Em termos de cálculo, podemos escrever a lei de Beer da seguinte forma:

$$\frac{dP}{dn} = -kP$$

Onde  $dP$  é a potência absorvida ao nível de potência  $P$  por um incremento  $dn$  no número de moléculas absorventes e  $k$  é uma constante de proporcionalidade. O rearranjo seguido por integração entre os limites fornece:

$$\int_{P_0}^P \frac{dP}{P} = -k \int_0^N dn$$

Onde  $P$  e  $P_0$  já foram definidos e  $N$  é o número de moléculas absorventes atravessadas por um feixe de  $1 \text{ cm}^2$  de seção transversal. Para um feixe de área de seção transversal  $s \text{ cm}^2$ , o membro a direita deve ser multiplicado por  $s$ :

$$\ln \frac{P}{P_0} = -kNs$$

Transmitância,  $T$ , é definida como a fração de luz que passa pela amostra.

A quantidade  $Ns$  é uma medida do número de partículas que são efetivas na absorção da radiação. Uma medida mais útil, contudo, é o produto da concentração  $c$  e do comprimento de percurso  $b$ , de modo que podemos escrever:

$$Ns = bc$$

Além disso, por conveniência, pode-se substituir  $k$  por outra constante  $\epsilon$ , que inclui o fator de conversão dos logaritmos naturais em decimais (EWING, 1960):

$$\log \frac{P_0}{P} = A = \epsilon bc$$

Quando não é absorvida nenhuma luz,  $P = P_0$  e  $A = 0$ . Se 90% da luz são absorvidos, 10% são transmitidos e  $P = P_0/10$ . Esta razão dá  $A = 1$ . Se apenas 1% da luz é transmitido,  $A=2$ .

**Tabela 4:** Relação entre transmitância e absorbância. (HARRIS *et al*, 1999).

| $P/P_0$ | % $T$ | $A$ |
|---------|-------|-----|
| 1       | 100   | 0   |
| 0,1     | 10    | 1   |
| 0,01    | 1     | 2   |

No estudo de espectros de absorção e análises absorciométricas, geralmente é necessário usar uma estreita banda de comprimentos de onda. Em alguns casos uma fonte de

linhas fornece a estreita banda desejada, mas mais frequentemente é aconselhável iniciar com uma radiação de fonte contínua e escolher uma banda de comprimento de onda da mesma. Esse procedimento resulta em uma maior flexibilidade que a que seria produzida pela fonte de linhas, pois a banda escolhida pode ser tomada em qualquer posição desejada no intervalo coberto pela fonte (EWING, 1960).

A absorbância é adimensional, mas algumas pessoas escrevem “unidades de absorbância” após o valor numérico (HARRIS, 1999).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Fontes de micro-organismos com potencial de biodegradação

O material utilizado era proveniente de solos contaminados por derivados de petróleo ou borra de óleo descartado, sendo obtido em oficinas mecânicas do município de Rio Claro – SP. As oficinas foram escolhidas de modo aleatório, sendo a localidade delas, variada em bairros de diversos padrões sócio-econômicos.

#### 4.1.2. Meios de isolamento

4.1.2.1. Meio de enriquecimento de micro-organismos que utilizam biodiesel, segundo AARONSON (1970):

|                                                |         |
|------------------------------------------------|---------|
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,100 g |
| KCl                                            | 0,020 g |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O           | 0,020 g |
| Extrato de levedura                            | 0,300 g |
| Biodiesel                                      | 1,0 mL  |
| Água destilada (q.s.p.)                        | 100 mL  |

4.1.2.2. Meio de enriquecimento de micro-organismos que utilizam hidrocarbonetos, segundo AARONSON (1970):

|                                                |         |
|------------------------------------------------|---------|
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,100 g |
| KCl                                            | 0,020 g |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O           | 0,020 g |
| Extrato de levedura                            | 0,300 g |
| Petróleo diluído                               | 1,0 mL  |
| Água destilada (q.s.p.)                        | 100 mL  |

4.1.2.3. Meio de isolamento e manutenção de fungos e leveduras

Utilizou-se o meio de Sabouraud (DIFCO,1984), contendo a seguinte composição:

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Glicose                 | 40 g    |
| Ágar                    | 15 g    |
| Peptona                 | 10 g    |
| Água destilada (q.s.p.) | 1000 mL |

4.1.2.4. Meio de isolamento e manutenção de bactérias

Utilizou-se o meio PCA (DIFCO,1984), contendo a seguinte composição:

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Tryptona                | 5,0 g   |
| Extrato de levedura     | 2,5 g   |
| Glicose                 | 1,0 g   |
| Ágar                    | 15 g    |
| Água destilada (q.s.p.) | 1000 mL |

4.1.2.5. Meio Bushnell-Hass, (BH) (DIFCO, 1984)

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,20 g  |
| CaCl <sub>2</sub>               | 0,02 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,00 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,00 g  |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 1,00 g  |
| FeCl <sub>3</sub>               | 0,05 g  |
| Água destilada (q.s.p.)         | 1000 mL |

## 4.1.2.6. Solução salina

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| NaCl                    | 8,5 g   |
| Água destilada (q.s.p.) | 1000 mL |

## 4.1.2.7. Solução de Tween 80 a 10%

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Tween 80                | 10 mL |
| Água destilada (q.s.p.) | 90 mL |

## 4.1.2.8. Indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| 2,6-diclorofenol indofenol | 0,1 g  |
| Água destilada (q.s.p.)    | 110 mL |

## 4.1.2.9. Amostras de substâncias lipídicas

Petróleo bruto –

Biodiesel - origem vegetal (óleo de soja)

## 4.1.2.10. Melaço

Melaço de cana-de-açúcar com diluição de 8 a 10° Brix

## 4.1.3. Equipamentos e vidraria

## 4.1.3.1. Vidraria

Foi utilizada vidraria convencional de laboratório de microbiologia.

