



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS POR  
RESÍDUOS DE PETRÓLEO: UM ESTUDO COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
*EICHORNIA CRASSIPES* NA AMAZÔNIA.**



**MANAUS-AM  
2009**

**IEDA HORTÊNCIO BATISTA**

**BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS POR  
RESÍDUOS DE PETRÓLEO: UM ESTUDO COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
*EICHORNIA CRASSIPES* NA AMAZÔNIA.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. José Odair Pereira  
**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. Valdir Florêncio Veiga Jr.

**MANAUS-AM  
2009**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Batista, Ieda Hortêncio

*B333b* Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia / Ieda Hortêncio Batista. - Manaus: UFAM, 2009.

185 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio Veiga Jr.

1. Água - Contaminação 2. Diversidade microbiana 3. Biodegradação I. Pereira, José Odair II. Veiga Jr., Valdir Florêncio III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 628.19(811)(043.2)



**UFAM**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**IEDA HORTÊNCIO BATISTA**

**BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS POR**  
**RESÍDUOS DE PETRÓLEO: UM ESTUDO COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE**  
***EICHORNIA CRASSIPES* NA AMAZÔNIA.**

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia – Área de concentração: Agroflorestal.

Aprovada pela banca examinadora em 24 de junho de 2009.

Membros da banca:

Dr. José Odair Pereira (Presidente) \_\_\_\_\_

Dr. João Lúcio de Azevedo (CBA) \_\_\_\_\_

Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão (UFAM) \_\_\_\_\_

Dra. Milade dos Santos Carneiro Cordeiro (UEA) \_\_\_\_\_

Dr. Luiz Antonio de Oliveira (INPA) \_\_\_\_\_

***Aos meus amados***

***Pai Manoel Rodrigues Batista***

***Mãe Euda Hortêncio Batista (In memorian)***

***Marido Carlossandro Carvalho de Albuquerque***

***e filho Carlos Eduardo Batista de Albuquerque***

***Dedico esta importante conquista***

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, força onipresente e onipotente que guia e motiva minha vida;*

*Aos meus pais Manoel Rodrigues Batista e Euda Hortêncio Batista (In memoriam), pelo amor e apoio incondicionais a mim dispensados.*

*Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, por todo conhecimento transmitido a mim, por sua confiança, orientação e motivação.*

*Ao prof. Dr. Valdir Florêncio Veiga Jr., pela orientação e apoio na realização deste trabalho.*

*Ao prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, pelo apoio durante o processo de ingresso ao Curso, pela confiança e oportunidades a mim concedidas.*

*À profa Dra Joana D'Arc Ribeiro (In memoriam,) pelo incentivo à minha formação acadêmica.*

*Ao meu marido Carlossandro Carvalho de Albuquerque, pela importante colaboração no desenvolvimento desta pesquisa e pelo amor e incentivo constantes.*

*À minha família que mesmo à distância (Belém, São Luis, Parintins) sempre acreditaram em mim, incentivando e apoiando.*

*À minha sogra Natalina Carvalho de Albuquerque, pelo importante apoio nos cuidados com meu filho e pelo carinho e apoio sempre presentes.*

*À minha família em Manaus (cunhadas e sobrinhas) pela amizade e motivação.*

*Aos meus filhos do coração Carlos Henrique e Ana Luiza.*

*À Suzanna Batista, pela ajuda na formatação dos gráficos.*

*À Fabíola Araújo, pelos cuidados e carinho com o "Dudu".*

*À Rosa Cunha, por assumir nos momentos da minha ausência os cuidados com meu filho, e por fazê-lo da melhor forma possível.*

*Aos professores e colegas, pela participação em minha vida acadêmica.*

*Aos amigos Rozana Medeiros Galvão, Pedro Queiroz Neto e Aline Rondon, pela importante orientação em vários momentos deste trabalho, pelo apoio e incentivo sempre presentes e pela amizade sincera.*

*À amiga Helena Ezawa, pelo incentivo e por compartilhar as angústias e alegrias dessa conquista.*

*À profª Drª Ágata, por sua atenção e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos, orientando e apoiando este trabalho.*

*Ao professor José Cardoso, pela valiosa contribuição na análise estatística deste trabalho.*

*Ao Prof. Januário e Felipe do laboratório de microbiologia, pela atenção e contribuição sempre que precisei.*

*Aos amigos do laboratório Luciana, Lívio, Girlene, Geíza, obrigada pela amizade e por auxiliarem, dando importantes dicas e tirando dúvidas.*

*Ao amigo Rufino (Seu Zé), pelo incontestável apoio no laboratório, no preparo e esterilização do material.*

*Aos meus alunos Karen Balieiro, Luana Carolina e Aldvan Barros pelo inestimável auxílio nas atividades laboratoriais.*

*Ao Carlos Henrique pelo auxílio em vários momentos deste trabalho desde a etapa inicial de isolamento dos microrganismos, preparo dos materiais e amostras, até a etapa final de impressão e encadernação. Valeu a força!!!!*

*À amiga Eliana Elias pela fundamental ajuda no preparo das amostras para a cromatografia.*

*Aos colegas do CBA Karol e Raimundo Junior, pelos auxílios e disponibilidade em esclarecer dúvidas.*

*Aos colegas do laboratório da Biotecnologia, em especial à Elza, Jonso, Rogério, Tiago e Dina pela ajuda na extração, PCR e sequenciamento.*

*Aos amigos da Universidade do Estado do Amazonas em especial à Maria Amélia Freire, Socorro Viana, Clarice Zita e Adilma Portela, pelo carinho, incentivo e amizade.*

*À amiga Francisca Ferreira pelo imensurável apoio recebido e pelo incentivo permanente, mesmo nos momentos difíceis. Você e sua família são um exemplo de fé e coragem!!! Obrigada pelo carinho e amizade.*

*Às amigas Joeliza Nunes e Nazaré Viana pelo apoio constante e amizade sincera*

*À Petrobrás, por permitir a coleta da planta nos efluentes da Refinaria de Manaus-REMAN.*

*À Universidade Federal do Amazonas pela formação profissional;*

*Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e seu corpo docente, pela oportunidade concedida e conhecimentos adquiridos.*

*Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), pelas análises cromatográficas.*

*Ao CNPQ, pelo apoio financeiro à realização deste projeto*

*À banca examinadora, pelas importantes contribuições a este trabalho.*

*E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

*E principalmente ao meu querido DUDU, obrigada por você existir. TE AMO.*

**MUITO OBRIGADO!!!**

## SUMÁRIO

	<b>PÁG.</b>
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral.....	25
2.2 Específicos.....	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1 Biodiversidade amazônica e biotecnologia ambiental.....	28
3.2 A indústria do petróleo e seus potenciais impactos .....	31
3.2.1 Breve histórico do uso do petróleo .....	31
3.2.2 Composição físico-química do petróleo.....	33
3.2.3 A contaminação pelo petróleo: os riscos ambientais de acidentes com petróleo e combustíveis .....	36
3.3 Processos de remediação.....	40
3.3.1 Processos físicos e químicos.....	40
3.3.2 Biorremediação .....	41
3.3.2.1 A biodegradação de hidrocarbonetos.....	44
3.3.2.1.1 Biodegradação da fração saturada.....	48
3.3.2.1.2 Biodegradação da fração aromática.....	49
3.3.2.1.3 Biodegradação da fração asfáltica.....	51
3.4 Macrófitas aquáticas.....	52
3.5 Bactérias isoladas de vegetais .....	54
3.5.1 Bactérias epifíticas.....	55
3.5.2 Bactérias endofíticas.....	55
3.6 Caracterização genética de bactérias.....	58
4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO A PARTIR DA MACRÓFITA AQUÁTICA <i>EICHORNIA</i> <i>CRASSIPES</i> .....	60
Resumo.....	61
Abstract.....	62
4.1 Introdução.....	63

4.2 Material e métodos.....	65
4.2.1 Material biológico e coleta das amostras.....	65
4.2.2 isolamento seletivo de bactérias epifíticas e endofíticas.....	66
4.2.2.1 bactérias epifíticas.....	66
4.2.2.2 bactérias endofíticas.....	68
4.2.2.3 índice de colonização.....	69
4.2.2.4 caracterização morfológica, purificação e preservação das bactérias isoladas.....	70
4.2.3 caracterização genética.....	70
4.2.3.1 Extração de DNA.....	70
4.2.3.2 Quantificação do DNA.....	71
4.2.3.3 Amplificação do dna pela reação de PCR.....	72
4.2.3.4 Purificação do produto amplificado.....	73
4.2.3.5 Precipitação do produto da reação de sequenciamento.....	73
4.2.3.6 Eletroforese de sequenciamento.....	74
4.2.3.7 Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas.....	74
4.3 Resultados e discussão.....	75
4.3.1 Isolamento seletivo de bactérias epifíticas e endofíticas.....	75
4.3.2 Caracterização genética .....	81
4.3.2.1 Identificação.....	81
4.3.2.2 Principais gêneros de bactérias isolados: relação e importância com processos de biorremediação.....	85
4.3.2.2.1 <i>Acinetobacter sp</i> .....	85
4.3.2.2.2 <i>Pseudomonas sp</i> .....	86
4.3.2.2.3 <i>Bacillus sp</i> .....	88
4.3.2.2.4 <i>Stenotrophomonas sp</i> .....	89
4.3.2.2.5 Outros gêneros identificados.....	89
4.4 Conclusões .....	93
5.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO E DO CRESCIMENTO CELULAR EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE MACRÓFITA AQUÁTICA AMAZÔNICA.....	94
Resumo.....	95
Abstract.....	96
5.1 Introdução.....	97
5.2 Material e métodos.....	102
5.2.1 Microrganismos.....	102
5.2.2 Seleção das bactérias para avaliação da produção de biossurfactantes e crescimento celular.....	102
5.2.3 Pré-inóculo e fase de adaptação.....	103
5.2.4 Teste qualitativo do colapso da gota de óleo.....	104
5.2.5 Produção de biossurfactantes .....	104
5.2.6 Avaliação do crescimento celular.....	105
5.2.7 Avaliação da atividade de emulsificação.....	106
5.2.8 Teste de toxicidade .....	107
5.3 Resultados e discussão.....	109
5.3.1 Seleção das bactérias para avaliação da produção de biossurfactantes e crescimento celular.....	109

5.3.2 Teste qualitativo do colapso da gota de óleo.....	110
5.3.3 Avaliação do crescimento celular .....	111
5.3.4 Avaliação do ph.....	117
5.3.5 Avaliação da atividade de emulsificação.....	118
5.3.6 Avaliação da toxicidade .....	122
5.4 Conclusões.....	125
<b>6 PRODUÇÃO DE CONSÓRCIO MICROBIANO PARA BIORREMEDIAÇÃO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS DA AMAZÔNIA</b>	
Resumo .....	127
Abstract.....	128
6.1 Introdução.....	129
6.2 Material e métodos.....	132
6.2.1 Produção de consórcio microbiano.....	132
6.2.2 Planejamento experimental.....	133
6.2.3 Experimentos com bioaumentação e bioestimulação.....	133
6.2.4 quantificação de hidrocarbonetos.....	134
6.3 resultados e discussão.....	136
6.3.1 Hidrocarbonetos alifáticos.....	136
6.3.2 Hidrocarbonetos aromáticos.....	144
6.3.3 Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.....	151
6.3.4 Cinética de degradação.....	158
6.4 Conclusões .....	162
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>163</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>164</b>

---

## RESUMO GERAL

---

A biodiversidade é elemento fundamental para o desenvolvimento da Biotecnologia, em especial na Amazônia devido sua inconteste potencialidade. Um dos aspectos de elevado interesse é a busca por mecanismos de gestão que possam promover a qualidade ambiental, garantindo a manutenção das características naturais dos ecossistemas. Neste contexto situa-se uma importante ferramenta biotecnológica que é a biorremediação de ambientes contaminados por compostos tóxicos e recalcitrantes. Assim, a prospecção de microrganismos para uso nesses processos tem sido um desafio permanente. No presente trabalho realizou-se estudo de amostra da comunidade bacteriana associada à macrófita aquática *Eichornia crassipes*, avaliando seu potencial de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Foi feito isolamento seletivo e identificação preliminar de parte dos isolados por meio da região do DNA ribossomal 16S com comparação com sequências do Gen Bank. Verificou-se o potencial para a produção de biossurfactantes por meio da avaliação da atividade de emulsificação em cepas bacterianas. O crescimento de cepas foi avaliado em meio mineral com mistura de hidrocarbonetos e em meio mineral com petróleo bruto. O índice de toxicidade foi avaliado nos extratos dos meios com mistura de hidrocarbonetos das cinco cepas que apresentaram melhor crescimento. Considerando os resultados destes primeiros testes, foi produzido um consórcio com as cepas bacterianas mais eficientes. Este consórcio foi avaliado quanto à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em experimento contendo água de rio da Amazônia, sendo utilizadas as técnicas de bioaumentação e bioestimulação. Obteve-se no isolamento 71 bactérias, sendo 42 epifíticas e 29 endofíticas. A identificação preliminar revelou a predominância dos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas*. Verificou-se melhor crescimento bacteriano no meio com petróleo bruto, destacando-se a cepa *Stenotrophomonas sp.* que atingiu cerca de  $13,4 \times 10^6$  UFCs/mL. O crescimento bacteriano nos meios utilizados indicou a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo, considerando que estes eram a única fonte de carbono. Destacaram-se na produção de biossurfactantes as cepas *Stenotrophomonas sp.* e *Methylobacterium radiotolerans*, com melhores resultados no meio com petróleo. Os índices de toxicidade mostraram melhores resultados nos extratos do crescimento bacteriano em comparação aos extratos controles. As cepas que demonstraram melhores resultados e que foram utilizadas para a produção do consórcio foram *Stenotrophomonas sp.*, *Uncultured Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Acinetobacter baumannii*. No planejamento experimental com o consórcio, os resultados obtidos demonstraram que o efeito principal de todos os parâmetros analisados influenciaram na degradação dos hidrocarbonetos avaliados, entretanto a adição do consórcio foi o fator mais importante nesta degradação, demonstrando o potencial destas linhagens para uso em futuros processos de biorremediação.

---

**Palavras-chave:** diversidade microbiana, biodegradação, consórcio bacteriano, biodiversidade Amazônica.

---

## ABSTRACT

---

Biodiversity is a fundamental element for biotechnology development, especially in Amazon because its incontestable potential. One aspect of high interest is the search for management mechanisms that can promote environmental quality, ensuring the maintenance of natural features of ecosystems. In this context is located an important biotechnology tool that is the bioremediation of environments contaminated with toxic and recalcitrant compounds. Thus the exploration of microorganisms for use in these processes has been a challenge. This work presents a study about sample of bacterial community associated with the aquatic macrophyte *Eichornia crassipes*, assessing their potential for biodegradation of petroleum hydrocarbons. Selective isolations and preliminary identification of some of the isolates by region of 16S ribosomal DNA sequences to compare with the Gen Bank were done. The potential to produce biosurfactantes was evaluated by the activity of bacteria in emulsification. The growth of strains was assessed by mineral medium with hydrocarbons mixing and mineral medium with crude oil. The rate of toxicity was evaluated in mixture of hydrocarbon extracts with the five strains that showed the best growth. Considering the results of these first tests, it was produced a consortium with bacteria more efficient. It was evaluated the degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons in experiment containing Amazon river water, using the techniques of bioaugmentation and biostimulation. There were isolated 71 bacteria, 42 epiphytic and 29 endophytic. The preliminary identification revealed the predominance of the genera *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Stenotrophomonas*. There was more bacterial growth in medium with crude oil, especially the strain *Stenotrophomonas sp.*, reaching around  $13.4 \times 10^6$  UFCs / mL. The methods used in bacterial growth indicated the degradation of petroleum hydrocarbons, whereas they were the sole source of carbon. Highlighted in the production of biosurfactantes the strains *Methylobacterium sp* and *Stenotrophomonas radiotolerans*, with better results in the medium with oil. The indices of toxicity showed better results in extracts of bacterial growth compared to control extracts. The strains that showed better results were used for consortium production: *Stenotrophomonas sp.*, *Uncultured Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* and *Acinetobacter baumannii*. In the experimental design with the consortium, the results showed that the main effect of all parameters studied influenced the degradation of the hydrocarbons studied, however the addition of the consortium was the most important factor in this decline, demonstrating the potential of these strains for use in future processes of bioremediation.

---

**Key words:** microbial diversity, bioremediation, bacteria consortia, Amazon biodiversity.

## LISTA DE FIGURAS

PÁG.

## REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1 Via metabólica de degradação de hidrocarbonetos lineares.. 49
- Figura 2 Sumário da via metabólica aeróbia de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos aromáticos por bactéria. .... 51

## CAPÍTULO 04

- Figura 1 **A**– Saída dos efluentes da Refinaria Isaac Sabá-Manaus/Am. **B**- Amostra da macrófita aquática *Eichornia crassipes*..... 65
- Figura 2 Procedimentos para o isolamento de bactérias epifíticas (A) e endofíticas(B,C e D)..... 69
- Figura 3 (A) *Eichornia crassipes*; (B) bactéria endofítica isolada da folha em meio seletivo..... 75
- Figura 4 Colônias de bactérias em meio Luria Bertani (LB)..... 80
- Figura 5 Perfil eletroforético em gel de agarose dos rDNA amplificados de bactérias endofíticas e epifíticas isoladas de *Eichornia crassipes*..... 81
- Figura 6 Gêneros de bactérias isoladas da macrófita *Eichornia crassipes* identificadas por técnicas moleculares..... 84
- Figura 7 Frequência dos quatro gêneros mais representativos de bactérias identificadas..... 84

## CAPÍTULO 05

- Figura 1 Crescimento bacteriano em meio mineral com petróleo..... 109
- Figura 2 Teste do colapso da gota de óleo. **A**- Tempo 0; **B**- 7 dias..... 110
- Figura 3 Ápice do crescimento bacteriano em meio mineral com petróleo bruto..... 112
- Figura 4 Ápice do crescimento bacteriano em meio mineral com mistura de hidrocarbonetos..... 113
- Figura 5 Comparação do crescimento bacteriano em meio com petróleo e em meio com mistura de hidrocarbonetos..... 113

Figura 6	Curvas de crescimento bacteriano das cinco melhores cepas crescidas em meio mineral com petróleo.....	115
Figura 7	Curvas de crescimento bacteriano das três melhores cepas em meio mineral acrescido de mistura de hidrocarbonetos.	116
Figura 8	Variações do pH nos extratos do crescimento bacteriano.....	117
Figura 9	Halo formado no teste de emulsificação com petróleo.....	119
Figura 10	Índice de germinação das sementes de alface nas diferentes concentrações dos extratos bacterianos.....	123

## CAPÍTULO 06

Figura 1	Efeitos principais e interações entre os parâmetros (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na degradação de hidrocarbonetos alifáticos.....	138
Figura 2	Efeitos principais de cada parâmetro avaliado (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na degradação de hidrocarbonetos alifáticos.....	140
Figura 3	Comparação dos efeitos principais da presença e ausência de cada parâmetro (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na degradação de hidrocarbonetos alifáticos.....	141
Figura 4	Interação entre os parâmetros avaliados na degradação de hidrocarbonetos alifáticos. <b>A</b> – interação entre consórcio e correção de pH; <b>B</b> - interação entre consórcio e fonte de carbono e nitrogênio e <b>C</b> - interação entre correção de pH e fonte de carbono e nitrogênio.....	142
Figura 5	Comparação das concentrações relativas de hidrocarbonetos alifáticos dos experimentos com consórcios (4,3,2,1) e seus respectivos controles (8,7,6,5) após 28 dias. <b>Exp. 01</b> - Consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp.2</b> - Consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; <b>Exp. 03</b> - Consórcio sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp. 04</b> - Consórcio sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N; <b>Exp. 05</b> -Sem adição do consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp.06</b> - Sem adição do consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; <b>Exp. 07</b> -Sem adição do consórcio e sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp. 08</b> - Sem adição do consórcio e sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N.....	143

Figura 6	Efeitos principais dos parâmetros (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) avaliados na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos.....	147
Figura 7	Comparação dos efeitos principais da presença e ausência de cada parâmetro (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na avaliação dos hidrocarbonetos aromáticos.....	148
Figura 8	Interação entre os parâmetros avaliados na degradação de hidrocarbonetos aromáticos. <b>A</b> – interação entre consórcio e correção de pH; <b>B</b> - interação entre consórcio e fonte de carbono e nitrogênio e <b>C</b> - interação entre correção de pH e fonte de carbono e nitrogênio.....	149
Figura 9	Comparação das concentrações relativas de hidrocarbonetos aromáticos dos experimentos com consórcios (4, 3,2,1) e seus respectivos controles (8,7,6,5). <b>Exp. 01</b> - Consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp.2</b> - Consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; <b>Exp. 03</b> - Consórcio sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp. 04</b> - Consórcio sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N; <b>Exp. 05</b> -Sem adição do consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp.06</b> - Sem adição do consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; <b>Exp. 07</b> -Sem adição do consórcio e sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp. 08</b> -Sem adição do consórcio e sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N.....	150
Figura 10	Efeitos principais dos parâmetros (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) avaliados na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.....	153
Figura 11	Comparação dos efeitos principais da presença e ausência de cada parâmetro na avaliação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.....	154
Figura 12	Interação entre os parâmetros avaliados na degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. <b>A</b> – interação entre consórcio e correção de pH; <b>B</b> - interação entre consórcio e fonte de carbono e nitrogênio e <b>C</b> - interação entre correção de pH e fonte de carbono e nitrogênio.....	155
Figura 13	Comparação das concentrações relativas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos dos experimentos com consórcios (4,3,2,1) e seus respectivos controles	

(8,7,6,5). <b>Exp. 01-</b> Consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp.2-</b> Consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; <b>Exp. 03-</b> Consórcio sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp. 04-</b> Consórcio sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N; <b>Exp. 05-</b> Sem adição do consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp.06-</b> Sem adição do consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; <b>Exp. 07-</b> Sem adição do consórcio e sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; <b>Exp. 08-</b> Sem adição do consórcio e sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N.....	156
Figura 14 Cromatograma do experimento 01 após 07 dias de incubação .....	159
Figura 15 Cromatograma do experimento 01 após 28 dias.....	159
Figura 16 Cinética da degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.....	159
Figura 17 Experimentos após 7 dias. <b>A-</b> sem adição de consórcio <b>B-</b> Experimentos com adição de consórcio.....	161
Figura 18 Experimentos após 28 dias. <b>A-</b> Exp.1 (com consórcio) e Exp. 5 (sem consórcio) <b>B-</b> Exp.2 (com consórcio) e Exp. 6 (sem consórcio) <b>C-</b> Exp.3 (com consórcio) e Exp. 7 (sem consórcio) <b>D-</b> Exp.4 (com consórcio) e Exp. 8 (sem consórcio).....	161

## LISTA DE TABELAS

PÁG.

## REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1	Derramamentos de óleo no mundo.....	37
Tabela 2	Gêneros de microrganismos hábeis na degradação de hidrocarbonetos de petróleo.....	45
Tabela 3	Elementos necessários para a biodegradação do petróleo	46
Tabela 4	Gênero de microrganismos que metabolizam hidrocarbonetos aromáticos.....	50

## CAPÍTULO 04

Tabela 1	Meios de cultura acrescido de petróleo.....	67
Tabela 2	Meio Luria Bertani (LB).....	67
Tabela 3	Número e índice de colonização de bactérias epifíticas isoladas da macrófita aquática <i>Eichornia crassipes</i> .....	76
Tabela 4	Número e frequência de isolamento de bactérias endofíticas isoladas da macrófita aquática <i>Eichornia crassipes</i> .....	76
Tabela 5	Características morfológicas de culturas de bactérias epifíticas isoladas da macrófita aquática <i>Eichornia crassipes</i> .....	78
Tabela 6	Características morfológicas de culturas de bactérias endofíticas isoladas da macrófita aquática <i>Eichornia crassipes</i> . ....	79
Tabela 7	Identificação preliminar de bactérias isoladas a partir da <i>Eichornia crassipes</i> com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA.....	82
Tabela 8	Gêneros exclusivos e comuns das bactérias epifíticas e endofíticas isoladas.....	83

## CAPÍTULO 05

Tabela 1	Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos..	99
Tabela 2	Meio mínimo de sais acrescido de petróleo.....	103
Tabela 3	Convenção adotada para qualificar a atividade	

	emulsificante.....	107
Tabela 4	Crescimento bacteriano observado pela turvação do meio..	109
Tabela 5	Cepas selecionadas para a avaliação da produção de biosurfactantes.....	111
Tabela 6	Atividades de emulsificação em petróleo (P) e tolueno (T) nos extratos das bactérias que cresceram no petróleo.....	118
Tabela 7	Atividades de emulsificação em petróleo (P) e tolueno (T) nos extratos das bactérias que cresceram nos hidrocarbonetos padrões.....	120
Tabela 8	Índice de germinação (%) em diferentes concentrações ...	123
Tabela 9	Concentrações efetivas (%) que causam 50% de inibição de germinação .....	124

## CAPÍTULO 06

Tabela 1	Especificação das condições de cada erlenmeyer nos experimentos com bioaugmentação e bioestimulação.....	134
Tabela 2	Matriz estendida do planejamento experimental $2^3$ para os hidrocarbonetos alifáticos.....	137
Tabela 3	Descrição estatística dos efeitos isolados de cada fator na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos.....	138
Tabela 4	Matriz estendida do planejamento experimental $2^3$ para os hidrocarbonetos aromáticos.....	145
Tabela 5	Descrição estatística dos efeitos isolados de cada fator na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos.....	145
Tabela 6	Matriz estendida do planejamento experimental $2^3$ para os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.....	151
Tabela 7	Descrição estatística dos efeitos isolados de cada fator na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos.....	152

# INTRODUÇÃO

As perspectivas de desenvolvimento sustentável para a Amazônia perpassam pelas oportunidades de uso da megadiversidade biológica de forma a manter intacta a floresta. Isto, obviamente, constitui importante e decisivo desafio que traz nas biotecnologias potenciais alternativas para este fim. Assim, a biodiversidade amazônica representa importante fonte de novos produtos biotecnológicos, sendo necessários estudos e investimentos efetivos que possam assegurar o real desenvolvimento para a região.

Um dos aspectos da biodiversidade ainda carente de pesquisas que evidenciem sua imensa potencialidade é a prospecção de microrganismos com capacidade de atuar em processos de interesse nos variados setores da atividade humana. É válido ressaltar que parte significativa da biodiversidade amazônica está representada por fungos e bactérias, sendo a maioria ainda desconhecida. Entre os microrganismos existentes, poucos estão relacionados a doenças. Em sua grande maioria, os microrganismos desempenham algum benefício, direto ou indireto, nos mais diferentes aspectos de interesse ambiental e/ou biotecnológico.

A complexidade dos variados ecossistemas e a exploração ininterrupta dos recursos naturais impõem a necessidade de novas formas de gestão no sentido de manter o equilíbrio das condições ambientais, imprescindível à qualidade de vida humana. Assim, uma das áreas que vem crescendo nas últimas décadas é a Biotecnologia Ambiental.

Considerando esses aspectos, a busca por microrganismos e seus produtos para processos de biorremediação tem sido destaque nas ações que visam garantir maior qualidade ambiental. Desse modo, investimentos têm sido direcionados para a detecção de microrganismos com potencial de atenuar, ou até mesmo eliminar poluentes em condições diversas.

Os microrganismos possuem grande variabilidade genética, o que lhes permite adaptação a condições ambientais bastante diversificadas, incluindo ambientes com variações extremas de temperatura e pH, além de serem fundamentais na manutenção dos ecossistemas, desempenhando funções únicas. Entretanto pouco se conhece sobre as comunidades microbianas e suas interações, as quais podem ser determinantes para o entendimento da dinâmica ambiental.

Realizar prospecção de microrganismos com potencial para degradar compostos poluentes constitui o princípio básico da biorremediação. Desta forma é importante desenvolver métodos eficientes de isolamento de organismos que possam ser utilizados com este objetivo. Estes métodos devem considerar o fato de que microrganismos de interesse específico devem ser provenientes de amostras ambientais coletadas em áreas com histórico de contaminação pelo composto poluente em questão.

Um dos impactos ambientais com necessidade de monitoramento contínuo está relacionado à indústria do petróleo, pelo fato do uso intensivo que a sociedade humana faz desse produto. Com o desenvolvimento de tecnologias que permitem sua adoção em diversos setores da economia, as demandas aumentaram consideravelmente, assim como os riscos potenciais de contaminação do ambiente. Esse fator decorre da crescente produção, distribuição e estocagem do material. Destacam-se, entre os acidentes com petróleo, os grandes derrames nos oceanos, que apesar de poderem ser minimizados, não podem ser solucionados totalmente, mas principalmente derramamentos em menor proporção, como os vazamentos nos oleodutos que também trazem inúmeros impactos ao ambiente receptor.

A toxicidade do petróleo aos organismos vivos é imediata, matando rapidamente peixes, moluscos crustáceos, enfim, a exposição ao óleo pode resultar em alterações em toda comunidade afetando diretamente a sucessão ecológica e o repovoamento de determinada área.

Os ecossistemas da Amazônia também estão suscetíveis aos impactos ocasionados pelos eventuais acidentes causados pelas atividades da indústria de petróleo e gás. As várzeas e os rios são ambientes altamente sensíveis à poluição, sendo acumuladores naturais de resíduos poluentes. O risco potencial de acidentes com petróleo e derivados é agravado pela utilização dessas águas pelas populações locais para a subsistência alimentar e econômica e pelo aproveitamento desses recursos hídricos pelos sistemas de captação de água potável que abastecem as cidades banhadas na região. Assim, alternativas viáveis que possam mitigar quaisquer possíveis impactos se tornam necessárias e urgentes.

Apesar de processos físicos, químicos e físico-químicos serem bastante utilizados na remediação de ambientes contaminados por resíduos de petróleo, processos biológicos têm despertado a atenção das comunidades científica e empresariais nas últimas décadas. Com o intuito de buscar alternativas que reduzam a contaminação por resíduos de petróleo, avançam as pesquisas, e surgem possibilidades reais de conter este tipo de problema.

Pesquisas sobre a atuação de microrganismos degradadores de compostos xenobióticos atestam que, sob determinadas condições, é possível identificar o poder biodegradador e as possíveis situações que maximizam esse potencial. Neste contexto, consideram-se as associações não somente entre microrganismos, mas entre estes e organismos multicelulares como os vegetais. Tem-se evidenciado que muitos mecanismos de adaptação de plantas a variados ambientes, permitindo a sobrevivência e reprodução destas, estão relacionados a metabólitos produzidos por microrganismos associados tanto aos tecidos externos, denominados epifíticos, quanto aos internos destas plantas, os endofíticos.

Microrganismos epifíticos podem conferir determinadas adaptações do vegetal ao meio. O estudo do uso do potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos é relativamente recente, porém vem despertando interesse crescente nos pesquisadores. Esse fato deve-se principalmente aos aspectos vantajosos que a elucidação das vias bioquímicas desses organismos representa para diversos setores da vida humana.

Em processos de biorremediação, o uso e/ou adição de microrganismos autóctones tem sido utilizado preferencialmente, pelo fato de trazer menos riscos ao ambiente do que microrganismos provenientes de

outros locais ou modificados geneticamente. Destacam-se ainda as associações de microrganismos, que mostram maior eficiência do que os efeitos de cada um isoladamente. Pela complexidade da composição química do petróleo, um único microrganismo não teria capacidade para eliminar todos os compostos poluentes. Assim, para biorremediação mais efetiva, o uso de um consórcio microbiano seria o mais adequado.

Diante do exposto, esta pesquisa apresenta um estudo sobre o potencial de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em bactérias epifíticas e endofíticas, isoladas a partir da macrófita aquática *Eichornia crassipes*, coletada em área contaminada por resíduos de petróleo na Amazônia.

A escolha desses vegetais neste trabalho foi devido a um aspecto de especial interesse que é a presença dessas plantas em ambientes contaminados e poluídos. Nestes locais, estes indivíduos representam importante mecanismo de equilíbrio, liberando nutrientes e oxigênio na água.

Analisou-se a existência de microrganismos associados com a referida macrófita que pudessem estar relacionados com processos de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Verificou-se ainda a ação *ex situ* de consórcios bacterianos para biorremediação de ambientes contaminados por petróleo.

A compreensão do poder de ação de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos possibilitará ampliar este potencial em escala industrial, tornando possível encontrar alternativas viáveis para a descontaminação, em especial de ambientes aquáticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Estudar amostra da comunidade bacteriana associada à macrófita aquática *Eichornia crassipes*, avaliando seu potencial de biodegradação de hidrocarboneto de petróleo.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias epifíticas e endofíticas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos a partir da macrófita aquática *Eichornia crassipes*, coletada em área com resíduos de petróleo;
- Fazer a caracterização genética dos isolados, utilizando a região do rDNA 16S;
- Avaliar a cinética de crescimento de bactérias degradadoras em meio líquido suplementado com petróleo e mistura de hidrocarbonetos;
- Realizar teste de toxicidade em extratos de crescimento das bactérias com melhor eficiência de degradação;
- Verificar o potencial para produção de biossurfactantes em bactérias selecionadas dentre os isolados;
- Selecionar as cepas com maior potencial para biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por petróleo.
- Produzir consórcio microbiano com as cinco melhores cepas selecionadas;
- Realizar ensaios de tratamento *ex situ* de água do Rio Negro contaminada por hidrocarbonetos de petróleo, aplicando técnicas de bioestimulação e bioaugmentação, utilizando consórcio de bactérias isoladas seletivamente;

# **REVISÃO DA LITERATURA**

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Biodiversidade Amazônica e Biotecnologia Ambiental.

A formação geológica da Região Amazônica determinou a apresentação de variados ecossistemas, resultando em grande quantidade de oportunidades ecológicas. A consequência dessa heterogeneidade e grandiosidade territorial é uma incrível biodiversidade, considerada megadiversidade por pesquisadores do mundo inteiro (VIEIRA, 2008). É a maior floresta tropical do mundo, abrigando importante reserva de água doce superficial e subterrânea (OLIVEIRA, 2007a).

Essas características justificam o interesse em pesquisas voltadas ao uso sustentável dos recursos naturais da região e relacionadas a formas de promover a qualidade ambiental, minimizando potenciais impactos prejudiciais aos seus ecossistemas.

A diversidade biológica está relacionada com a diversidade dos seres vivos – plantas, animais, microrganismos – e do ecossistema e é representada pela diversidade genética, diversidade de espécies e diversidade de *habitats* (GARCIA, 1995). Essa diversidade representa, do ponto de vista

biotecnológico, importantes e promissoras ferramentas para o desenvolvimento de tecnologias que possam servir aos mais variados setores da atividade humana.

Lacava & Azevedo (2008) ressaltam que as estimativas quanto ao número de microrganismos existentes revelam que atualmente são conhecidos menos de 10% de espécies de fungos e bactérias e a grande biodiversidade existente entre eles faz supor que a potencialidade em termos biotecnológicos seja imensa.

Neste sentido é importante destacar o potencial microbiológico da Amazônia já descrito em vários estudos (MEDEIROS-GALVÃO, 1998; CASSA BARBOSA, 2001; COSTA NETO, 2002; RONDON, 2003; SOUZA *et al.*, 2004a.; NEVES *et al.*, 2006; VOLPATO & AYUB, 2006; HANADA, 2006; CENCIANI, 2007; EZAWA, 2008; SOUZA *et al.*, 2008), assim como o uso de microrganismos em processos de mitigação de danos ambientais, tema que tem sido o foco de pesquisas sob variados aspectos (CUNHA & LEITE, 2000; KREPSKY *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2001; BIDOIA & DOMINGUES, 2004; OJUMU *et al.*, 2005; ABBATI & SILVA, 2005; BENTO, 2005; CORRÊA, 2005; CONEGLIAN *et al.*, 2006; MARIANO, 2006; ABBASSI & SHQUIRAT, 2007; COLLA *et al.*, 2008; DIAS, 2007; JACQUES *et al.*, 2007; MEIRA, 2007;). No contexto amazônico esta linha de estudos representa importante mecanismo na proteção e recuperação de ambientes degradados.

Assim, destaca-se a Biotecnologia Ambiental, associando a pesquisa e as ferramentas biotecnológicas para promover a qualidade dos ambientes terrestres e aquáticos. De acordo com Peixoto *et al.*(2008), essa área pode ser entendida como um conjunto de tecnologias que utilizam

sistemas biológicos para eliminar poluentes ambientais, aumentar e melhorar de forma sustentável a produção agrícola, além de inúmeras outras aplicações. Destacam ainda que essa abordagem implica na prospecção de organismos com potencial para eliminação ou viabilização de poluentes, o que tem gerado atenção por parte das indústrias interessadas em tecnologias menos agressivas ao ambiente.

Desta forma se faz necessário a bioprospecção de organismos com potencial para serem utilizados em processos de biorremediação, adaptados às condições específicas de cada região, em particular na Amazônia, onde as atividades antrópicas têm interferido de forma intensa e contínua nos ecossistemas naturais.

Uma das formas de interferência que tem comprometido a qualidade ambiental é a contaminação por resíduos de petróleo e derivados. Assim, a seguir destacam-se alguns aspectos de interesse acerca deste produto e de como é possível remediar os processos de contaminação, inclusive utilizando-se da biodiversidade para promover processos de biorremediação.

## **3.2 A indústria do petróleo e seus potenciais impactos**

### **3.2.1 Breve histórico do uso do petróleo**

A sociedade adaptou-se, ao longo do tempo, ao uso intenso dos recursos naturais, explorando-os e transformando-os em produtos de interesse para vários setores. Destacam-se entre esses recursos, o petróleo, cujos derivados estão presentes em larga escala em praticamente todas as atividades econômicas. O petróleo assume, assim, significativa importância

dentro da atual configuração de nossa sociedade, representando importante fração da matriz energética dos países, sendo utilizado desde sua forma bruta até as mais refinadas.

O petróleo constitui uma das principais fontes de energia, tendo em seus derivados a matéria prima para manufatura de inúmeros produtos sintéticos. Seus resíduos são ainda aproveitados para uso em construções e estradas.

O uso desse recurso não é recente. Há registros do petróleo desde tempos remotos, existindo referências na Bíblia sobre a existência de lagos de asfalto. Nabucodonosor (imperador assírio 630 a.C) pavimentava estradas com petróleo na Babilônia, enquanto os egípcios o utilizavam como impermeabilizante. Por vários séculos o petróleo foi utilizado para iluminação. O seu uso na modernidade teve como marco a descoberta de petróleo a cerca de 20 metros de profundidade pelo norte americano conhecido como Coronel Drake (Edwin Laurentine Drake, 1819-1880), que utilizou uma máquina perfuratriz para a construção do poço (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Essa descoberta provocou grande revolução, fazendo com que quinze refinarias de petróleo fossem instaladas na região (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

No entanto, a grande revolução da indústria do petróleo ocorreu com a invenção dos motores de combustão interna e a produção de automóveis em grande escala.

Atualmente, é incontestável o uso deste recurso em praticamente todos os setores da atividade humana. Durante o século passado houve um aumento na produção mundial de cerca de três milhões e quinhentos mil toneladas métricas por ano (ROSENBERG & RON, 1996). Esta intensa

produção, além dos benefícios que tem proporcionado à sociedade moderna, traz também a problemática da potencial contaminação dos ecossistemas.

As primeiras descobertas de petróleo na Amazônia ocorreram em 1954, quando a Petrobras encontrou quantidades não comerciais em cidades do Estado do Amazonas (CASTELÕES, 2002). As pesquisas iniciais foram direcionadas para a bacia do Amazonas, sendo realizado o primeiro levantamento de sísmica de reflexão na bacia do Solimões somente em 1976. Em 1986, ocorreu a descoberta da província do Urucu, a 600 km de Manaus. Dois anos depois, o óleo estava sendo escoado por balsas, por meio do rio Solimões, até a Refinaria Isaac Sabbá (UN-Reman), na capital do estado (CASTELÕES, 2002). Iniciou-se em 1998 a operação do poliduto, com um total de 285 Km de extensão, entre a província de Urucu e a cidade de Coari.

Apesar do grande enfoque que tem sido dado para os acidentes em ambientes marinhos, pois os oceanos têm sido os maiores e últimos receptores de poluição por hidrocarbonetos, muitas pesquisas estendem a preocupação da contaminação por petróleo e derivados para ambientes de água doce e solos (ATLAS, 1994; GRUIZ & KRINSTON, 1996; FERREIRA, 1997; PUCCI, *et al.*, 2000; CUNHA & LEITE, 2000; DEL'ARCO & FRANÇA, 2001; MACEDO *et al.*, 2002)

Considerando as características peculiares dos ecossistemas Amazônicos, se evidencia a necessidade de mais estudos voltados à ação da indústria do petróleo na região, pois o clima tropical úmido impõe uma biogeoquímica particular à região e, apesar do interesse científico na

Amazônia, pouco se conhece sobre o reflexo, nos corpos d'água e das atividades de transporte fluvial (OLIVEIRA, 2007a).

### **3.2.2 Composição físico-química do petróleo**

O petróleo é um recurso natural de grande complexidade, formado pela mistura de compostos orgânicos e com alto teor de energia. É composto de várias centenas de compostos orgânicos que podem ser divididos em hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos e cíclicos), hidrocarbonetos aromáticos (mono e poli aromáticos), asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetanos e ésteres) e compostos polares que incluem as resinas (piridina, quinolinas, carbazóleo, amidas, tiofeno, entre outros) (SEABRA, 2008). Contém hidrocarbonetos, que variam de simples moléculas, como o metano, a moléculas com alto peso molecular (ROSATO, 1997).

A avaliação da composição de 636 petróleos de diversas regiões do mundo demonstrou que as proporções de hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos apresentam grande variação (SEABRA, 2008). Sua composição química está diretamente relacionada com a origem, o que determina as diferenças na sua composição básica.

Durante a migração primária, o petróleo ou óleo cru sofre mudanças em sua composição. A comparação entre o betume presente nas rochas-mãe e o óleo no reservatório mostra que a drenagem é seletiva. As moléculas mais pesadas e mais polares, como o asfalteno, são fortemente adsorvidas na rocha-mãe e dificilmente são expelidas para o reservatório. Conseqüentemente, a composição do petróleo está na dependência da capacidade de adsorção desses compostos, ou seja, os hidrocarbonetos

saturados menos polares são mais frequentes, seguidos pelos compostos aromáticos e benzotiofenos, e os menos abundantes são as resinas mais polares e facilmente adsorvidas e os asfaltenos menos solúveis (ROSATO, 1997).

Em estudos realizados em amostras de óleo do campo de Ponca City (Oklahoma, EUA) foram identificados cerca de 350 hidrocarbonetos, 200 compostos de enxofre, além de diversos não-hidrocarbonetos (PETROLEUM GEOSCIENCE TECHNOLOGY, 2007).

Hidrocarbonetos alifáticos são compostos químicos que apresentam átomos de carbono e hidrogênio em sua estrutura, e somente ligações sigmas na molécula. Estes hidrocarbonetos saturados, compostos de C e H unidos por ligações simples, incluem os alcanos normais (parafinas normais ou n-alcanos), os isoalcanos (isoparafinas ou alcanos ramificados) e os cicloalcanos (alcanos cíclicos ou naftenos) e são encontrados no petróleo na faixa de 5 até 40 átomos de carbono (SEABRA, 2008).

Os aromáticos compreendem o benzeno, os alquilbenzenos (tolueno, xileno, etilbenzeno e outros) e os policíclicos (naftaleno, antraceno, fenantreno, entre outros). Podem apresentar mais de um anel aromático, como os naftalenos (2 anéis) e os fenantrenos (3 anéis). O tolueno, com apenas um núcleo benzênico, é o composto aromático mais comum no petróleo, seguido pelo xileno e o benzeno (SEABRA, 2008).

Finalmente, as resinas e os asfaltenos compreendem a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e com alta condensação de anéis aromáticos (SEABRA, 2008). São compostos que contém outros elementos, além do carbono e hidrogênio, denominados de

heteroátomos. Como os elementos nitrogênio, enxofre e oxigênio são os heteroátomos mais comuns, esses compostos são geralmente conhecidos como NSO. Também é comum a ocorrência de metais (especialmente níquel e vanádio) associados à matéria orgânica em compostos denominados de organometálicos. As resinas e asfaltenos são compostos NSO de alto peso molecular, pouco solúveis em solventes orgânicos. Sua estrutura básica consiste de “camadas” de compostos poliaromáticos condensados, empilhadas sob a forma de agregados. A proporção de resinas e, principalmente, de asfaltenos no petróleo é diretamente proporcional a sua viscosidade (SEABRA, 2008).

Segundo a PGT (Petroleum Geoscience Technology, 2007) existem basicamente dois tipos de classificações de óleos. A dos engenheiros baseada na composição e propriedades físico-químicas do óleo (densidade, viscosidade, etc) e voltadas para as áreas de produção e refino e as classificações propostas por geólogos que dão ênfase à composição, entendidas a partir da origem e evolução do petróleo.

Destaca-se a classificação de caráter geológico proposta por Tissot & Welte (1978), que divide os óleos em seis tipos: parafínicos, parafínico-naftênicos, naftênicos, aromáticos intermediários, aromático-asfálticos e aromático-naftênicos. A composição de cada tipo reflete a origem, o grau de evolução térmica e os processos de alteração a que o petróleo foi submetido.

A variedade de componentes do petróleo o torna um produto suscetível aos processos de biorremediação em diversos graus, apresentando moléculas facilmente degradáveis e outras altamente recalcitrantes.

### 3.2.3 A contaminação pelo petróleo: os riscos ambientais de acidentes com petróleo e combustíveis

A sociedade contemporânea, com o uso intenso do petróleo nas últimas décadas, tem vivenciado acidentes, em maior ou menor proporção, que provocam impactos negativos sobre variados ambientes. As causas desses acidentes envolvem todo o processo do uso do petróleo, desde a exploração, passando pelo transporte, armazenamento e refino até o despejo de resíduos.

Grande parte da poluição por petróleo é resultante do fato de que os maiores produtores de óleo não são os maiores consumidores. (ROSENBERG & RON, 1996). Isso significa que o transporte do petróleo tem que ser feito de áreas de alta produção para aquelas de alto consumo. Rosenberg & Ron (1996) também afirmam que apesar da maioria dos acidentes com derramamento de óleo cru serem os de grande proporção (Tabela 1) e receberem maior atenção do público, eles representam apenas uma fração do total. As maiores fontes de poluição são os resíduos industriais e escapes nos dutos, tubulações e tanques de armazenamento.

**Tabela 1 Derramamentos de óleo no mundo**

Origem	Local	Data	10 <sup>3</sup> Tons de óleo
Iraque / Kuwait	Golfo Pérsico	Fevereiro 1991	1000
Exxon Valdez	Golfo do Alaska	Abril 1989	33
IXTOC I Wvll	Campeche Bay, Mexico	Junho 1979	350
Amoco Cadiz	Brittany, França	Março 1978	223
<i>Torrey Canyon</i>	Cornwall, Inglaterra	Março 1967	117

Fonte: Rosenberg e Ron (1996).

No Brasil há registros de acidentes com petróleo e derivados ocasionando danos diversos aos ecossistemas. A toxicidade do petróleo aos organismos vivos é imediata, matando rapidamente peixes, moluscos crustáceos, enfim, a exposição ao óleo pode resultar em alterações em toda

comunidade afetando diretamente a sucessão ecológica e o repovoamento de determinada área.

São inúmeros os efeitos negativos do petróleo já registrados nos organismos, em especial nos marinhos, onde se destaca grande parte dos estudos (SUCHANEK, 1993; CLARK & WARD, 1994; MILLANELLI, 1994; MICHEL, 2002). Essas pesquisas afirmam que as principais consequências observadas são: morte direta por recobrimento e asfixia, morte direta por intoxicação, morte de larvas e recrutas, redução na taxa de fertilização, alteração nos recursos alimentares, incorporação e bioacumulação de substâncias carcinogênicas e ainda efeitos indiretos como dificuldades na localização de presas, alterações na percepção química e motora, inibição da desova, deformidades nos órgãos reprodutores, alteração nas taxas de fotossíntese.

Os efeitos tóxicos do óleo sobre as algas se enquadram em duas categorias: os associados ao recobrimento dos organismos e os associados à assimilação de hidrocarbonetos com alteração do metabolismo celular. O recobrimento reduz a difusão de CO<sub>2</sub> e a penetração de luz nos vegetais. As alterações no metabolismo celular podem ser percebidas por meio das mudanças na sua morfologia e fisiologia (LOBBAN *et al.*, 1995).

O petróleo, quando exposto ao ambiente, sofre alterações em suas características originais. Isso ocorre devido a fatores físicos (evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, adsorção às partículas, etc) e principalmente biológicos (biodegradação) (SLOAN, 1999).

Dias (2007) afirma que os efeitos tóxicos imediatos do petróleo tendem a ser causadas, principalmente, por moléculas de baixa massa

molecular e que se degradam mais rapidamente. Já os efeitos tóxicos crônicos são devidos às moléculas de alta massa molecular, geralmente aromáticas, que apresentam menor toxicidade, mas são persistentes, causando efeitos mais duradouros (SPIES *et al*, 1996). Dias (2007) destaca ainda que hidrocarbonetos aromáticos, como o benzeno, tolueno e xileno, possuem mais facilidade de dissolução em água, tendo, com isso, alto potencial tóxico e facilidade de serem incorporados pelos seres vivos.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) apresentam configuração molecular mais resistentes à biodegradação, se tornando recalcitrantes nos ambientes e possuindo alto poder carcinogênico (CETESB, 2003).

A população microbiana de um ambiente também está suscetível à ação dos hidrocarbonetos, havendo ainda, após processos iniciais de biodegradação, o efeito tóxico de produtos da oxidação desses hidrocarbonetos, que podem ser mais tóxicos que os compostos originais (DIAS, 2007).

Há, portanto, diversas consequências relacionadas ao derramamento de óleo no ambiente, resultando em alterações significativas nas comunidades expostas e até na redução e/ou desaparecimento de espécies, redução da tolerância às condições do ambiente, e efeitos sub-letais que influenciam no comportamento, crescimento e sucesso reprodutivo dos organismos marinhos (MILANELLI, 1994; DIAS, 2007). O contato com o óleo cru é, portanto, grave, principalmente em plantas e animais, atingindo ainda o plâncton. Mariuzzo (2005) afirma que “nos mangues, o petróleo mata as plantas ao recobrir suas raízes, impedindo sua nutrição. Além disso, a baixa

velocidade das águas e o emaranhado vegetal nesses locais dificulta a limpeza”.

Os ecossistemas da Amazônia também estão suscetíveis aos impactos ocasionados pelos eventuais acidentes causados pelas atividades da indústria de petróleo e gás. A problemática dos acidentes, inclusive nessa região, que provocam derramamento de óleo cru e derivados, requer medidas severas de controle e minimização dos impactos, pois a recuperação é sempre muito lenta, difícil e demorada, apesar de toda a intervenção humana.

### **3.3 Processos de remediação**

A preocupação com a proteção ambiental tem sido crescente. A qualidade ambiental vem assumindo com mais intensidade a função de precursora da qualidade de vida. Muitas atividades produtivas utilizam matérias primas que são obtidas à custa da degradação ambiental, e reverter quadros de deterioração do ambiente tem se tornado preocupação constante, principalmente pela complexidade do processo e pela importância da proteção dos recursos naturais para as gerações futuras.

Assim, como a questão relacionada aos impactos causados pelo derramamento de óleo nos ecossistemas tem sido tema cada vez mais frequente nas discussões sobre proteção ambiental, é justificado que sejam direcionados mais estudos sobre os processos de remediação necessários ao problema.

### 3.3.1 Processos físicos e químicos

Em relação ao tratamento destinado à remediação de ambientes degradados por derramamentos de petróleo e derivados, é fato que os acidentes com estes produtos levaram ao desenvolvimento de técnicas que buscam reverter ou pelo menos minimizar os impactos gerados.

Essas técnicas incluem, em geral, métodos físicos e químicos, como barreiras e contenção, aparelhos de sucção, uso de jatos d'água para dispersar o óleo, absorventes, formadores de gel, precipitantes e dispersantes químicos (CRAPEZ *et al.*, 2002). A precipitação é realizada com o lançamento, sobre a camada de petróleo na superfície, de pós ou materiais de granulometria fina, mas com alta densidade. O óleo absorve essas partículas e sofre decantação, depositando-se no sedimento. Já os dispersantes químicos fazem com que o óleo se espalhe de modo muito rápido, tornando-o menos visível. Nos dois casos, porém, o material continua no ambiente, sendo assimilado pelos organismos marinhos e acumulado nos tecidos, em diferentes níveis da cadeia alimentar, desde os microrganismos até os grandes peixes, além das aves e mamíferos que se alimentam no mar e dependem dele (CRAPEZ *et al.*, 2002) .

Há muitos problemas de resíduos já presentes no meio ambiente, originário das mais diferentes atividades econômicas, e que requerem ações para a sua remediação ou descontaminação, de modo que seus efeitos ambientais negativos sejam minimizados ou eliminados.

### 3.3.2 Biorremediação

Uma das formas de degradar os resíduos presentes no meio ambiente é utilizar o seu próprio potencial de reação contra esses químicos. Nesse sentido, os microrganismos desempenham importante papel, uma vez que utilizam essas substâncias como fonte de energia, podendo, portanto desempenhar a função de restauração dos padrões ambientais (MELO & AZEVEDO, 1997).

Peixoto *et al.* (2008) afirmam que o princípio da biorremediação se baseia na prospecção de populações microbianas que possuam a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. Neste sentido destacam ainda a utilização de microrganismos autóctones, assim como provenientes de outros ambientes ou modificados geneticamente.

Os microrganismos estão largamente distribuídos em nosso planeta. Representantes desses seres são muitas vezes encontrados mesmo em ambientes de características extremas e presumivelmente adversas.

Segundo Monteiro (1997), a atividade microbiana é reconhecida como um dos fatores mais importantes na eliminação de produtos químicos do ambiente. É característica de determinados ambientes poluídos, a contaminação por metais pesados. Todos os microrganismos absorvem e acumulam metais do ambiente onde proliferam, uma vez que os metais, como o ferro, o zinco, cobre, molibdênio, entre outros, são componentes essenciais de um grande número de enzimas e outras moléculas biológicas. Outro componente dos ambientes poluentes são os compostos xenobióticos (xeno=estranho, biótico=vida) que são compostos orgânicos sintetizados pelo homem com poucas semelhanças com os compostos químicos naturais (FAY

*et al.*, 2008). São, pois, compostos químicos antropogênicos, sintéticos, com atributos estruturais não naturais (SILVA & VIEIRA, 2008).

A degradação de uma substância em outra pode ser promovida por processos físicos, como o calor ou a irradiação ultravioleta, por reações químicas decorrentes do pH ou da ação de certas substâncias no ambiente, e por processos biológicos por meio de enzimas existentes em animais, plantas e microrganismos (FAY *et al.*, 2008)

Os xenobióticos têm estruturas moleculares e sequências de ligações químicas que podem não ser reconhecidas pelas enzimas degradativas existentes e, portanto resistem à biodegradação ou não são completamente metabolizados, resultando num acúmulo de xenobióticos no ambiente. Se esses produtos trazem um benefício evidente, causam, em contrapartida, problemas por sua grande persistência no ambiente, a qual pode chegar a anos de duração, afetando a fauna, a flora e os microrganismos (LANGEBACH, 1995).

Biorremediação pode ser definida como uma nova tecnologia para o tratamento de áreas contaminadas, por meio do uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor determinados poluentes, ou seja, realizando a biodegradação. É realizada por meio da adição de microrganismos nativos ou exógenos, ou até microrganismos geneticamente modificados (PRINCE, 1996), que aceleram o processo natural da biodegradação.

No processo de biorremediação há a exploração da diversidade genética e da versatilidade metabólica dos microrganismos para a transformação de contaminantes em produtos finais menos tóxicos, os quais são integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (ALEXANDER, 1994).

As técnicas de biorremediação podem ser realizadas no local do acidente (*In situ*) ou fora deste (*Ex situ*) e envolvem inúmeros processos, tais como: biorremediação passiva; bioventilação, landfarming, compostagem, bioestimulação e bioaumentação (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Na evolução do processo de biorremediação, alguns aspectos devem ser considerados. Em primeiro lugar, a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante (LEAHY & COLWELL, 1990). Outro fator é que o contaminante tem que estar disponível ou acessível ao ataque microbiano ou enzimático, o que se denomina biodisponibilidade. E por fim, condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador.

### **3.3.2.1 A biodegradação de hidrocarbonetos**

As primeiras descrições do mecanismo de ação dos microrganismos como degradadores de hidrocarbonetos foram realizados por Claude E. Zobell (1946), que desenvolveu diversas pesquisas em que reconhece que muitos microrganismos têm a habilidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de energia e carbono e que tais microrganismos têm ampla e variada distribuição na natureza (ZOBELL, 1946, 1950, 1964, 1969, 1971, 1973a, 1973b). Este autor destaca que a utilização dos hidrocarbonetos é fortemente dependente da natureza química dos compostos do petróleo e das condições ambientais.

Biodegradação de hidrocarbonetos pode ser entendido como a quebra destes componentes do petróleo para componentes de menor peso molecular ou mais polares por ação de microrganismos (ROSATO, 1997).

Vários autores destacam a importância dos microrganismos no processo de biodegradação (CUNHA & LEITE, 2000; OLIVEIRA, 2001; CRAPEZ *et al.*, 2002, MARIANO, 2006; DIAS, 2007).

Os microrganismos envolvidos na degradação de compostos xenobióticos podem ser classificados em dois grupos: os microrganismos primários e os secundários. Os primários são aqueles capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto os secundários não utilizam o substrato principal, porém, os produtos liberados pelos microrganismos primários, o que é denominado cometabolismo (MARIANO, 2006).

Oliveira (2001) destaca que muitos microrganismos são hábeis na degradação de hidrocarbonetos (Tabela 2).

**Tabela 2 Gêneros de microrganismos hábeis na degradação de hidrocarbonetos de petróleo**

Bactérias	Fungos filamentosos	Leveduras
<i>Achromobacter</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Candida</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Debaryomyces</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Dendryphella</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Humicola</i>	
<i>Chromobacterium</i>	<i>Mortierella</i>	
<i>Flavobacterium</i>	<i>Penicillium</i>	
<i>Micrococcus</i>	<i>Phoma</i>	
<i>Nocardia</i>	<i>Sporotrichum</i>	
<i>Pseudomonas</i>	<i>Tolyposcladium</i>	
<i>Rhodococcus</i>	<i>Verticillium</i>	
<i>Sarcina</i>		
<i>Serratia</i>		
<i>Streptomyces</i>		
<i>Vibrio</i>		
<i>Xanthomonas</i>		

Fonte: Del'Arco (1999), Cravo Jr. (1998) apud Oliveira (2001)

A biodegradação do petróleo é bastante complexa, dependendo da natureza do óleo, da natureza da comunidade microbiana e da variedade de fatores ambientais que influenciam a comunidade microbiana (ATLAS, 1994). De acordo com Peixoto *et al.* (2008), várias condições têm que ser satisfeitas para que a biodegradação aconteça em determinado ambiente, entre as quais, citam: a) existência de organismos que possuam enzimas necessárias para que os processos ocorram; b) que estes organismos estejam presentes no ambiente que contenha as substâncias a serem biodegradadas e c) as substâncias devem estar acessíveis ao organismo que contém estas enzimas.

A degradação dos hidrocarbonetos está diretamente relacionada à produção de moléculas com poder de solubilizar estes compostos, tornando-os disponíveis no meio, os surfactantes. Essas moléculas são polímeros anfipáticos que atuam reduzindo a tensão superficial em sistemas aquosos (BANAT *et al.*, 2000). Com base na crescente preocupação ambiental, a busca por surfactantes de origem natural, os biossurfactantes, tem crescido consideravelmente (MACIEL, 2003). A origem desses biossurfactantes está nos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos que potencialmente sintetizam estes compostos.

É válido destacar a importância da determinação das complexas vias metabólicas da degradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos.

Existem requisitos básicos para a ação biodegradadora (Tabela 3). De acordo com Rosenberg & Ron (1996) há duas características essenciais que definem os microrganismos com capacidade degradadora:

1. Presença de membranas com grupos específicos de enzimas oxigenases;

2. Existência de mecanismos para otimizar o contato entre os microrganismos e os hidrocarbonetos hidrofóbicos.

**Tabela 3 Elementos necessários para a biodegradação do petróleo**

A. Microrganismos com
1. enzimas oxigenases
2. habilidade para aderir aos hidrocarbonetos
3. potencial de emulsificação
4. mecanismos para adsorção dos hidrocarbonetos
B. Água
C. Oxigênio
D. Fósforo
E. Fonte de nitrogênio

**Fonte: Rosenberg & Ron *apud* Crawford & Crawford (1996).**

A degradação de hidrocarbonetos para CO<sub>2</sub> necessariamente envolve reações de oxidação. Por essa razão, a maioria dos microrganismos é aeróbica. Rosato (1997) destaca que apesar do destino dos hidrocarbonetos ser a produção de CO<sub>2</sub>, podem acontecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados como glóbulos e alguns alcanos podem ser incorporados como biomassa. Podem ainda ser convertidos para a produção de diferentes lipídios aplicáveis na indústria oleoquímica (RADWAN & SORKHOH, 1993).

A especificidade do processo de biodegradação de hidrocarbonetos pode ser descrita como o potencial genético de um microrganismo em particular em introduzir uma molécula de oxigênio em uma de hidrocarboneto e, com relativamente poucas reações, gerar produtos intermediários que na sequência entram na via catabólica da célula (ROSATO, 1997).

Wang *et al.* (1990) ressaltam que, a longo prazo, a maioria dos hidrocarbonetos é convertida a CO<sub>2</sub>, porém os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto original e,

portanto, existe a preocupação de que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação.

Dias (2007) descreve que no processo de biodegradação de um composto, este é alterado gerando sub-compostos que podem ser utilizados por outros seres vivos, sendo assimilados e utilizados no seu processo metabólico, oferecendo poder toxicológico e causando, em alguns casos, manifestações adversas.

É importante destacar que existem diferenças metabólicas no processo de degradação das frações em que se divide o petróleo, como se descreve a seguir.

#### **3.3.2.1.1 Biodegradação da fração saturada**

Diversos autores descritos por Rosato (1997) demonstram que os n-alcanos são considerados os mais facilmente degradados, e procede normalmente por um ataque monoterminal: há formação de um álcool primário, seguido por um aldeído e um ácido monocarboxílico. O ácido é degradado via  $\beta$ -oxidação com a formação de ácidos graxos com dois carbonos a menos e formação de acetilcoenzima A, com liberação eventual de  $\text{CO}_2$ . Descrevem ainda que os grupos metil aumentam a resistência dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano e os cicloalcanos são particularmente resistentes à biodegradação. Os compostos alicíclicos, como os hopanos, estão entre os mais persistentes na natureza.

Oliveira (2001) também descreve que o metabolismo aeróbio dos hidrocarbonetos lineares envolve a ação de enzimas monooxigenases, que transformam estes compostos em álcoois correspondentes, formando-se os

aldeídos e finalmente os ácidos carboxílicos, os quais são degradados por  $\beta$ -oxidação (Figura 1). Destaca ainda que em anaerobiose o metabolismo degradativo ainda não está completamente esclarecido.

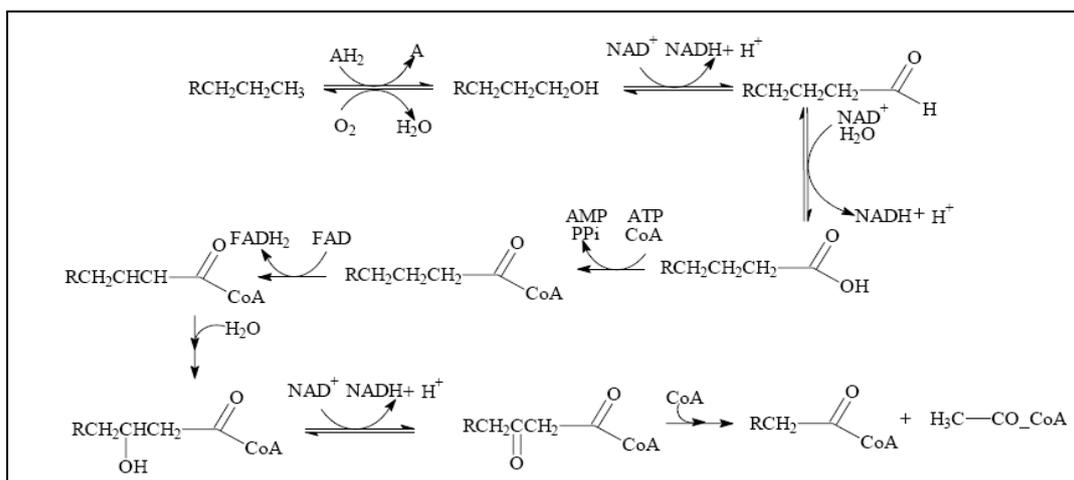


Figura 1: Via metabólica de degradação de hidrocarbonetos lineares.  
Fonte: Baker & Herson (1994 b) *apud* Oliveira (2001)

### 3.3.2.1.2 Biodegradação da fração aromática

Tanto microrganismos eucariotos quanto procariotos tem potencial enzimático para oxidar hidrocarbonetos aromáticos (Tabela 4). Entretanto, os mecanismos moleculares para a degradação dos compostos aromáticos é diferente entre eles (ROSENBERG & RON, 1997). Fungos e outros eucariotos oxidam hidrocarbonetos aromáticos com um sistema mono-oxigenase citocromo p-450, levando à formação de *trans*-diidrodiols .

De maneira geral, o metabolismo de HPAs por microrganismos ocorre de maneira aeróbia, via oxidação do anel aromático pela monooxigenase citocromo P-450 de bactéria e fungos não-ligninolíticos,

formando óxido de areno, que por ação de outra enzima epóxido-hidrolase forma *trans*-diidrodiol (SILVA, 2007).

Compostos com poucos anéis aromáticos são degradados mais facilmente. Há linhagens com capacidade de degradar compostos com até cinco anéis aromáticos. A degradação bacteriana envolve a ação de uma dioxigenase que gera a formação de *C/S*-diidrodióis, que se transformam em catecol por meio das enzimas desidrogenases (SILVA, 2007).

Oliveira (2001) destaca que os hidrocarbonetos cíclicos alifáticos têm seu processo de degradação dificultada devido à sua estrutura e ao seu estado físico. A via metabólica aeróbia de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos aromáticos por bactéria é apresentada na Figura 2.

**Tabela 4 Gênero de microrganismos que metabolizam hidrocarbonetos aromáticos**

<b>bactéria</b>	<b>Fungos</b>	<b>microalgas</b>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Chytridomycetes</i>	<i>Porphyridium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Oomycetes</i>	<i>Petalonia</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Zygomycota</i>	<i>Diatoms</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Chlorella</i>
<i>Flavobacteria</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Dunaliella</i>
<i>Achrobacteria</i>	<i>Deuteromycota</i>	<i>Chlamydomonas</i>
<i>Nocardia</i>		<i>Ulva</i>
<i>Corynebacteria</i>		
<i>Acinetobacteria</i>		
<i>Alcaligenes</i>		
<i>Mycobacteria</i>		
<i>Rhodocci</i>		
<i>Streptomyces</i>		
<i>Bacilli</i>		
<i>Arthobacter</i>		
<i>Aeromonas</i>		
<i>Cyanobacteria</i>		

Fonte: Cerniglia (1992) *apud* Crawford & Crawford, 1997.

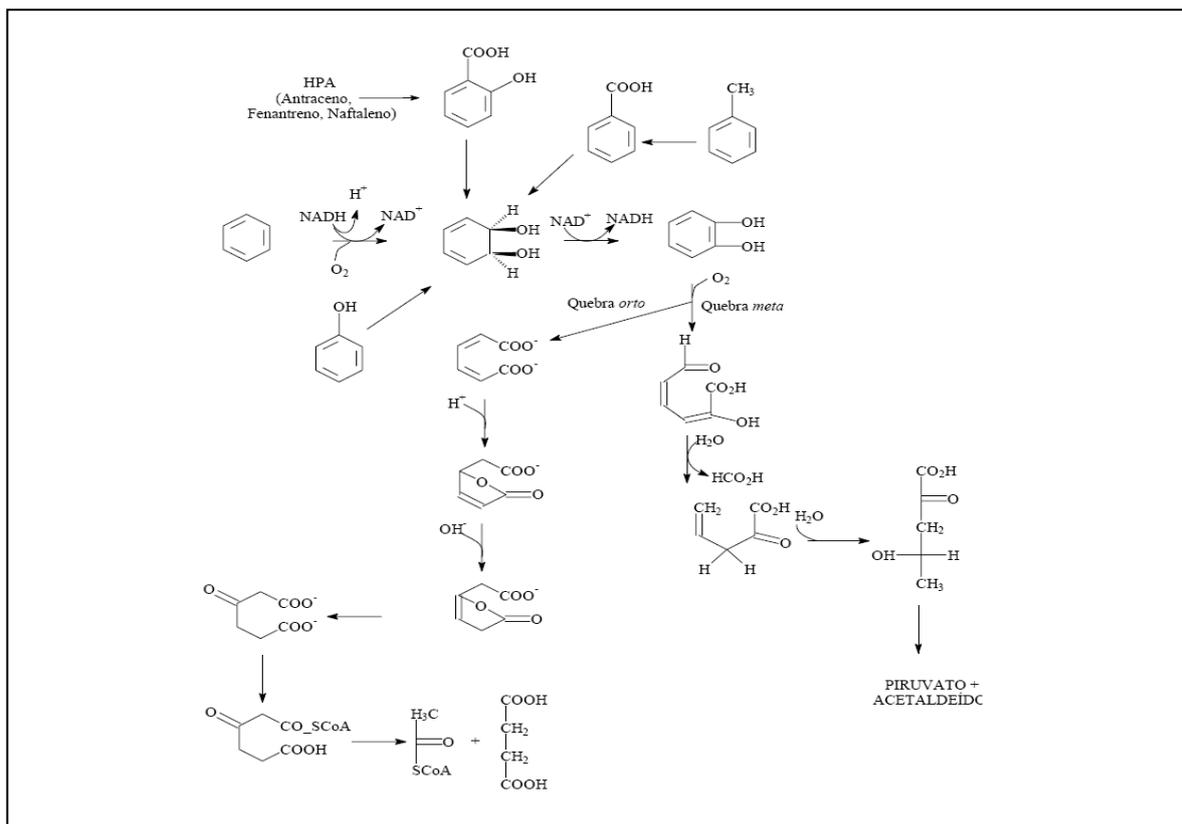


Figura 2: Sumário da via metabólica aeróbia de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos aromáticos por bactéria.

Fonte: Del'Arco (1994) *apud* Oliveira (2001).

### 3.3.2.1.3 Biodegradação da fração asfáltica

A biodegradação da fração asfáltica é a menos compreendida. As vias metabólicas dos microrganismos envolvidos ainda não foram bem esclarecidas.

Há pesquisas que demonstram a capacidade de diversos isolados bacterianos de mineralizar moléculas contendo enxofre ou nitrogênio (AISLABIE *et al.*, 1990; FEDORAK *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 1992).

Pouco se sabe sobre a degradação dessas moléculas e supõe-se que sejam inertes para a biodegradação (ROSATO, 1997).

Devido à alta complexidade dos processos de degradação dos diferentes compostos do petróleo, a associação de microrganismos tem sido muito mais eficiente em processos de biorremediação do que o microrganismo isolado. Essa associação, denominada consórcios microbianos, tem sido foco de vários estudos (OLIVEIRA, 2001; DIAS, 2007). Entretanto, pelas dificuldades de análise de culturas mistas, a maioria dos estudos tem focado a atuação isolada de microrganismos (KATAOKA, 2001).

### **3.4 Macrófitas aquáticas**

As macrófitas aquáticas (plantas aquáticas) constituem uma importante comunidade dos ecossistemas aquáticos, por sua abundância, altas taxas de produtividade e por sua contribuição para a diversidade biológica. Frequentemente, em ambientes com influência antrópica, esses vegetais proliferam indesejadamente e prejudicam a utilização de lagos, represas e rios, havendo a necessidade da aplicação de técnicas de controle. Por outro lado, estes vegetais têm sido utilizados em sistemas de tratamento de efluentes e na recuperação de ambientes degradados.

Essas plantas são essenciais para a manutenção da produtividade dos lagos, pois participam ativamente da ciclagem de nutrientes e produção de matéria orgânica. Servem também de refúgio e abrigo para outros organismos, desempenhando um papel fundamental para a manutenção dos estoques naturais de peixes. As macrófitas aquáticas são, ainda, grandes armazenadoras de nutrientes e toleram ambientes impactados, apresentando elevadas taxas de crescimento mesmo em ambientes poluídos por diferentes

tipos de efluentes, sendo assim consideradas excelentes bioindicadoras, inclusive da toxicidade do petróleo e de seus derivados.

Podem ser consideradas macrófitas aquáticas, os vegetais visíveis a olho nu com partes fotossinteticamente ativas permanentemente, ou por diversos meses, todos os anos, total ou parcialmente submersas em água doce ou salobra, podendo ainda ser flutuantes (GASTAL Jr & IRGANG., 1997). Entretanto, há algumas divergências na definição de macrófitas por diferentes autores, sendo que alguns consideram macrófitas também as plantas de margem que mantêm relação com a água em abundância (VIANA, 2005).

Estudos ecológicos relativos às macrófitas particularmente em ecossistemas aquáticos tropicais brasileiros, sempre evidenciam a importante contribuição dessas comunidades para o metabolismo do ecossistema (POMPÊO, 2003).

Destacam-se entre os estudos sobre macrófitas aquáticas o trabalho pioneiro no Brasil feito por Hoehne (1948) e a descrição de aspectos anatômicos e ecológicos de gramíneas aquáticas da Amazônia (BLACK, 1950), assim como vários trabalhos de identificação de macrófitas aquáticas como o de RODRIGUES & IRGANG (2001). Para a ecologia de macrófitas aquáticas tropicais no Brasil podemos citar mais recentemente o estudo de Viana (2005) sobre macrófitas no Estado de São Paulo.

A espécie *Eichhornia crassipes* é conhecida como mururu ou aguapé e pertence à família Ponteriaceae. Tem importante função na purificação de água contaminada, inclusive retirando metais pesados. É uma das macrófitas mais abundantes na Amazônia (SPINDOLA, 2007)

A ampliação dos estudos sobre estes vegetais demonstra a importância dessa comunidade para o ecossistema (ESTEVES & MENEZES, 1992) e denota a necessidade de serem realizadas novas e relevantes pesquisas envolvendo estes organismos.

### **3.5 Bactérias isoladas de vegetais**

As bactérias constituem o grupo de seres vivos mais diverso do planeta, podendo ser encontradas em variados ecossistemas, afetando as propriedades químicas e físicas do ambiente (NEWMAN & BANFIELD, 2002). Destaca-se sua importante função na atenuação do impacto ambiental dos compostos orgânicos, uma vez que podem adaptar-se à presença desses poluentes e/ou utilizá-los como nutrientes.

Magnani (2005) destaca que as plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano e que nestas plantas hospedeiras, diferentes nichos são ocupados pelos microrganismos, tais como as superfícies das raízes, caules e folhas (as epífitas), ou então, colonizando o interior de diversos tecidos das plantas (endofíticas).

Bactérias endofíticas e epifíticas podem conferir algumas vantagens a seu hospedeiro, como maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, entre outros (SOBRAL, 2003).

#### **3.5.1 Bactérias epifíticas**

Bactérias epifíticas são assim denominadas, por habitarem os tecidos externos, vivendo na superfície dos vegetais.