## 4.1.3.2. Equipamentos

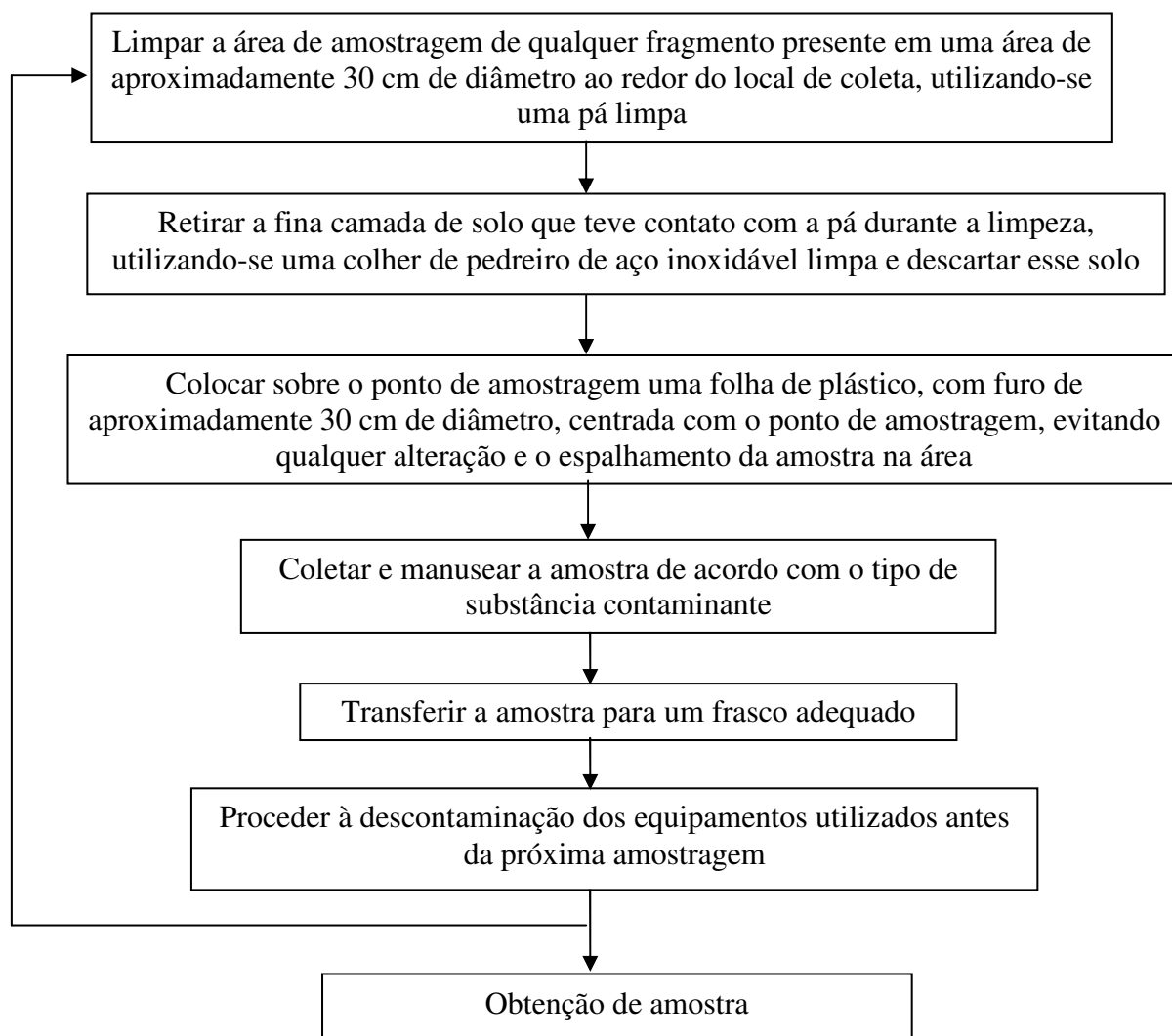
- Microscópio
- Câmara fria a 5°C
- Autoclave FABBE, mod. 107
- Estufas de 28°C e 35°C
- Balança semi-analítica MASTE, mod. AS2000C

- Mesa rotatória MARCONI®
- Espectrofotometro METROLAB 1700
- Centrífuga

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Coleta de amostras

As coletas foram feitas de acordo com as diretrizes apresentadas no Manual de Gerenciamento de Áreas Contaminadas (CETESB, 2001) em 8 pontos. Fez-se a amostragem do solo superficial utilizando-se de uma pá de aço inoxidável. Os passos seguidos são descritos na figura 4, abaixo:



**Figura 4:** Procedimento de coleta de amostras de solos para análise microbiológica.

As amostras foram transportadas para o Departamento de Bioquímica e Microbiologia e mantidas sob refrigeração.

#### 4.2.2. Meios de cultura

Os meios de cultura eram preparados de acordo com orientação técnica dos fabricantes, dissolvendo os componentes indicados em água destilada em béqueres, e quando necessária, era feita a dissolução térmica do ágar, contido nos meios sólidos. Todos foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

#### 4.2.3. Ativação dos micro-organismos das amostras e preparação dos inóculos

As amostras de material quando coletadas eram armazenadas em câmara fria. Para desenvolver o trabalho os micro-organismos foram ativados para a preparação de inóculos.

Para esta etapa, pesou-se 10g de cada material adicionando-as em erlenmyers de 250 mL contendo solução salina e Tween 20 o quanto necessário para a emulsificação do material oleoso. Utilizou-se agitação em shaker a 60rpm e 28°C durante uma hora para acelerar a emulsificação.

A partir deste material, procedeu-se a inoculação com 2 mL retirada da interface solúvel do material e da solução em 7 erlenmyers de 500 mL contendo melaço diluído a 10° Brix e deixados em estufa a 28°C por cerca de 48 horas.

A amostra procedente do efluente de refinaria, por estar suspenso em líquido não foi reativado.

#### 4.2.4. Isolamento de micro-organismos

Empregando-se os meios de cultura 4.1.2.1, adicionou-se 1 mL dos inóculos ativados a 80mL do meio, contendo 1mL de biodiesel e dispostos em shaker por 48 horas.

Terminado o período de 48 horas de agitação, houve a transferência de 1 mL da suspensão obtida em cada erlenmyer para outros contendo novamente 80 mL do mesmo meio e 1 mL de biodiesel, postos em agitação por um período de 5 dias. Esta etapa foi programada para induzir uma seleção mais eficiente de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos.

Posterior a isso, fez-se diluições decimais em tubos de cultura contendo solução salina e adicionando 1 mL de cada suspensão obtida em cada erlenmyer respectivamente. As

diluições foram plaqueadas em placas de Petri pelo método *por plate*, contendo meios Sabouraud e PCA e deixadas em estufas a 28° e 35°C, respectivamente, por 48 horas. A seguir as colônias de fungos e bactérias foram isoladas e purificadas.

Com o petróleo, o mesmo processo foi utilizado, com diferença apenas na quantidade da fonte de carbono adicionada ao meio cultura antes da agitação, consistindo no meio de cultura 4.1.2.2. Neste experimento, fez-se uma diluição de 3 a 4 gotas de petróleo bruto em solução de Tween 20 a 10%. Esta etapa foi incluída prevendo-se diminuição da alta viscosidade e baixa solubilidade em água do hidrocarboneto.

#### 4.2.5. Isolamento e purificação das culturas

As colônias obtidas nos plaqueamentos foram isoladas em culturas puras em placas diferentes contendo os meios PCA e Sabouraud por meio da técnica de estrias com alça de inoculação.

As culturas puras obtidas foram transferidas para tubos contendo meio de cultivo inclinados. PCA para as bactérias e Sabouraud para os fungos.

#### 4.2.6. Testes de biodegradação

Os testes executados nesta etapa do trabalho foram baseados na utilização do indicador redox DCPIP. O princípio básico funcional deste teste consiste na detecção da oxidação da fonte de carbono fornecida aos micro-organismos, que durante o processo de metabolização oxidam o hidrocarboneto e os elétrons que são liberados e transferidos aos aceptores como oxigênio, nitrato ou sulfato.

Ao adicionar o indicador redox DCPIP ao meio de cultura Bushnell-Hass (BH) (DIFCO,1984), ele funcionará como umceptor de elétrons capaz de confirmar a atividade degradadora dos micro-organismos sobre a fonte de carbono. O ensaio positivo é confirmado através da mudança de cor do DCPIP de azul, estado oxidado para o incolor, estado reduzido.

Para a execução dos testes com as linhagens de micro-organismos selecionados, fez-se a distribuição do meio BH em tubos de cultura, contendo cada um 10 mL do meio. Posteriormente adicionou-se 2 mL da solução de DCPIP (concentração de 1 g/L) obtendo-se uma tonalidade azul escura e adicionando-se 0,1 mL da fonte de hidrocarboneto em cada tubo. A seguir os tubos em duplicatas foram inoculados com os micro-organismos a serem testados em condições assépticas. Para confirmar a atividade microbiológica, foram deixados

2 tubos com a ausência de inoculação de micro-organismos. Após inoculação, procedia-se a homogeneização manual do conteúdo do tubo e disposto em estufas a 28°C para os fungos e leveduras, e 35°C para bactérias. O tempo de permanência em agitação variou entre 3 a 5 dias para cada linhagem testada. Embora a observação dos tubos se fizesse a cada 24 horas.

Depois da descoloração, retirava-se uma alíquota de 5 mL da suspensão e centrifugava-se por 10 minutos para decantação da matéria sólida. O líquido metabólico resultante foi submetido a análise de absorvância em espectrofotômetro a  $\lambda = 604$  nm. Tendo-se como padrão de absorvância para o controle do biodiesel o valor de 0,877 e para o petróleo 1,457.

O cálculo utilizado para estimar a taxa de biodegradação foi baseado no quanto a absorvância média das duplicatas da amostra reduziu com relação ao controle respectivo, este dependendo da fonte de carbono, biodiesel ou petróleo bruto.

$$\bar{A} = \frac{(A_1 + A_2)}{2}$$

Equação 1

$$R = 100 - (\bar{A} \cdot A_p)$$

Equação 2

Onde as siglas representam:

- $\bar{A}$ : absorvância média
- $A_1$ : absorvância no primeiro tubo de cultura
- $A_2$ : absorvância no segundo tubo de cultura
- $A_p$ : pico de absorvância para a dada fonte de carbono
- R: diminuição média em porcentagem



Petróleo

- 1) Meio BH + DCPIP + inóculo
- 2) Controle: meio BH + DCPIP + petróleo
- 3 e 4) Meio BH + DCPIP + petróleo + inóculo



Biodiesel

- 1) Meio BH + DCPIP + inóculo
- 2) Controle: meio BH + DCPIP + biodiesel
- 3 e 4) Meio BH + DCPIP + biodiesel + inóculo

**Figura 5:** Testes com meio BH e indicador redox DCPIP para a biodegradação de petróleo e biodiesel.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Preparação do material para cultivo dos micro-organismos

Ao todo, coletou-se seis amostras do material, recebendo-se mais uma amostra de *landfarming* e efluente de refinaria, totalizando assim oito amostras para análise. A tabela abaixo mostra a procedência de cada amostra:

**Tabela 5:** Procedência das amostras analisadas.

| <i>Número da amostra</i> | <b>Procedência</b>              |
|--------------------------|---------------------------------|
| <b>1</b>                 | Oficina Mecânica Adilson        |
| <b>2</b>                 | Oficina Mecânica Moreno         |
| <b>3</b>                 |                                 |
| <b>4</b>                 | Auto Diesel Rio Claro           |
| <b>5</b>                 | Oficina Tadeu                   |
| <b>6</b>                 | Oficina Botion                  |
| <b>7</b>                 | <i>Landfarming</i> de refinaria |
| <b>8</b>                 | Efluente de refinaria           |

Destas amostras cultivou-se os micro-organismos utilizados neste trabalho.

## 5.2. Resultado da agitação do meio lipolítico com petróleo / biodiesel e micro-organismos

Para verificar o nível de atividade ocorrido em cada erlenmyer analisou-se visualmente o quanto de óleo residual, criando-se uma escala de degradação com níveis variando de 1 a 3, onde 1 corresponde a pouca degradação, e 3, degradação avançada não havendo quantidade perceptível de óleo. O nível 2, intermediário, representa a escala onde o óleo apresentava-se em menor quantidade que o inicial.

**Tabela 6.** Escala de degradação do biodiesel e petróleo bruto frente aos micro-organismos isolados de áreas contaminadas com hidrocarbonetos e cultivadas nos meios 4.1.2.1 e 4.1.2.2, durante 5 dias a 28°C.

| <i>Número da amostra</i> | <b>Escala de degradação</b> |                 |                  |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|
|                          | <b>Biodiesel</b>            | <b>Petróleo</b> | <b>Diferença</b> |
| <b>1</b>                 | 2                           | 1               | 1                |
| <b>2</b>                 | 3                           | 3               | 0                |
| <b>3</b>                 | 3                           | 1               | 2                |
| <b>4</b>                 | 1                           | 1               | 0                |
| <b>5</b>                 | 2                           | 3               | -1               |
| <b>6</b>                 | 3                           | 3               | 0                |
| <b>7</b>                 | 1                           | 2               | 1                |
| <b>8</b>                 | 1                           | 2               | 1                |

As escalas de degradação definidas na tabela 3 consideraram o estado visual de degradação dos combustíveis utilizados como fonte de carbono. Pode-se verificar que nas amostras em que o solo foi contaminado com derivados de petróleo, que os micro-organismos aparentemente estão mais adaptados à biodegradação que quando o substrato é o biodiesel – um substrato para o qual não há históricos de derrames. A escala de observação dos erlenmeyers avaliou também o desenvolvimento dos micro-organismos no meio líquido.

## 5.3. Resultado dos plaqueamentos em meios PCA e Sabouraud

A partir das diluições decimais dos inóculos do biodiesel, efetuou-se plaqueamentos em meios PCA e Sabouraud. Verificou-se que houve desenvolvimento dos micro-organismos,

necessitando-se diluir as amostras 1;4;5;6;7;8 ao nível de  $10^{-5}$  e as amostras 2 e 3 foram necessárias diluições até  $10^{-7}$ , para poder recuperar as culturas.

Na etapa de utilização do petróleo, as culturas foram diluídas a  $10^{-5}$ , e a amostra 2 na diluição a  $10^{-7}$ .

O número de colônias de diferentes biótipos variou de 2 a 3 em média por placa nas amostras correspondentes ao experimento do biodiesel. Em relação ao petróleo, o número de biótipos permaneceu nessa mesma média, porém maior número de placas contendo apenas um biótipo.

As placas após incubação revelaram baixa diversidade microbiana, indicando que os ambientes contaminados promoveram seleção com alto nível de inibição de muitas espécies.

#### **5.4. Culturas isoladas e puras**

As amostras cujos cultivos foram efetuados no erlenmeyers após a purificação dos micro-organismos estão descritos na tabela 5.

Após o plaqueamento as culturas foram examinadas no microscópio, identificadas como fungos ou bactérias, além da observação de características macroscópicas da cultura, para que depois fossem purificadas por estriamentos, e então preservadas em tubos nos meios pertinentes.

De acordo com a tabela 4, foram isoladas 46 diferentes biótipos de micro-organismos selecionados que estão preservados.

**Tabela 7.** Culturas microbianas isoladas e preservadas em tubos de culturas em meios PCA (bactérias) e Sabouraud (fungos).

| Amostra                                | Cultura        | Biodiesel        |           | Petróleo         |           |
|----------------------------------------|----------------|------------------|-----------|------------------|-----------|
|                                        |                | Fungos/Leveduras | Bactérias | Fungos/Leveduras | Bactérias |
| 1                                      | C <sub>1</sub> | Isolada          | -         | Isolada          | Isolada   |
|                                        | C <sub>2</sub> | -                | -         | Isolada          | Isolada   |
| 2                                      | C <sub>1</sub> | Isolada          | Isolada   | Isolada          | Isolada   |
|                                        | C <sub>2</sub> | -                | Isolada   | -                | -         |
| 3                                      | C <sub>1</sub> | Isolada          | Isolada   | Isolada          | Isolada   |
|                                        | C <sub>2</sub> | Isolada          | Isolada   | -                | Isolada   |
| 4                                      | C <sub>1</sub> | -                | Isolada   | Isolada          | Isolada   |
|                                        | C <sub>2</sub> | -                | Isolada   | Isolada          | -         |
| 5                                      | C <sub>1</sub> | -                | -         | Isolada          | Isolada   |
|                                        | C <sub>2</sub> | Isolada          | Isolada   | Isolada          | Isolada   |
| 6                                      | C <sub>1</sub> | -                | Isolada   | Isolada          | Isolada   |
|                                        | C <sub>2</sub> | Isolada          | Isolada   | Isolada          | Isolada   |
|                                        | C <sub>3</sub> | -                | Isolada   | Isolada          | -         |
| 7                                      | C <sub>1</sub> | Isolada          | -         | -                | Isolada   |
|                                        | C <sub>2</sub> | -                | -         | -                | Isolada   |
| 8                                      | C <sub>1</sub> | Isolada          | Isolada   | Isolada          | Isolada   |
|                                        | C <sub>2</sub> | Isolada          |           | -                | Isolada   |
| Porcentagem de sucesso nos isolamentos |                | 52,94%           | 64,70%    | 70,58%           | 82,35%    |