Azevedo (1999) descreve que as distinções entre microrganismos endofíticos, epifíticos e patogênicos são de natureza apenas didática, não existindo um claro limite entre grupos e sim um gradiente entre eles. Segundo o autor, um organismo endofítico, por exemplo, pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um microrganismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por certo período, causando ou não danos à mesma.

Assim a compreensão da microbiota associada ao vegetal inclui tanto os epifíticos quanto os microrganismos denominados endofíticos, conforme descrito a seguir.

### **3.5.2 Bactérias endofíticas**

Microrganismos endofíticos podem ser definidos como aqueles que vivem no interior das plantas, sistematicamente, sem causar danos e podendo conferir benefícios aos seus hospedeiros, resultando em um sistema simbiótico reconhecido e com características específicas (PEREIRA *et al.*, 2007).

Os endófitos são potencialmente vantajosos em diversos aspectos tais como a produção de antibióticos, no controle biológico como vetores para a introdução de genes em plantas e quando cultivados *in vitro* são capazes de produzir antibióticos, fato que os tornam alvos na busca desses produtos ou de outros metabólitos secundários de interesse farmacológico (MEDEIROS-GALVÃO, 1998; SALLES *et al.* 2000; ZHANG *et al.* 2006; STROBEL & DAISY 2003; BILLS *et al.* 2002). Microrganismos associados a plantas, ao invés das próprias plantas, podem algumas vezes, oferecer matéria-prima com potencial promissor.

As associações entre endofíticos e hospedeiros ainda são pouco conhecidas e possuem importante potencial biotecnológico a ser explorado. É fato comprovado que esse microhabitat está repleto de microrganismos, muitos dos quais com forte associação simbiótica com a planta hospedeira, conferindo-lhe condições para seu estabelecimento (PEREIRA *et al.*, 2007). Muitas bactérias desenvolveram mecanismos especializados para degradar compostos complexos e recalcitrantes.

Bactérias endofíticas possuem íntima ligação com seus hospedeiros por meio de processos co-evolutivos e podem interferir na fisiologia da planta (MISAGUI & DONDELINGER, 1990) e sua habilidade de sobreviver dentro dos tecidos vegetais as torna candidatas potenciais a aplicações biotecnológicas (SOBRAL, 2003).

Mourão (2001) destaca a importância dos microrganismos endofíticos em estudos biotecnológicos, principalmente onde poderiam ser utilizados como vetores para a introdução de caracteres de interesse em plantas. Fahey (1998) afirma que microrganismos endofíticos que apresentam antagonismos a fitopatógenos podem ser isolados do interior de tecidos ou órgãos da parte aérea da planta e podem vir a ser uma grande ferramenta na agricultura.

Pesquisas envolvendo bactérias endofíticas têm se mostrado bastante promissoras, dentre outros aspectos pelo seu potencial biotecnológico e pelo esclarecimento dos aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos da interação plantas-microrganismos, em especial de plantas de climas tropical e sub-tropical (AZEVEDO *et al.*, 2000; PEIXOTO-NETO *et al.*, 2002; MARCON, 2002; SOBRAL, 2003). Destaca-se ainda o potencial uso de endófitos em

processos de fitorremediação de contaminantes orgânicos e metais pesados (SICILIANO *et al.*, 2001; LODEWYCKX *et al.*, 2002)

Atualmente ainda são poucos os trabalhos em relação a microrganismos endofíticos presentes em hospedeiros tropicais, destacando-se, entretanto, importantes estudos que tem demonstrado o potencial biotecnológico desses seres (MEDEIROS-GALVÃO, 1998; GUIMARÃES, 1998; DRUMOND *et al.*, 2000; CASSA-BARBOSA, 2001; COSTA-NETO, 2002; RONDON, 2003; CRUZ, 2004; SOUZA *et al.*, 2004a; HANADA, 2006)

Uma observação descrita nos estudos realizados por Strobel & Long (1998) é que no processo de seleção de plantas e seus microrganismos associados é importante investigar plantas que ocupem nichos ecológicos não usuais, por exemplo, aquelas que crescem em temperaturas extremamente altas ou baixas, sobrevivem por muito tempo ou resistem a altas concentrações de radiações e de sal. A adversidade nos ecossistemas característicos da planta e sua resistência a eles remetem a potencial interação com microrganismos endofíticos.

Muitos outros aspectos da interação entre endófitos e hospedeiros ainda estão por ser elucidados, inclusive a interação entre esses microrganismos e plantas que sobrevivem em situações extremas, como em ambientes poluídos. A associação existente pode proporcionar a manutenção do hospedeiro em ambientes degradados pela síntese de moléculas biodegradadoras, conferindo à planta vantagens adaptativas.

### 3.6 Caracterização genética de bactérias

Muitos estudos ambientais têm utilizado técnicas de biologia molecular para uma exploração mais abrangente da comunidade microbiana e suas funções ecológicas em ambientes naturais (PEIXOTO *et al.*, 2008).

Dias (2007) descreve que os primeiros sistemas de classificação de procariotos foram baseados apenas em algumas propriedades fenotípicas que eram usadas para agrupar linhagens, a despeito de qualquer afinidade evolutiva verdadeira. Os atuais sistemas de classificação podem contar com novas tecnologias, em especial as derivadas da biologia molecular (LACAVA & AZEVEDO, 2008). Os procedimentos para extração do material genético microbiano tem se tornado mais simples e eficientes, podendo ser extraído tanto de microorganismos cultiváveis como de não cultiváveis (LACAVA & AZEVEDO, 2008).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é a base para as ferramentas moleculares utilizadas em estudos ambientais e análise de comunidades microbianas (LACAVA & AZEVEDO, 2008). Consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias do DNA a partir de uma sequência alvo conhecida, onde são utilizados oligonucleotídeos que funcionam como iniciadores da síntese e são complementares ao gene ou à região do ácido nucléico de interesse (MULLIS & FALLONA, 1987).

O desenvolvimento dos métodos de sequenciamento de DNA e o acúmulo da informação de sequências em bases de dados públicos de livre acesso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) têm permitido o seqüenciamento de genes homólogos entre linhagens microbianas, tornando-se o procedimento padrão em sistemática microbiana (DIAS, 2007).

## **CAPÍTULO IV**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE  
BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE  
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO A PARTIR DA  
MACRÓFITA AQUÁTICA *EICHORNIA CRASSIPES***

**MANAUS-AM  
2009**

---

---

## RESUMO

---

Pesquisas têm demonstrado que a diversidade microbiana da Amazônia apresenta grupos promissores com amplo interesse biotecnológico. O desafio apresentado está no isolamento e seleção de linhagens com potencial para uso em escala industrial. Destaca-se neste trabalho o isolamento seletivo e caracterização genética de bactérias associadas à macrófita aquática amazônica *Eichornia crassipes*. A identificação preliminar de parte dos isolados bacterianos foi realizada por meio da região do DNA ribossomal 16S com posterior comparação das sequências obtidas com sequências do Gen Bank. Foram isoladas 71 bactérias, sendo 42 epifíticas e 29 endofíticas, oriundas de folhas, caules, bulbos e raízes de plantas coletadas em local com resíduos de petróleo. Dentre os isolados, 48 linhagens foram identificadas, sendo a maioria identificada apenas em nível de gênero, com predominância dos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas*. Segundo a literatura, os principais gêneros identificados neste trabalho apresentaram estreita relação com processos de biorremediação. Os estudos revelaram que o método utilizado para o isolamento seletivo permitiu a seleção de grupos de bactérias com potencial para biorremediação de ambientes contaminados com petróleo.

---

**Palavras-chave:** Diversidade microbiana, endofíticos, epifíticos, DNA ribossomal, biorremediação.

---

## ABSTRACT

---

Studies have shown that microbial diversity of Amazon presents interest groups for biotechnology. The actual challenge is the isolation and selection of strains with potential for use in industrial scale. This work presents the selective isolation and genetic characterization of bacteria associated with the Amazon aquatic macrophyte *Eichornia crassipes*. Preliminary identification of some isolates were performed using the 16S ribosomal DNA region and further comparison with data from Gen Bank . Were isolated 71 bacteria, 42 epiphytic and 29endophytic, from leaves, stems, roots and bulbs of plants collected from site with waste oil. Among the isolates, 48 strains were identified, the majority being identified only at the genus level, with predominance of *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Stenotrophomonas*. According the literature, the most commom genera identified in this work, showed close relationship with bioremediation processes. The results obtained in this paper demonstrate that the method used for the selective isolation allowed the selection of bacteria groups with potential for bioremediation of environments contaminated with petroleum.

---

**Key words:** microbial diversity, endophytic, epiphytic, ribosomal DNA, bioremediation

## 4.1 Introdução

O desenvolvimento biotecnológico, adquirido a partir do aprimoramento das técnicas de exploração dos recursos naturais, vem destacando a grande importância da biodiversidade (PEIXOTO, ROSADO & TAKETANI, 2008). Este fato tem conduzido à busca de novos organismos com potencial de serem utilizados em produtos nas mais diversas áreas de interesse humano. Fazer a bioprospecção de microrganismos de interesse requer, entretanto, um planejamento focado exatamente no que se pretende isolar.

Atualmente, com o avanço da Biotecnologia Ambiental, o isolamento de populações microbianas com habilidades para modificar ou decompor determinados poluentes, a partir de amostras de ambientes contaminados, tem sido o objetivo de vários estudos (BATISTA, 2002; LAGUILIO *et al.*, 2002; LOBATO, ARAÚJO & MACEDO, 2003; MACIEL, 2003; SILVA *et al.*, 2003a; SOUZA *et al.*, 2004b., JACQUES, 2005a; MARTINEZ, 2006; MARTINS *et al.*, 2007; SANTOS, 2007).

Melo e Azevedo (1997) destacaram que o sucesso de um programa de biorremediação de áreas contaminadas dependerá, em parte, de um bom planejamento inicial sobre isolamento e seleção de um microrganismo ou de um consórcio de microrganismos eficientes na degradação da molécula em estudo. Assim, uma etapa fundamental é selecionar o ambiente para o isolamento, planejando as estratégias e os métodos seletivos para isolar os microrganismos de interesse.

Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticos) (KATAOKA, 2001) e as estratégias de isolamento incluem métodos relativamente simples. Peixoto *et al.* (2008) destacam a possibilidade de cultivo de microrganismos pertencentes a diversos grupos taxonômicos de interesse a partir de amostras ambientais, por meio da utilização de meios de cultura específicos ou enriquecidos, por exemplo, com um determinado composto a ser degradado.

O uso dessas técnicas tradicionais de cultivo tem permitido uma boa amostragem das comunidades microbianas. Há, entretanto a necessidade de que outras técnicas estejam associadas para uma exploração mais abrangente. Atualmente, o desenvolvimento de ferramentas moleculares tem auxiliado de forma significativa a compreensão desses microrganismos, sendo que muitos estudos ambientais tem utilizado técnicas da biologia molecular (WATANABE & BAKER, 2000; COWAN *et al.*, 2005; DIAS, 2007).

Este estudo teve por objetivos isolar em meio seletivo, contendo petróleo, bactérias epifíticas e endofíticas a partir da macrófita aquática amazônica *Eichornia crassipes* coletada na saída dos efluentes da Refinaria de Manaus, e fazer a caracterização genética dos isolados por meio da amplificação e sequenciamento da região do DNA ribossomal 16S.

Assim, pretende-se encontrar mecanismos para futuros processos de biorremediação, a partir da biodiversidade amazônica, potencializando futuramente o poder de ação dos microrganismos promissores encontrados na pesquisa.

## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1 Material biológico e coleta das amostras

Foram utilizadas no presente estudo, amostras da macrófita aquática *Eichornia crassipes* coletadas na saída dos efluentes da refinaria da Petrobrás/Manaus-AM (REMAN) (Figura 1-A) em períodos diferentes: outubro de 2005, julho de 2006 e janeiro de 2008.

Em cada coleta, recolheram-se indivíduos em triplicata, contendo folhas, caules, bulbos e raízes, tendo como critérios de seleção a aparência sadia das plantas, sem sintomas visuais de doenças e sem sinais de ataques de insetos (Figura 1-B). Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno transparentes e levadas para o Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas, onde se procedeu ao isolamento dentro do prazo de oito horas.

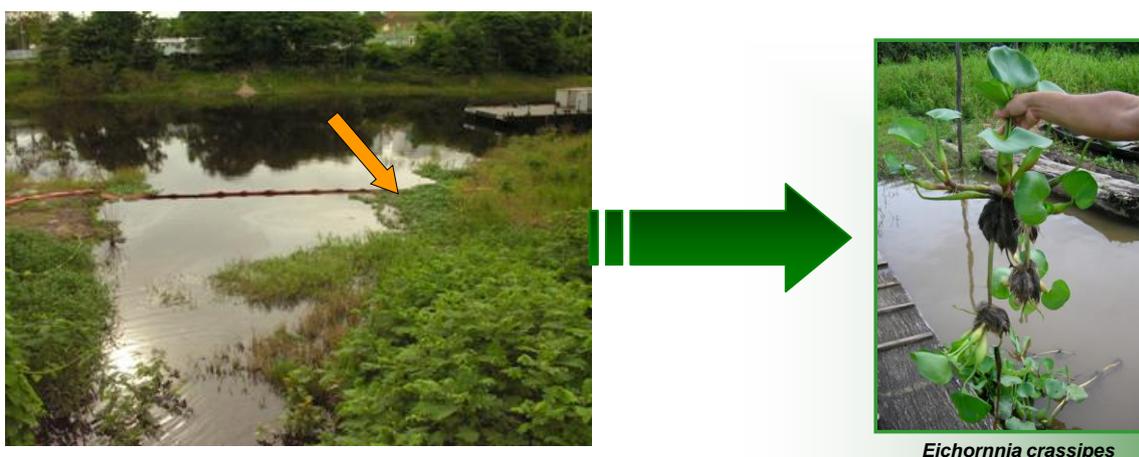


Figura 1: **A**– Saída dos efluentes da Refinaria Isaac Sabá-Manaus/Am. **B**- Amostra da macrófita aquática *EICHORNIA crassipes*

#### 4.2.2 Isolamento seletivo de bactérias epifíticas e endofíticas

Foi realizado o isolamento de bactérias epifíticas e endofíticas segundo a metodologia descrita por Pereira (1993) com adaptações descritas a seguir.

##### 4.2.2.1 Bactérias epifíticas

Foram utilizadas duas técnicas para o isolamento de bactérias epifíticas: **diluição e esfregaço**. Na primeira, após lavagem superficial das plantas, 200 mg de tecidos vegetais (folhas, caules, bulbos e raízes, individualmente) foram colocados em tubos de ensaio contendo solução fisiológica acrescida de 0,1% de Tween 80. Após agitação vigorosa em vortex, a suspensão foi submetida a diluição seriada de até  $10^{-4}$  e 0,1 mL de cada diluição foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio mínimo de sais acrescido de petróleo de Urucu e fungicida. Foram utilizados dois meios minerais com composições diferentes (Tabela 1). As placas foram incubadas em temperaturas de 30°C, onde permaneceram por um período de 3 a 10 dias. Após o crescimento bacteriano, os isolados foram repicados para tubos contendo meio Luria Bertani-LB (Tabela 2) inclinado e novamente incubados para crescimento e identificação. Os isolados também foram repicados e mantidos no mesmo meio seletivo de isolamento.

Na segunda técnica, foi realizado um esfregaço do material vegetal e posterior inoculação no meio específico. Neste procedimento, as folhas coletadas também receberam lavagem superficial em água corrente, sendo a seguir cortadas em um tamanho padrão (5cm x 5cm) com o objetivo de estipular o valor de infecção. Estes fragmentos foram esfregados com o auxílio

de cotonetes esterilizados, que na sequência foram passados em forma de estrias em placas de Petri contendo os meios minerais, acrescido de petróleo e fungicida (Figura 2-A).

**Tabela 1 Meios de cultura acrescido de petróleo <sup>1</sup>**

Meio 1		Meio 2	
Componentes	Quantidade/L	Componentes	Quantidade/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	9 g	Tris(hidroximetil)aminometano (0,1 M)	12,10 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 g	NaCl	23,00 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g	KCl	0,75 g
Extrato de levedura	0,01 g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,47 g
Agar	15 g	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,08 g
		MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,16 g
		NH <sub>4</sub> Cl	3,74 g
		Solução de Sulfato de Ferro (1 g/L)	2,00 mL
		Solução de Fosfato de Sódio (0,1 M)	4,00 mL
Petróleo (Urucu)	5 mL	Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL	Petróleo (Urucu)	5 mL
Fungicida pH 7,30 pH	2mL	Água destilada	1000 mL
		Fungicida pH 7,30 pH	2mL

**Fonte:** Meio 1 – NEDER (1992); Meio 2 – RAMBELOARISOA *et al.* (1984).

**Tabela 2- Meio Luria Bertani (LB)**

Componentes	Quantidade /L
Peptona bacteriológica	10 g
NaCl	5 g
Extrato de levedura	10 g
Ágar	16 g
Água destilada	1000 mL
PH 7,50	

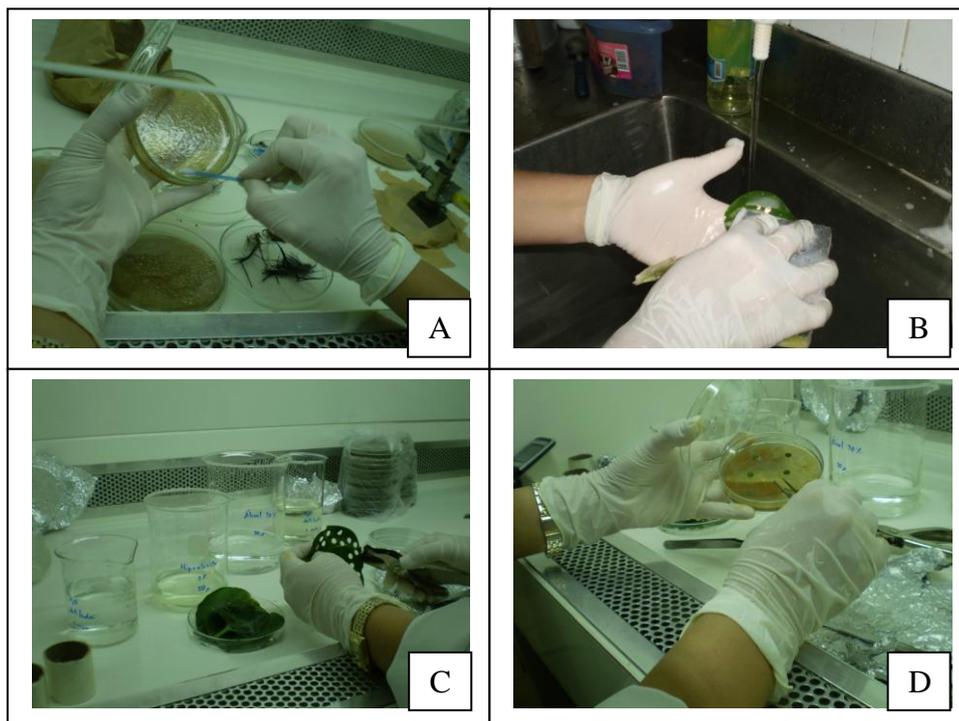
**Fonte:** NEDER (1992).

<sup>1</sup> Com exceção do Petróleo, o meio foi autoclavado antes das inoculações. A esterilização do Petróleo foi feita em filtro millipore 2,2 µm.

#### 4.2.2.2 Bactérias endofíticas

Inicialmente foi feita a desinfecção superficial dos tecidos vegetais, para retirada da microbiota externa. Lavou-se com água corrente e detergente neutro com o auxílio de uma esponja de plástico nova (Figura 2-B). Em câmara de fluxo laminar o material foi mergulhado em álcool a 70% por 1 minuto, sendo a seguir introduzido em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 1 minuto. Logo após os tecidos foram lavados novamente em solução de álcool 70% por 30 segundos para retirada do excesso de cloro da superfície. Para a retirada de todo o restante das soluções, o material foi lavado três vezes com água destilada esterilizada. Como controle, a água de lavagem foi inoculada em placas de Petri contendo os meios de cultura para o isolamento (Tabela 1).

Após passar pelo processo de descontaminação superficial, o material foi cortado em fragmentos de 5 a 7 mm com o auxílio de um furador de papel estéril (Figura 2-C). Estes foram dispostos em placas com meios seletivos (Tabela 1), em duas linhas, sendo que cada uma com três fragmentos (Figura 2-D). Cada placa foi identificada e depois todas foram postas numa câmara incubadora com temperatura de 30° C, onde permaneceram de um a 10 dias, sendo observadas diariamente para observação do crescimento bacteriano. Nestes casos, as placas foram levadas à câmara asséptica para repicagem dos isolados para tubos de ensaio contendo meio LB e meio seletivo. Esses tubos foram datados e identificados e em seguida guardados em recipientes plásticos à temperatura ambiente.



**Figura 2- Procedimentos para o isolamento de bactérias e epifíticas (A) e endofíticas (B,C e D)**

#### **4.2.2.3 Índice de colonização**

O índice de colonização de epifíticos, no caso da técnica da diluição, foi obtida por meio da fórmula  $I_{cep} = (C/G)100$  onde: G é o peso total dos fragmentos inoculados e C o número de isolados. Para os isolados obtidos pela técnica do esfregaço, o cálculo foi por meio da estimativa por área em  $cm^2$ .

O índice de colonização dos endófitos foi calculado pela razão entre o número total de fragmentos infectados, e o número total de fragmentos inoculados.

#### **4.2.2.4 Caracterização morfológica, purificação e preservação das bactérias isoladas**

As colônias foram submetidas ao processo de purificação por meio de repiques sucessivos em placas de Petri contendo meio LB utilizando a técnica de esgotamento por estrias. A purificação foi verificada pelo método da coloração de GRAM.

As colônias bacterianas purificadas foram repicadas para placa de Petri contendo meio LB. Após o crescimento, as colônias foram raspadas e inseridas em microtubos de 1,5 mL contendo glicerol 30% e mantidas a -20°C.

No momento da preservação, foi realizada a caracterização morfológica de cada colônia, sendo observadas as características cor e consistência, para posterior comparação e análise.

#### **4.2.3 Caracterização genética**

As bactérias isoladas foram submetidas à identificação molecular de acordo com as etapas descritas na sequência.

##### **4.2.3.1 Extração de DNA**

Após purificação das colônias (item 4.2.3.4), foi realizada a extração do DNA genômico segundo o método de Isola *et al.* (1994).

Uma alçada de cada bactéria, individualmente, foi repicada para tubos de ensaio com roscas, contendo 4 mL de meio LB. Foram incubadas a 30° C sob agitação de 120 rpm, durante o período da noite. As células foram coletadas por meio de centrifugação e ressuspensas em 200 µL de solução TEN (Tris 50mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; NaCl 100mM). A seguir

acrescentou-se 20  $\mu\text{L}$  de Lisozima (5mg/mL) e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Acrescentou-se 0,1 V do surfactante SDS a 10% e 10  $\mu\text{L}$  da enzima Proteinase K (10mg/mL) e incubou-se a 37°C por 15 minutos.

Na sequência acrescentou-se 1V de fenol hidratado e após centrifugação foi recuperada a fase aquosa. A esta fase adicionou-se 1V de clorofane (fenol:clorofórmio, v/v) e novamente centrifugou-se e recuperou-se a fase aquosa. Por fim adicionou-se 1V de clorofórmio, procedendo-se novamente à centrifugação e recuperação da fase aquosa. Foi realizada a precipitação das moléculas de ácido nucléico, utilizando-se 0,1 V de NaCl 3M e 2V de etanol a 100%. A ressuspensão do pellet foi realizada em 197  $\mu\text{L}$  de Tampão R (Tris HCl 10 mM, pH 7,5 e EDTA a 1 mM ), acrescido de 3  $\mu\text{L}$  de RNase.

#### **4.2.3.2 Quantificação do DNA**

A concentração do DNA extraído foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% acrescido do corante brometo de etídio. Foram aplicados no gel 2 $\mu\text{L}$  do DNA de cada amostra e 3 $\mu\text{L}$  de tampão 5X. Como padrões para a quantificação, foram utilizadas amostras de DNA com concentrações conhecidas (25, 50, 75, e 100 ng). Para a leitura da quantificação do DNA utilizou-se um fotodocumentador de imagens acoplado a uma fonte de luz ultravioleta (Biotech Image Master VDS modelo FTI-500, da Amersham Pharmacia Biotech).

#### 4.2.3.3 Amplificação do dna pela reação de PCR

O DNA extraído e quantificado foi amplificado utilizando-se um par de iniciadores, os oligonucleotídeos 530 F (5' – TGA CTG ACT GAG TGC CG – 3') e 1492 R (5' – TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT – 3'), utilizados para amplificar a região do DNA responsável pela síntese da região ribossomal 16S. As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, aos quais foram adicionados 11,4 µL de água Milli-Q, 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 µL de mix de dNTPs (2,5 mM), 2,5 µL de Tampão 10X, 1,0 µL de oligonucleotídeos F (5 pmol), 1,0 µL de oligonucleotídeos R (5 pmol), 0,6 de Taq DNA Polimerase (2,5 U/µL) e 3,0 µL do DNA genômico extraído (10 ng/µL) obtendo um volume final de 25 µL. Os tubos foram acondicionados em termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf.

Foi utilizada para a reação de PCR a seguinte programação:

- 1- Etapa inicial de desnaturação: 4 minutos a 94°C;
- 2- Desnaturação: 94°C por um minuto
- 3- Anelamento: 62°C por um minuto
- 4- Extensão 72°C por dois minutos
- 5- Repetição por 35 ciclos itens 2-4
- 6- 72°C por cinco minutos.
- 7- -4° C por infinito

Os produtos finais foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio como corante. Nos poços do gel foram aplicados 5µL do produto da PCR mais 3µL de tampão 5X e como padrão, foi utilizado DNA Ladder 1Kb. A leitura da amplificação do DNA foi realizada por meio da intensidade de fluorescência em fotodocumentador.

Posteriormente foi realizada a comparação do peso molecular do fragmento amplificado com o padrão utilizado.

#### **4.2.3.4 Purificação do produto amplificado**

Foi realizada a purificação do produto amplificado, com o objetivo de eliminar os produtos não incorporados na região de amplificação. Foram utilizadas duas enzimas a Exonuclease (EXO) e a fosfatase alcalina de camarão (SAP). A reação se deu em microtubos de 0,2 mL, onde se acrescentou 0,27  $\mu$ L de EXO, 0,40  $\mu$ L de SAP, 2,33  $\mu$ L de água Milli-Q esterilizada e 10  $\mu$ L do produto da PCR, para um volume final de 13  $\mu$ L. As amostras foram acondicionadas em termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf. O programa utilizado teve o seguinte perfil: 37°C por 30 minutos e 80°C por 15 minutos. Os produtos da PCR purificados foram novamente visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio conforme descrito anteriormente.

#### **4.2.3.5 Precipitação do produto da reação de sequenciamento**

Adicionou-se 1 $\mu$ L de acetato de amônia e 40 $\mu$ L de etanol absoluto ao produto de PCR de sequenciamento purificado. Após seguiu-se agitação em vortex. Incubou-se a mistura por 20 minutos à temperatura ambiente, envolta em papel alumínio. A placa foi centrifugada em centrífuga refrigerada 5804R da Eppendorf, o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 150  $\mu$ L de etanol 70% ao pellet. Realizou-se nova centrifugação, sendo o sobrenadante descartado. A placa foi centrifugada invertida por apenas um *spin*. O DNA foi

ressuspensão em 10 µL de tampão, a placa foi vedada e agitada em vortex, por dois minutos. Em seguida, foi realizada mais uma centrifugação por apenas um *spin*.

#### **4.2.3.6 Eletroforese de sequenciamento**

A decodificação do fragmento amplificado foi realizada em sequenciador automático MegaBase 1000 – DNA Analysis System (Amersham Biosciences – Pharmacia). A eletroforese capilar em gel de poliacrilamida foi realizada com base na tecnologia padrão do fabricante. Para condições de injeção: 3 KV por 80 segundos; condições de corrida: 6 KV por 200 minutos; sob temperatura de 44°C. A incorporação de cada dideoxynucleotídeo marcado com um cromóforo na reação de sequenciamento cíclico foi lida pelo sequenciador automático pela captação da fosforilação.

#### **4.2.3.7 Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas**

Após o término do sequenciamento nucleotídico das amostras, as sequências foram visualizadas por meio do programa Bio Edit e procedeu-se à conferência e edição visual entre as sequências por comparação ao padrão apresentado no cromatograma de cada reação. A sequência foi analisada por similaridade com as depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 4.3 Resultados e discussão

### 4.3.1 Isolamento seletivo de bactérias epifíticas e endofíticas

São relativamente abundantes os estudos sobre macrófitas aquáticas no que se refere à distribuição das espécies, sua abundância, densidade e biomassa, o que tem sido fundamental para revelar importantes aspectos ecológicos que contribuem para sua sobrevivência nos mais variados ecossistemas (ALLI, 1999; CAMARGO *et al.*, 2003; PEDRALLI, 2003; VIANA, 2005, SPINDOLA, 2007). Entretanto são poucos os estudos sobre os microrganismos associados a estas, em específicos aqueles envolvidos em processos de biorremediação. As pesquisas neste sentido situam-se principalmente no contexto dos microrganismos micorrizos (MARINS, 2008).

No presente estudo foram isoladas 71 colônias de bactérias a partir da macrófita aquática *Eichornia crassipes* (Figura 3-A) em meio seletivo. As bactérias epifíticas cresceram em maior proporção do que as endofíticas: 42 epifíticas e 29 endofíticas (Figura 3-B).

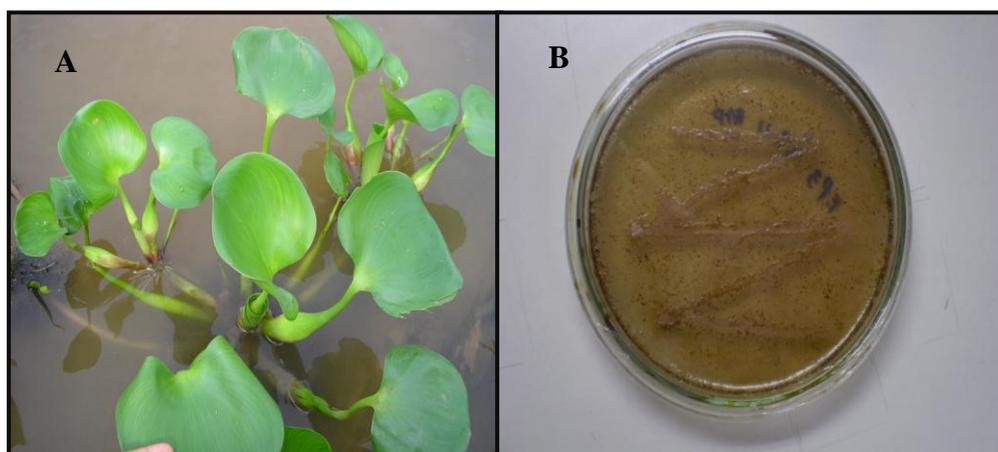


Figura 3. (A) *EICHORNIA crassipes*; (B) bactéria endofítica isolada da folha em meio seletivo.

Em relação aos microrganismos epifíticos, a parte da planta que mais apresentou isolados foi a raiz (Tabela 3). Obteve-se uma maior infecção de endofíticos nas folhas (Tabela 4). Foram obtidos 26 isolados endofíticos a partir das folhas, um a partir do caule e dois da raiz. Entre as bactérias epifíticas, 14 foram isoladas da folha, duas do caule, três do bulbo e 23 da raiz. A técnica da diluição para o isolamento de bactérias epifíticas foi menos eficiente, obtendo 12 isolados, enquanto que a do esfregaço permitiu o isolamento de 30 cepas (Tabela 3).

**Tabela 3- Número e índice de colonização de bactérias epifíticas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes***

Origem	Número de bactérias Epifíticas isoladas		Índice de colonização	
	Diluição	Esfregaço	Diluição %	Esfregaço
Folha	04	10	0,6	0,4 /cm <sup>2</sup>
Bulbo	0	03	0	0,1/cm <sup>2</sup>
Caule	0	02	0	0,07/cm <sup>2</sup>
Raiz	08	15	1,3	0,5/cm <sup>2</sup>
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>30</b>	<b>1,9</b>	<b>1,07/cm<sup>2</sup></b>

**Tabela 4- Número e frequência de isolamento de bactérias endofíticas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes***

Origem	Número de bactérias Endofíticas isoladas	Índice de colonização %
Folha	26	48,1
Bulbo	-	-
Caule	01	1,8
Raiz	02	3,7
<b>TOTAL</b>	<b>29</b>	<b>53,6</b>

A princípio, um número maior de bactérias foi isolado, sendo que, não permaneceram viáveis após repiques sucessivos em meio mineral acrescido de petróleo.

O meio 2 (Tabela 1) mostrou-se mais eficiente para o isolamento das bactérias, determinando um percentual de 78,9% das colônias isoladas,

obviamente por ser um meio mineral mais enriquecido, proporcionando maior fonte de nutrientes para os organismos. Utilizando-se de meio seletivo, contendo sacarose e óleo árabe leve, Krespy *et al.* (2007) conseguiram fazer a triagem e manutenção de consórcios bacterianos isolados de sedimento de mangue contaminado com hidrocarbonetos.

Em isolamentos seletivos, a presença de microrganismos autóctones adaptados às condições específicas da área em estudo tem se revelado significativa. Coneglian *et al.* (2006) destacam que o solo do 'landfarming' apresenta uma população autóctone de microrganismos com capacidade de degradar vários compostos presentes nos resíduos estudados. Jacques (2005a) isolou de solo de *Landfarming* um consórcio composto de seis bactérias. Batista (2002) realizou isolamento seletivo a partir de amostras de ambientes aquáticos e terrestres com histórico de contaminação por petróleo e derivados obtendo 192 microrganismos com características morfológicas diferentes, dentre os quais 185 bactérias. Em estudos com amostras de efluentes petroquímicos em Fortaleza, foi realizado o isolamento e a identificação de três gêneros de bactérias autóctones (BARBOSA *et al.*, 2007).

Diversos autores relatam o isolamento de microrganismos com potencial de degradar hidrocarbonetos de petróleo a partir de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (LEMOS & ARAÚJO, 2002; ABASSI & SHQUIRAT, 2007; COSTA *et al.*, 2007; KREPSKY *et al.*, 2003). Luepromchai *et al.* (2007) descrevem que folhas de tamarindo e outras leguminosas tem sido relatados por conterem vários microrganismos degradadores de HPAs (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos).

Dentre as colônias isoladas, várias apresentam características morfológicas diferenciadas (Tabelas 5 e 6), havendo semelhanças entre as linhagens endofíticas e epifíticas. Observa-se uma maior predominância de bacilos Gram negativos. Em ambientes com histórico de contaminação com petróleo ou derivados, a maior frequência é de populações de bactérias Gram negativas; possivelmente, essa é uma característica das populações que sobrevivem em ambientes inóspitos (BICCA *et al.*, 1999)

**Tabela 5- Características morfológicas de culturas de bactérias epifíticas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes*.**

Cepa	Linhagem	Parte da planta da qual foi isolada	Forma das Células	Características da cultura Cor/consistência	Coloração de Gram
01	EF211	Folha	Bacilos pequenos	Branco amarelada/cremosa	-
02	ER212	Raiz	Bacilos pequenos	Amarelo claro/cremosa	-
03	EF113	Folha	Bacilos	Branco amarelada/cremosa	-
04	ER114	Raiz	Bacilos	Rosa claro/cremosa	+
05	ER215	Raiz	Cocos	Branco amarelada/cremosa	+
06	ER116	Raiz	Diplococos	Rosa claro/cremosa	+
07	ER317	Raiz	Bacilos	Branco amarelada/cremosa	-
08	ER318	Raiz	Bacilos pequenos	Amarelo claro/cremosa	-
09	ER319	Raiz	Cocos	Laranja claro/cremosa	-
10	EF1110	Folha	Bacilos pequenos	Amarelo claro/cremosa	-
11	EF1111	Folha	Bacilos	Branco amarelada/cremosa	-
12	ER1112	Raiz	Bacilos pequenos	Branco amarelada/cremosa	-
13	ER2113	Raiz	Cocos	Branco amarelada/cremosa	-
14	EB1114	Bulbo	Diplococos	Amarelo escuro/cremosa	+
15	ER2115	Raiz	Cocos	Branco amarelada/cremosa	-
16	EF2116	Folha	Diplococos	Creme amarelada/cremosa	+
17	EB1117	Bulbo	Bacilos	Branco amarelada/cremosa	-
18	ER2120	Raiz	Bacilos pequenos	Branco amarelada/cremosa	-
19	EF2121	Folha	Bacilos compridos	Creme esbranquiçada/rugosa	+
20	EF2122	Folha	Bacilos compridos	Creme /rugosa	+
21	ER1123	Raiz	Bacilos pequenos	Creme amarelada/cremosa	-
22	EF2124	Folha	Bacilos pequenos	Amarelo claro/rugosa	-
23	ER1125	Raiz	Bacilos finos	Amarelo escuro/rugosa	-
24	ER1126	Raiz	Diplococos	Rosa claro/cremosa	+
25	ER1127	Raiz	Bacilos	Creme amarelada/cremosa	-
26	EF1129	Folha	Bacilos pequenos	Branco amarelada/cremosa	-
27	ER2130	Raiz	Bacilos pequenos	Bege/cremosa	-
28	ER1133	Raiz	Cocos	Creme amarelada/cremosa	-
29	EF1134	Folha	Diplococos	Bege claro/cremosa	+

30	ER1I35	Raiz	Cocos	Branco amarelada/cremosa	+
31	EF2I36	Folha	Bacilos	Amarelo claro/rugosa	-
32	EB1I37	Bulbo	Bacilos pequenos	Branco amarelada/cremosa	-
33	ER1I39	Raiz	Bacilos	Amarelo escuro/cremosa	-
34	ER2I40	Raiz	Bacilos	Amarelo/ cremosa	+
35	ER2I44	Raiz	Bacilos	Rosa claro/cremosa	-
36	ER2I45	Raiz	Cocos	Creme/cremosa	-
37	EF1I46	Folha	Bacilos	Bege amarelada/cremosa	-
38	EC1I47	Caule	Cocos	Amarelo claro/cremosa	-
39	ER2I48	Raiz	Bacilos	Creme esbranquiçada/cremosa	-
40	EF1I49	Folha	Bacilos	Creme amarelada/cremosa	-
41	EF2I52	Folha	Bacilos compridos	Laranja escuro/cremosa	+
42	EC1I53	Caule	Bacilos	Rosa claro/cremosa	+

**Tabela 6- Características morfológicas de culturas de bactérias endofíticas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes*.**

Cepa	Linhagem	Parte da planta da qual foi isolada	Forma das Células	Características da cultura Cor/consistência	Coloração de Gram
01	EF2I18	Folha	Bacilos	Bege /cremosa	-
02	EF2I19	Folha	Bacilo pequeno	Bege /cremosa	-
03	EF2I28	Folha	Bacilo pequeno	Bege /cremosa	-
04	EF2I38	Folha	Bacilos	Amarelo escuro /cremosa	-
05	EC1I41	Caule	Bacilos	Bege /cremosa	-
06	EF1I42	Folha	Cocos	Amarelo /cremosa	-
07	EF1I43	Folha	Cocos	Rosa claro /cremosa	-
08	EF2I50	Folha	Bacilos pequenos	Amarelo claro/cremosa	-
09	ER2I51	Raiz	Bacilos pequenos	Bege /cremosa	-
10	EF1I31	Raiz	Bacilos pequenos	Amarelo/cremosa	-
11	EF1I32	Folha	Bacilos pequenos	Branco amarelada/cremosa	-
12	EFK1	Folha	Bacilos	Creme amarelada/cremosa	+
13	EFK2	Folha	Bacilos	Amarelo claro/cremosa	+
14	EFK3	Folha	Bacilos	Amarelo claro/cremosa	-
15	EFK4	Folha	Cocos	Brancoamarelada/cremosa	-
16	EFK5	Folha	Cocos	Amarelo claro/cremosa	+
17	EFK6	Folha	Bacilos	Bege claro/cremosa	+
18	EFK7	Folha	Bacilos	Branco amarelada/cremosa	+
19	EFK8	Folha	Bacilos	Bege claro/cremosa	-
20	EFK9	Folha	Bacilos pequenos	Bege/cremosa	-
21	EFK10	Folha	Cocos	Amarela /cremosa	+
22	EFK11	Folha	Bacilos	Amarelo claro/ cremosa	+
23	EFK12	Folha	Bacilos	Amarelo claro/ cremosa	+
24	EFK13	Folha	Bacilos	Bege claro/ cremosa	-
25	EFK14	Folha	Bacilos	Bege claro/ cremosa	-
26	EFK15	Folha	Bacilos	Amarelo Rosado/ cremosa	-
27	EFK16	Folha	Bacilos	Amarelo claro/ cremosa	-
28	EFK17	Folha	Bacilos	Bege /cremosa	+
29	EFK18	Folha	Bacilo	Branco amarelada/rugosa	-

As colônias predominantes apresentaram consistência cremosa e coloração branco amarelada (Figura 4). Todas as colônias foram purificadas em meio LB, e preservadas em glicerol a 30% para estudos posteriores.

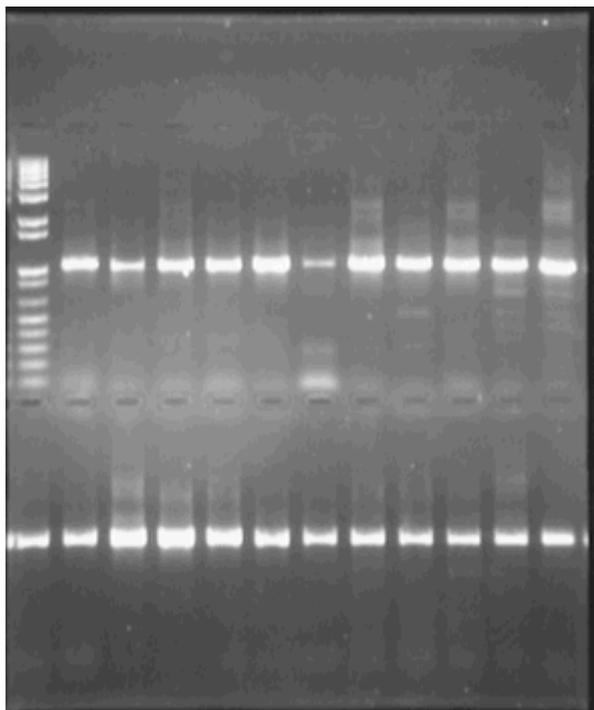


**Figura 4- Colônias de bactérias em meio Luria Bertani (LB).**

### 4.3.2 Caracterização genética

#### 4.3.2.1 Identificação

A técnica de identificação molecular utilizando a amplificação da região ribossomal 16S do DNA bacteriano (Figura 5) permitiu identificar 48 linhagens, havendo entre estas 32 possíveis espécies diferentes (Tabela 7). Os gêneros mais frequentes foram *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Stenotrophomonas sp.*(Figura 6). Entre os isolados identificados o gênero *Acinetobacter sp.* foi o mais representativo, com 16,7% de frequência (Figura 7).



**Figura 5 – Perfil eletroforético em gel de agarose dos rDNA amplificados de bactérias endofíticas e epifíticas isoladas de *Eichhornia crassipes***

**Tabela 7- Identificação preliminar de bactérias isoladas a partir da *Eichornia crassipes* com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA**

<b>EPIFÍTICAS</b>					
<b>Isolado</b>	<b>Organismo mais relacionado<sup>1</sup></b>	<b>Score<sup>2</sup></b>	<b>Valor E<sup>3</sup></b>	<b>Identidade<sup>4</sup></b>	<b>Acesso no Genbank<sup>5</sup></b>
EF2I1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	488	7e-135	98%	<a href="#">FJ550344.1</a>
ER2I2	<i>Acinetobacter junii</i>	542	4e-151	98%	<a href="#">FJ392119.1</a>
EF1I3	<i>Citrobacter farmeri</i>	553	1e-153	95%	<a href="#">AM937453.1</a>
ER1I4	<i>Artrobacter sp</i>	342	2e-90	74%	<a href="#">AY641537.1</a>
ER2I5	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	352	3e-94	99%	<a href="#">FJ200403.1</a>
ER1I6	<i>Rhodococcus equi</i>	502	3e-139	99%	<a href="#">FJ468344.1</a>
ER3I7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95.1	1e-17	100%	<a href="#">FJ823152.1</a>
ER3I9	<i>Pseudoxanthomonas sp</i>	457	1e-125	99%	<a href="#">EF219047.1</a>
EF1I11	<i>Pseudomonas sp.</i>	241	7e-61	97%	<a href="#">FJ013261.1</a>
ER1I12	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	89.7	7e-16	100%	<a href="#">FJ811876.1</a>
EB1I14	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	583	2e-163	99%	<a href="#">FJ459994.1</a>
ER2I15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	482	3e-133	99%	<a href="#">FJ232613.1</a>
EF2I16	<i>Rhodococcus sp.</i>	342	4e-91	99%	<a href="#">AY429711.1</a>
EB1I17	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	645	0	99%	<a href="#">FJ459994.1</a>
EF2I21	<i>Bacillus cereus</i>	1104	0	98%	<a href="#">EU741099.1</a>
EF2I22	<i>Bacillus cereus</i>	610	1e-171	98%	<a href="#">EU400647.1</a>
EF2I24	<i>Bacillus sp.</i>	475	4e-131	99%	<a href="#">EU597103.1</a>
ER1I25	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98.7	2e-16	85%	<a href="#">AF390081.1</a>
ER1I27	<i>Chryseobacterium sp</i>	405	5e-110	98%	<a href="#">AM988902.1</a>
EF1I29	<i>Uncultured Klebsiella sp.</i>	396	3e-107	98%	<a href="#">GQ418156.1</a>
ER2I30	<i>Klebsiella sp.</i>	446	3e-122	99%	<a href="#">FJ238518.1</a>
EF2I36	<i>Acinetobacter sp.</i>	571	9e-160	99%	<a href="#">FJ755816.1</a>
EB1I37	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	980	0	98%	<a href="#">FM210755.1</a>
ER1I39	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	542	4e-151	99%	<a href="#">FJ418580.1</a>
ER2I40	<i>Curtobacterium sp.</i>	389	4e-105	99%	<a href="#">FJ654468.1</a>
ER2I44	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	343	2e-91	92%	<a href="#">AF530072.1</a>
ER2I45	<i>Kluyvera ascorbata</i>	403	2e-109	98%	<a href="#">AM933755.1</a>
EF1I46	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1011	0	99%	<a href="#">EU239149.1</a>
EC1I47	<i>Acinetobacter sp.</i>	520	1e-144	99%	<a href="#">FJ719330.1</a>
ER2I48	<i>Enterobacter sp.</i>	1216	0	99%	<a href="#">EU430751.1</a>
EF1I49	<i>Acinetobacter sp.</i>	304	1e-79	98%	<a href="#">FJ755816.1</a>
EF2I52	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	37.4	8.6	92%	<a href="#">CP001001.1</a>
EC1I53	<i>Bacillus subtilis</i>	886	0	98%	<a href="#">DQ071266.1</a>

### ENDOFÍTICAS

Isolado	Organismo mais relacionado <sup>1</sup>	Score <sup>2</sup>	Valor E <sup>3</sup>	Identidade <sup>4</sup>	Acesso no Genbank <sup>5</sup>
EF2118	<i>Citrobacter sp</i>	77.0	4e-10	86%	<a href="#">FM995511.1</a>
EF2119	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	688	0	98%	<a href="#">AJ131909.1</a>
EF2128	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	111	2e-22	100%	<a href="#">FJ748682.1</a>
EF1131	<i>Pantoea dispersa</i>	433	1e-131	99%	<a href="#">FJ232613.1</a>
EF1132	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	542	4e-151	98%	<a href="#">FJ748674.1</a>
EF2138	<i>Pseudomonas sp.</i>	554	0.001	76%	<a href="#">EU285592.1</a>
EC1141	<i>Herbaspirillum sp</i>	459	3e-126	99%	<a href="#">FJ719355.1</a>
EF1142	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	618	7e-174	99%	<a href="#">FJ748674.1</a>
EF1143	<i>Pseudomonas sp.</i>	663	0	96%	<a href="#">AF039488.1</a>
EF2150	<i>Uncultured Klebsiella sp.</i>	339	4e-90	97%	<a href="#">GQ418156.1</a>
ER2151	<i>Enterobacter sp.</i>	477	1E-131	98%	<a href="#">FJ596544.1</a>
EFK4	<i>Alcaligenes sp.</i>	289	2e-75	98%	<a href="#">FJ842652.1</a>
EFK5	<i>Bacillus sp.</i>	1157	0	100%	<a href="#">EF188283.1</a>
EFK6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	589	3e-165	99%	<a href="#">FJ550344.1</a>
EFK7	<i>Uncultured Burkholderia sp.</i>	199	2e-48	97%	<a href="#">EF600618.1</a>

Análise baseada na identidade de seqüências do gene 16S rDNA com seqüências do banco de dados do Genbank.

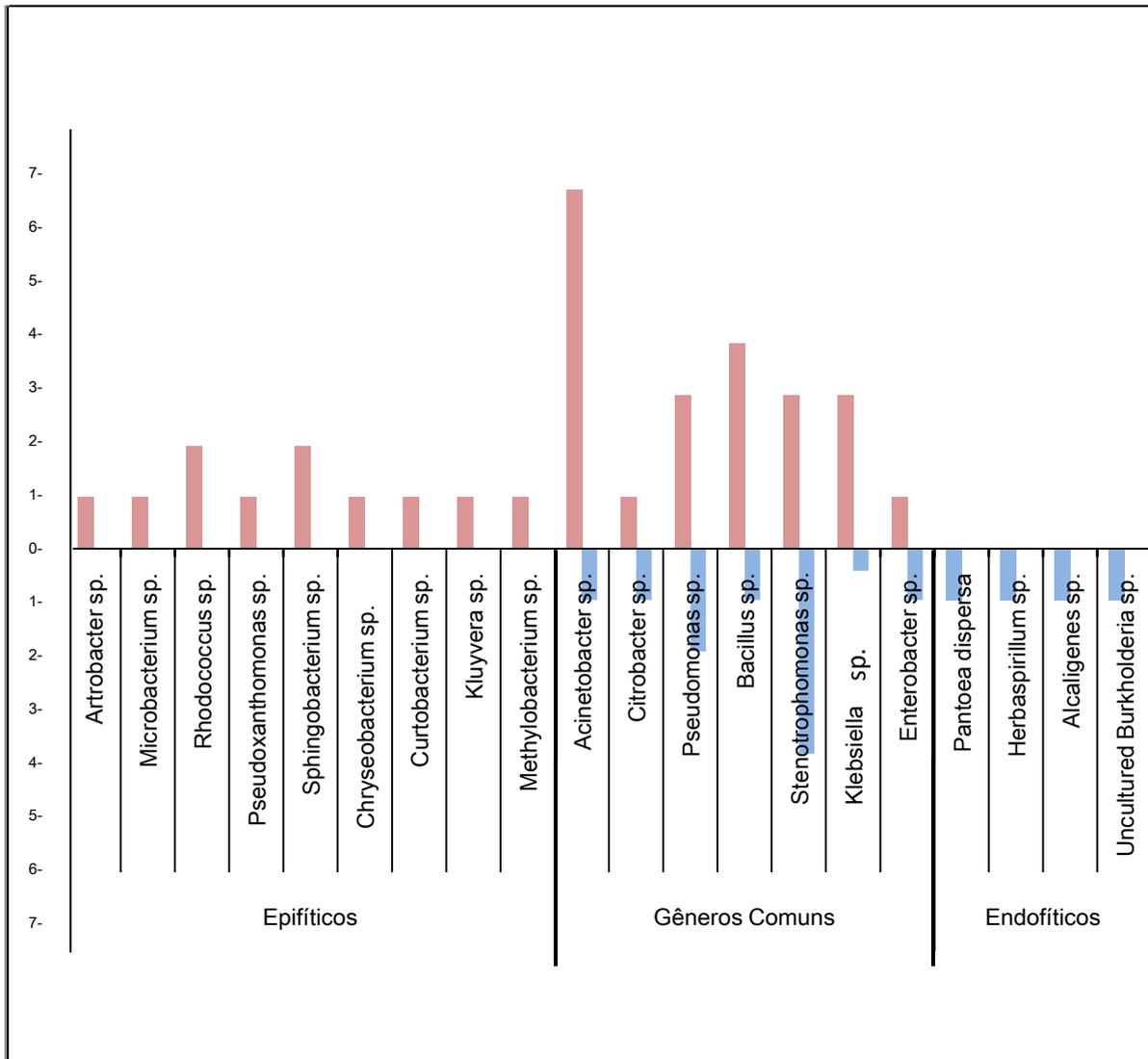
- 1- **Organismo mais relacionado:** organismo que possui a seqüência com a qual a seqüência parcial do gene 16S rDNA do isolado apresentou maior homologia.
- 2- **Score:** pontuação do alinhamento.
- 3- **Valor E:** probabilidade de se encontrar aleatoriamente o mesmo alinhamento entre duas seqüências.
- 4- **Identidade:** porcentagem de identidade entre a seqüência do isolado e o organismo relacionado.
- 5- **Acesso no GenBank:** número de acesso da seqüência do organismo relacionado.

Adaptado de: MAGNANI, 2005

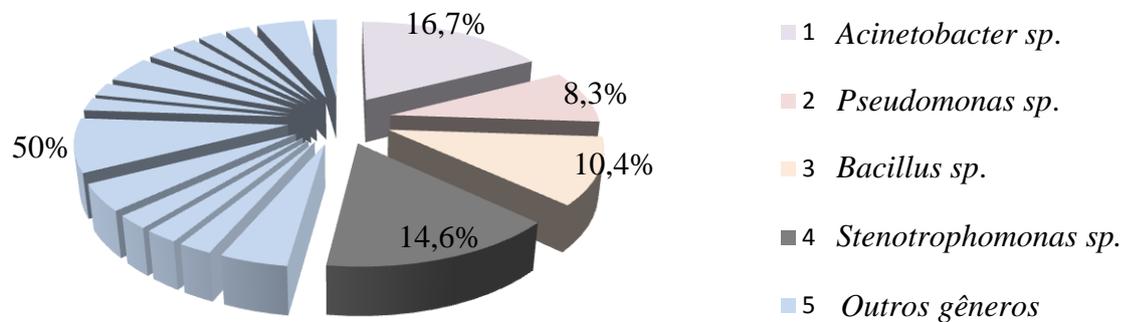
Alguns gêneros foram exclusivos de epifíticos ou de endofíticos, entretanto houve um significativo número de gêneros encontrados nos dois ambientes (Tabela 8).

**Tabela 8- Gêneros exclusivos e comuns das bactérias epifíticas e endofíticas isoladas**

	Gêneros exclusivos epifíticos	Gêneros exclusivos endofíticos	Gêneros comuns
01	<i>Artrobacter sp</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>
02	<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Herbaspirillum sp</i>	<i>Citrobacter sp</i>
03	<i>Rhodococcus sp.</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
04	<i>Pseudoxanthomonas sp</i>	<i>Uncultured Burkholderia sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>
02	<i>Sphingobacterium sp.</i>		<i>Klebsiella sp.</i>
03	<i>Chryseobacterium sp.</i>		<i>Stenotrophomonas sp.</i>
04	<i>Curtobacterium sp.</i>		<i>Enterobacter sp.</i>
05	<i>Kluyvera sp</i>		
06	<i>Methylobacterium sp.</i>		



**Figura 6- Gêneros de bactérias isoladas da macrófita *Eichornia crassipes* identificadas por técnicas moleculares**



**Figura 7- Frequência dos quatro gêneros mais representativos de bactérias identificadas**

### 4.3.2.2 Principais gêneros de bactérias isolados: relação e importância com processos de biorremediação

#### 4.3.2.2.1 *Acinetobacter sp.*

O gênero *Acinetobacter sp.* foi o mais representativo com 16,7%, principalmente entre os epifíticos. Como endófito apareceu apenas uma vez, tendo 99% de similaridade com sequências da região do DNA ribossomal 16S da espécie *Acinetobacter baumannii*. Esse gênero, entre os epifitos, apresentou o mesmo índice de similaridade com várias espécies de *Acinetobacter*, aparecendo com maior frequência *Acinetobacter baumannii* (98%), *Acinetobacter junii* (98%), *Acinetobacter iwoffii* (100%) e *Acinetobacter calcoaceticus* (98%) (Tabela 5).

Esse gênero é bastante heterogêneo, sendo encontrado no solo, água e organismos vivos. Uma importante característica de muitas linhagens desse gênero é a capacidade de utilizar uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e energia e de crescimento em meios relativamente simples (ABDEL-EL-HALEEM, 2003).

Vários estudos têm destacado o potencial degradador de bactérias do gênero *Acinetobacter sp.* Roque & Melo (2000) realizando isolamentos a partir de solos com histórico de contaminação pelo herbicida Diuron, comprovaram a ação degradadora da espécie *Acinetobacter baumannii* no referido herbicida. Smith-Greiner & Adkins (1996) demonstraram que a bactéria *Acinetobacter baumannii* possui capacidade para crescer e utilizar o herbicida diclofopmethyl como fonte de carbono e energia. Em estudo sobre degradação de compostos fenólicos, isolou-se esse gênero a partir de lodo de lagoa de

decantação de Estação de Tratamento de efluentes de Usina de Açúcar e álcool, comprovando-se também seu potencial degradador (SANTOS, 2007).

Apresenta importante desempenho na produção de biossurfactantes (DESAI & BANAT, 1997; NITSCHKE & PASTORE, 2002; COLLA & COSTA, 2003; MATSUURA, 2004; JACQUES, 2005a; PIRÔLLO, 2006; BARBOSA, CAMINHA & PAZ, 2007; DIAS, 2007; MEIRA, 2007). Como a produção de surfactantes é fundamental para a biodegradação de compostos lipídicos, verificamos a importância deste gênero para processos de biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados. Como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo, destacam-se os estudos realizados por Leahy & Colwell (1990), Al-Hadhrami *et al.* (1995), Venkateswaram e Harayama (1995), Cravo Jr. (1998), Hanson *et al.* (1997), Del'Arco (1999), Maciel (2003), Silva (2007).

O gênero *Acinetobacter sp.* apresenta-se como um importante degradador dos hidrocarbonetos naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e criseno (SILVA, 2007).

#### **4.3.2.2.2 *Pseudomonas sp.***

O gênero *Pseudomonas sp* foi isolado como endófito e como epífita. Como este último, apresentou índice de similaridade de 100% com a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Outro isolado apresentou índice de 92% com *Pseudomonas citroneolllis*. Como endofítico não foi possível classificar em nível de espécie.

Este gênero inclui uma variedade de espécies com ampla diversidade metabólica. A maioria dos membros do gênero *Pseudomonas sp.*

encontra-se no solo e água e tem grande capacidade de crescimento em ambientes com condições extremas, utilizando diferentes fontes de carbono. Os registros mostram seu frequente isolamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (OLIVEIRA, 2001). Já foi isolado de solos com altos níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e teve seu potencial de degradação destes compostos comprovados por várias pesquisas (BENINCASA *et al.*, 2002; MUTNURI *et al.*, 2005; JACQUES, 2005a; JACQUES *et al.*, 2005b).

Oliveira (2001) realizou estudo com consórcio microbiano, incluindo *Pseudomonas sp.* obtendo sucesso nos processos de degradação de hidrocarbonetos lineares e policíclicos aromáticos.

Se destaca como degradador dos hidrocarbonetos naftaleno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo (a) antraceno, dibenzo (a,h) antraceno (SILVA, 2007). Mariano (2006) relata que estudos com *Pseudomonas putida* identificaram vias metabólicas dedicadas aos componentes benzeno, tolueno e p-xileno.

Destaca-se ainda como produtor de biossurfactantes, principalmente ramnolipídeos, com ênfase para *Pseudomonas aeruginosa* (DESAI & BANAT, 1997; ZHANG *et al.*, 1997; KOSARIC, 2001; SANTA ANNA *et al.*, 2002; MATSUURA, 2004). O estudo de Piróllo (2006) demonstrou a capacidade de *Pseudomonas aeruginosa* se desenvolver e produzir biossurfactante em querosene, óleo diesel, petróleo e borra oleosa.

#### 4.3.2.2.3 *Bacillus sp.*

*Bacillus sp.* é um dos gêneros mais frequentes, tanto como epifíticos quanto como endofíticos. Dois isolados epifíticos puderam ser classificados em nível de espécie como *Bacillus cereus*, com 98% de similaridade e um como *Bacillus subtilis* também com 98% de similaridade.

Organismos deste gênero também são descritos por diversos autores como importantes degradadores de diversos compostos tóxicos. Santos (2007) descreve que linhagens microbianas, entre as quais se inclui o gênero *Bacillus*, cresceram em meio contendo ácido tânico e ácido gálico, sendo capazes de degradar ainda compostos fenólicos naturais como catecol ou catequina. Silva (2007) apresenta a atuação do *Bacillus cereus* como degradador do hidrocarboneto naftaleno. Destaca ainda o gênero como degradador de fenantreno, criseno e benzo (a) antraceno. As espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* destacam-se como promissores produtores de biossurfactantes, como a surfactina, um excelente redutor de tensão superficial da água (DESAI & BANAT, 1997; MATSUURA, 2004)

Jacques (2005a) isolou de solo de *Landfarming* consórcio microbiano, do qual fazia parte a espécie *Bacillus cereus*. Este consórcio demonstrou alta eficiência na degradação de hidrocarbonetos de petróleo no solo.

Moran *et al.* (2000) destacam que algumas vezes a degradação de hidrocarbonetos complexos deve-se à adição de biossurfactantes produzidos por este gênero.

#### 4.3.2.2.4 *Stenotrophomonas sp.*

*Stenotrophomonas sp* foi isolada neste estudo com predominância entre os endofíticos. Vários estudos relatam sua presença como endofíticos (VEGA *et al.*, 2005; TEIXEIRA, 2004, LACAVA, 2007). Foi possível em alguns isolados, com índices de similaridade entre 85% e 99%, identificar a espécie *Stenotrophomonas maltophilia*.

Tem sido relatada a ação do gênero *Stenotrophomonas sp.* na degradação de compostos policíclicos aromático (JACQUES, BENTO & CAMARGO, 2007). BOONCHAN *et al.* (2000) com o objetivo de avaliar a degradação e a mineralização de HAPs pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, pelo fungo *Penicillium janthinellum* e pelo consórcio resultante da inoculação conjunta destes dois microrganismos demonstrou que em presença de benzo(a)pireno, nenhum cresceu isoladamente. Entretanto como consórcio houve crescimento de ambos e degradação de 59% do HAP no meio de cultura mineral, assim como mineralização dos compostos.

#### 4.3.2.2.5 Outros gêneros identificados

Linhagens epifíticas e endofíticas apresentaram índice de similaridade de 97% a 99% com uma espécie do gênero *Klebsiella*, o qual aparece em alguns estudos sobre biodegradação. A espécie identificada *Klebsiella pneumoniae*, é descrita como o mais importante membro do gênero e tem grande importância médica. A espécie mais relatada em trabalhos sobre biorremediação é *Klebsiella cepacia* (MARIANO, 2006), entretanto encontra-se referências sobre *Klebsiella pneumoniae* em trabalhos como o de Martins *et al.* (2007) que apresenta um estudo sobre seleção de microrganismos

degradadores do herbicida S-Metolachlor. O gênero *Klebsiella* também foi encontrado em isolamento feito a partir de efluentes de usina de açúcar (SANTOS, 2007).

Outros dois gêneros também foram encontrados tanto em linhagens epifíticas quanto endofíticas: *Citrobacter* e *Enterobacter*, ambos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Santos (2007) descreve espécies do gênero *Enterobacter* como degradadores de taninos. Estudos também comprovam a produção de biossurfactantes por este gênero (COLLA & COSTA, 2003). O gênero *Citrobacter* é citado entre os gêneros isolados de bagaço de cana e seu percolado e utilizados para a degradação de resíduos sólidos agrícolas (SILVA, 2008).

Gêneros exclusivos dos endofíticos: *Pantoea*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, destacam-se em estudos sobre processos de biorremediação. O gênero *Pantoea* é descrito em artigo sobre bactérias utilizadas no tratamento de efluentes de indústria de laticínios, mais especificamente *Pantoea agglomerans* (LAGUILIO *et al.*, 2002), espécie que também se destaca na produção de biossurfactantes (MATSUURA, 2004). Na presente pesquisa apresentou 99% de similaridade com a espécie *Pantoea dispersa*, capaz de desintoxicar o princípio tóxico e o fator de patogenicidade do patógeno de plantas *Xanthomonas albilineans*, as albidinas (ROSA JR. & SOUZA, 2007). Foi isolada uma espécie do gênero *Alcaligenes*, a *Alcaligenes faecalis*, degradadora de fenol, em solo da Amazônia (BASTOS *et al.*, 2002). Também há registros deste gênero com crescimento significativo em naftaleno e antraceno (ASHOK *et al.*, 1995). Em relação ao gênero *Burkholderia* vários registros apontam seu potencial para uso na biorremediação (VIEIRA *et al.*,

2006; SILVA, 2007 ). Não foram encontrados registros de estudos com o gênero *Herbaspirillum* como potencial agente biorremediador.

Dentre os gêneros encontrados apenas entre os epifíticos neste estudo, destacam-se *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudoxanthomonas* e *Methylobacterium*.

As bactérias do gênero *Arthrobacter* são habitantes comuns do solo, exercendo várias funções importantes na área da remoção de produtos químicos. Em estudo recente descobriu-se que várias espécies de *Arthrobacter* podem reduzir o cromo hexavalente, substância extremamente tóxica para o ambiente e para o ser humano (QUINTELAS, 2007). É produtor de um biossurfactante do tipo glicolípido (MATSUURA, 2004). Procópio et al (2008) descreve ainda a produção do surfactante artrofactina, da classe dos lipopeptídeos, pela espécie *Arthrobacter oxydans*. Este surfactante apresenta importante potencial para a recuperação de ambientes contaminados por petróleo, entre outras aplicações.

Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos pertencentes ao gênero *Microbacterium* foram isoladas em estudos anteriores como o de Jacques (2005a). Este autor destaca que o envolvimento das bactérias do gênero *Microbacterium* pode ser evidenciada pelas novas espécies identificadas denominadas de *M. oleivoram* e *M. oxydans*.

A produção de biossurfactantes por duas espécies do gênero *Rhodococcus*, *Rhodococcus rubber* e *Rhodococcus erythropolis* foi avaliada por Bicca, Fleck & Ayub (1999). Este trabalho demonstrou promissor potencial das cepas para uso em processos de biorremediação. A espécie *Rhodococcus*

*equi* demonstrou capacidade de degradar o herbicida hexazinona (MOSTAFA & HELLING, 2003).

Nakatani *et al.* (2008) isolaram da rizosfera de plantas de ocorrência espontânea em solo de sistema de “landfarming” de resíduos petroquímicos, bactérias degradadoras de antraceno que apresentaram relação filogenética com os gêneros *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Arthrobacter*, *Pseudoxanthomonas* e com gêneros não identificados das famílias Cellulomonadaceae, Xanthomonadaceae e Rhodobacteraceae.

Bactérias degradadoras de sulfentrazone foram identificadas, entre outras espécies, como *Methylobacterium radiotolerans* (MARTINEZ, 2006). Mostafa & Helling (2003) demonstraram que as linhagens *Methylobacterium organophilum* e *Methylobacterium radiotolerans* apresentaram capacidade de degradar o herbicida tebutiuron.

#### 4.4 Conclusões

- ✚ O isolamento de bactérias associadas a plantas coletadas em regiões com histórico de contaminação é uma importante técnica para obtenção de microrganismos com capacidade para biorremediação;
  
  - ✚ Os métodos utilizados para o isolamento seletivo de bactérias com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo mostraram-se eficientes, considerando o número de linhagens bacterianas isoladas e a relação entre os principais gêneros identificados com processos de biorremediação;
  
  - ✚ A comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no Gen Bank permitiu fazer inferências sobre as possíveis espécies isoladas. Assim, entre as 71 colônias de bactérias isoladas, foram identificados de forma preliminar 20 gêneros diferentes, sendo sete comuns a endofíticos e epifíticos.
-

## **CAPÍTULO V**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO E DO  
CRESCIMENTO CELULAR EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
*EICHORNIA CRASSIPES* NA AMAZÔNIA**

**MANAUS-AM  
2009**

---

---

## RESUMO

---

No processo de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo existe uma relação direta entre a degradação destes compostos e a produção de biossurfactantes. Estas moléculas têm despertado grande interesse comercial pelo menor custo e maior eficiência do que os surfactantes sintéticos. Na obtenção de microrganismos com capacidade para modificar ou decompor determinada substância, torna-se importante avaliar o crescimento do organismo em meio seletivo, pois este crescimento indica o consumo do substrato ou sua alteração para compostos secundários, com possível produção de biossurfactantes. Os compostos secundários podem apresentar em alguns casos características mais tóxicas do que os compostos originais. Neste estudo foi verificado o potencial para a produção de biossurfactantes por meio da avaliação da atividade de emulsificação em cepas bacterianas isoladas em meio seletivo a partir da macrófita aquática amazônica *Eichornia crassipes* e selecionadas aquelas com maior potencial. O crescimento de cepas foi avaliado em meio mineral com mistura de hidrocarbonetos e em meio mineral com petróleo bruto. O índice de toxicidade foi avaliado nos extratos dos meios com mistura de hidrocarbonetos das cinco cepas que apresentaram melhor crescimento. No meio com petróleo bruto verificou-se melhor crescimento bacteriano, destacando-se a cepa *Stenotrophomonas sp.* que atingiu cerca de  $13,4 \times 10^6$  UFCs/mL. O crescimento bacteriano nos meios utilizados indicou a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo, considerando que estes eram a única fonte de carbono. As cepas que demonstraram melhores resultados foram *Stenotrophomonas sp.*, *Uncultured Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Acinetobacter baumannii*. Destacaram-se na produção de biossurfactantes as cepas *Stenotrophomonas sp.* e *Methylobacterium radiotolerans*, com melhores resultados no meio com petróleo. Os índices de toxicidade mostraram melhores resultados nos extratos do crescimento bacteriano em comparação aos extratos controles. Assim, considera-se que as cepas estudadas apresentam importante potencial como produtoras de biossurfactantes e para uso em processos de biorremediação.

---

**Palavras-chave:** toxicidade, biorremediação, petróleo

---

## ABSTRACT

---

In the hydrocarbon oil biodegradation there is a direct relationship between the degradation of these compounds and the production of biosurfactants. These molecules have attracted much commercial interest at the lower cost and higher efficiency than the synthetic surfactants. To obtain microorganisms with the ability to modify or decompose a substance, it is important to assess the growth of the organism in selective medium, as this indicates the consumption of the substrate or the change for secondary compounds, with possible production of biosurfactants. The secondary compounds may have characteristics in some cases more toxic than the original compound. This study verified the potential to produce biosurfactants by the emulsification activity on selective medium with bacteria isolated from *Eichornia crassipes* and selected those with the greatest potential. The strains growth was assessed on mineral culture media, added with hydrocarbons and added with crude oil. The rate of toxicity was evaluated in extracts with mixture of hydrocarbon resources with the strains that showed the best growth. With crude oil in the middle there was better bacterial growth, especially the strain *Stenotrophomonas sp.* reaching around  $13.4 \times 10^6$  UFCs / mL. The methods used in bacterial growth indicated the degradation of petroleum hydrocarbons, whereas they were the sole source of carbon. The strains that showed better results were *Stenotrophomonas sp.*, *Uncultured Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* and *Acinetobacter baumannii*. The strains *Stenotrophomonas sp* and *Methylobacterium radiotolerans* stood out in the surfactants production with better results in the medium with oil. The indices of toxicity showed better results in extracts of bacterial growth compared to control extracts. Thus, it is considered that the strains studied have significant potential as producers of biosurfactants and for use in bioremediation processes.

---

**Key words:** toxicity, bioremediation, oil

## 5.1 Introdução

Compostos com propriedades surfactantes/ emulsificantes, com ação intra ou extracelular são sintetizados por uma grande variedade de organismos vivos, sendo denominados biossurfactantes quando produzidos por microrganismos (BENTO *et al.*, 2008). Estão diretamente envolvidos na remoção de petróleo e derivados do ambiente, sendo produzidos por diferentes linhagens de fungos e bactérias (BICCA *et al.*, 1999).

Silva *et al.* (2003b) destacam que os biossurfactantes são produzidos, majoritariamente, por bactérias aeróbias em meio de cultura líquida e possuem atividade intra ou extracelular. Afirmam ainda que devido às propriedades físico-químicas, os biossurfactantes são melhores que os surfactantes sintéticos para aplicação na indústria de petróleo, pois os sintéticos, disponíveis no mercado, podem levar à depleção da vida, trazendo perdas na biodiversidade e características físico-químicas ambientais. Assim, os biossurfactantes têm sido reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos, sendo considerados com características superiores aos sintéticos na indústria petrolífera e de óleos (ROCHA *et al.*, 1992; MULLIGAN, 2005).

A busca de cepas bacterianas produtoras de surfactantes visa o emprego potencial destas substâncias em alimentos e indústrias têxteis, restauração ambiental e recuperação de óleos em poços de petróleo, solo e sedimento (SILVA *et al.*, 2003b). O potencial de aplicação dos biossurfactantes baseia-se em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, demulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial (COLLA & COSTA, 2003). Essas propriedades são aplicadas na agricultura, na

construção civil, em indústrias de alimentos, papel, metal, têxteis e farmacêuticas, apresentando seu maior potencial de aplicação na indústria petrolífera, principalmente na limpeza de tanques, na recuperação melhorada de petróleo e em casos de biorremediação, como em derramamentos de óleos em ecossistemas aquáticos (COLLA & COSTA, 2003).

Surfactantes são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, sendo capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (COLLA & COSTA, 2003).

Batista (2002) afirma que os surfactantes microbianos são moléculas complexas e compreendem compostos de uma grande variedade de classes químicas, incluindo os peptídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos, glicolipídeos e lipopeptídeos (Tabela 6).

Bento *et al.* (2008) destacam que várias espécies de microrganismos são reconhecidas por produzirem vários tipos de biossurfactantes. Citam alguns disponíveis comercialmente: surfactina, produzida pelo *Bacillus subtilis*, o emulsan produzido pelo *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1, e um ramnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 1 Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos

	BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO
GLICOLIPÍDIOS	Micolatos de Trealose	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i>
	Ésteres de trealose	<i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Micromonospora</i> sp. <i>Mycobacterium paraffinicum</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Micolados de mono-di e trissacarídeos	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Arthrobacter</i> sp.
	Raminolipídios	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Torulopsis bombicola</i>
	Soforolipídios	<i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Candida</i> sp.
FOSFOLIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS	Fosfolipídios e ácidos Graxos	<i>Candida</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp.
	Ácidos graxos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus</i> sp.
LIPOPEPTÍDIOS	Lipopeptídios e lipoproteínas	<i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
POLIMÉRICOS	Lipopolissacarídeos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Heteropolissacarídeos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A1

Fonte: Adaptado de ANNA (2000) *apud* COLLA & COSTA (2003)

Pela grande variedade de aplicações dos biossurfactantes, pelo reconhecido potencial industrial e inúmeras aplicações biotecnológicas, tem-se nesta área de investigação, um desafio relacionado à prospecção de espécies produtoras, assim como dos métodos de análise, extração, purificação e otimização desta produção.