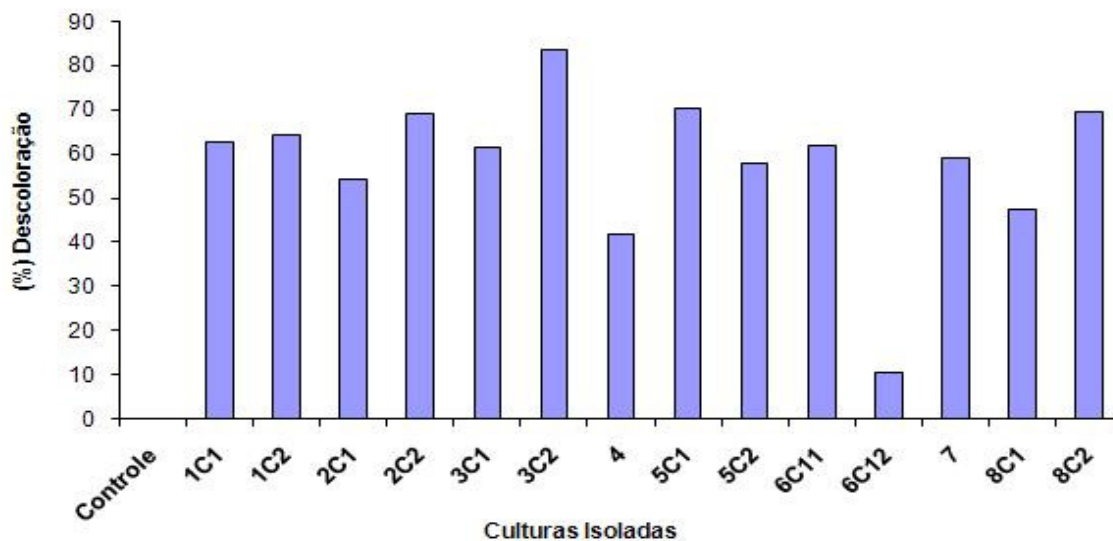
(-) indica ausência de cultura

### 5.5. Testes de biodegradação

A apresentação dos resultados dos testes utilizando o meio BH e o indicador redox DCPIP baseou-se no cálculo da diminuição média da absorbância, sendo o resultado final dado em porcentagem de absorbância como registrado nas tabelas 8, 9, 10, 11 e figuras 6, 7, 10, 11 para os substratos: biodiesel e petróleo.

**Tabela 8:** Absorbâncias dos líquidos metabólicos obtidos das culturas de fungos e leveduras cultivados em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel em estufa a 28°C, durante 5 dias.

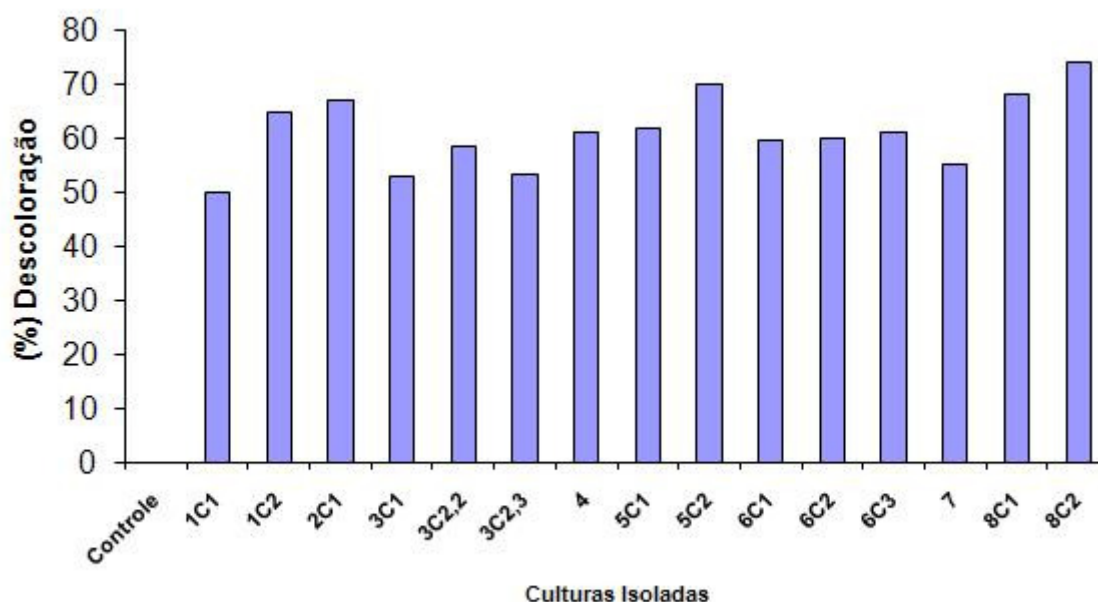
| Culturas | Absorbância ( $\lambda = 604nm$ ) |                |           | Diminuição Média (%) |
|----------|-----------------------------------|----------------|-----------|----------------------|
|          | A <sub>1</sub>                    | A <sub>2</sub> | $\bar{A}$ |                      |
| Controle | 0,877                             | 0,877          | 0,877     | 00,00                |
| 1C1      | 0,321                             | 0,330          | 0,325     | 62,80                |
| 1C2      | 0,310                             | 0,315          | 0,312     | 64,36                |
| 2C1      | 0,413                             | 0,391          | 0,402     | 54,16                |
| 2C2      | 0,288                             | 0,256          | 0,272     | 68,98                |
| 3C1      | 0,331                             | 0,346          | 0,338     | 61,40                |
| 3C2      | 0,158                             | 0,133          | 0,145     | 83,41                |
| 4        | 0,522                             | 0,498          | 0,510     | 41,84                |
| 5C1      | 0,254                             | 0,269          | 0,261     | 70,18                |
| 5C2      | 0,355                             | 0,381          | 0,368     | 58,04                |
| 6C11     | 0,300                             | 0,369          | 0,334     | 61,85                |
| 6C12     | 0,784                             | 0,784          | 0,784     | 10,60                |
| 7        | 0,376                             | 0,343          | 0,359     | 59,00                |
| 8C1      | 0,436                             | 0,484          | 0,460     | 47,54                |
| 8C2      | 0,160                             | 0,372          | 0,266     | 69,67                |



**Figura 6:** Representação gráfica da diminuição percentual média de absorbância para os líquidos metabólicos obtidos dos fungos e leveduras cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel.

**Tabela 9:** Absorbâncias dos líquidos metabólicos obtidos das culturas bactérias cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel em estufa a 35°C, durante 5 dias.

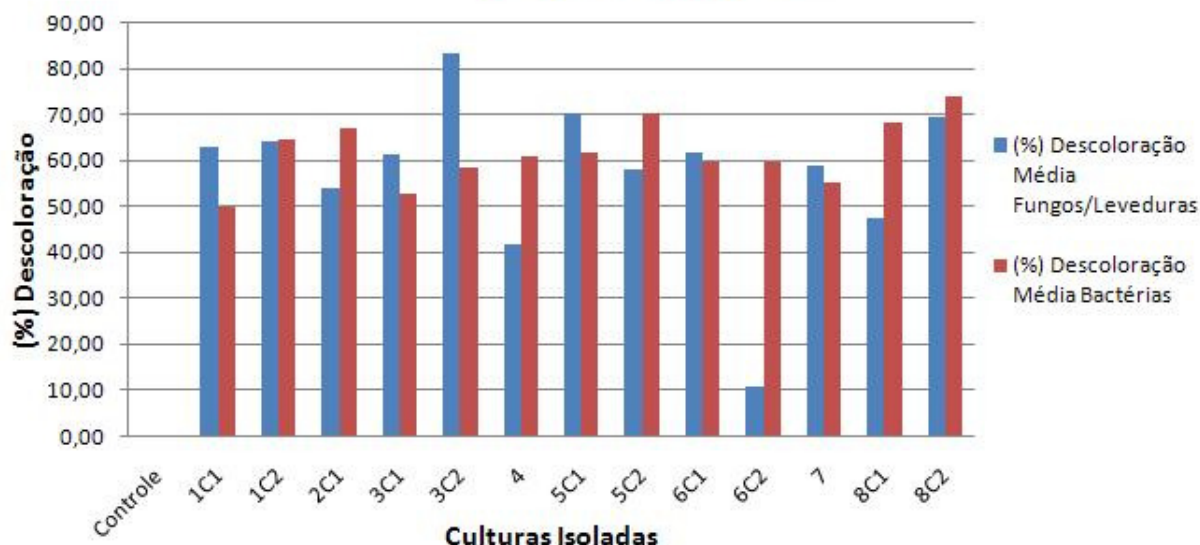
| Culturas | Absorbância ( $\lambda = 604nm$ ) |                |           | Diminuição Média (%) |
|----------|-----------------------------------|----------------|-----------|----------------------|
|          | A <sub>1</sub>                    | A <sub>2</sub> | $\bar{A}$ |                      |
| Controle | 0,877                             | 0,877          | 0,877     | 00,00                |
| 1C1      | 0,452                             | 0,423          | 0,437     | 50,11                |
| 1C2      | 0,368                             | 0,251          | 0,309     | 64,70                |
| 2C1      | 0,288                             | 0,291          | 0,289     | 66,98                |
| 3C1      | 0,402                             | 0,423          | 0,412     | 52,96                |
| 3C2,2    | 0,360                             | 0,365          | 0,362     | 58,66                |
| 3C2,3    | 0,412                             | 0,409          | 0,410     | 53,19                |
| 4        | 0,337                             | 0,345          | 0,341     | 61,12                |
| 5C1      | 0,328                             | 0,341          | 0,334     | 61,85                |
| 5C2      | 0,245                             | 0,278          | 0,261     | 70,18                |
| 6C1      | 0,358                             | 0,349          | 0,353     | 59,69                |
| 6C2      | 0,352                             | 0,351          | 0,351     | 59,92                |
| 6C3      | 0,324                             | 0,357          | 0,340     | 61,18                |
| 7        | 0,397                             | 0,388          | 0,392     | 55,24                |
| 8C1      | 0,285                             | 0,271          | 0,278     | 68,31                |
| 8C2      | 0,228                             | 0,228          | 0,228     | 74,01                |



**Figura 7:** Representação gráfica da diminuição percentual média de absorbância para bactérias cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel.

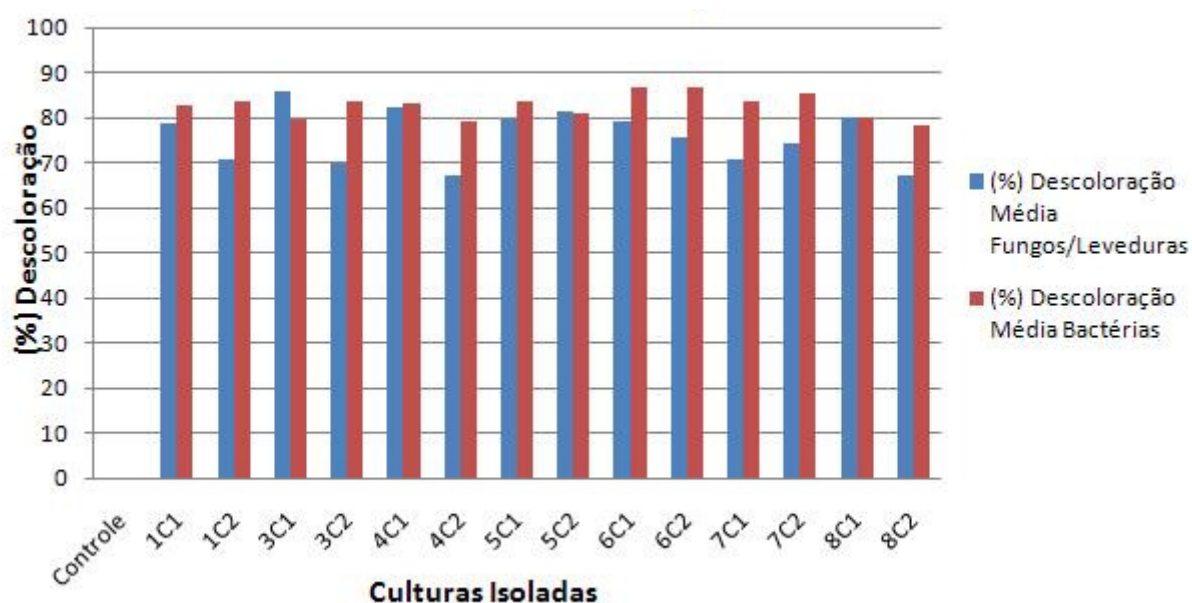
Comparando-se as figuras 6 e 7, verifica-se que dentre os micro-organismos empregados, os fungos apresentaram menor desempenho na degradação do biodiesel ao longo

do período. Quando se compara as culturas isoladas da mesma amostra de material analisado, este resultado relatado fica evidenciado na figura 8.



**Figura 8:** Comparação gráfica da descoloração percentual média entre culturas de fungos e leveduras e culturas de bactérias em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao biodiesel.