O crescimento bacteriano em meio mineral com hidrocarbonetos de petróleo apresenta relação direta com a degradação destes compostos e com a produção de biossurfactantes. Apesar de bactérias se desenvolverem bem em meios sólidos, os estudos de crescimento são feitos essencialmente em meios líquidos. Nestes estudos é possível avaliar se um meio ou os compostos presentes neles são favoráveis ao crescimento de determinada cepa, como realizou Vanzo *et al.* (2001) em pesquisas com as cepas *P. aeruginosa* e *S. aureos*.

Outro aspecto a se considerar é a toxicidade dos produtos e/ou subprodutos do meio, já existentes ou até mesmo gerados pelas bactérias inoculadas. A toxicidade é a resposta biológica de um organismo quando exposto a um agente estressante, potencialmente tóxico, em determinadas concentrações e durante certos períodos de tempo. Dias (2007) descreve que os testes de toxicidade, têm como objetivo avaliar propriedades tóxicas destas substâncias em determinado grupo ou quantidade de organismos. Destaca ainda o teste de toxicidade aguda que avalia respostas severas e rápidas de um organismo vivo frente à determinada substância, sendo avaliada num intervalo que varia de 0 a 96 horas.

Schvartsman (1991) ressalta que a exposição a um agente tóxico pode ser aguda, quando a dose letal do tóxico é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em doses subletais, durante um período de tempo. O objetivo dos testes de toxicidade é determinar a Concentração Letal Média (CL50), isto é, aquela em que metade dos indivíduos morre depois de determinado tempo de exposição ao agente tóxico (FERREIRA, 2003).

O uso de espécies com crescimento rápido e baixa reserva de energia, como sementes de alface é o procedimento recomendado devido ao fato de poder-se avaliar a germinação e/ou crescimento radicular em curto espaço de tempo (DUTKA,1989).

Diante do exposto, este estudo teve o objetivo verificar a produção de biossurfactantes por cepas bacterianas selecionadas de linhagens isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes* e avaliar a cinética de crescimento de bactérias degradadoras em meio líquido suplementado com petróleo bruto e mistura de hidrocarbonetos. Realizou-se ainda teste de toxicidade em extratos bacterianos.

## 5.2 Material e métodos

### 5.2.1 Microrganismos

Foram inicialmente utilizadas neste estudo, 71 cepas bacterianas, endofíticas e epifíticas, isoladas da macrófita aquática amazônica *Eichornia crassipes* coletada em ambiente com histórico de contaminação por resíduos de petróleo. As nove linhagens selecionadas para os testes de produção de biossurfactantes foram identificadas por meio da região do DNA ribossomal 16S no laboratório de Genética de microrganismos (LAGEM) da Universidade Federal do Amazonas como: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas sp*, *Uncultured Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp*, *Pantoea sp*, *Acinetobacter baumannii*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Bacillus subtilis*. Estas cepas estão preservadas em glicerol a 30% a 4° C.

### 5.2.2 Seleção das bactérias para avaliação da produção de biossurfactantes e crescimento celular

A seleção inicial das bactérias para a etapa de avaliação da produção de biossurfactantes e crescimento celular se deu a partir de ensaio que permitiu destacar as que apresentavam uma melhor eficiência de degradação.

Foram cultivadas 71 bactérias em 20 mL de meio mineral acrescido de 100 µL de petróleo de Urucu (Tabela 2) em tubos de falcon de 50 mL. Foram utilizados como controle frascos contendo o mesmo meio com o petróleo, porém sem bactérias e frascos contendo meio mineral e bactéria, mas

sem petróleo. Os frascos ficaram incubados a 30° C em agitador rotatório a 120 rpm para conferir aeração adequada, por um período de nove dias.

Bactérias que turvaram o meio com mais intensidade e menor tempo, foram selecionadas para o teste do colapso da gota de óleo que determinou as nove melhores cepas para os experimentos seguintes.

**Tabela 2- Meio mínimo de sais acrescido de petróleo <sup>2</sup>**

Componentes	Quantidade/L
Tris(hidroximetil) aminometano (0,1 M)	12,10 g
NaCl	23,00 g
KCl	0,75 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,47 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,08 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,16 g
NH <sub>4</sub> Cl	3,74 g
Solução de Sulfato de Ferro (1 g/l)	2,00 mL
Solução de Fosfato de Sódio (0,1 M)	4,00 mL
Petróleo (Urucu)	5 mL
Água destilada	1000 mL
Fungicida	2mL
PH 7,30 pH	

**Fonte:** RAMBELOARISOA *et al.* (1984).

### 5.2.3 Pré-inóculo e fase de adaptação

Foram selecionadas 40 linhagens na etapa anterior. Estas linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio Luria Bertani (Peptona bacteriológica, NaCl, extrato de levedura) a 30° C, sob agitação de 120 rpm, por 24 horas, resultando em colônias de cerca de  $2 \times 10^8$  que foram utilizadas como pré-inóculo. Em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral acrescido de 0,5 mL de petróleo de Urucu foram adicionados 0,3 mL do inóculo padrão e deixados à 30° C sob agitação de 120 rpm por mais 24

<sup>2</sup> Com exceção do Petróleo, o meio foi autoclavado antes das inoculações. A esterilização do Petróleo foi feita em filtro millipore 2,2 µm.

horas. Após esse período os inóculos foram plaqueados em meio mineral sólido acrescido de petróleo e incubados a 30° C por 24 horas. Colônias destas placas foram utilizadas para produzir um inóculo de cerca de 10<sup>2</sup> UFC/mL.

#### **5.2.4 Teste qualitativo do colapso da gota de óleo**

O potencial das linhagens em utilizar o petróleo como fonte de carbono e produzirem biossurfactantes foi previamente verificado por meio do teste qualitativo do colapso da gota de óleo (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998) com adaptações. Este teste permitiu a seleção das bactérias utilizadas neste trabalho. O teste foi realizado em placas multipoços contendo 2 mL de meio mineral, 1 µl do inóculo e uma gota de petróleo de Urucu. O teste com cada bactéria foi realizado em triplicata fotografado nos tempo zero e após sete dias. O resultado foi considerado positivo quando houve a formação de microemulsões na gota de petróleo, avaliadas pela comparação com os poços em que foi inoculado 1 µl de água deionizada utilizada como controle negativo.

#### **5.2.5 Produção de biossurfactantes**

Nove cepas bacterianas selecionadas após o teste do colapso da gota foram cultivadas em 100 mL de meio mineral acrescido de petróleo de Urucu (Tabela 2) em erlenmeyers de 250 mL. Foram utilizados como controles frascos contendo o mesmo meio com o petróleo, porém sem bactérias e frascos contendo meio mineral e bactéria, mas sem petróleo. Os frascos ficaram incubados a 30° C em agitador rotatório a 120 rpm para conferir aeração adequada, por um período de nove dias. O pH inicial e final de cada

amostra foi aferido para verificar se houve interferência neste parâmetro químico.

Em um segundo experimento as mesmas linhagens foram incubadas nas mesmas condições do experimento anterior, com o mesmo meio mineral porém sem o petróleo e acrescido dos hidrocarbonetos: tetradecano, tridecano, fenildecano, hexadeceno, pireno, benzo-a-pireno, fenantreno e naftaleno, cada um na concentração de 0,005%.

### **5.2.6 Avaliação do crescimento celular**

Foi avaliado o crescimento celular de cada cepa tanto no meio com petróleo de urucu quanto no meio com os hidrocarbonetos padrões, por meio da estimativa do número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFCs), utilizando-se a técnica *spread plate* ou espalhamento em placas. Foram coletadas alíquotas de 0,1 mL de cada amostra, em intervalos de 12 horas até o total de 204 horas. A partir destas alíquotas foram feitas diluições da ordem 1/10 até a diluição  $10^{-4}$  em 0,9 mL do mesmo meio mineral sem o petróleo e espalhadas em placas de Petri contendo meio LB. As placas foram incubadas a 30° C por 24 horas para contagem das colônias. Só foram contadas as placas com colônias visivelmente individualizadas.

### **5.2.7 Avaliação da atividade de emulsificação**

A produção de surfactantes foi avaliada a partir da análise da atividade de emulsificação água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A). Foram realizados experimentos com os meios de cultura utilizados para o crescimento das bactérias no item 2.2.3. Após período de incubação, foram retiradas

alíquotas do meio, após centrifugação, para verificação da capacidade de emulsão de cada bactéria. Para cada 3,5 mL das culturas, foram adicionados 3,5 mL de tolueno (experimento 1) e petróleo de urucu (experimento 2) em tubos de ensaio que foram agitados durante 2 minutos em vortex e deixados 24 horas em repouso. Após esse período, a altura do petróleo emulsificado (cm) foi comparada à altura total adicionada (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

A atividade de emulsificação óleo em água foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro com medida de 610 nm de absorvância (JOHNSON *et al.*,1992). Dias (2007) descreve que no caso da emulsificação O/A, os hidrocarbonetos estarão disponíveis no próprio meio, enquanto que nas emulsões A/O os hidrocarbonetos estão acima do meio. Utilizam-se valores para qualificar a atividade emulsificante (Tabela 3).

**Tabela 3- Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante**

<b>ATIVIDADE EMULSIFICANTE</b>	<b>ALTURA DA EMULSÃO (TIPO ÁGUA EM ÓLEO)</b>	<b>DENSIDADE ÓPTICA <sub>610 nm</sub> (TIPO ÓLEO EM ÁGUA)</b>
Alta	≥2 cm	≥1,2
Moderada	de 1 a 1,9 cm	de 0,7 a 1,1
Baixa	< 1 cm	de 0,1 a 0,6

**Fonte: Matsuura, 2004**

### **5.2.8 Teste de toxicidade**

O teste de toxicidade foi realizado de acordo com metodologia descrita por Dias (2007). Foram selecionadas as cinco melhores cepas de acordo com os resultados da produção de surfactantes e do crescimento bacteriano. As linhagens foram inoculadas em meio mineral acrescido de

petróleo e incubadas por 10 dias. Alíquotas foram retiradas dos sobrenadantes e filtradas em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ . O filtrado foi diluído em diferentes concentrações: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56% em água destilada esterilizada. Foram retirados 2mL de cada concentração para embeber discos de papel de filtro, que foram colocados no interior de placas de Petri de poliestireno (9cm de diâmetro) (DUTKA, 1989). O controle positivo de toxicidade consistiu em embeber o papel de filtro em 2 mL de NaCl (5 g/L) e o controle negativo, em água destilada. Em cada placa inoculou-se 50 sementes de alface e estas foram envoltas em papel alumínio por 48 horas, incubadas em temperatura ambiente. Foi realizada após esse período a medida do tamanho das raízes germinadas com auxílio de papel milimetrado (DUTKA, 1989). O índice de germinação (%IG) foi calculado por meio da seguinte fórmula:

---


$$\%IG = (\% \text{ germinação das sementes}) \times (\% \text{ crescimento das raízes}): 100$$

**Onde:** % Germinação de sementes = (% germinação no extrato): (% germinação no controle) x 100

% Crescimento das raízes = (média de crescimento no extrato): (média de crescimento no controle) x 100

---

A porcentagem de variação de crescimento foi calculada segundo a equação: % variação de crescimento = comprimento médio da amostra – comprimento médio do controle x 100 / comprimento médio do controle (DUTKA, 1989). A concentração efetiva que inibiu 50% da germinação e alongamento das raízes foi calculada pela equação correspondente à curva de regressão (valores médios de crescimento pelas concentrações de diluição correspondentes) e o valor de R<sup>2</sup> da equação.

### 5.3 Resultados e discussão

#### 5.3.1 Seleção das bactérias para avaliação da produção de biossurfactantes e crescimento celular

Os ensaios para seleção das bactérias a serem utilizadas na avaliação de crescimento foram realizados com as 71 cepas bacterianas isoladas da macrófita *Eichornia crassipes*. Considerou-se positivo o ensaio que demonstrou turvação no meio, quando comparado ao tubo controle. Tiveram crescimento significativo os tubos que turvaram com mais intensidade e em menor tempo (Figura 1). Estes ensaios apresentaram resultados positivos para a maioria das cepas testadas conforme Tabela 4.

**Tabela 4- Crescimento bacteriano observado pela turvação do meio.**

Crescimento bacteriano	Percentual de tubos com resultados positivos%
Muito bom	32,4
Bom	26,8
Pouco	19,7
Sem crescimento	21,1

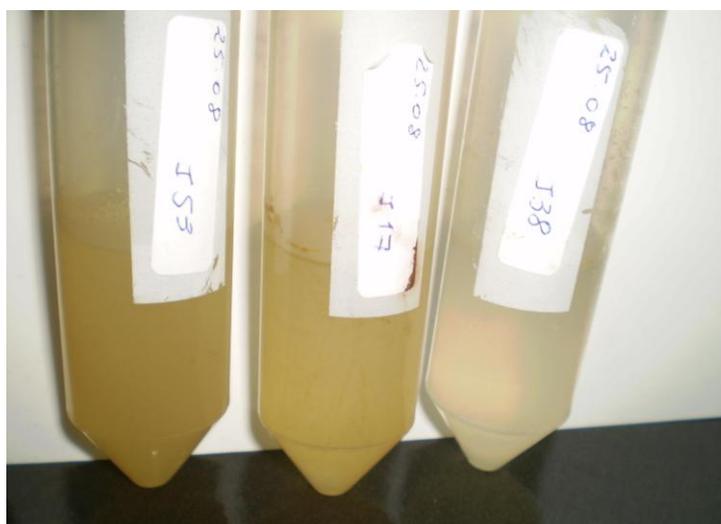


Figura 1- Crescimento bacteriano em meio mineral com petróleo

As bactérias que apresentaram crescimentos considerados muito bom e bom totalizaram 42 cepas, sendo selecionadas para o teste do colapso da gota de óleo.

### 5.3.2 Teste qualitativo do colapso da gota de óleo

O teste do colapso da gota para verificação do potencial das cepas em produzirem biossurfactantes demonstrou que a maioria das bactérias analisadas sintetiza algum tipo de surfactante. Fato observado pela transformação da gota de óleo em micro emulsões após uma semana de crescimento (Figura 1).

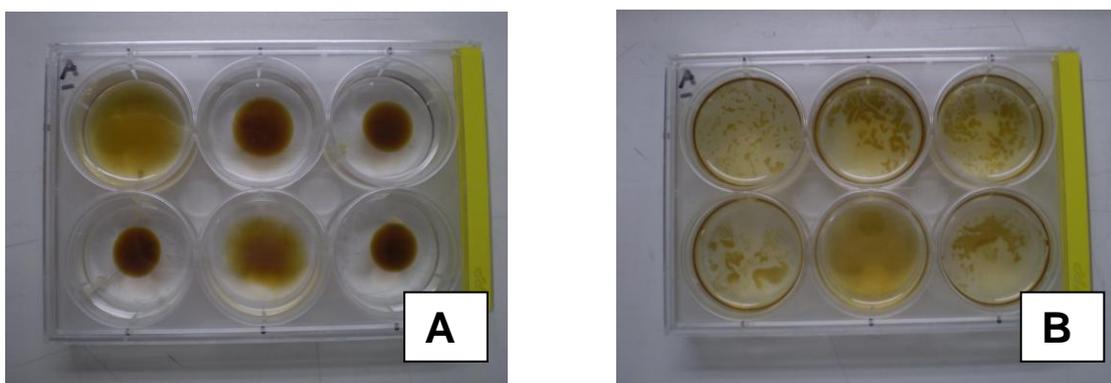


Figura 2- Teste do colapso da gota de óleo. A- Tempo 0; B- 7 dias

Algumas bactérias demonstraram maior habilidade na quebra da gota de óleo, permitindo a seleção de nove cepas (Tabela 5) para as etapas seguintes. Silva *et al.* (2003b) em trabalho com bactérias isoladas da coluna d'água da alga *Grateloupia sp.* e do sedimento meso litoral da praia de Boa Viagem-RJ observou o colapso da gota de óleo em experimento com os extratos do crescimento bacteriano e adição de óleo árabe leve nos primeiros cinco minutos. Savergnini (2004) também obteve resultados positivos para os

testes que realizou com consórcio bacterianos isolados de talos de algas e incubados com compostos aromáticos.

**Tabela 5- Linhagens selecionadas para a avaliação da produção de biossurfactantes.**

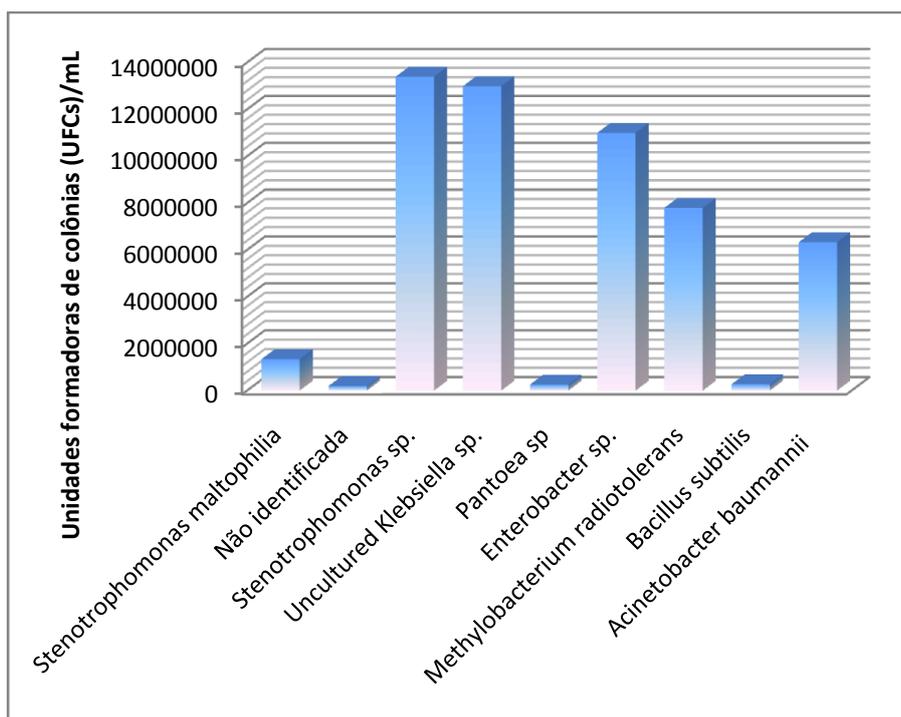
<b>Linhagens</b>	<b>Identificação</b>
K6	<i>Acinetobacter baumannii</i>
I19	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
I23	Não identificado
I28	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
I29	<i>Uncultured Klebsiella sp.</i>
I43	<i>Pantoea sp.</i>
I48	<i>Enterobacter sp.</i>
I52	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
I53	<i>Bacillus subtilis</i>

### 5.3.3 Avaliação do crescimento celular

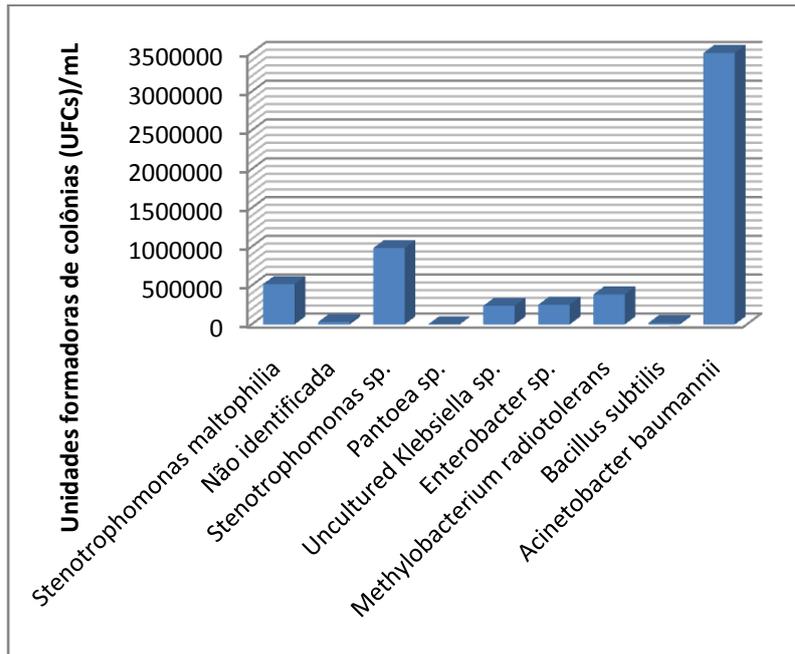
Foram realizados experimentos, tanto em meio com petróleo quanto em meio com hidrocarbonetos para verificação da produção de biossurfactantes por meio dos testes de emulsificação.

Foi observado que houve uma fase de latência de algumas horas, a partir da qual, as linhagens entraram em fase exponencial de crescimento, atingindo o máximo de produção de biomassa em tempos variando entre 48 e 96 horas, seguida de fase de declínio. Considerando, que a densidade inicial da cultura era cerca de  $10^2$ ufc/mL, e que ao final da fase exponencial, essa densidade chegou ao limite de  $10^6$ ufc/mL, pode-se confirmar a degradação de hidrocarbonetos pelas bactérias, já que eram a única fonte de carbono no meio.

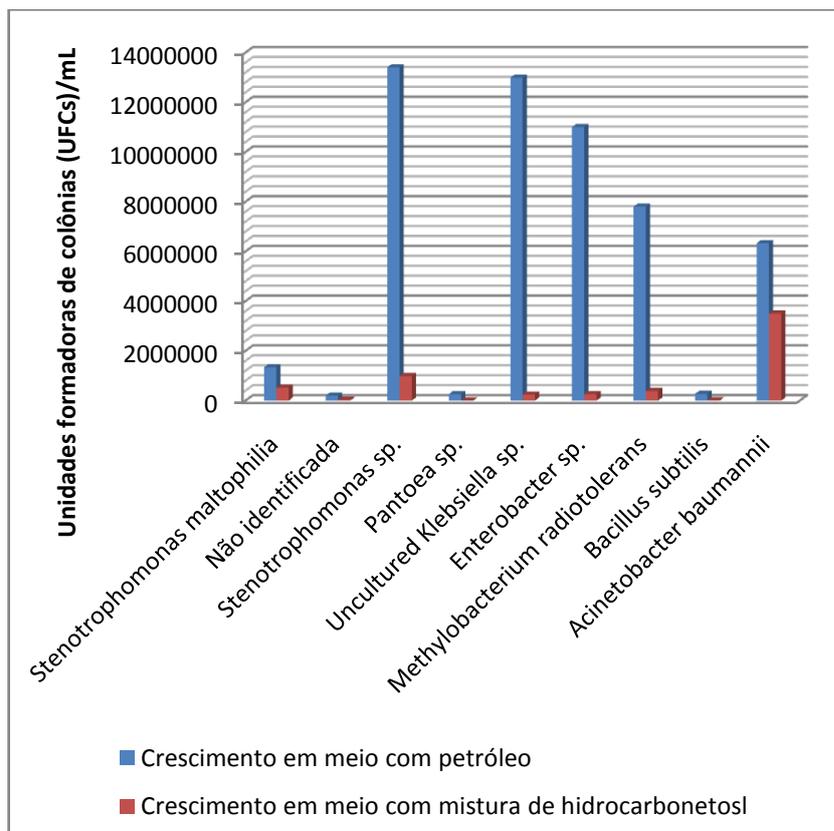
As linhagens apresentaram melhor crescimento celular no meio de cultura acrescido de petróleo (Figura 3 e 5). Observou-se que as espécies *Stenotrophomonas sp.*(EF2128), *Uncultured Klebsiella sp.* (EF1129), *Enterobacter sp.*(ER2148), *Methylobacterium radiotolerans* (EF152) e *Acinetobacter baumannii* (EFK6) obtiveram melhores resultados no meio com petróleo bruto. Destacaram-se no meio com a mistura de hidrocarbonetos as linhagens *Stenotrophomonas maltophilia*, *stenotrophomonas sp* e *acinetobacter baumannii* (Figura 4). A diferença de crescimento nos dois meios foi significativa, conforme se pode observar na Figura 5.



**Figura 3- Ápice do crescimento bacteriano em meio mineral com petróleo bruto**



**Figura 4- Ápice do crescimento bacteriano em meio mineral com mistura de hidrocarbonetos.**



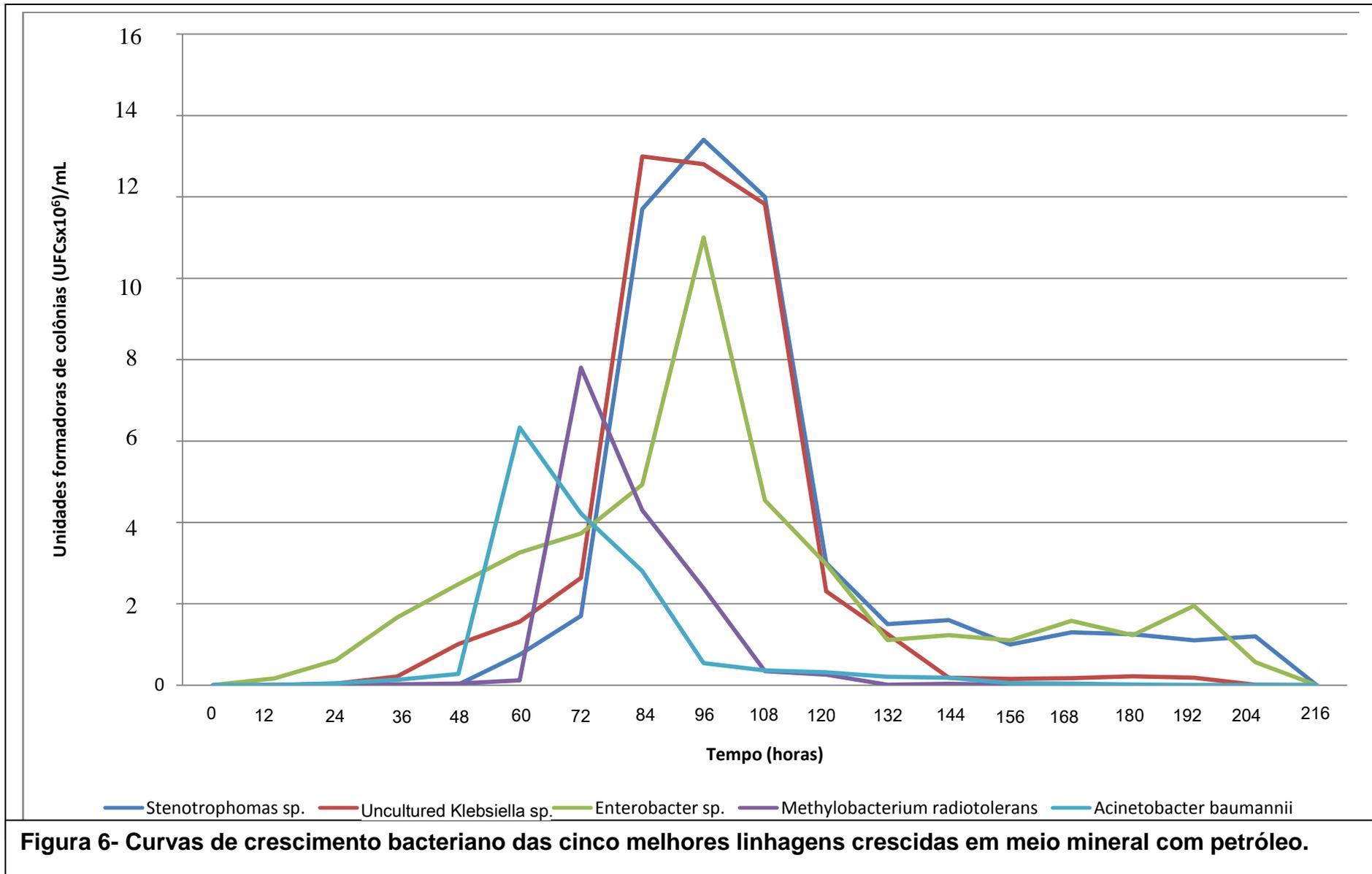
**Figura 5- Comparação do crescimento bacteriano em meio com petróleo e em meio com mistura de hidrocarbonetos**

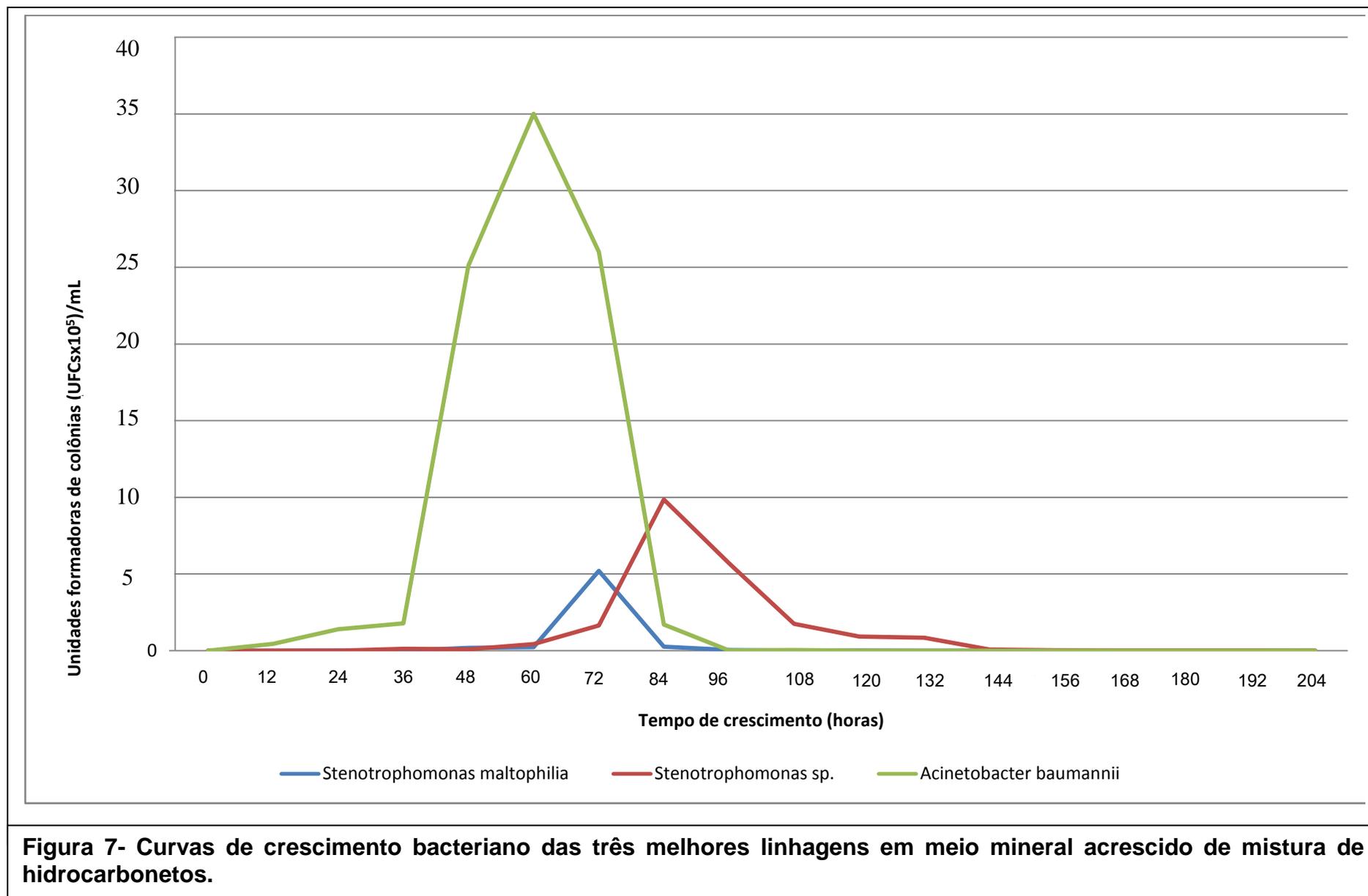
Dias (2007) ao realizar experimentos sobre crescimento celular com 43 linhagens de bactérias isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos, utilizou o peso seco bacteriano como parâmetro. Este autor registrou o crescimento das melhores linhagens na ordem de 0,00022 g/mL em hidrocarbonetos lineares e variando de 0,00033 g/mL a 0,00043 g/mL em hidrocarbonetos aromáticos.

Em estudo com as bactérias *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*, Jacobucci (2000) utilizou meios com efluentes de derivados de petróleo e, também utilizando o peso seco, observou crescimento de 1, 826 mg/mL para a primeira bactéria e 2,478 mg/mL para a segunda.

Dias (2007) destaca que o crescimento celular está diretamente relacionado com a produção de biossurfactantes. Destaca ainda o estudo realizado por Kushida (2000) onde demonstrou que houve aumento na produção de biomassa, na produção de biossurfactantes e uma diminuição gradativa do óleo residual, com o aumento do tempo de contato entre a cepa *Planococcus citreus* e o óleo residual utilizado.

Nas Figuras 06 e 07, se observa as curvas de crescimento das melhores cepas em cada meio avaliado.

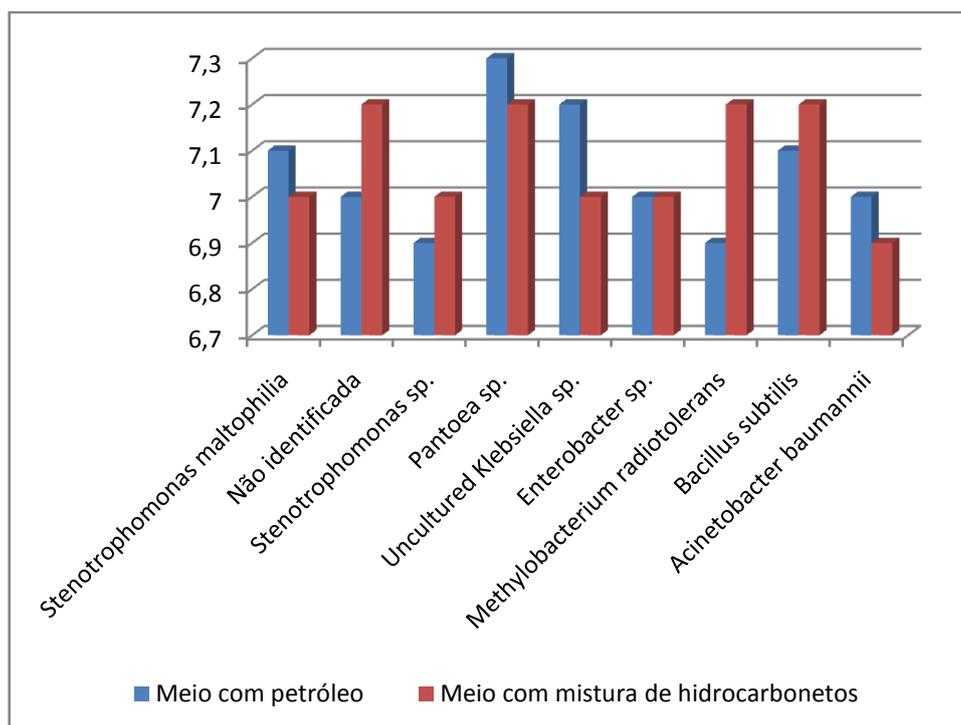




**Figura 7- Curvas de crescimento bacteriano das três melhores linhagens em meio mineral acrescido de mistura de hidrocarbonetos.**

### 5.3.4 Avaliação do pH

Não houve variações significativas no pH que iniciou em 7,3 e finalizou na faixa de 6,9 a 7,3, tanto no meio com petróleo quanto no meio com os hidrocarbonetos padrões (Figura 8).



**Figura 8- Variações do pH nos extratos do crescimento bacteriano.**

Nos estudos de Dias (2007) também foi observado que os valores do pH das amostras pouco se desviaram dos valores iniciais. Rosato (1997) descreve que a maioria dos microrganismos apresentam melhor desenvolvimento em pH neutro, podendo ocorrer o dobro da taxa de biodegradação de petróleo com a correção do pH.

### 5.3.5 Avaliação da atividade de emulsificação

Os resultados dos experimentos para avaliação das atividades de emulsificação apresentaram para as bactérias crescidas no meio com petróleo, o total de três linhagens com atividade emulsificante de moderada a alta do tipo água em óleo, nos valores de 1,5 a 2,3 em destaque na Tabela 2. A bactéria *Stenotrophomonas sp.* destacou-se na formação do halo indicador da produção de surfactante (Figura 9). Para a atividade tipo óleo em água, destacaram-se duas bactérias com produção máxima de 0,913 em petróleo e 0,961 em tolueno (Em destaque na Tabela 6).

**Tabela 6- Atividades de emulsificação em petróleo (P) e tolueno (T) nos extratos das bactérias que cresceram no petróleo.**

Cepa	ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO			
	Densidade óptica Tipo óleo em água		Altura da emulsão (cm) – Tipo água em óleo	
	P	T	P	T
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,240	0,317	0,5	0,04
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	0,022	0,414	<b>1,8</b>	<b>1,5</b>
Não identificada	0,005	0,014	0,05	0,03
<b><i>Stenotrophomonas sp.</i></b>	0,051	0,025	<b>2,3</b>	<b>1,9</b>
<b><i>Uncultured Klebsiella sp.</i></b>	<b>0,913</b>	0,849	0,05	0,01
<i>Pantoea sp.</i>	0,110	0,117	0,05	0
<b><i>Enterobacter sp.</i></b>	0,012	0,026	<b>2,0</b>	0,02
<b><i>Methylobacterium radiotolerans</i></b>	0,711	<b>0,961</b>	0,05	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0,012	0,173	0,04	0



Figura 9- Halo formado no teste de emulsificação com petróleo

As bactérias crescidas no meio com a mistura de hidrocarbonetos demonstraram uma menor produção de surfactantes. Neste meio três linhagens apresentaram atividade emulsificante moderadas. Do tipo água em óleo se destaca a *Stenotrophomonas sp.* e do tipo óleo em água a *Uncultured Klebsiella sp.* com os maiores valores (Em destaque na Tabela 3).