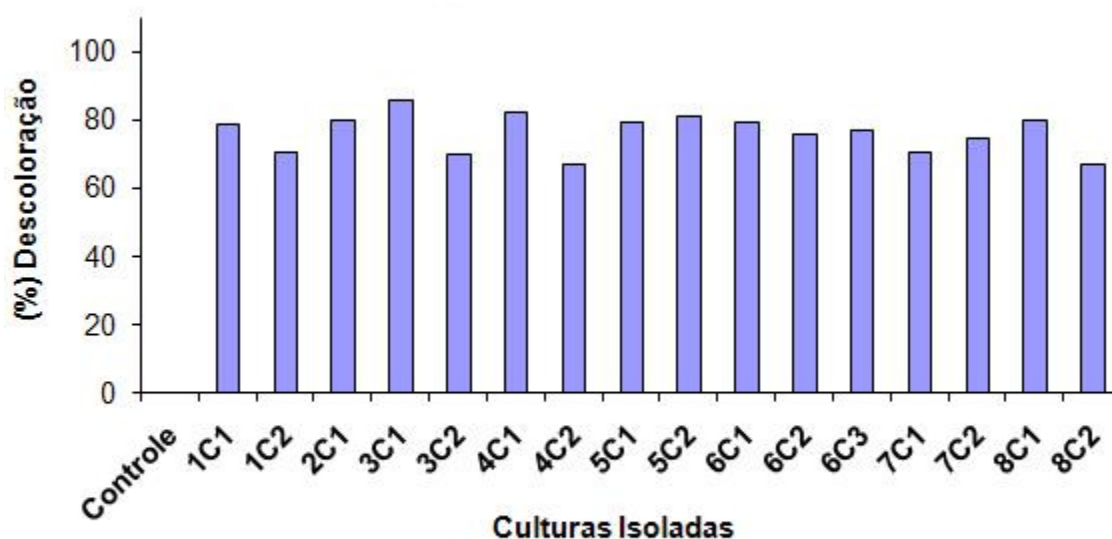
Quando se faz a mesma comparação entre os micro-organismos selecionados cultivados frente ao petróleo, a atividade microbiológica das bactérias na degradação desse substrato demonstra também ter sido maior do que as culturas de fungos e leveduras, como pode ser visto, de acordo com a figura 9, abaixo.



**Figura 9:** Comparação gráfica da descoloração percentual média entre as culturas de fungos e leveduras e culturas de bactérias em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol, frente ao petróleo.

**Tabela 10:** Absorbâncias dos líquidos metabólicos obtidos das culturas de fungos e leveduras cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo.

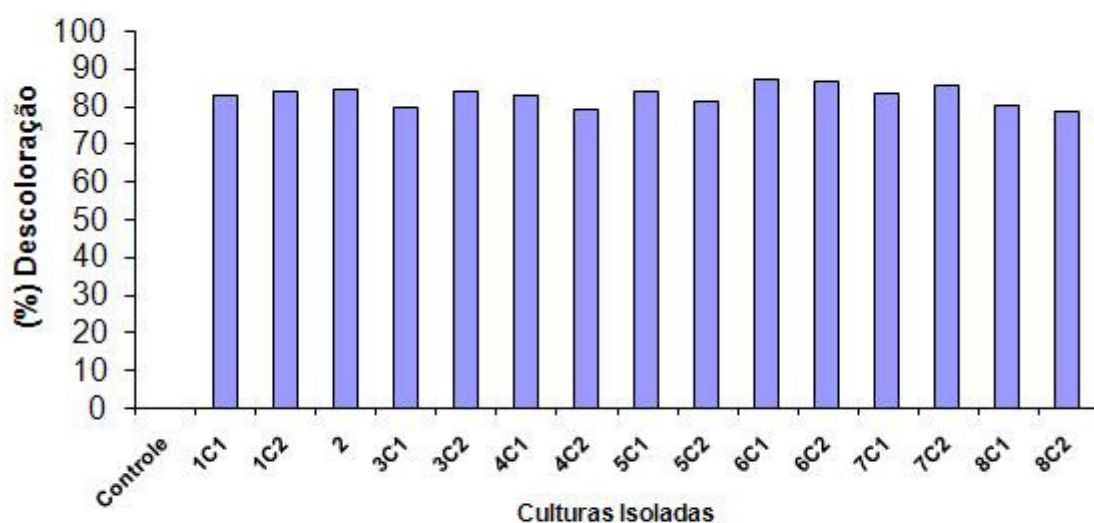
| <i>Culturas</i> | <i>Absorbância (<math>\lambda = 604nm</math>)</i> |                      |                             | <i>Diminuição Média (%)</i> |
|-----------------|---------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                 | <i>A<sub>1</sub></i>                              | <i>A<sub>2</sub></i> | <i><math>\bar{A}</math></i> |                             |
| Controle        | 1,457                                             | 1,457                | 1,457                       | 00,00                       |
| 1C1             | 0,322                                             | 0,297                | 0,309                       | 78,75                       |
| 1C2             | 0,458                                             | 0,398                | 0,428                       | 70,62                       |
| 2C1             | 0,258                                             | 0,332                | 0,295                       | 79,75                       |
| 3C1             | 0,198                                             | 0,215                | 0,206                       | 85,82                       |
| 3C2             | 0,486                                             | 0,398                | 0,442                       | 69,66                       |
| 4C1             | 0,223                                             | 0,294                | 0,258                       | 82,25                       |
| 4C2             | 0,488                                             | 0,471                | 0,479                       | 67,08                       |
| 5C1             | 0,315                                             | 0,287                | 0,301                       | 79,34                       |
| 5C2             | 0,272                                             | 0,276                | 0,274                       | 81,19                       |
| 6C1             | 0,335                                             | 0,269                | 0,302                       | 79,27                       |
| 6C2             | 0,379                                             | 0,331                | 0,355                       | 75,63                       |
| 6C3             | 0,287                                             | 0,395                | 0,341                       | 76,59                       |
| 7C1             | 0,421                                             | 0,433                | 0,427                       | 70,69                       |
| 7C2             | 0,344                                             | 0,401                | 0,372                       | 74,43                       |
| 8C1             | 0,281                                             | 0,299                | 0,290                       | 80,09                       |
| 8C2             | 0,413                                             | 0,566                | 0,489                       | 67,05                       |



**Figura 10:** Representação gráfica da diminuição percentual média de absorbância para fungos e leveduras cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo.

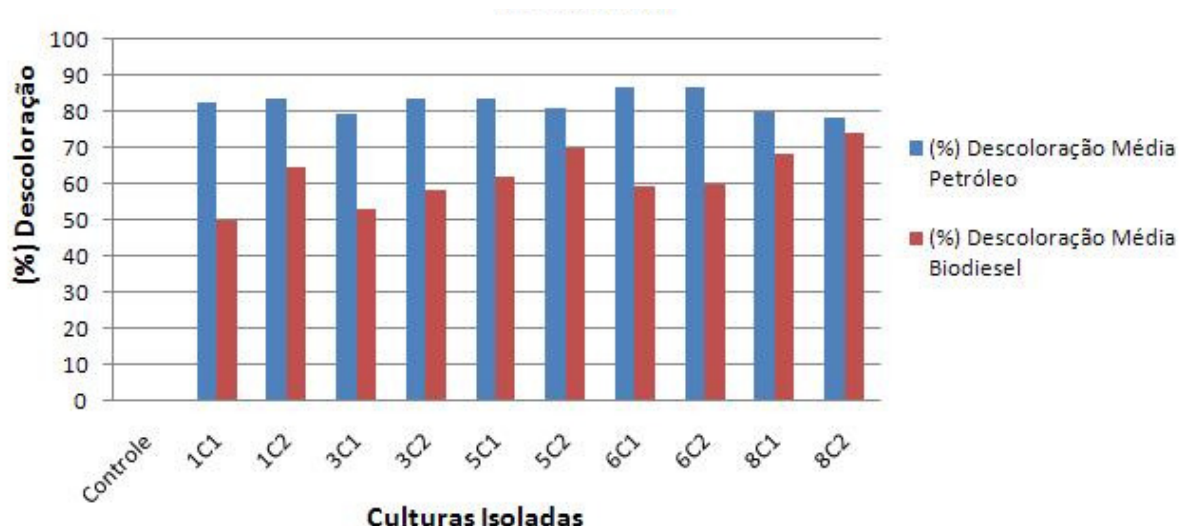
**Tabela 11:** Absorbâncias dos líquidos metabólicos obtidos das culturas de bactérias cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo.

| Culturas | Absorbância ( $\lambda = 604nm$ ) |                |           | Diminuição Média (%) |
|----------|-----------------------------------|----------------|-----------|----------------------|
|          | A <sub>1</sub>                    | A <sub>2</sub> | $\bar{A}$ |                      |
| Controle | 1,457                             | 1,457          | 1,457     | 00,00                |
| 1C1      | 0,248                             | 0,261          | 0,254     | 82,53                |
| 1C2      | 0,214                             | 0,263          | 0,238     | 83,63                |
| 2        | 0,265                             | 0,180          | 0,222     | 84,55                |
| 3C1      | 0,300                             | 0,300          | 0,300     | 79,40                |
| 3C2      | 0,239                             | 0,236          | 0,237     | 83,69                |
| 4C1      | 0,253                             | 0,244          | 0,248     | 82,94                |
| 4C2      | 0,316                             | 0,298          | 0,307     | 78,93                |
| 5C1      | 0,235                             | 0,240          | 0,237     | 83,69                |
| 5C2      | 0,278                             | 0,276          | 0,277     | 80,98                |
| 6C1      | 0,188                             | 0,198          | 0,193     | 86,75                |
| 6C2      | 0,215                             | 0,263          | 0,194     | 86,68                |
| 7C1      | 0,251                             | 0,233          | 0,242     | 83,39                |
| 7C2      | 0,215                             | 0,213          | 0,214     | 85,31                |
| 8C1      | 0,311                             | 0,268          | 0,289     | 80,13                |
| 8C2      | 0,277                             | 0,351          | 0,314     | 78,44                |

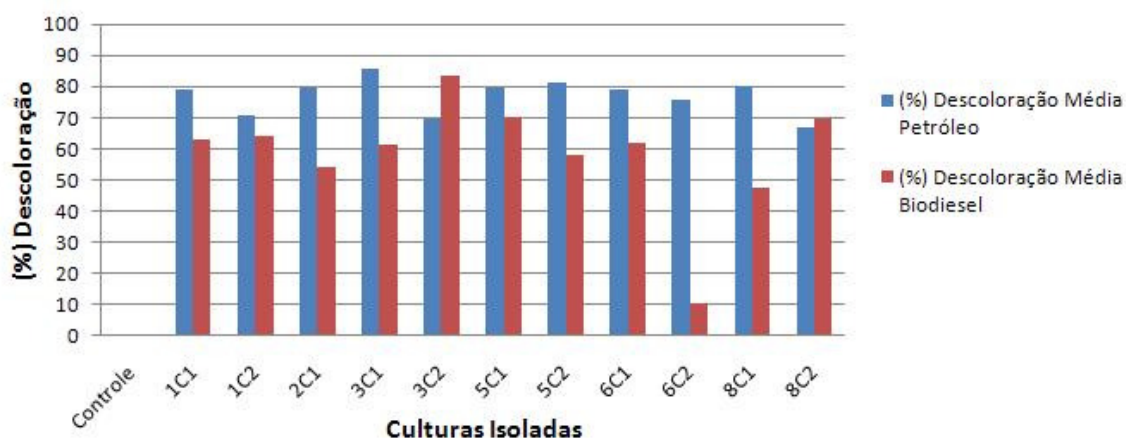


**Figura 11:** Representação gráfica da diminuição percentual média de absorbância para bactérias cultivadas em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo.

Comparando-se as figuras 12 e 13, verifica-se uma maior atividade biodegradadora para as linhagens de fungos e bactérias selecionadas na utilização do petróleo como substrato. A atividade média de diminuição da cor do DCPIP é maior no petróleo bruto. Tal fato pode ser explicado pela presença do antioxidante terc-butilhidroquinona (TBHC), que quando presente inibe a atividade microbiológica, como demonstrou Soares Junior (2008).



**Figura 12:** Comparação da descoloração percentual média resultante da atividade degradadora de bactérias em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo e biodiesel.



**Figura 13:** Comparação da descoloração percentual média resultante da atividade degradadora de fungos e leveduras em meio Bushnell-Hass com 2,6-diclorofenol indofenol frente ao petróleo e biodiesel.

No mesmo estudo de Junior (2008), o autor considerou que ocorreu a seleção de micro-organismos provenientes de amostras de biodiesel comercial de duas usinas diferentes. Ainda que haja a presença do antioxidante, os micro-organismos permaneciam com sua atividade atenuada, garantindo assim a qualidade do biodiesel. Muito embora, nota-se que estes eram adaptados a presença do antioxidante e após a inativação do conservante, os micro-organismos atuavam degradando o combustível.

Com isso, justificam-se os resultados obtidos de que as linhagens de fungos e bactérias selecionadas no presente estudo degradem com mais facilidade petróleo e derivados que o biodiesel. As amostras de solo coletadas para seleção dos micro-organismos utilizados eram provenientes de ecossistemas impactados principalmente com derivados de petróleo. Dessa

forma, o ambiente previamente já elaborou uma seleção natural de micro-organismos de tal forma que foram adaptados à utilização de hidrocarbonetos provenientes do petróleo. Tal fato também explica a baixa diversidade de biótipos selecionados das amostras de solo, uma vez que os ecossistemas trabalhados demonstram uma grande diversidade de linhagens de micro-organismos.

## **6. CONCLUSÕES**

Na avaliação comparativa da biodegradação do biodiesel com o petróleo, verificou-se que este foi degradado com mais eficiência que o primeiro.

A biodegradação ocorre pelo mecanismo de óxido-redução em condições aeróbias.

Nos ensaios de biodegradação de biodiesel e petróleo bruto, pode-se inferir que a médio e longo prazo o solo se auto-recupera pela ação dos micro-organismos remanescentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, S. **Experimental Microbial Ecology**. 1ed. New York: Academic press, 1970. 236 p.

ADMON, S.; GREEN, M.; AVNIMELECH, Y. Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. **Bioremediation Journal**. Philadelphia, v.5, n.3, p. 193-209, 2001.

**Ambiente Brasil: Biorremediação**. 2005. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/artigos/biorremediacao.html>>. Acesso em 8 de dezembro de 2007

ASCON-CABRERA, M.A.; LEBEAUT, J.M. Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic-degrading microorganisms in a continuous bifasic aqueous-organic system. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Osaka, Japão, v.80, n. 3, p. 270 – p. 275, 1995.

ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v.31, n. 4-12, p. 178-182, 1995.

BROWN, J. L.; NADEAU, R. J. Restoration of petroleum-contaminated soil using phase bioremediation. **Bioremediation Journal**. Philadelphia, v.6, n.4, p. 315-319, 2002.

CAMPBELL, R. **Microbial Ecology – Basic Microbiology**. Blackwell Scientific Publications, 1977. v.5.

CAMPO, P.; ZHAO, Y.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D. E.; SORIAL, G. A. **Biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil triacylglycerols under aerobic conditions**. Chemosphere: Oxford, Inglaterra, GB, v.68, n.11, p. 2054 – 2062, 2007.

CETESB<sup>®</sup> **Aspectos toxicológicos dos óleos**. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a\\_toxicologicos.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a_toxicologicos.asp)>, 2005. Acesso em: 9 de dezembro de 2007.

CETESB<sup>®</sup> **Aspectos físicos e químicos do óleo**. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a\\_fisicos.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a_fisicos.asp)>. 2005. Acesso em: 9 de dezembro de 2007.

CETESB<sup>®</sup> - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Amostragem de solo. In: CETESB, **Manual de Gerenciamento de áreas contaminadas** – CETESB, GTZ. São Paulo, 2001, 2. ed. 389p.