**Tabela 7- Atividades de emulsificação em petróleo (P) e tolueno (T) nos extratos das bactérias que cresceram nos hidrocarbonetos padrões.**

Cepa	ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO			
	Densidade óptica		Altura da emulsão (cm)	
	P	T	P	T
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,050	0,123	0,02	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,012	0,025	0,6	0,02
Não identificada	0,001	0	0	0
<b><i>Stenotrophomonas sp.</i></b>	0,230	0,020	<b>1,6</b>	0,5
<b><i>Uncultured Klebsiella sp.</i></b>	<b>0,540</b>	<b>0,779</b>	0	0
<i>Pantoea sp.</i>	0,003	0,001	0	0
<i>Enterobacter sp.</i>	0,290	0,445	0,05	0,01
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	0,543	0,735	0,23	0,10
<i>Bacillus subtilis</i>	0,329	0,044	0	0

Matsuura (2004), estudando microrganismos provenientes da região amazônica, encontrou seis linhagens de leveduras com atividade emulsificante significativas do tipo água em óleo, com a formação de uma emulsão de 2,3 cm de altura. Esse valor foi o mesmo encontrado neste estudo para a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* quando crescida em meio mineral acrescido de petróleo. Matsuura (2004) obteve, entre as leveduras, um máximo de atividade do tipo óleo em água com densidade óptica de 0,93 por uma das linhagens. Destaca que Carvalho, Marchi e Durrant (1997) obtiveram com a bactéria *Planococcus citreus* a densidade óptica de 1,8.

Dias (2007) encontrou valores de emulsão do tipo óleo em água em linhagens com crescimento em presença de hidrocarbonetos lineares de 0,890 e em linhagens com crescimento em presença de hidrocarbonetos aromáticos de 0,1308. Destaca que NEVES (2002) obteve atividade de emulsificação de óleo em água para a linhagem *Bacillus badius*, utilizando meio de cultura para produção de biossurfactante, adicionado de uma mistura de

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Naftaleno, Antraceno, Fluoreno e Pireno) no valor de 0,018 em seis dias de cultivo.

Maciel (2003) destacou o potencial para a produção de biossurfactantes extracelulares em bactérias preliminarmente identificadas, como *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp, isoladas a partir de uma amostra de água de descarga, contaminada com óleo, de num navio petroleiro, na costa cearense.

Neste estudo a linhagem *Acinetobacter baumannii* apresentou maiores valores de crescimento em meio com mistura de hidrocarbonetos, entretanto não apresentou os maiores valores de atividade emulsificante. A diminuição da atividade emulsificante poderia ser explicada pelo consumo dos biossurfactantes produzidos. Considerando que muitos desses compostos são proteínas, carboidratos, lipídios ou misturas desses compostos, é possível especular que em uma situação de estresse, a bactéria recorra a esta fonte de matéria orgânica para sua sobrevivência. Outra explicação plausível seria a neutralização da atividade emulsificante como consequência de reações químicas entre metabólitos gerados em um sistema fechado (MACIEL, 2003).

### 5.3.6 Avaliação da toxicidade

Os testes de germinação têm sido frequentemente utilizados devido ao seu baixo custo e simplicidade, sendo a espécie *Lactuca sativa* (alface) uma das espécies mais recomendadas (FLETCHER, 1991). Assim, o teste realizado com as sementes de alface para avaliação da toxicidade dos extratos do crescimento bacteriano permitiu observar os índices de germinação e a concentração efetiva que causou 50% ( $EC_{50\%}$ ) da inibição de germinação e crescimento radicular.

Em relação ao índice de germinação (Tabela 8), as concentrações 50% e 25% mostraram-se altamente tóxicas para as sementes de alface, impedindo a germinação das sementes em todas as amostras. A germinação começou a acontecer a partir da concentração 12,5%, havendo, entretanto, crescimento em menos de 10% das amostras. Nas demais concentrações houve aumento crescente no índice de germinação, tendo crescimento mais significativo os extratos da bactéria *Uncultured Klebsiella sp.* que chegou a 81,72% de germinação.

Os resultados obtidos demonstraram a relação inversamente proporcional entre a concentração do extrato bacteriano e o índice de germinação. Foi observado que quanto maior a concentração do extrato menor o índice de sementes germinadas e, obviamente, maior a toxicidade do meio (Figura 10).

Tabela 8- Índice de germinação (%) em diferentes concentrações

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (%)					
	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56
Controle abiótico	-	-	-	10,65	38,32	50,58
<i>Enterobacter sp</i>	-	-	0,29	10,97	41,38	73,45
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	-	5,56	38,17	60,17	71,96
<i>Uncultured Klebsiella sp.</i>	-	-	7,898	26,91	46,69	81,72
<i>Methilobacterium radiotolerans</i>	-	-	8,89	36,71	45,28	58,05
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	5,996	38,29	55,58	54,26

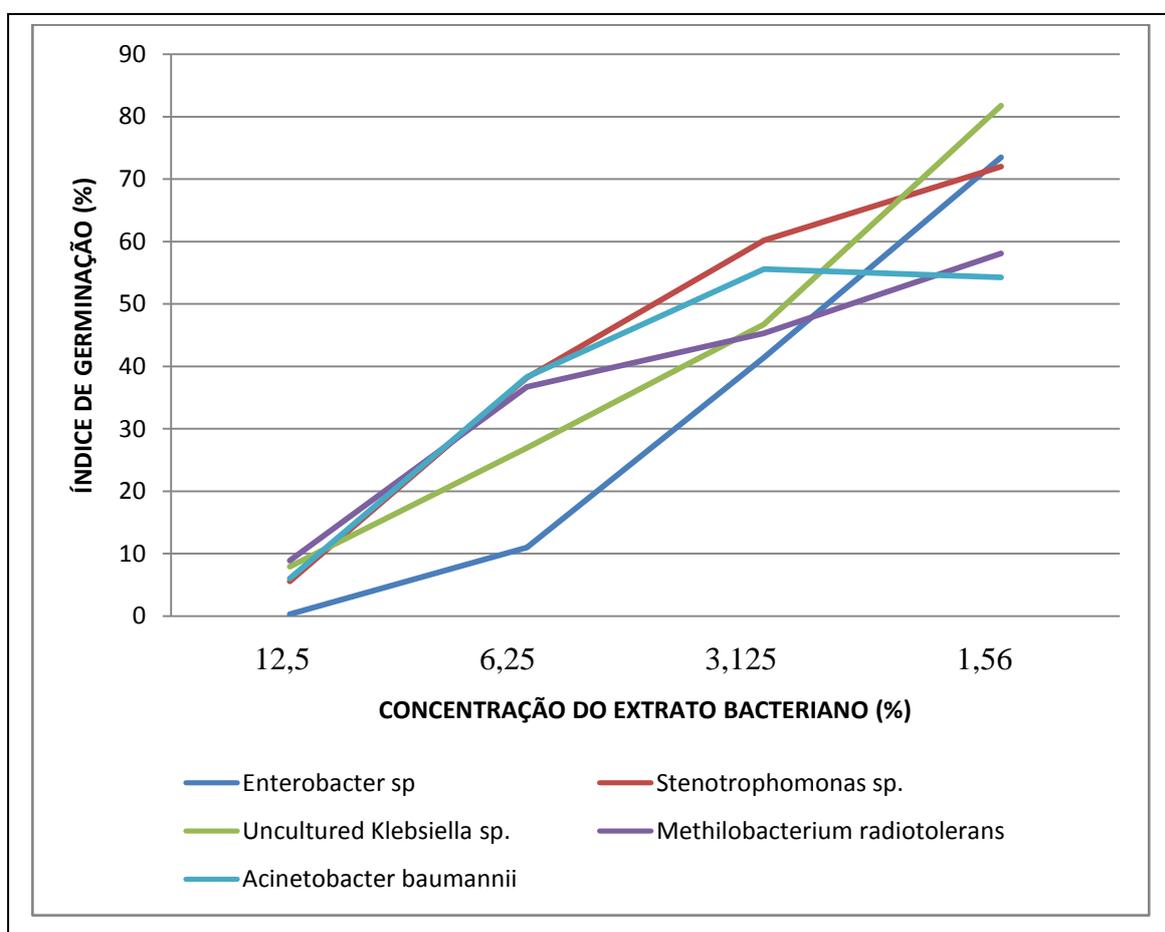


Figura 10- Índice de germinação das sementes de alface nas diferentes concentrações dos extratos bacterianos.

A Tabela 9 apresenta, de acordo com a ordem crescente de concentração das amostras, os efeitos tóxicos dos extratos bacterianos na

germinação e alongamento das raízes das sementes, verificando a concentração efetiva que causou 50% (CE<sub>50</sub>) da inibição de germinação e crescimento radicular.

**Tabela 9- Concentrações efetivas (%) que causam 50% de inibição de germinação**

Amostras/Inibição de Germinação (%) para os hidrocarbonetos						
Concent. (%)	Controle abiótico	1*	2**	3***	4****	5*****
1,56	16,35	1,89	23,89	5,03	7,55	6,66
3,125	17,6	22,64	22,64	16,35	18,86	37,11
6,25	34,59	21,38	43,39	27,67	36,85	41,59
12,5	100	87,42	40,25	43,39	52,2	48,43
25	100	100	100	100	100	100
50	100	100	100	100	100	100
Equação (y=50)	30,115*Ln -4,193	25,215*Ln 0,0862	30,5535*Ln -17,8327	32,4976*Ln -15,2537	29,7093*Ln -12,1566	27,2875*Ln -3,8247
R <sup>2</sup>	0,8351	0,834	0,9041	0,8799	0,9389	0,9043
*****EC <sub>50%</sub>	<b>6,0466</b>	<b>7,2391</b>	<b>9,2085</b>	<b>7,4481</b>	<b>8,1024</b>	<b>7,187</b>

\*1 *Stenotrophomonas sp.*; 2\*\**Uncultured Klebsiella sp.*; 3\*\*\**Enterobacter sp.*; 4\*\*\*\**Methilobacterium radiotolerans*; 5\*\*\*\*\* *Acinetobacter baumannii*

\*\*\*\*\* EC<sub>50%</sub> : Concentração efetiva de toxicidade para 50% das sementes

Os resultados destacam que a bactéria *Uncultured Klebsiella sp.* teve o menor efeito tóxico sobre o bioindicador utilizado (9,2085%), considerando que este valor indica a concentração efetiva para inibir a germinação e alongamento de raiz para 50% das sementes testadas. Dias (2007) encontrou valores da ordem de 7,93% para extratos de linhagens bacterianas crescidas em meio com hidrocarbonetos lineares e de 13,1% para extratos de linhagens em meio com hidrocarbonetos aromáticos.

No presente estudo os extratos das cinco bactérias avaliadas obtiveram valores da EC<sub>50%</sub> maiores do que o do controle abiótico (Tabela 5). Este fato indica que todos os extratos bacterianos apresentaram menor efeito tóxico sobre as sementes de alface, quando comparados ao extrato sem as

bactérias. Em muitos casos, a presença da bactéria pode levar ao surgimento de substâncias menos tóxicas do que as originalmente existentes. Entretanto, há situações em que o inverso acontece. Dias (2007) destaca em seu estudo linhagens com alto percentual de degradação de hidrocarbonetos que apresentaram valores na ordem de 3,2% e 3,38% para os testes de toxicidade, sendo que o controle obteve o valor de 4,08.

#### 5.4 Conclusões

- ✚ As linhagens bacterianas utilizadas nos experimentos deste estudo demonstraram potencial para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo e para a produção de biossurfactantes;
- ✚ As espécies epifíticas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes* e identificadas preliminarmente como *Uncultured Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, e *Methilobacterium radiotolerans* e as endofíticas *Stenotrophomonas s* e *Acinetobacter baumannii* demonstraram maior potencial entre as nove linhagens testadas;
- ✚ Os meios metabólicos obtidos nos ensaios de biodegradação apresentaram menor toxicidade que os meios contaminados com hidrocarbonetos, utilizados como controle;
- ✚ São necessários testes adicionais, como o de patogenicidade para confirmar a possibilidade do uso dessas linhagens em futuros processos de biorremediação.

## **CAPÍTULO VI**

**PRODUÇÃO DE CONSÓRCIO MICROBIANO PARA  
BIORREMEDIAÇÃO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS DA  
AMAZÔNIA**

**MANAUS-AM  
2009**

---

---

## RESUMO

---

Consórcios microbianos têm apresentado melhores resultados nas taxas de degradação de compostos tóxicos e recalcitrantes do que culturas puras. Fato determinado pela ação conjunta de microrganismos com metabolismos diversificados, o que proporciona maior eficiência na transformação ou mineralização dos compostos. Em ambientes previamente impactados é possível encontrar bactérias e fungos adaptados ao contaminante, tendo capacidade para metabolizá-lo e aproveitá-lo como fonte de carbono e energia. Este estudo teve o objetivo de produzir um consórcio de bactérias isoladas a partir de macrófita aquática amazônica e testá-lo quanto à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em experimento contendo água de rio da Amazônia. O consórcio foi constituído pelas linhagens identificadas como *Stenotrophomonas sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Acinetobacter baumannii*, sendo utilizadas as técnicas de bioaugmentação e bioestimulação. Os resultados obtidos demonstraram que o efeito principal de todos os parâmetros analisados (consórcio, fonte adicional de carbono e nitrogênio e correção de pH) influenciaram na degradação dos hidrocarbonetos avaliados. Entretanto, a adição do consórcio, no nível de significância de 5% apresentou *p-value* de 0,000, sendo o fator mais importante nesta degradação, demonstrando o potencial destas linhagens para uso em futuros processos de biorremediação.

---

**Palavras-chave:** consórcios, hidrocarbonetos, biorremediação, Amazônia.

---

## ABSTRACT

---

Microbial consortia have shown better results for toxic and recalcitrant compounds degradation than pure cultures. Fact determined by the joint action of microorganisms with diverse metabolisms, which provides greater efficiency in processing and mineralization of compounds. In previously impacted environments is possible to find bacteria and fungi adapted to the contaminant, with ability to metabolizes it and use it as a source of carbon and energy. This study aimed to produce a consortium of bacteria isolated from aquatic macrophyte Amazon and test it for degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons in experiment with water from a Amazon River. The consortium was formed by the lines identified as *Stenotrophomonas sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, and *Acinetobacter baumannii*, *Methylobacterium radiotolerans*, using bioaugmentation and biostimulation. The results showed that the main effect of all parameters examined (consortium, additional source of carbon and nitrogen and correction of pH) influenced the degradation of the hydrocarbons studied. However the addition of the consortium, with significance level of 5% had p-value of 0.000, being the most important factor in this decline, demonstrating the potential of these lines for future use in bioremediation processes.

---

**Key words:** consortia, hydrocarbons, bioremediation, Amazon

## 6.1 Introdução

Cada ambiente possui uma microbiota capaz de metabolizar uma vasta variedade de substâncias. A presença de uma substância específica em determinado local pode indicar que ali existem organismos adaptados àquela condição, havendo, portanto consórcios naturais com potencial de remediar situações de contaminação ambiental.

É fato que a utilização de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos é a alternativa mais eficaz para eliminar a presença destes contaminantes do ambiente, havendo, porém, a necessidade de adaptar as estratégias de biorremediação para cada ambiente específico (ALVAREZ & PUCCI, 2000).

Os microrganismos possuem alta diversidade metabólica, o que lhes confere grande vantagem adaptativa. Isto permite que habitem ambientes com condições extremas, inclusive contaminados com determinados poluentes, como hidrocarbonetos de petróleo.

A degradação de hidrocarbonetos depende de uma série de variáveis como presença de bactérias adequadas, concentração ideal de nutrientes e oxigênio, pH na faixa otimizada (DIAS, 2007). Venosa (2001) descreve que a faixa de pH ótima para a degradação está na faixa de 6 a 9. Na degradação do petróleo, além dos hidrocarbonetos como fonte de carbono, são necessários diversos outros nutrientes minerais como nitrogênio, fósforo, enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio (DIAS, 2007).

Devido à complexidade das moléculas encontradas na composição do petróleo, um único organismo não é capaz de degradar completamente uma área contaminada (DIAS, 2007), sendo necessário o uso de culturas mistas para um processo mais efetivo. Consórcios microbianos podem ter maior potencial degradativo nos processos de biorremediação pela interdependência de organismos, agindo em cooperação e promovendo uma maior eficiência e versatilidade na limpeza de locais contaminados (KANALY *et al.*, 2000).

Isto acontece pelo fato de que em uma cultura mista, os sub-compostos podem ser degradados por outras espécies, podendo acontecer a degradação completa do produto (KATAOKA, 2001), havendo uma maior capacidade biodegradativa tanto quantitativa, quanto qualitativamente (MARIANO, 2006). Assim, consórcios microbianos configuram-se como a melhor alternativa para processos de biorremediação de ambientes contaminados. A atuação conjunta de microrganismos favorece a alteração ou até mesmo o desaparecimento de determinados compostos recalcitrantes nos mais variados ecossistemas.

Biorremediação é um método frequentemente utilizado em tratamentos de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo devido à sua simples manutenção, sua aplicabilidade em larga escala e à possibilidade de destruição completa do contaminante (BENTO *et al.*, 2003).

Os microrganismos que realizam a biorremediação utilizam o carbono dos hidrocarbonetos, processando essas moléculas e podendo transformá-las em compostos inócuos ao ambiente. Entretanto como qualquer ser vivo, também necessitam de outros nutrientes para sua sobrevivência: nitrogênio, fosfato e outros minerais.

Na realização da biorremediação, existem duas técnicas a considerar: a bioaugmentação e a bioestimulação. A primeira se baseia no fornecimento de nutrientes às populações de microrganismos e na otimização das condições ambientais, aumentando sua população, promovendo o crescimento e conseqüentemente o aumento da atividade metabólica na degradação de contaminantes (SEKLEMOVA *et al.*, 2001). A bioaugmentação introduz misturas específicas de microrganismos em um ambiente contaminado ou em um biorreator para iniciar o processo da biorremediação (BARATHI & VASUDEVAN, 2001). Este é o processo no qual são introduzidos no ambiente microrganismos cujo potencial de degradação é conhecido, mas que podem ter sido isolados daquele ou de outro local (ATLAS, 1994).

De acordo com Peixoto, Rosado & Taketani (2008) a bioestimulação é o processo de biorremediação que estimula o crescimento dos microrganismos nativos do local contaminado, por meio da correção do pH, aeração e balanceamento de nutrientes em relação à carga de carbono do poluente orgânico por meio da adição de N e P.

Nos ensaios para estudos de biodegradação a medida mais direta da biodegradação é o monitoramento da taxa de consumo dos poluentes (MARIANO, 2006). Assim para a caracterização dos componentes individuais de uma classe específica de hidrocarbonetos é indicado o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia em fase gasosa (CG) (FERRARI, 1996).

Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de produzir um consórcio de bactérias isoladas a partir da macrófita aquática *Eichornia crassipes*, realizando ensaios de tratamento *ex situ* de água do Rio Negro

contaminada em laboratório por hidrocarbonetos de petróleo, aplicando técnicas de bioestimulação e bioaumentação.

## **6.2 Material e métodos**

### **6.2.1 Produção de consórcio microbiano**

Foram utilizadas cinco linhagens bacterianas isoladas da macrófita aquática *Eichornia crassipes*, identificadas como *Stenotrophomonas sp.*, *Uncultured Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Acinetobacter baumannii*. A partir destas linhagens foi produzido um consórcio visando avaliar a capacidade do mesmo em degradar petróleo em água do Rio Negro em uma concentração de 5mL/L .

De acordo com metodologia descrita em Dias (2007), as bactérias foram cultivadas em meio Luria Bertani (peptona bacteriológica, NaCl, extrato de levedura, ágar) por um período de 24 horas. Após o período de incubação, de cada linhagem foi transferida uma alçada para o meio mínimo de sais (RAMBELOARISOA *et al.*, 1984) com petróleo, e incubadas em agitador rotatório a 120 rpm e 30°C. O crescimento acompanhado a intervalos regulares de tempo, por meio de leitura da densidade óptica (DO<sub>610nm</sub>) até que as bactérias atingissem D.O de 1. Foram retiradas alíquotas de 300 µL de cada bactéria e colocadas em tubos do tipo eppendorf, para formulação do consórcio. As alíquotas foram centrifugadas por 10 minutos há 12000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (célula) ressuspenso com 1 mL do próprio meio mínimo de sais.

### **6.2.2 Planejamento experimental**

Foi utilizado um planejamento fatorial  $2^3$  onde se trabalhou com as seguintes variáveis (OLIVEIRA, 2001):

- 1- Presença ou ausência do consórcio. O experimento sem o consórcio justifica-se para verificar o potencial da microbiota nativa.
- 2- Correção ou não do pH para neutro (condição ideal para o crescimento bacteriano).
- 3- Adição ou não de fonte adicional de carbono e nitrogênio (10g de glicose e 10 g de Nitrato).

Cada experimento, conforme descrito na Tabela 1, foi realizado em triplicata e os cálculos estatísticos foram feitos por meio do Software estatístico MINITAB 14.

### **6.2.3 Experimentos com bioaugmentação e bioestimulação**

Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers com 500 mL de capacidade. Em cada erlenmeyer foi adicionado 250 mL de água (coletada no Rio Negro) acrescida com 100  $\mu$ L de petróleo de Urucu.

Durante os experimentos foram coletadas amostras de 30 mL do meio em diferentes tempos: zero; sete; quatorze; e vinte e oito dias de processo, a fim de quantificar os hidrocarbonetos naftaleno, fenantreno, pireno, tridecano, tetradecano, hexadeceno, e fenildecano, presentes no óleo bruto.

**Tabela 1 Especificação das condições de cada erlenmeyer nos experimentos com bioaumentação e bioestimulação**

<b>Erlenmeyer</b>	<b>Especificações</b>
<b>01</b>	Consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N
<b>02</b>	Consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N
<b>03</b>	Consórcio sem alteração de pH + fonte adicional de C e N
<b>04</b>	Consórcio sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N
<b>05</b>	Sem adição do consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N
<b>06</b>	Sem adição do consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N
<b>07</b>	Sem adição do consórcio e sem alteração de pH + fonte adicional de C e N
<b>08</b>	Sem adição do consórcio e sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N

#### **6.2.4 Quantificação de hidrocarbonetos**

Os hidrocarbonetos presentes nas amostras coletadas nos tempos 0, 7, 14 e 28 dias foram extraídos com 30 mL de hexano, na concentração 1:1 (v/v), em funil de separação conforme descrito por Chhatre *et al.* (1996). Foram feitas três extrações em cada amostra e ao sobrenadante, com o solvente, foi acrescentado sulfato de sódio, para retirada de água remanescente. Após esse processo cada amostra passou por cromatografia em coluna de sílica gel para separação dos compostos apolares. A seguir o filtrado de cada amostra foi coletado em frasco volumétrico para concentração em rotavapor. O concentrado de cada amostra foi submetido à cromatografia a gás para análise do percentual de degradação (JACOBUCCI, 2000).

Foi avaliada a degradação dos hidrocarbonetos benzeno, naftaleno, fenantreno, pireno, benzo-a-pireno, tridecano, tetradecano, hexadeceno, e fenildecano, presentes no óleo bruto.

As amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa (Cromatógrafo gasoso da Shimadzu, modelo GC2010), por meio da injeção de 1µL de amostra, utilizando uma coluna capilar DB-5 (0,25 µm de espessura de fase 5% fenil em metil silicone, 0,25 mm de diâmetro interno e 30 m de comprimento), detector de ionização de chama (DIC) a 300 °C, injetor a 250 °C, razão de split 1:20 e hélio como gás de arraste em fluxo de 2,35 mL/min. A coluna foi mantida a 70°C por 2 minutos, em seguida, por meio de um incremento na temperatura de 6 °C/min. a temperatura foi elevada até 250 °C dentro de um intervalo de tempo de 20 min.

Os hidrocarbonetos foram identificados por comparação com o tempo de retenção da mistura de padrões (contendo os hidrocarbonetos a serem avaliados) submetido à análise via GC/DIC, nas mesmas condições das amostras. O método utilizado para determinação quantitativa dos hidrocarbonetos foi o cálculo da concentração relativa média baseada na proporcionalidade das áreas sob os picos cromatográficos dos hidrocarbonetos em estudo nas amostras e a área de hidrocarboneto padrão.

### 6.3 Resultados e discussão

O isolamento de microrganismos nativos permite que linhagens com capacidade de adaptação a condições adversas, como a presença de hidrocarbonetos, sejam selecionados e utilizados para biorremediação.

A produção do consórcio de bactérias envolveu linhagens selecionadas a partir de cepas isoladas em meio seletivo a partir da macrófita *Eichornia crassipes* coletada na saída dos efluentes da refinaria da Petrobrás/Manaus-AM (REMAN). Estas linhagens foram identificadas como *Stenotrophomonas sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Acinetobacter baumannii* (Tabela 7 do Capítulo IV.)

Os resultados dos experimentos realizados são apresentados a seguir, avaliando-se separadamente os hidrocarbonetos alifáticos (tridecano, tetradecano, hexadeceno e fenildecano) e os hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, pireno e fenantreno). Por fim, é apresentada a análise da matriz com os dados referentes ao total dos hidrocarbonetos avaliados.

#### 6.3.1 Hidrocarbonetos alifáticos

A matriz estendida do planejamento experimental, assim como as concentrações relativas da degradação dos hidrocarbonetos alifáticos (tridecano, tetradecano, hexadeceno e fenildecano) como função das condições de cada experimento após 28 dias são apresentados na Tabela 2. Também são mostrados os cálculos do logaritmo decimal de cada concentração. Estes cálculos foram realizados devido os dados das concentrações apresentarem no gráfico de normalidade pequena assimetria,

não possuindo distribuição normal. Assim, admitindo-se a normalidade para o conjunto de valores obtido por meio do logarítmo, procedeu-se à verificação da significância dos parâmetros estudados por meio dos cálculos dos efeitos principais e das interações utilizando-se a matriz estendida dos três parâmetros avaliados.

**Tabela 2-Matriz estendida do planejamento experimental 2<sup>3</sup> para os hidrocarbonetos alifáticos**

Exp.	Presença de consórcio <sup>1</sup>	Correção a pH neutro <sup>2</sup>	Fonte adicional de carbono e nitrogênio <sup>3</sup>	Concentrações relativas de hidrocarbonetos alifáticos <sup>4</sup> (%)	Logarítmo decimal da concentração de hidrocarbonetos alifáticos <sup>5</sup>
<b>01</b>	+	+	+	11,48±5,00	1,035±0,907
<b>02</b>	+	+	-	4,34±3,20	0,562±0,308
<b>03</b>	+	-	+	3,16±0,956	0,487±0,134
<b>04</b>	+	-	-	5,32±0,624	0,724±0,499
<b>05</b>	-	+	+	17,09±2,85	1,229±0,0721
<b>06</b>	-	+	-	4,52±1,340	0,642±0,1373
<b>07</b>	-	-	+	18,72±5,23	1,259±0,1349
<b>08</b>	-	-	-	8,56 ±1,46	0,928±0,0734

1 + corresponde a presença e - a ausência do consórcio bacteriano.

2 O nível + corresponde a pH = 7,0 ± 0,1 e o nível - a pH = 3 ± 0,1.

3+ corresponde a adição de fonte de carbono e nitrogênio e - a não adição

4 Média das concentrações relativas de três experimentos (tempo 28 dias) mais desvio padrão

5 Média do logarítmo decimal das concentrações de três experimentos mais desvio padrão

Para melhor análise dos valores obtidos é importante considerar os efeitos isolados de cada parâmetro em estudo (Tabela 3).

**Tabela 3- Descrição estatística dos efeitos isolados de cada fator na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos.**

Variável		Média da concentração (mc) e desvio padrão	Média log. Concentração (logmc) e desvio padrão
Consórcio	-	12,22±6,71	1,0145±0,2784
	+	<b>6,08±4,23</b>	0,7021±0,2736
Correção do pH	-	8,94±6,66	0,8496±0,3092
	+	9,36±6,24	0,8669±0,3314
Fonte adicional de carbono e nitrogênio	-	<b>5,687±2,407</b>	0,7141±0,2057
	+	12,62±7,18	1,0025±0,3434

(-)ausência (+) presença

Pela comparação dos valores demonstrados na Tabela 3 e análise da Figura 1, observa-se que, independentemente de fonte adicional de carbono ou correção de pH, o fator presença do consórcio foi o mais relevante na biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos avaliados, obtendo média de concentração no valor de  $6,08 \pm 4,23$ , e média logarítmica de 0,7021 enquanto que a ausência do consórcio representou praticamente o dobro deste valor:  $12,22 \pm 6,71$  para a média da concentração e 1,0145 para o logaritmo.

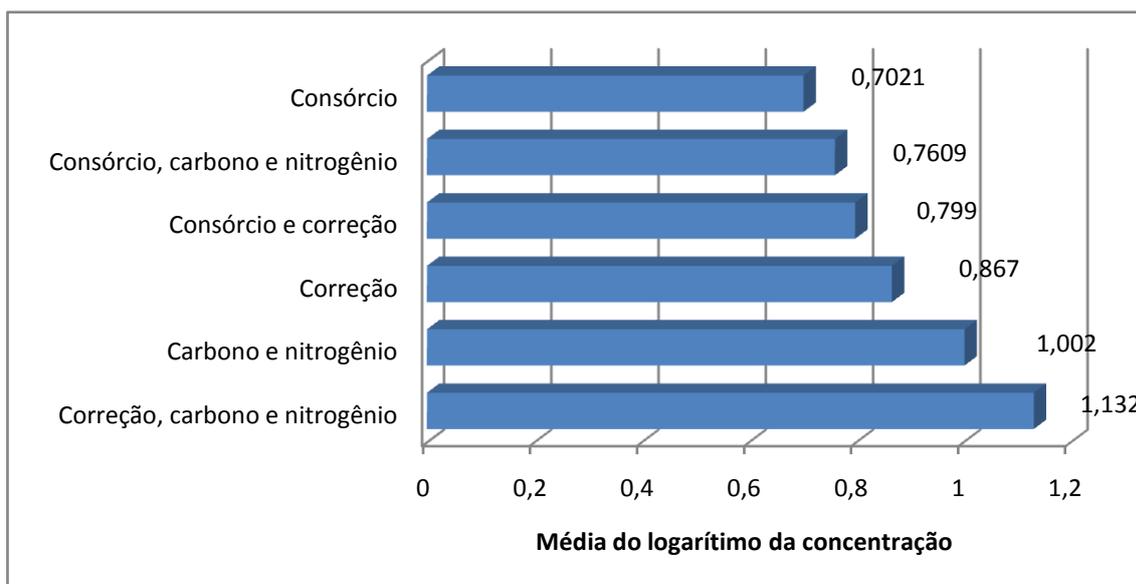


Figura 1- Efeitos principais e interações entre os parâmetros (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos)

A ausência de fonte adicional de carbono e nitrogênio (Tabela 3 e Figura 2) representou menor valor na concentração relativa dos hidrocarbonetos alifáticos avaliados, o que significa maior degradação. Uma das possíveis justificativas pode ser o fato de que com a adição de uma fonte extra de carbono e energia, os microrganismos não tenham metabolizado os hidrocarbonetos. Castiglioni *et al.*(2009) ao avaliarem a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos, encontraram valores que comprovam que os experimentos sem fonte adicional de carbono foram os que apresentaram os melhores resultados. Mielniczuc (1991) também observou que a adição de 1% de glicose ao solo, contaminado com 8.800mg kg<sup>-1</sup> de Carbono orgânico originado de um resíduo petroquímico, não resultou em aumento da mineralização, após 272 dias de incubação.

Nos ambientes naturais, um dos fatores que normalmente limita o crescimento microbiano é o carbono. Os resultados indicam que na ausência do carbono os microrganismos com enzimas para a degradação de hidrocarbonetos se desenvolveram aproveitando os compostos do petróleo como fonte de carbono e energia.

Entretanto, é importante considerar que a bioestimulação deve ser precedida de criteriosa avaliação, visando determinar os nutrientes e as doses que necessitam ser adicionados (JACQUES, 2007).

Em relação ao pH, a sua correção não foi significativa estatisticamente, tendo o  $p\text{-value}^3$  ( $p$ )=0,801, não havendo portanto influência deste fator na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos. A Figura 2 apresenta os efeitos principais de cada parâmetro analisado e a Figura 3 traz uma comparação dos efeitos principais da ausência e presença de cada parâmetro .

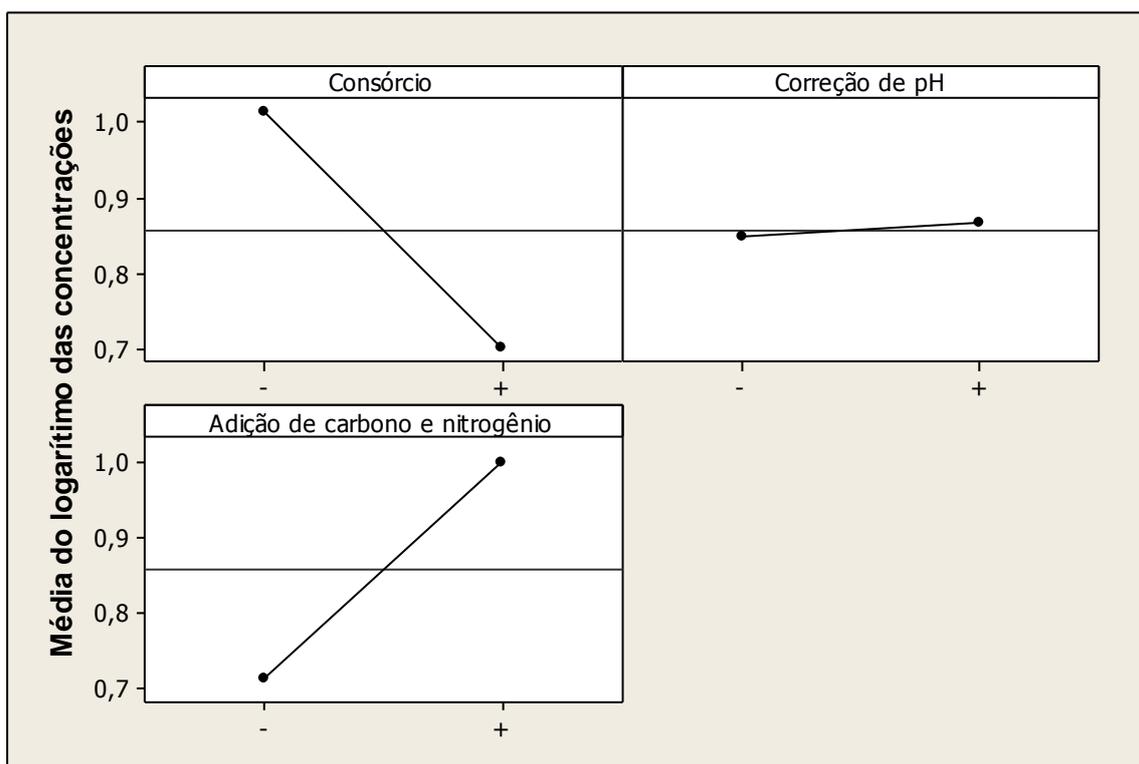


Figura 2- Efeitos principais de cada parâmetro avaliado (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos.

<sup>3</sup> O  $p\text{-value}$  corresponde ao menor nível de significância que pode ser assumido para rejeitar a hipótese nula. Há significância estatística quando o  $p\text{-value}$  é menor que o nível de significância adotado. Neste trabalho, o nível de significância é de 5%.

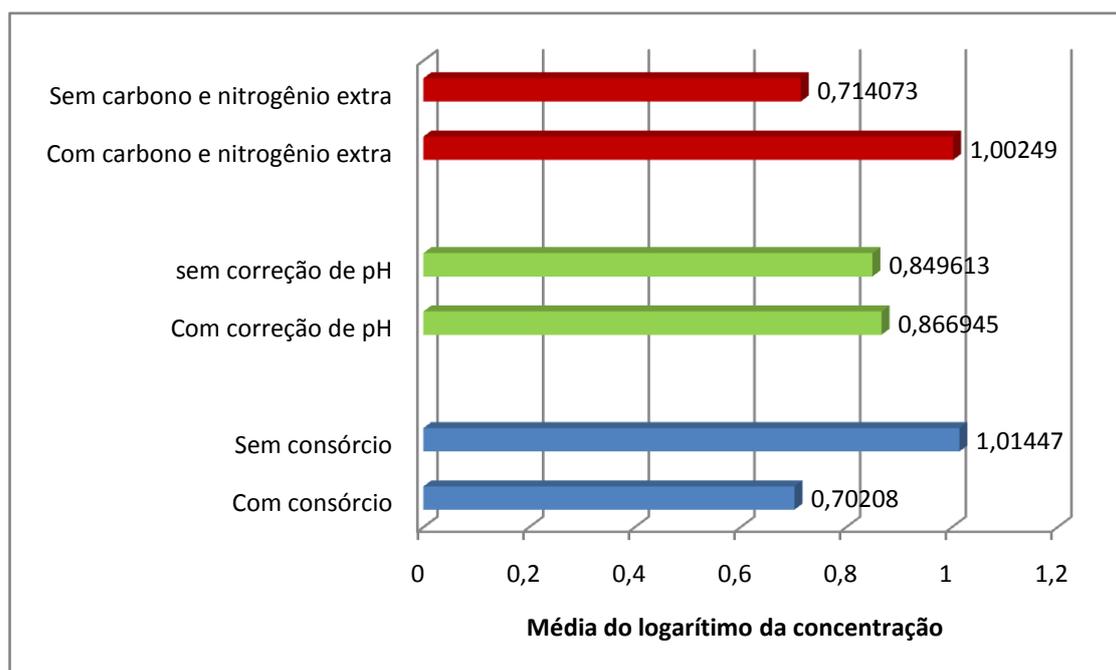


Figura 3- Comparação dos efeitos principais da presença e ausência de cada parâmetro (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos)

Esta comparação (Figura 3) sugere que a adição do consórcio realmente representou melhor eficiência no processo quando comparado com a ação da microbiota nativa, apresentando significativo resultado estatístico ( $p=0,003$ ).



Considera-se que na avaliação geral dos experimentos, em relação à degradação dos hidrocarbonetos alifáticos, os experimentos com os consórcios obtiveram melhores resultados conforme Figura 5.

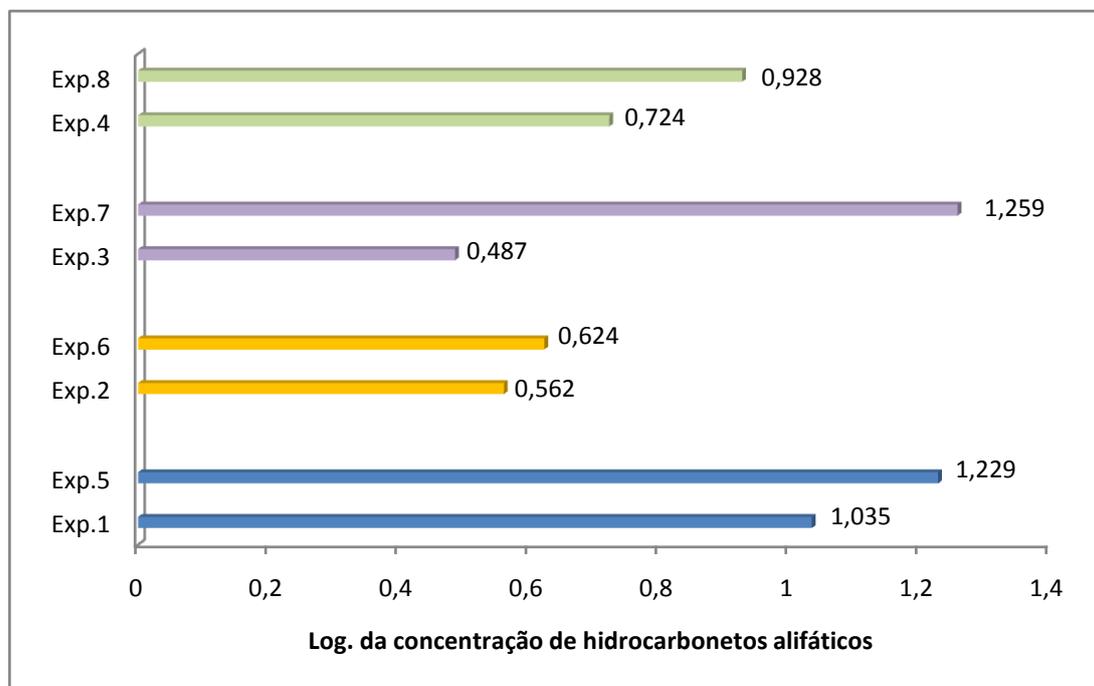


Figura 5- Comparação das concentrações relativas de hidrocarbonetos alifáticos dos experimentos com consórcios (4, 3,2,1) e seus respectivos controles (8,7,6,5) após 28 dias. **Exp. 01-** Consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp.2-** Consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; **Exp. 03-** Consórcio sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 04-** Consórcio sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N; **Exp. 05-** Sem adição do consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp.06-** Sem adição do consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; **Exp. 07-** Sem adição do consórcio e sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 08-** Sem adição do consórcio e sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N

Observa-se que após 28 dias, não ocorreu degradação completa dos hidrocarbonetos alifáticos avaliados, sugerindo a necessidade de um tempo maior para completa eliminação dos compostos. Dependendo das condições, esse tempo pode variar. Em estudo sobre o comportamento de hidrocarbonetos em ambientes rasos, Pederzoli *et al.* (2005) observaram que em apenas 5 horas houve redução de mais da metade dos compostos. Oliveira *et al.* (2007b) verificaram que após 180 dias ocorre um decaimento de

cerca de 99% de todos os hidrocarbonetos alifáticos que avaliaram, tempo que consideraram suficiente para a degradação destes compostos.

### **6.3.2 Hidrocarbonetos aromáticos**

A eliminação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) introduzidos no ambiente por diversas atividades antropogênicas é fundamental para a manutenção da qualidade ambiental. Os HAPs são lipossolúveis na membrana celular e prontamente absorvidos no organismo dos humanos via inalação, exposição oral e dérmica, com posterior acúmulo no tecido adiposo (NETTO *et al.*, 2000), apresentando estes compostos propriedades carcinogênicas e mutagênicas.

Assim, encontrar alternativas para decompor estas substâncias ou até mesmo eliminá-las completamente do ambiente é um importante desafio para as modernas técnicas de biorremediação.

A matriz estendida do planejamento experimental  $2^3$  com os valores da concentração relativa média e do logarítmo decimal de cada concentração para os hidrocarbonetos aromáticos (pireno, naftaleno e fenantreno) são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4- Matriz estendida do planejamento experimental 2<sup>3</sup> para os hidrocarbonetos aromáticos**

Exp.	Presença de consórcio <sup>1</sup>	Correção a pH neutro <sup>2</sup>	Fonte adicional de carbono e nitrogênio <sup>3</sup>	Concentrações relativas de hidrocarbonetos aromáticos <sup>4</sup> (%)	Logarítimo decimal da concentração de hidrocarbonetos aromáticos <sup>5</sup>
01	+	+	+	8,9±2,80	0,9355±0,1294
02	+	+	-	6,11±2,64	0,761±0,178
03	+	-	+	22,71±3,22	1,3533±0,0628
04	+	-	-	13,44±4,85	1,105±0,182
05	-	+	+	10,42±2,26	1,0203±0,0978
06	-	+	-	19,2±8,73	1,248±0,224
07	-	-	+	22,3±4,92	1,3403±0,1024
08	-	-	-	32,8±9,53	1,5052±0,1198

1 + corresponde a presença e - a ausência do consórcio bacteriano.

2 O nível + corresponde a pH = 7,0 ± 0,1 e o nível - a pH = 3 ± 0,1.

3 + corresponde a adição de fonte de carbono e nitrogênio e - a não adição

4 Média das concentrações relativas de três experimentos (tempo 28 dias) mais desvio padrão

5 Média do logarítimo decimal das concentrações de três experimentos mais desvio padrão

Os dados referentes aos efeitos isolados de cada fator são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5- Descrição estatística dos efeitos isolados de cada fator na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos.**

Variável		Média da concentração (mc) e desvio padrão	Média log. Concentração (logmc) e desvio padrão
Consórcio	-	21,24±10,22	1,2783±0,2211
	+	<b>12,79±7,22</b>	1,0388±0,2602
Correção do pH	-	22,82±8,87	1,3260±0,1832
	+	<b>11,21±6,59</b>	0,9911±0,2305
Fonte adicional de carbono e nitrogênio	-	17,90±11,86	1,1548±0,3199
	+	16,13±7,30	1,1623±0,2134

(-)ausência (+) presença

Os valores em destaque na Tabela 5 demonstram que também para os hidrocarbonetos aromáticos, a presença do consórcio foi fundamental, representando, quando analisado de forma isolada, concentração relativa média de 12,79%, enquanto que sua ausência registra o valor de 21,24%. Ao realizar estudo com a inoculação de um consórcio microbiano composto por seis bactérias e um fungo no solo contaminado com antraceno, fenantreno e pireno, Jacques *et al.* (2005b) registraram aumento de aproximadamente 10 vezes na mineralização destes HAPs em relação à microbiota nativa do solo.

Para os aromáticos, o fator correção do pH foi muito significativo (Figura 6), pois em comparação com a não correção apresentou valores em torno de 50% inferiores. Oliveira *et al.* (2007b) realizando ensaios de biodegradação com microbiota nativa de manguezal em Florianópolis observaram que as melhores condições em termos de pH para a biodegradação de pireno foi pH 5. Destaca, entretanto, que estes resultados foram divergentes para os obtidos em estudo em outro manguezal da região, onde o ideal foi pH 8.

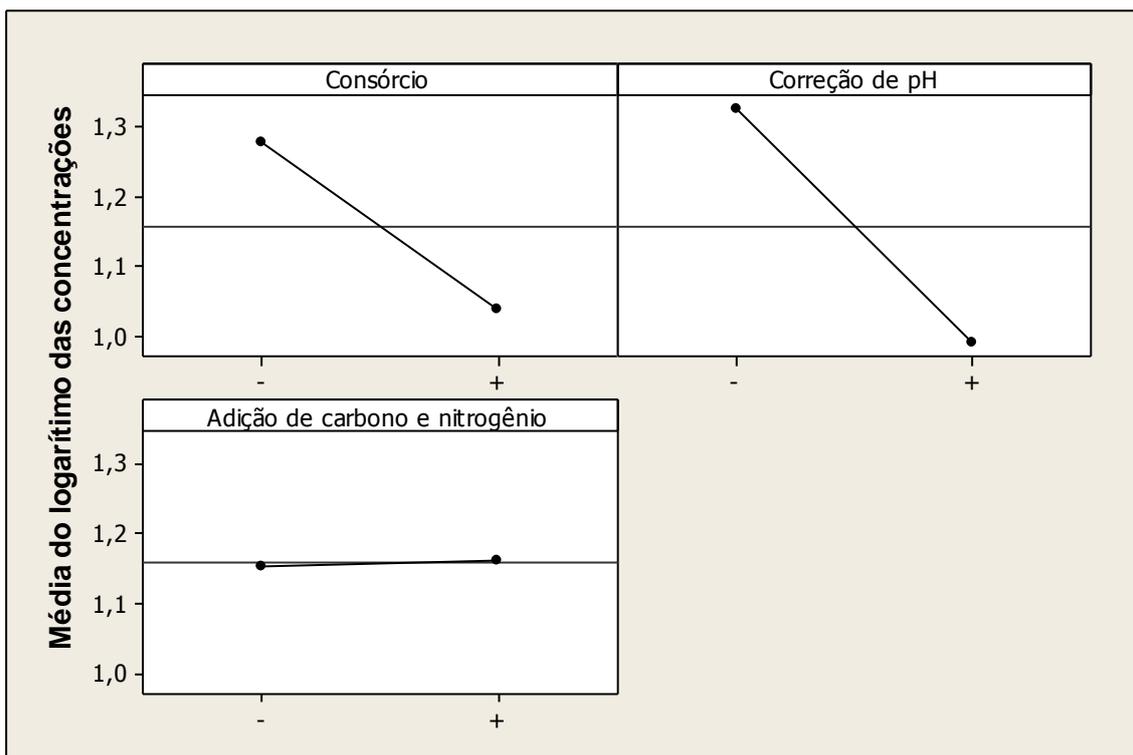


Figura 6- Efeitos principais dos parâmetros avaliados (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos

Analisando o efeito principal de cada um dos parâmetros avaliados (Figura 6) considera-se a presença do consórcio e a correção do pH como os fatores de maior importância na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Ao contrário do que foi observado para os alifáticos, com os aromáticos a ausência de carbono e nitrogênio não teve valor estatístico significativo para a degradação ( $p=0,901$ ).

A Figura 7 apresenta comparação dos efeitos principais da ausência e presença dos três parâmetros avaliados, demonstrando que a presença do consórcio e a correção de pH destacam-se quando comparados com a ausência.

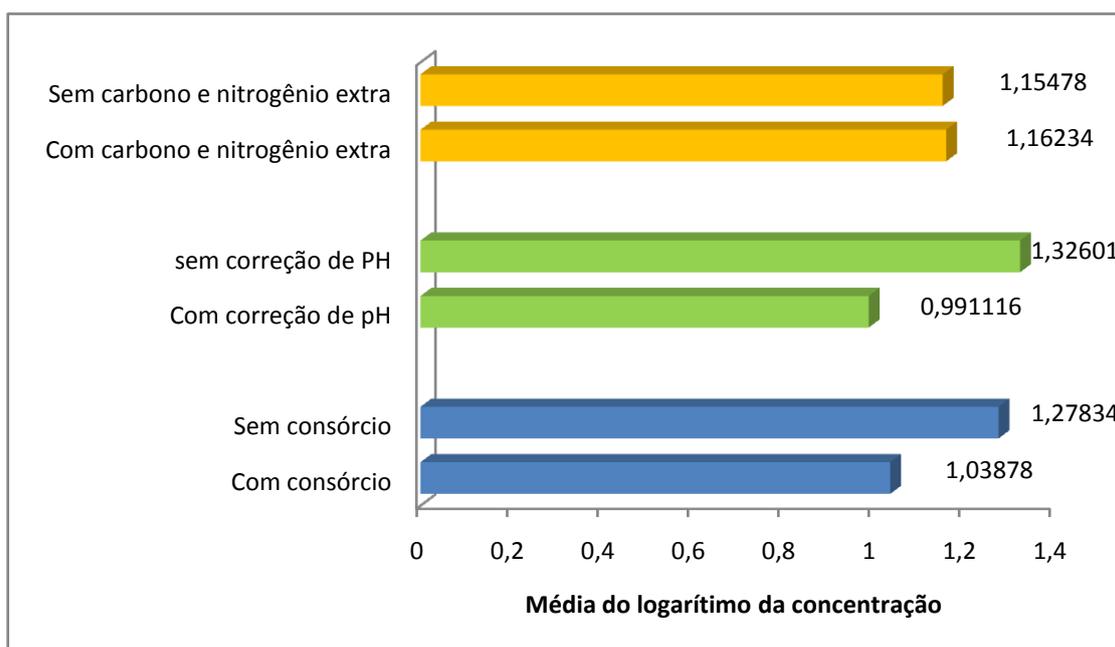


Figura 7- Comparação dos efeitos principais da presença e ausência de cada parâmetro (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) na avaliação dos hidrocarbonetos aromáticos.

A interação dos fatores sugere que a presença do consórcio junto com a correção do pH foi a combinação mais eficiente (Figura 8-A). Em relação à interação entre consórcio e fonte de carbono e nitrogênio, observou-se que nos experimentos com ausência de consórcio, a presença da fonte de carbono e nitrogênio favoreceu a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, porém, na presença do consórcio, a eficiência foi maior na ausência da fonte adicional (Figura 8-B). Entretanto apesar desta interação ser visualizada na Figura 8, os valores estatísticos não corroboram essa associação.

A interação entre correção do pH e presença de fonte de carbono e nitrogênio também não teve significado estatístico, pois independente da adição ou não da fonte extra, a correção do pH apresentou melhores resultados (Figura 8-C).

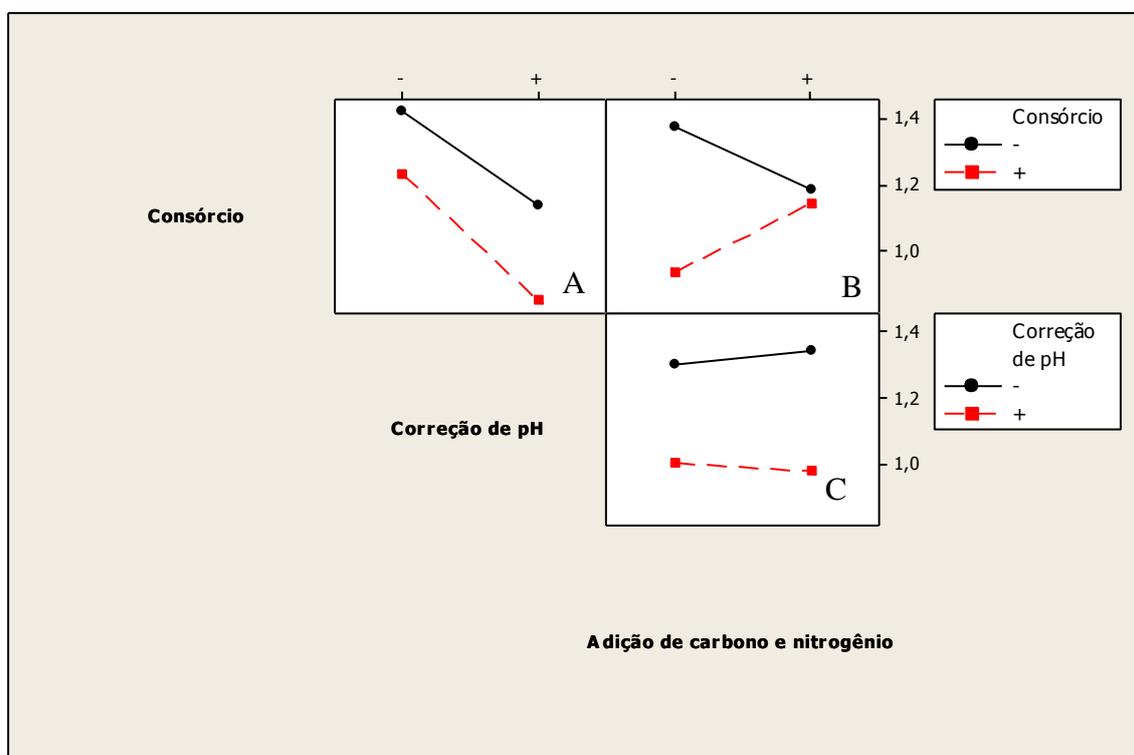


Figura 8- Interação entre os parâmetros avaliados na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos. A – interação entre consórcio e correção de pH; B – interação entre consórcio e fonte de carbono e nitrogênio e C- interação entre correção de pH e fonte de carbono e nitrogênio.

eficiência de degradação, com exceção do experimento 3, que obteve valores estatisticamente similares ao experimento controle (Figura 9). Neste experimento não foi feita a correção de pH e foi acrescentada a fonte de carbono e nitrogênio. Estas condições podem ter favorecido a microbiota nativa.

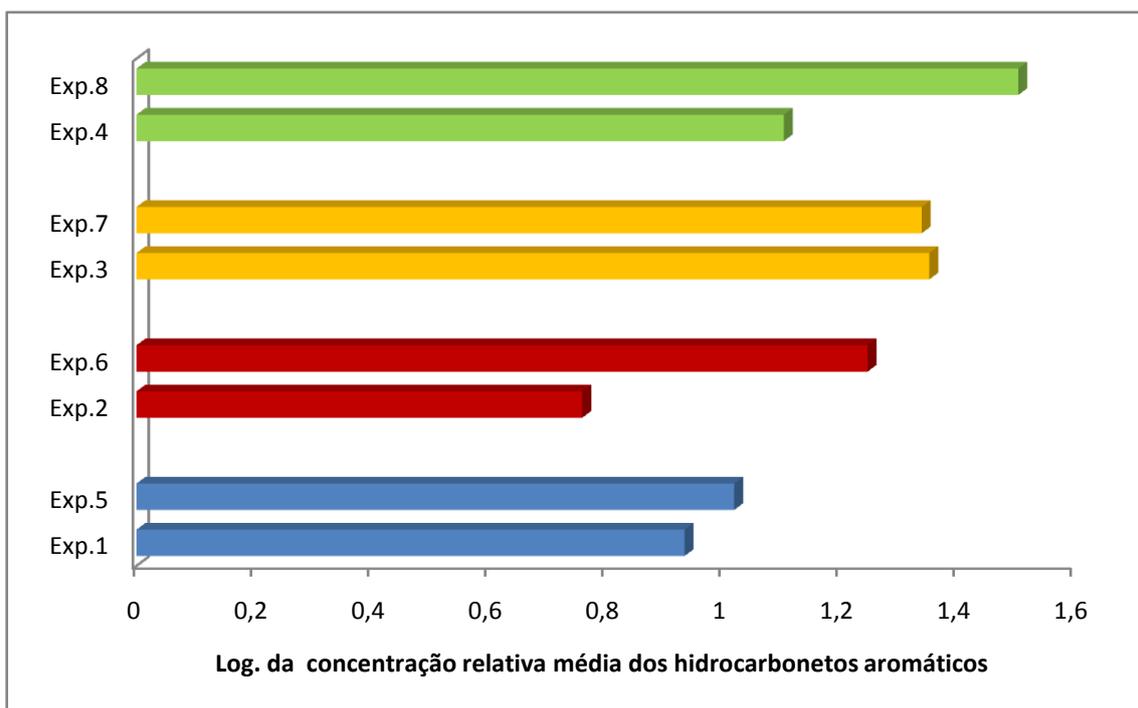


Figura 9- Comparação das concentrações relativas de hidrocarbonetos aromáticos dos experimentos com consórcios (4, 3,2,1) e seus respectivos controles (8,7,6,5).

**Exp. 01-** Consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 02-** Consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; **Exp. 03-** Consórcio sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 04-** Consórcio sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N; **Exp. 05-** Sem adição do consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 06-** Sem adição do consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; **Exp. 07-** Sem adição do consórcio e sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 08-** Sem adição do consórcio e sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N

### 6.3.3 Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

A Tabela 6 apresenta a matriz estendida do planejamento experimental 2<sup>3</sup> com os valores da concentração relativa média e do logarítmo decimal de cada concentração para dos hidrocarbonetos totais avaliados (tridecano, tetradecano, hexadeceno, fenildecano, pireno, naftaleno e fenantreno).

**Tabela 6- Matriz estendida do planejamento experimental 2<sup>3</sup> para os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos**

Exp.	Presença de consórcio <sup>1</sup>	Correção a pH neutro <sup>2</sup>	Fonte adicional de carbono e nitrogênio <sup>3</sup>	Concentrações relativas de hidrocarboneto <sup>4</sup> (%)	Logarítmo decimal da concentração de hidrocarbonetos <sup>5</sup>
01	+	+	+	20,37±4,28	1,3022±0,0957
02	+	+	-	10,46±5,76	0,980±0,219
03	+	-	+	25,88±3,82	1,4399±0,1330
04	+	-	-	18,76±5,03	1,3015±0,2717
05	-	+	+	27,74±5,03	1,4383±0,0803
06	-	+	-	23,71±8,11	1,3553±0,1659
07	-	-	+	41,01±9,66	1,6095±0,0654
08	-	-	-	41,41±6,39	1,6094±0,0992

<sup>1</sup> + corresponde a presença e - a ausência do consórcio bacteriano.

<sup>2</sup> O nível + corresponde a pH = 7,0 ± 0,1 e o nível - a pH = 3 ± 0,1.

<sup>3</sup> + corresponde a adição de fonte de carbono e nitrogênio e - a não adição

<sup>4</sup> Média das concentrações relativas de três experimentos (tempo 28 dias) mais desvio padrão

<sup>5</sup> Média do logarítmo decimal das concentrações de três experimentos mais desvio padrão

Como mencionado para os hidrocarbonetos alifáticos e para os aromáticos quando avaliados separadamente, na análise destes hidrocarbonetos juntos, a presença do consórcio determinou a menor concentração relativa média: 18,87 (Tabela 7).

**Tabela 7- Descrição estatística dos efeitos isolados de cada fator na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.**

Variável		Média da concentração (mc) e desvio padrão	Média log. Concentração (logmc) e desvio padrão
<b>Consórcio</b>	–	33,47±10,42	1,5031±0,1484
	<b>+</b>	<b>18,87±7,07</b>	1,2383±0,2042
<b>Correção do pH</b>	–	31,77±11,66	1,4725±0,1728
	<b>+</b>	<b>20,57±8,40</b>	1,2689±0,2225
<b>Fonte adicional de carbono e nitrogênio</b>	–	23,59±13,40	1,3015±0,2717
	<b>+</b>	28,75±8,98	1,4399±0,1330

(-)ausência (+) presença

No trabalho de Oliveira (2001) sobre biorremediação de solos contaminados com petróleo utilizando consórcio de fungos e bactérias é destacado que o uso de cultura mista foi o fator que mais contribuiu para a remoção da fração pesada de óleo. O uso de cultura mista tem se configurado como importante e promissora ferramenta biotecnológica para os tratamentos ambientais. Na Tailândia, Charoenchang *et al.* (2003) encontraram um potente consórcio de microrganismos degradadores de fenantreno, fluoranteno e pireno em folhas de árvores tropicais e usaram estas bactérias para bioaugmentação de solo contaminado com Hidrocarbonetos poliaromáticos. Eles sugeriram que as folhas das árvores e suas bactérias associadas poderiam ser utilizados diretamente como inóculos para biorremediação.

O fator correção do pH também apresentou importância significativa na degradação dos compostos (Figura 10). A presença da fonte adicional de carbono e nitrogênio não representou contribuição ao processo, demonstrando maior concentração relativa média do que na ausência (Figura 10).

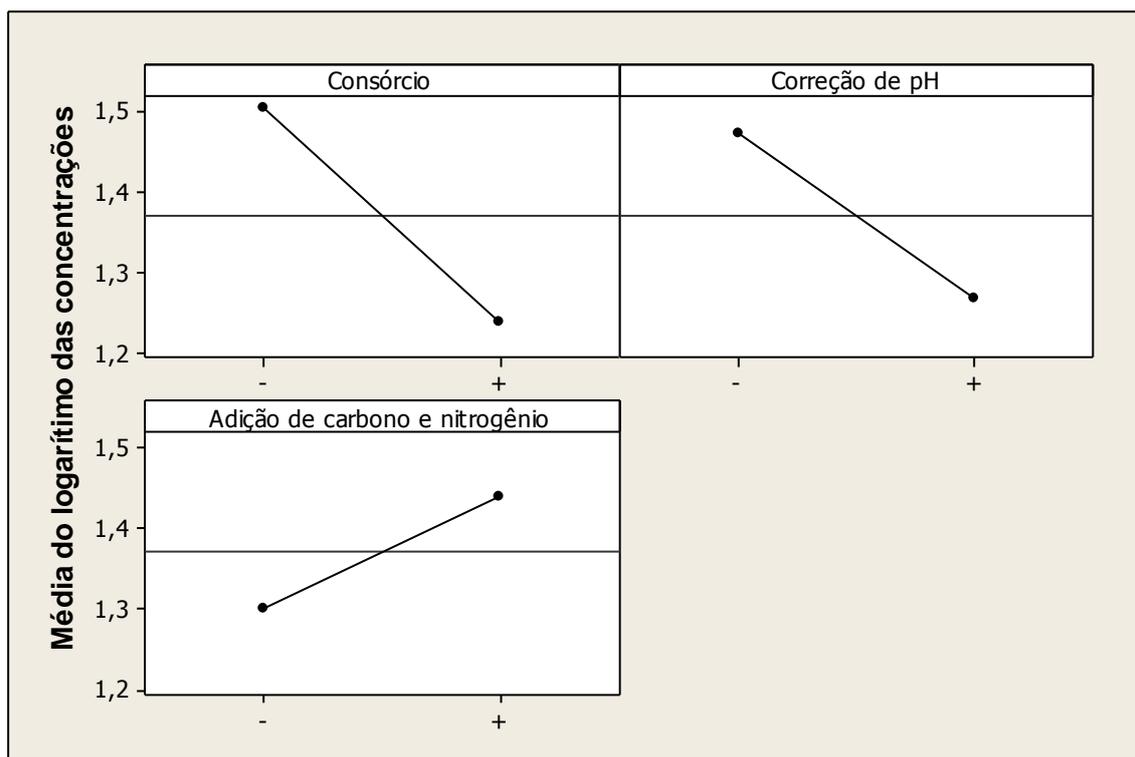


Figura 10- Efeitos principais dos parâmetros (consórcio, correção de pH, carbono e nitrogênio) avaliados na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

Oliveira (2001), nos ensaios de biodegradação em solo observou que o parâmetro pH não melhorou a eficiência do processo. Entretanto no presente estudo, considerando as concentrações relativas dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, a correção do pH teve um efeito principal significativo, indicando que esta alteração promove maior degradação dos compostos.

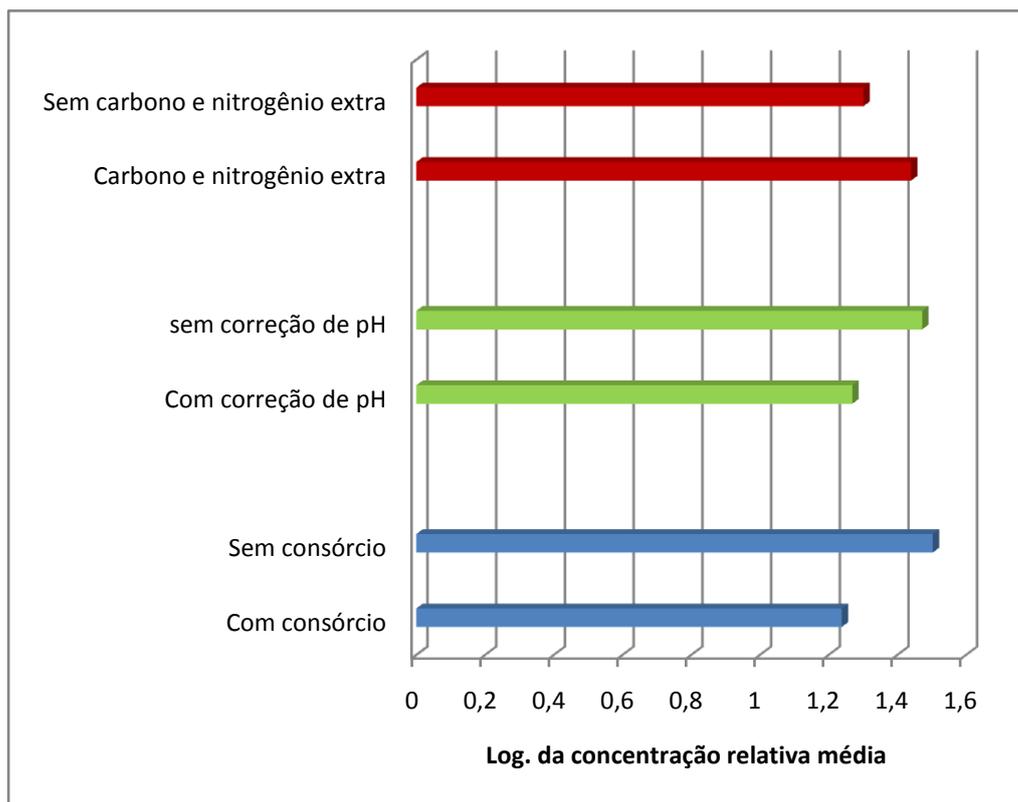


Figura 11- Comparação dos efeitos principais da presença e ausência de cada parâmetro na avaliação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.

Na Figura 11 observamos uma comparação do processo envolvendo todos os hidrocarbonetos avaliados. Assim é possível visualizar a maior eficiência dos parâmetros consórcio e correção do pH, como já mencionado.

Aparentemente a interação entre o consórcio e a correção do pH foi positiva, apresentando maior eficiência na redução da concentração dos hidrocarbonetos (Figura 12-A). A presença da fonte de carbono e nitrogênio foi um fator inibitório para a biodegradação dos hidrocarbonetos avaliados (Figura 12-B). Bento (2003) descreve que a adição de nutrientes em experimento sob biodegradação de solos teve efeitos mínimos.

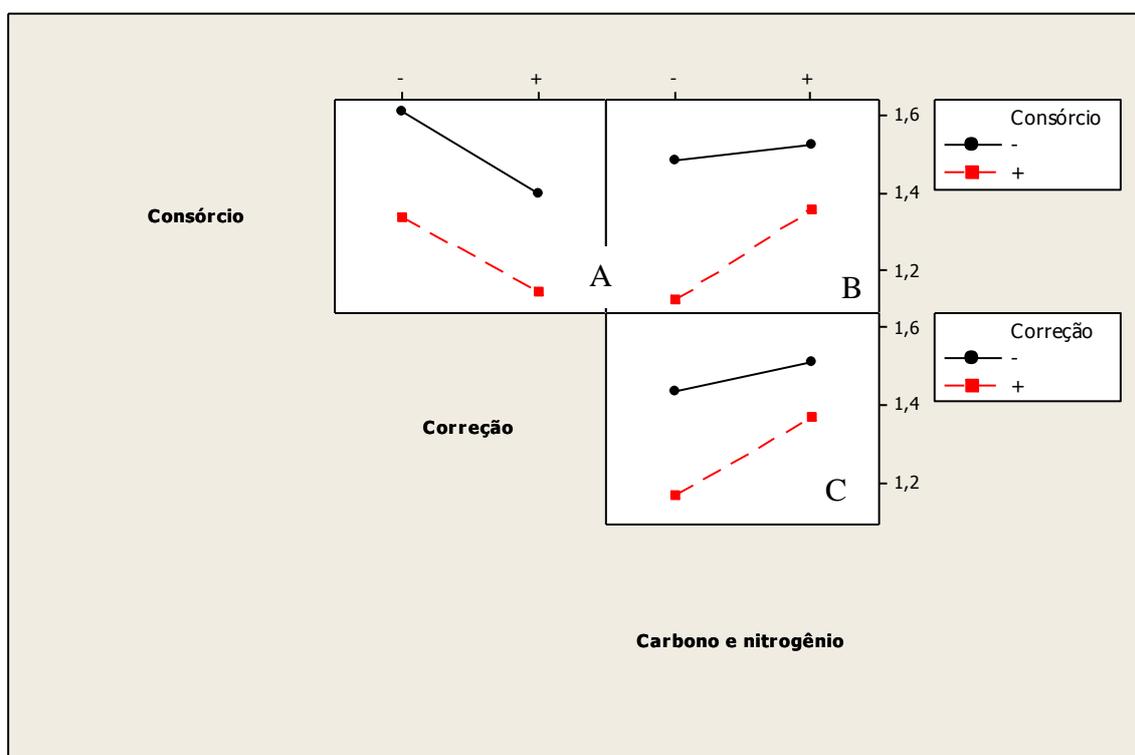


Figura 12- Interação entre os parâmetros avaliados na degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. A – interação entre consórcio e correção de pH; B- interação entre consórcio e fonte de carbono e nitrogênio e C- interação entre correção de pH e fonte de carbono e nitrogênio.

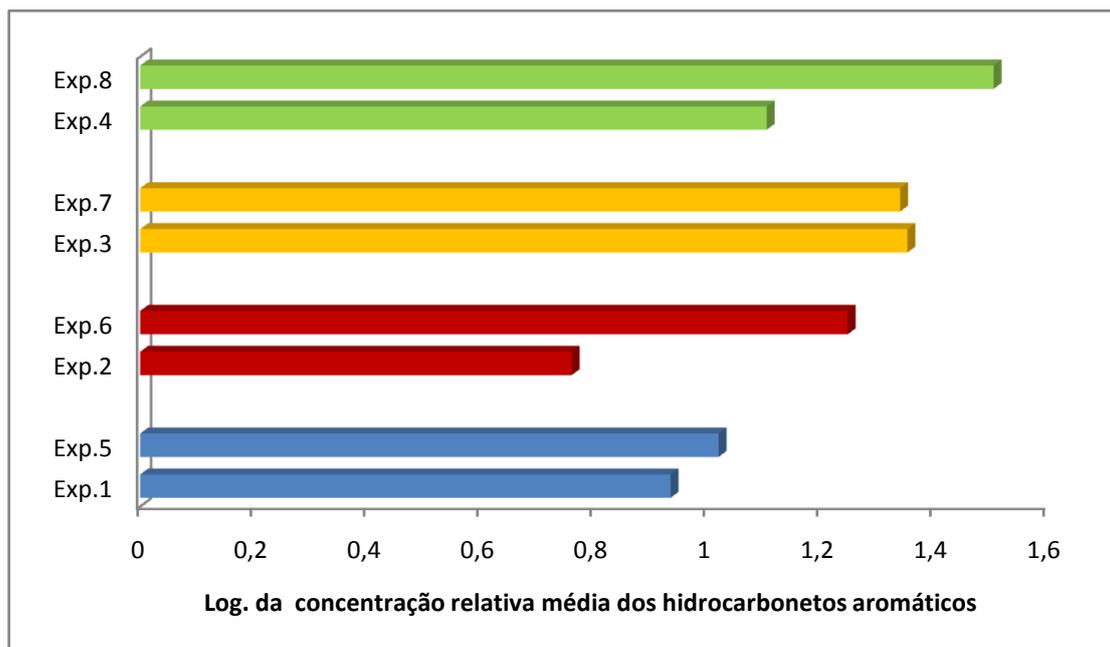


Figura 13- Comparação das concentrações relativas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos dos experimentos com consórcios (4, 3,2,1) e seus respectivos controles (8,7,6,5). **Exp. 01**- Consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 02**- Consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; **Exp. 03**- Consórcio sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 04**- Consórcio sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N; **Exp. 05**-Sem adição do consórcio + alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 06**- Sem adição do consórcio + alteração de pH sem adição de fonte de C e N; **Exp. 07**-Sem adição do consórcio e sem alteração de pH + fonte adicional de C e N; **Exp. 08**- Sem adição do consórcio e sem alteração de pH sem fonte adicional de C e N

A Figura 13 apresenta, de forma geral, o comportamento dos oito experimentos realizados (Tabela 1), havendo melhores taxas de degradação nos experimentos com consórcio, exceto no experimento três, considerando que seu controle (exp.7) apresentou taxas tão significativas de degradação.

Bento *et al.* (2003) avaliaram a atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação, concluindo que a bioaugmentação apresentou os melhores resultados de degradação tanto das frações leves, quanto das pesadas do petróleo e que a atenuação natural foi mais eficiente do que a bioestimulação. Concluiu ainda que a melhor performance para a biorremediação do solo contaminado com diesel foi obtida quando foram adicionados microrganismos pré-selecionados do ambiente contaminado.

Mariano (2006) cita que Venkateswaram & Harayama (1995), por meio do enriquecimento de culturas, isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto, verificando que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presentes foram biodegradadas por uma cultura mista. Contudo, quando as culturas foram colocadas puras, nenhuma delas apresentou melhor degradação do que quando estavam consorciadas. Entretanto há trabalhos como o de Mariano *et al.*(2007) que registram que a bioaugmentação com consórcio de bactérias isoladas de Landfarming foi a variável que apresentou os menores efeitos positivos nas taxas de biodegradação. Nos estudos destes autores apesar de ser possível observar claramente a melhoria na eficiência de biodegradação, não foi comprovada estatisticamente haver diferença dos controles.

No presente estudo, o modelo estatístico que se delineia, apesar da visualização da eficiência das interações na degradação dos hidrocarbonetos totais avaliados é o que considera apenas os efeitos principais de cada parâmetro, não tendo as associações, mesmo aparentemente mais eficientes, valor estatístico significativo. Assim considera-se o consórcio ( $p=0,000$ ) o principal fator responsável pelos resultados de biodegradação avaliados, seguido da correção do pH ( $p=0,001$ ) e ausência de fonte adicional de carbono e nitrogênio ( $p=.0,017$ ).