CORTEZ, H.; LIMA, R. **Estudo da Cetesb estima que o total de áreas contaminadas subiu 10% em SP**. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2009/03/03/estudo-da-cetesb-estima-que-o-total-de-areas-contaminadas-subiu-10-em-sp>> Acesso em 31/08/2009.

CUNHA, R. **As mil e uma utilidades de um líquido negro que vale ouro**. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet13.shtml>>. 2004. Acesso em: 1 de dezembro de 2007.

DIFCO. **Manual: Dehydrated culture media and reagents for microbiology**. 10 ed. Detroit, Michigan, USA, 1984.

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

EWING, G. W. **Instrumental methods of chemical analysis**. New York: McGraw-Hill, 1960. 454p.

FERREIRA, A.L. **BTEX e a sua problemática**. Disponível em <<http://geocities.yahoo.com.br/geoquimicaambiental2001/alexandre.htm>>. 2004. Acesso em: 5 de dezembro de 2007.

FOGAÇA, M. N. **Avaliação da capacidade de biodegradação de substâncias oleaginosas por *Candida viswanathii***, 2007. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ecologia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro: [s.n.], 2007.

FURTADO, M.I. **Ataque microbiano remedia áreas contaminadas**. 2004. Disponível em: <<http://www.quimica.com.br/revista/qd389/biotecnologia1.htm>>. Acesso em 5 de dezembro de 2007.

GARRITZ, A.; CHAMIZO, J.A. **Química**. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2003.

GAYLARDE, C. C. Biorremediação de solos poluídos. MIRCEN, Depto de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 6p. **II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**, UFSC – Florianópolis, SC. 1998.

GRAY, M. R.; BANERJEE, D. K.; DUDAS, M. J.; PICKARD, M. A. Protocols to enhance biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil. **Biorremediation Journal**, Philadelphia, v.4, n.4, p. 249-257, 2000.

GROWNEWOLD, J.C., PICO, F.R., WATSON, K.S. Comparison of BOD relationships for typical dibble and petroleum oils. **Journal of the water Pollution Control Federation**, Alexandria, v.54, p. 398 – 405, 1982.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. New York: W. H. Freeman, 1999, 1011p.

HENCKLEIN, F. A. **Estabilização de “landfarming” de refinaria de petróleo e aplicabilidade em solos com baixos teores de cárbono**. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Rio Claro – SP. [s.n.]. 2005.

HIGGINS, I.S.; BURNS, R.G. **The Chemistry and Microbiology of Pollution**. London, 248f., 1975.

HOEPPPEL, R. E.; HINCHEE, R. E. Enhanced biodegradation for on-site remediation of contaminated soils and groundwater, p. 311-431. In: WILSON, D. J.; CLARKE, A. N. (eds). Harzouds waste site oil remediation. **Theory and Application of Innovative Technologies**. New York, Marcel Dekker, Inc., 584p., 1994.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v.37, p. 1192-1201, 2007.

JUNIOR, J. S.; MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**. Vol 8 (12). P. 2774 – 2778. 2008.

KATAOKA, A.P.A. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por micro-organismos isolados de “landfarming”**. 202 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS L.P. **Manual de biodiesel**. 1.<sup>a</sup> Edição, 2006, Centro de Pesquisa em Química Aplicada – CEPESQ, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil.

LACAZ, C. S. **Introdução ao estudo dos fungos. Significado dos cogumelos na economia humana**. In: LACAZ, C. S.; MINAMI, P. S.; Purchio, a. *et al.* O grande mundo dos fungos. São Paulo. Editora Universidade e Editora Polígono, 1970.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbial Reviews**, v.53, p. 305-315, 1990.

LYON, T. L.; BUCKMAN, H. O. **The nature and proprieties of soils**. 4<sup>th</sup>. Ed. New York. Macmillan, 1943.

MACLEOD, C. T.; DAUGULIS A. J. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic Mycobacteriu. **Process Biochemistry**, Oxon, v.40, n.5, p. 1799-1805, 2005.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminadas com óleo diesel**. Tese (Doutorado em Geociências) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. **Monitoring of geochemical indicators and biodegradation evaluation at a site contaminated with diesel oil**. Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental. Vol. 12 n.º 3. Rio de Janeiro. Julho/Setembro. 2007.

MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; CONTIEIRO, J.; ANGELIS, D. F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 7. P. 1323 – 1328. 2008.

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino de petróleo**. Editora Interciência Ltda. Rio de Janeiro – RJ. 2005.

MARTINS, A. *et al.* **Biorremediação**. 2005. Disponível em: <<http://ceset.unicamp.br/Ite/Artigos/3fec2401.pdf>>. Acesso em 10 de dezembro de 2007.

MELLO, G. S. L. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. **Engenharia Sanitária Ambiental**. Rio de Janeiro, v.12, n.1, p. 71-78, 2007.

METTING, F. B. Jr. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In: METTING, F. B. Jr. (Ed.) **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1993, Cap. 1, p. 3-25.

MILANELLI, J. C. C. **Biomonitoramento de costões rochosos do canal de São Sebastião – Instrumento para a avaliação de impactos ambientais gerados por derrames de petróleo**. 297p. 2003. Tese de Doutorado em Oceanografia. Universidade de São Paulo. USP. 2003.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMISTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodegradation**, Barking, Inglaterra, v.50, n.2, 2002.

MORAIS, E.B. **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas**. 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

OLIVEIRA, D. M. **Biodegradação de biodiesel de origem animal**. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. São Paulo. 2008.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. 2<sup>nd</sup>. Ed. San Diego. Academic Press. 1989.

PASCHOA, G. **O petróleo e a agressão ao meio ambiente**. Disponível em <<http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet09.shtml>>. Acesso em: 8 de dezembro de 2007.

RAMASWAMI, A.; LUTHY, R. Measuring and modeling physicochemical limitations to bioavailability and biodegradation. In HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; McINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WATER, M. V. (eds.). **Manual of environmental Microbial**. ASM Press, Washington DC, pp. 721-729, 1997.

ROSATO, Y.B. **Biodegradação do petróleo**. In: MELO, I.S. Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa, 1997.

RUSSEL, J.B. **Química Geral**. 2.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1994. 2v.

SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale biorremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration Biodegradation**, Edinburg, v.54, n.1, p. 19-25, 2004.

SEABRA, P. N. C. **Uso de tensoativos na mobilização e biodegradação de óleo diesel em solos impactados**. Dissertação (mestrado). COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ. 1997.

SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M. H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.9, p. 4215-4224, 2001.

SILVA, O. C. **Óleos vegetais**. São Paulo, 2002.

SOARES JUNIOR, J. **Verificação de contaminantes e a biodegradação de biocombustíveis**. 108 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Rio Claro. [s.n.]. 2008.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química orgânica 1**. 7.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. LTC, 2001.

SPILBORGHES, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989.

STOLP, H. **Microbial ecology organisms habitats activities**. Cambridge University Press. 1988.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.<sup>a</sup> Edição. Porto Alegre. Artmed Editora, 894 p., 2005.

URURAHY, A.F.P., MARINS, M.D.M., VITA, R.L. et al. **Efeito da aeração sobre a biodegradação de resíduo de petróleo.** Rev. Microbiol., Out/Dez 1998, vol. 29, n.º 4. ISSN 0001-3714.

WACKETT, L. P.; ELLIS, L. B. M. Predicting biodegradation. **Environmental Microbiology**, Braunschweig, v.1, n.2, p. 119-124, 1999.

WIEDEMEIR, T. H. Approximation of biodegradation rate constants for monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in ground water. **Ground Water Monitoring Remote and Remediations**, Dublin, p. 186-194, 1996.