#### 6.3.4 Cinética de degradação

Alíquotas dos experimentos foram coletadas nos tempos 0, 7, 14 e 28 dias para avaliação da cinética de degradação, mensurada por meio da análise das concentrações relativas médias dos hidrocarbonetos em estudo (tridecano, tetradecano, hexadeceno, fenildecano, naftaleno, fenantreno e pireno).

As Figuras 14 e 15 mostram os cromatogramas do experimento 1 (Tabela 1) com 7 e 28 dias respectivamente . Ao se observar a cinética da degradação dos hidrocarbonetos (Figura 16) visualizamos que os experimentos 1,2,3 e 4, que possuem o inóculo do consórcio apresentam a cada tempo avaliado menor concentração de hidrocarbonetos, havendo entretanto degradação também nos experimentos controles (5,6,7 e 8). Isto indica também importante atuação da microbiota nativa. Vale ressaltar que como a água utilizada nos experimentos não foi esterilizada era esperado que processos de degradação também ocorressem nos experimentos controles.

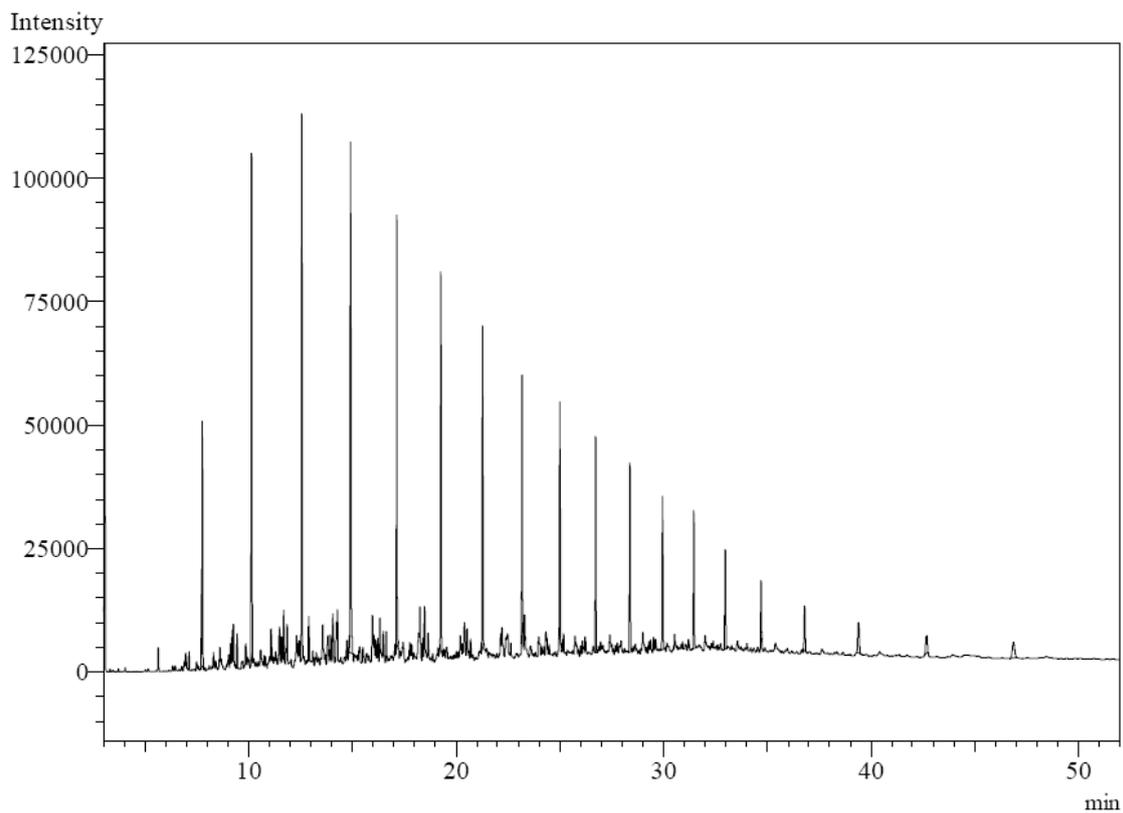


Figura 14- Cromatograma do experimento 01 após 07 dias de incubação

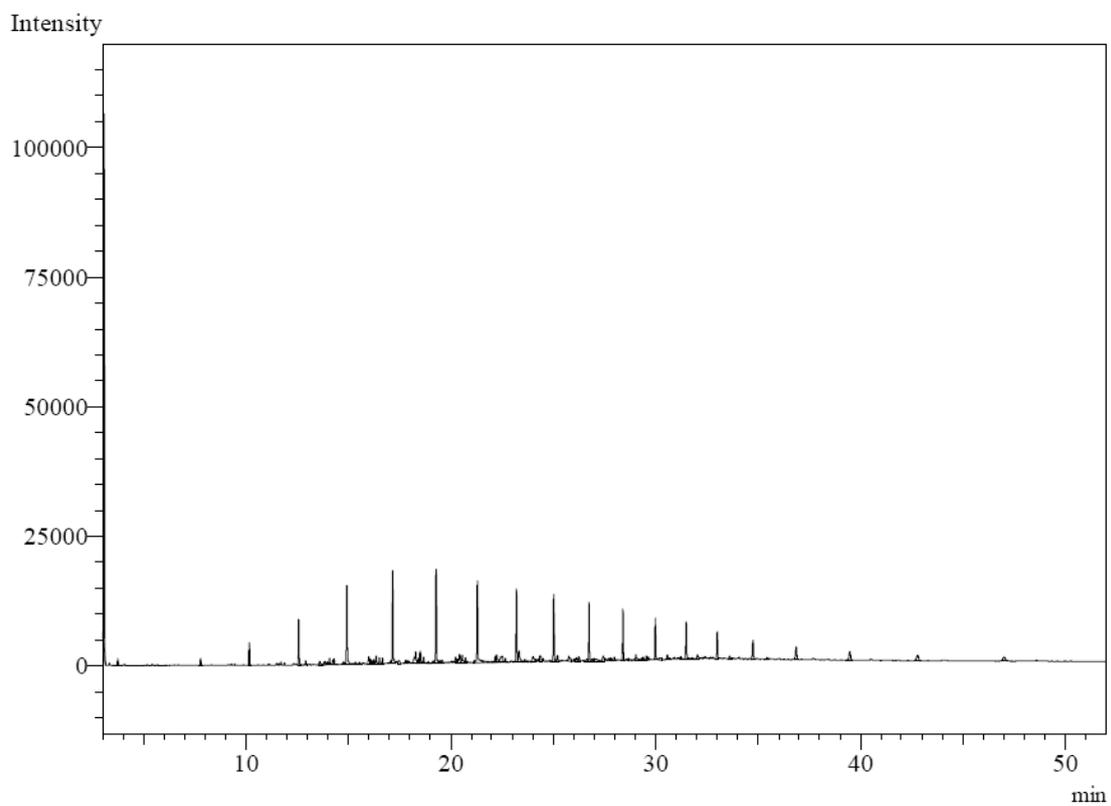


Figura 15- Cromatograma do experimento 01 após 28 dias de incubação.

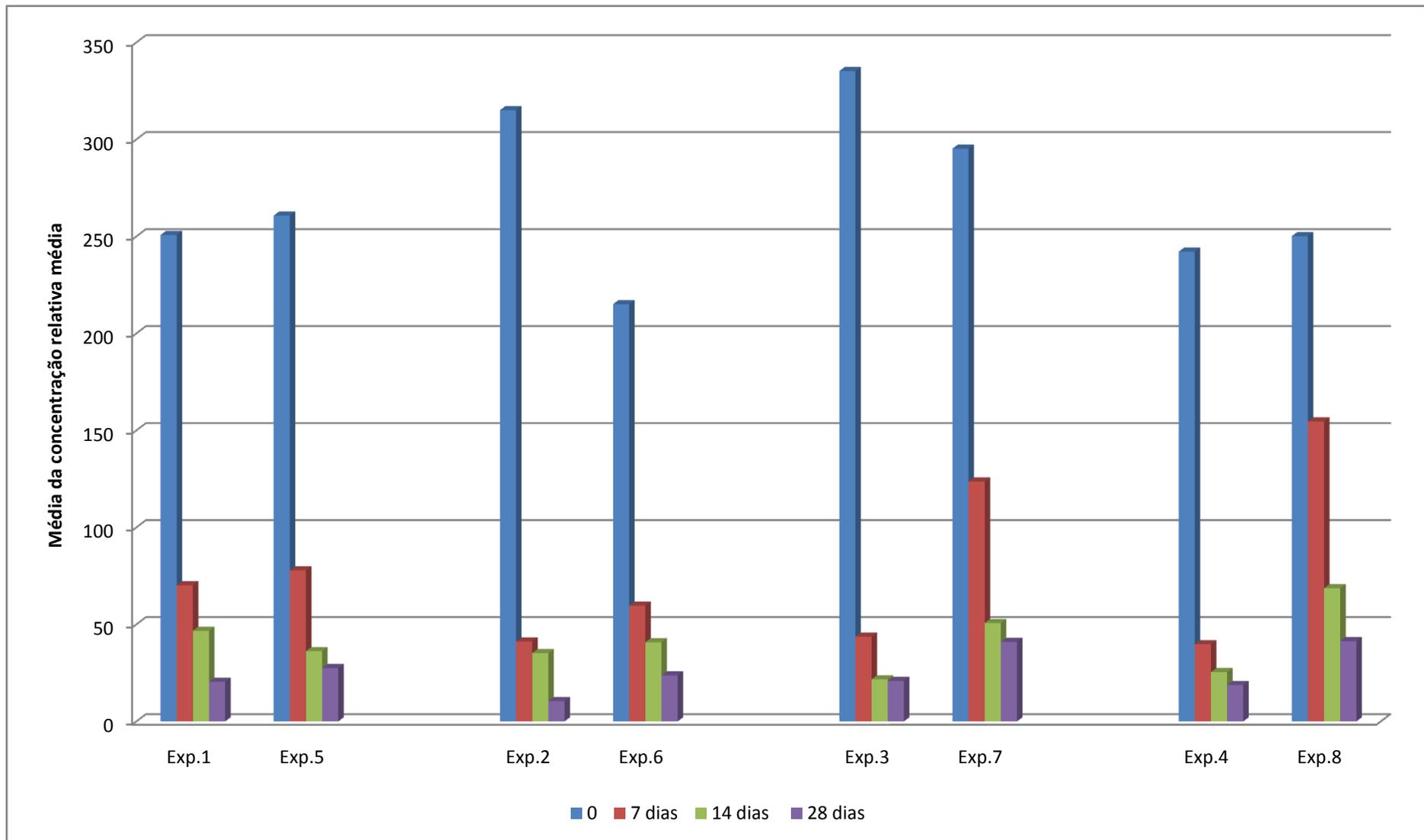


Figura 16- Cinética da degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

Uma visualização do processo é mostrada nas Figuras 17 e 18.

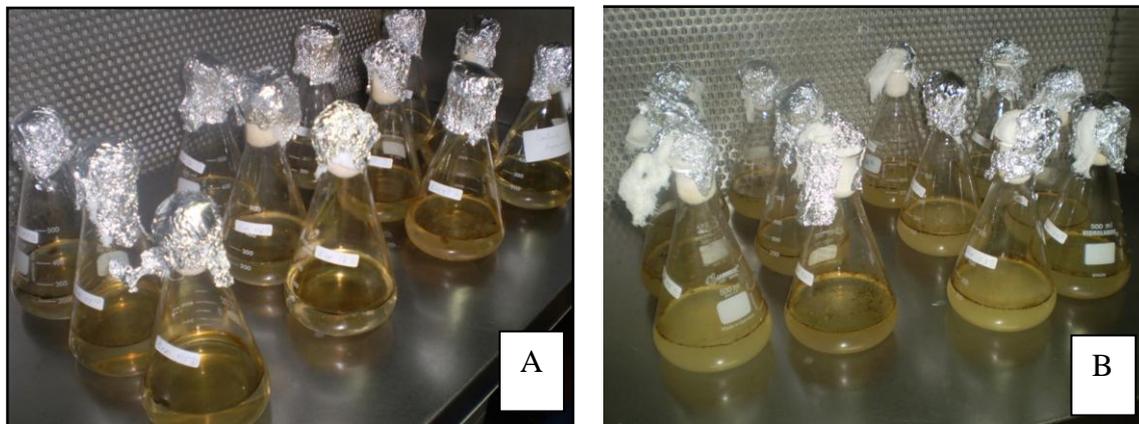


Figura 17- Experimentos após 7 dias. **A-** sem adição de consórcio **B-** Experimentos com adição de consórcio.

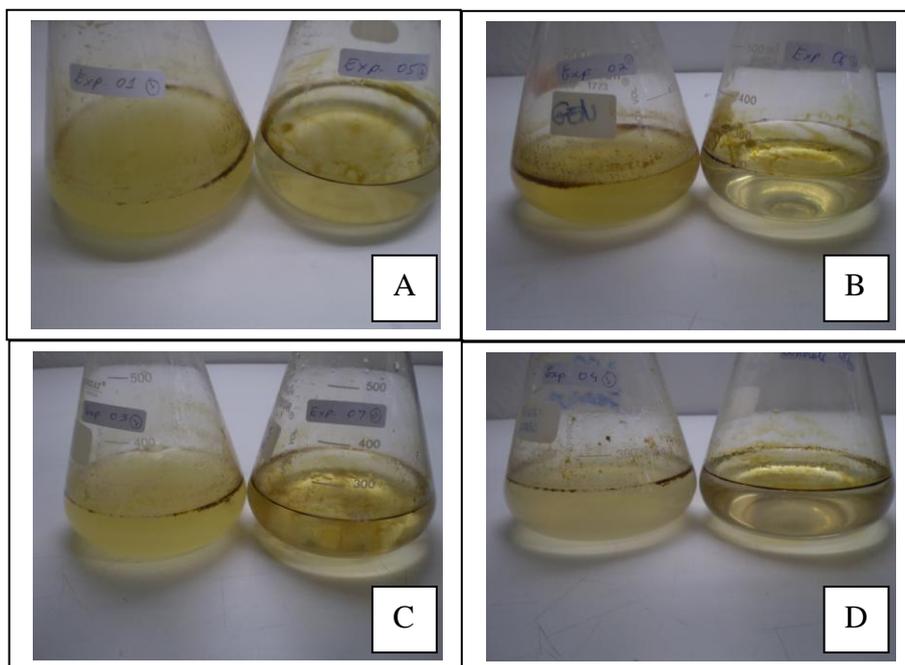


Figura 18- Experimentos após 28 dias. **A-** Exp.1 (com consórcio) e Exp. 5 (sem consórcio) **B-** Exp.2 (com consórcio) e Exp. 6 (sem consórcio) **C-** Exp.3 (com consórcio) e Exp. 7 (sem consórcio) **D-** Exp.4 (com consórcio) e Exp. 8 (sem consórcio)

## 6.4 Conclusões

- ✚ As estratégias de biorremediação testadas *ex situ* neste estudo mostraram-se potencialmente promissoras;
- ✚ De acordo com o modelo estatístico esboçado ao nível de significância de 5% os valores do p-value foram: consórcio  $p=0,000$ ; correção de pH  $p=0,001$  e ausência de carbono e nitrogênio  $p= 0,017$ . Assim, considera-se que todos os parâmetros avaliados apresentaram efeito, entretanto a presença do consórcio foi o fator mais importante na degradação dos hidrocarbonetos avaliados;
- ✚ Comparando-se os valores obtidos quando avaliados hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos separadamente, observa-se que houve consumo preferencial pelos compostos alifáticos;
- ✚ As melhores condições descritas para o processo podem ser resumidas como adição do consórcio, correção do pH e ausência de fonte adicional de carbono e nitrogênio.
- ✚ Considera-se que as bactérias utilizadas no consórcio avaliado neste estudo, apresentaram significativa vantagem na degradação dos compostos do petróleo, tornando-as linhagens promissoras para possíveis tratamentos por biorremediação;

## VII Considerações finais

✚ Com a realização deste estudo, microrganismos com potencial biodegradador foram identificados e conseqüentemente podem vir a ser empregados em processos de degradação de hidrocarbonetos no ambiente ou na produção de enzimas de valor biotecnológico. Acredita-se que seja possível obter bioprodutos para remediação de áreas impactadas com petróleo. Desta forma espera-se que a proteção dos ecossistemas, em especial os aquáticos possa ter um elemento a mais na sua efetivação.

✚ Espera-se que este conhecimento proporcione meios para aprimorar processos de biorremediação utilizando culturas de microrganismos oriundos da região amazônica, e portanto, adaptados ao clima da região, o que é um fator determinante para o êxito dos biotratamentos ambientais.

## REFERÊNCIAS

ABBASSI, Bassim E. & SHQUIRAT, Walid D. Kinetics of Indigenous Isolated Bacteria used for Ex-Situ Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil. **Journal Water, Air & Soil Pollution**. Springer Netherlands, v.192, nº 1, 2007.

ABBATI, C. & SILVA, E.L. **Remoção de sulfetos em efluentes líquidos por bactérias fotossintéticas em biorreator convencional**. Trabalho apresentado no VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005.

ABDEL- EL-HALEEM, D, BESHAY U, ABDELHAMID AO, MOAWAD H, ZAKI S. Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. Strain W-17. Afr. **Journal of Biotechnology**, v.2, p. 8-12, 2003.

ALLI, M.M.; MURPHY, K.J.; ABERNETH, V.J. **Macrophyte functional variables versus species assemblages as predictors of trophic status in flwing waters**. *Hydrobiologia*, v.415, p. 13-138, 1999.

AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and n-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. **Marine Pollution Bull**, v..30, n.6, p.403-408, 1995.

AISLABIE, J.; BEJ, A.K.; HURST, H.; ROTHENBURGER, S.; ATLAS, R.M. Microbial degradation of quinoline and mehyquinolines. **Applied & Envinmental Microbiology**, v. 56, p. 345-351, 1990

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. Academic Press: San Diego, 1994.

ALVAREZ, HÉCTOR M.; PUCCI, Oscar H., **Biodegradación de hidrocarburos por bacterias Actinomycetes aisladas en la Patagonia Central**. In: 4tas. Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y Gas, V. 2. P.99-106, 2000.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-enxertos de Citros**. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, da Universidade de São Paulo. Piracicaba/São Paulo. 1996. 99p.

ASHOK BT, SAXENA S, Musarrat J. Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.246–248, 1995.

ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbons degradation-bioremediation of soils spills. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**. V.52, p. 149-156, 1994

AZEVEDO, João Lúcio. Botânica: uma Ciência básica ou aplicada?. **Revista brasileira de Botânica**. São Paulo, V.22, n.2(suplemento), p.225-229, out. 1999.

AZEVEDO, J.L, MACCHERONI-JÚNIOR, W.M, PEREIRA, J.O, and ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4>. acesso em dez/2000.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, p. 495-508, 2000.

BARATHI, A., VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Rev. Environment International**, v. 26, p. 413-416, 2001.

BARBOSA, S. P. P.; CAMINHA, M. C. C.; PAZ, M. C. F. **Identificação da Microbiota Bacteriana Autóctone de Efluentes Petroquímicos no Município de Fortaleza**. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. João Pessoa. PB. 2007.

BASTOS, A. E. R. ; ALMEIDA, R. S. ; RIBEIRO, D. N. ; BORGES, C. C. ; NASCIMENTO FILHO, V. ; FIGUEIRA, A. . **Acumulação de metais pesados**

**(Zn, Cu, Pb,Hg e Cd) em cana-de-açúcar (Saccharum officinarum L.).** In: VIII Encontro Científico dos Pós-Graduandos no CENA/USP, 2002, Piracicaba-SP.

BATISTA, S. B. **Bactérias de Ambientes Contaminados Com Petróleo ou Derivados Produtoras de Surfactantes e Emulsificantes.** Tese apresentada Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. Viçosa. Minas Gerais. 2002. 32p.

BLACK, G. A. Os capins Aquáticos da Amazônia. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte**, v. 19, p.53-94, 1950.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.283-288, 2002.

BENTO, F. M. *et al.* Bioremediation approaches for soil contaminated with diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34,supl.1, p. 65-68, 2003.

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

BENTO, Fátima M.; CAMARGO, Flávio A. O.; OKEKE, Benedict; FRANKENBERGER-JUNIOR, WILLIAN T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34 (Supl.1), p.65-68, 2008.

BENTO, Fátima M.; CAMARGO, Flávio A.O.; GAYLARDE, Christine C. Biosurfactantes. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. **Microbiologia Ambiental**. 2ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

BICCA, Flávio C.; FLECK, Leonardo C. & AYUB; Marcos Antônio Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p.231-236, 1999.

BIDOIA, E.D.; DOMINGUES, R.F. Estudo da biodegradação de efluente oleoso automotivo. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.71, (supl.), p.1-749, 2004.

BILLS, G., A.; DOMBROWSKI, F.; PELAEZ, J.; POLISHOOK,; An, Z. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. Pp.165–194. In: Watling R., Frankland J. C., Ainsworth A. M., Issac S.; Robinson C. H.. (ed.), **Tropical mycology: micromycetes**; v. 2. CABI Publishing; New York - N.Y, 2002.

BOONCHAN, S. *et al.* Degradation and mineralization of highmolecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungalbacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1007-1019, 2000.

BODOUR, A.A; MILLER-MAIER, R.M. Application of modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal Microbiology Methods**, v.32, p.273-280, 1998.

CARVALHO, D.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. **Production of extracellular surface-ative compounds by microorganisms grown on hydrocarbons**. In: INTERNATIONAL IN SITU AND ON-SITE BIOREMEDIATION SYMPOSIUM, 4, 1997, New Orleans. Columbus: Battelle Press, v. 4, p. 91 – 97, 1997.

CASTELÕES, Liliâne. 2002. **Bacia sedimentar do Amazonas é a terceira em produção de petróleo**. Disponível em <http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet12.shtml>. Acesso em 10/08.

CASTIGLIONI, Gabriel L.; BERTOLIN, Telma E.; COSTA, Jorge Alberto V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, n.º. 2, p.292-295, 2009.

CALHOUN, L. A.; FINDLAY, J. A.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, Cambridge. v. 96, n. 4, 1992.

CAMARGO, A.F.M.; PEZZATO, M.M.; HENRY-SILVA, G. Fatores limitantes à produção primária de macrófitas aquáticas. In THOMAZ, S.M. & BINI, L.M. (Ed) **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. Edwen, Maringá, 2003.

CASSA BARBOSA, L. A. **Isolamento de Fungos Endofíticos de *Copaífera Multijuga* e produção de Enzimas de interesse Biotecnológico por diversos Isolados**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília UNB, Brasília, DF, 2001. 98p.

CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 170, p. 569-574, 1995.

CHAROENCHANG, N.; PINPHANICHAKARN, P.; PATTARAGULWANIT, K.; THANIYAVARN, S.; JUNTONGJIN, K. Utilization of agricultural materials to enhance microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. **Journal Science Research Chulalongkorn University**, v. 28,p. 1-13, 2003.

CHHATRE, S.; PUROHIT, H.; SHANKER, R.; KHANNA, P. Bacterial consortia for crude oil spill remediation. **Water Science Technology**, v. 34, n. 10, p. 187 –193, 1996.

CENCIANI, K.; **Diversidade Bacteriana em Solos da Amazônia: Variabilidades dos Gêneros Associados ao Processo de Nitrificação**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz. Piracicaba. SP. 2007.

CETESB. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. Relatório técnico, 2003. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/aguas\\_final.zip](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/aguas_final.zip)> Acesso em: 26 jul. 2008.

CLARK, P.J.; WARD, T.J. The response of southern hemisphere saltmarsh plants and gastropods to experimental contamination by petroleum hydrocarbons. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 175, p.43-57, 1994.

CRAPEZ, M.A.C; BORGES, A.L.N; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo, **Ciência Hoje**, Vol 30, N 179, 2002.

CRAVO Jr.; W. B. **Biodegradação de querosene de aviação (QAV) por culturas mistas e por *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Rio de Janeiro/EQ, Rio de Janeiro., 1998. 68p.

CRAWFORD, R.L. & CRAWFORD, D.L. **Bioremediation: principles and applications**. Great Britain: Cambridge University Press, 1996.

COLLA, L. M. & COSTA, J. A. V.; Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. **Vetor**, v.13, p. 85-103, 2003.

COLLA, Luciane Maria; PRIMAZ, Andreiza L.; LIMA, Marieli; BERTOLIN, Telma Elita; COSTA, Jorge Alberto V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

CONEGLIAN, C.M.R; SIVIERO, A.R.; POLETTI, E.C.C.; VENDEMIATI, J.A.S.; DRAGONI, G.S.; RIBEIRO, M.S.; ANGELIS, D.F.; FURLAN, L.T.; GONÇALVES, R.A. Avaliação da biodegradação no solo de resíduos gerados em refinaria de petróleo. **HOLOS Environment**, v.6. n.2, 2006-p.106, 2006.

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

CORRÊA, Célia Maria D. **Efeito de óleo de soja na persistência de Endosulfan no ambiente**. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” da Universidade de São Paulo, 2005. ;

COSTA NETO, P.Q.. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e caracterização genética através de marcadores moleculares**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Amazonas, São Carlos, SP, Brasil, 2002. 123p.

COSTA, Andréa F.S.; SILVA, José Roberto R.; SANTOS, Roberto César M.; FARIAS, Charles B.; SARRUBO, Leonie A., JORDÃO, Roziana C.C.; SALGUEIRO, Alexandra A. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciências e Tecnologia**. Ano 1 • n. 1, 2007.

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

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

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTEWER, P. Metagenomic gene discovery: Past, present and future. **TRENDS in biotechnology**, v. 23, p. 321-329, 2005.

CRUZ, A.A.. **Diversidade, patogenicidade e características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) & Sacc. Endofítico e Patogênico**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia- Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil, 2004. 58p.

CUNHA, Cláudia D.; LEITE, Selma G. F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p.45-49, 2000.

DEL'ARCO, J. P. **Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/EQ), 1999. 171 p.

DEL'ARCO, J. P.; de FRANÇA, F. P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbons biodegradation in sandy sediment. **Environmental Pollution**, v.110, p.515-519, 2001.

DESAI, Jitendra D.; BANAT, Ibrahim M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.61, n° 1, p. 47–64, 1997.

DIAS, Fábio G. **Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo**. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, SÃO PAULO, 2007. 106p.

DRUMOND, A.A.; GALVÃO, R.M.S.; PEREIRA, J.O.; COSTA NETO, P.Q.. Fungos endofíticos de cumaru (*Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd): Isolamento e identificação. In III Congresso Brasileiro de Micologia. **Micologia: Desenvolvimento e perspectivas para o milênio**. Águas de Lindóia, SP, Brasil, p.73, 2001.

DUTKA, B. J. (Ed). **Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments**, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canadá, 1989.

ESTEVES, F. A.; MENEZES, C. F. S. Productivity and organic carbon release in a tropical aquatic macrophyte: *Utricularia breviscapa* Griseb. **International Journal of Ecology and Environmental Sciences**, v. 18, p. 55-61, 1992.

EZAWA, HELENA K. H. **Caracterização da comunidade microbiana e atividade enzimática de bactérias termofílicas isoladas da folha do dossel**

**da espécie florestal *Goupia glabra* Aubl. (cupiúba).** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, 2008. 80p.

FAY, Elisabeth F.; SILVA, Célia Maria M. S.; MELO, Itamar S. Degradação de xenobióticos. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. **Microbiologia Ambiental**. 2ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for delivery of agrochemicals to plants. ACS SYMP. SER in: **Biologically Active Natural Products: Potential use Agriculture**, Hanouver, v. 380, 1998.

FEDORAK, P.M. & GRBIC-GALIC, D. Aerobic microbial cometabolism of benzothiophene and 3-methyl-benzothiophene. **Applied & Environmental Microbiology**, v. 57, p. 932-940, 1991.

FERRARI, M. D. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación em la biorremediación de suelos y lodos contaminados. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 28, p.83-98, 1996.

FERREIRA, P. S. **Avaliação físico-química e microbiológica de aquífero contaminado com gasolina no Rio de Janeiro – RJ.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 1997. 109p.

FERREIRA, C. M.; Testes de Toxicidade Aquática para Monitoramento Ambiental. Instituto de Pesca Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Peixes Ornamentais Laboratorial de Referência de Patologia de Organismos Aquáticos. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.17-18, 2003.

FLETCHER, J. A brief overview of plant toxicity testing. In: GORUCH, J.W.; LOWER, W.R.; LEWIS, M.A.; WANG, W. **Plants for toxicity Assessment**. Astm, Philadelphia, PA. ASTM Publication code number (PCN) 04011150-16. pp. 1-11. 1991.

GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Health. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11(3), p. 495-500, 1995.

GASTAL Jr., L. V. S.; IRGANG, B. E. Levantamento de macrófitas aquáticas do Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, **Brasil. Iheringia, série Botânica**, v. 49, p. 3-9, 1997.

GRUIZ, K.; KRINSTON, E. In situ bioremediation of hydrocarbons in soil. **Journal of soil Contamination**, v.4, n.5, p. digital. 1996.

GUIMARÃES, V. G. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro de *Paulinea cupana* H. B. K. ,var. *sorbilis* (Mar) Ducke e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito *Glomerella cingulata***. Dissertação de Mestrado Universidade de São Carlos/ Universidade do Amazonas, 1998.

HANADA, R.E.. **Controle de *Phytophthora palmivora* agente causal da podridão parda dos frutos de cacaueteiro com fungos endofíticos**. Tese de doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006. 101p

HANSON, K.G.; NIGAM, Madhavi K.; ANJANA, J.D. Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter* sp. A3. **Current microbiology**, v. 35, p. 191–193, 1997.

HOEHNE, F.C. **Plantas Aquáticas**. São Paulo: Instituto de Botânica, série D. 1948.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. *et al.* Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **American Journal of Pathology**, v. 145, n<sup>o</sup>. 6, p. 1301-1308, 1994.

JACQUES, Rodrigo J. S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em

Ciências do Solo- Faculdade de Agronomia da Universidade do Rio Grande do Sul, 2005a.

JACQUES, R.J.S. *et al.* Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.56, n.3, p.150-156, 2005b.

JACQUES, Rodrigo J. S.; BENTO, Fátima M. & CAMARGO, Flávio A. O., ANTONIOLLI, Zaida Inês. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, UFSM, v. 29 (1), p. 7 - 24, 2007.

JACOBUCCI CARVALHO, D. F. **Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos**. Dissertação de mestrado – FEA, UNICAMP. Campinas, 2000. 117 p

JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SITA, V. E YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **London: Biotechnology Letters**. v. 6, p. 487 – 490, 1992.

KATAOKA, A.P.A.G.. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”**. Ph.D Thesis. Instituto de Biociências, Unesp-Rio Claro, Rio Claro, 2001.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S.. Biodegradation of High-molecular-weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p.2059-2067, 2000.

KOSARIC, N. Biosurfactants for soil bioremediation. Food Technology and Biotechnology, **Zagreb**, v.39, n.4, p.295-304, 2001.

KRESPY., N. *et al.* **Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bactéria**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, RJ. 2007.

KREPSKY, Natascha; QUEIRÓZ, Fernanda; BARCELOS, Mabel A.; FONTANA, Luis Francisco; BITTENCOURT, José Augusto P.; PIMENTA, Alessandro L; SILVA, Frederico Sobrinho; BISPO, Maria das Graças S.; CRAPEZ, Mírian A.C. **Taxa de emulsificação de derivados do petróleo por bactérias isoladas de mangue.** Trabalho técnico científico apresentado no 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás, 2001.

KREPSKY, N. **Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclasticos.** Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, 2003. 119p.

KUSHIDA, M. M. **Caracterização parcial e propriedades de biossurfactantes bacterianos.** Dissertação de mestrado – FEA, UNICAMP. Campinas, 2000. 78 p.

LACAVA, Paulo T. **Análise da comunidade bacteriana associada a manguezais do Estado de São Paulo com interesse biotecnológico e agrícola.** Programa de Pós-doutorado da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

LACAVA, Paulo T. & AZEVEDO, João L. Técnicas moleculares aplicadas aos estudos de Ecologia microbiana: A PCR em tempo real (2008). In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. **Microbiologia Ambiental.** 2ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

LAGUILIO, J. V. *et al.*: **Isolamento e Identificação de Bactérias Utilizadas no Tratamento de Efluentes da Indústria de Laticínios.** Universidade Estadual de Maringá. XI Encontro Anual de Iniciação Científica. Maringá. PR. 2002

LANGENBACH, T.A. A bioacumulação e a persistência de xenobiontes no ambiente. *In*: HUNGRIA, M.; BALOTA, H.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.; ed. **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI.** III Simpósio

Brasileiro sobre microbiologia do solo. Londrina: Anais...IAPAR/ EMBRAPA-CNPS, 1995. P. 119-136.

LEAHY, J.G & COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**. V. 54, p.305-315, 1990.

LEMOS. Judith L. S. & ARAÚJO, Flávia M. S. 2002. **Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo**. Contribuição Técnica à X Jornada de Iniciação Científica do CETEM, Rio de Janeiro, Julho de 2002.

LIU, D.; MAGUIRE, R.J.; PACEPAVICIUS, G.L.; NAGY, E. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic nitrogen heterocyclics. **Environmental Toxicology & Water Quality**, v. 7, p. 335, 1992.

LOBBAN, C.S., HARRISON, P.J. & DUNCAN, M.J. 1995. The physiological ecology os seaweeds. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge. Pp 255-282. In SILVA, Mônica D.C. **Impacto por Petróleo em Repovoamento de Costões Rochosos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2003.

LOBATO, Ana Katerine C. L.; ARAÚJO, Manuelle M. S.; & MACEDO, Gorete R.. 2003. **Acompanhamento do crescimento da biomassa e síntese de biossurfactantes por microrganismos isolados de poços de petróleo**. Trabalho científico apresentado no 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2003.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M. and LELIE D. V. D., Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews Plant Science**, 21, 583-606, 2002.

LUEPROMCHAI, Ekawan; LERTTHAMRONGSAK, Waurapong; PINPHANICHAKARN, Pairoh; THANİYAVARN, Suthep; PATTARAGULWANIT, Kobchai; JUNTONGJIN, Kanchana. Biodegradation of PAHs in petroleum-

contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. **Songklanakarin Journal Science. Technology**, 29(2) : 515-527, 2007.

MACEDO, R. C.; BERBERT, V. H. C.; RIZZO, A. C. de L.; TRINDADE, P. V. O.; LEMOS, J. L. S. **Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos**. In: X Jornada de Iniciação Científica – CETEM, Rio de Janeiro, Anais. 2002.

MACIEL, I. C. T. **Avaliação do Potencial de Bactérias para Degradar Derivados do Petróleo e Produzir Biossurfactates**. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, UFC. Fortaleza. CE. 2003

MAGALHÃES, H. M.; VALDMAN, E.; “Cinética de Biodegradação de Naftaleno por *Pseudomonas fluorescens* HK44 ” **XII Jornada Interna de Iniciação Científica do CETEM/MCT**. 2004

MAGNANI, G.S. **Diversidade de Bactérias Endofíticas em Cana-De-Açúcar**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Pr. 2005

MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* spp. e interação com *Xylella fastidiosa***. Dissertação (Mestrado) –Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. 91p.

MARIANO, A. P. **Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminados com Óleo Diesel**. Tese de doutorado, Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, São Paulo, 2006

MARIANO, Adriano P.; Kataoka, Ana Paula A.G.; Angelis, Dejanira F.; Bonotto, Daniel M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.346-353, 2007.

MARINS, J. F. **Colonização Radicular de Macrófitas Aquáticas da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná por Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) e Dark Septate Ungi (DSF)**. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Biologia Comparada, Maringá, Paraná, 2008.

MARTINEZ, Camila O. **Biotransformação do herbicida sulfentrazone em solos brasileiros**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2006.

MARIUZZO, Patrícia. **Petróleo e seus efeitos no ambiente**. Disponível em [http://www.comciencia.br/reportagens/2005/11/05\\_impr.shtml](http://www.comciencia.br/reportagens/2005/11/05_impr.shtml). Acesso em 01/03/2007

MARTINS P. F.; MARTINEZ, Camila O.; CARVALHO, Giselle; CARNEIRO, Paulo I.B.; AZEVEDO, Ricardo A.; PILEGGI, Sônia A.V.; MELO, Itamar S.; PILEGGI, Marcos. Selection of Microorganisms Degrading S-Metolachlor Herbicide. **Brazilian archives of biology and technology an international journal**, v.50, nº. 1, p.153-159, January 2007.

MATSUURA, Ani Beatriz J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

MEDEIROS-GALVÃO, R. **Variabilidade Genética detectada por RAPD em *Gromerella cingulata*, um dos fungos mais frequentes isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pteorata***. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Carlos/ Universidade do Amazonas, Manaus, 1998.

MEIRA, Joel A. **Produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos**

**contaminados por hidrocarbonetos.** Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997.

MENDES, Adriano Aguiar, CASTRO, Heizir Ferreira de, PEREIRA, Ernandes Benedito *et al.* Application of lipases for wastewater treatment containing high levels of lipids. **Química Nova**, v. 28, nº 2, p. 296-305, 2005.

MENEZES, C. F. S.; ESTEVES, F. A.; ANÉSIO, A. M. Influência da variação artificial do nível d'água da Represa do Lobo (SP) sobre a biomassa e a produtividade de *Nymphoides indica* (L) O. Kuntze e *Pontederia cordata*. **Acta Limnol. Brasil.**, v. 6, p. 163-172, 1993.

MICHEL, J. **Adverse effects from oil.** Disponível em [http://www.darcnw.noaa.gov/iad\\_apd.pdf](http://www.darcnw.noaa.gov/iad_apd.pdf) . Acesso em abril de 2002.

MIELNICZUK, C. **A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo.** Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1991. 134f.

MILANELLI, J.C.C. **Efeitos do Petróleo e da Limpeza por Jateamento em um Costão Rochoso da Praia de Barequeçaba, São Sebastião, SP.** Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo, 1994. 103p.

MISHAGI, I.J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v.80 , p.808-811, 1990.

MONTEIRO, R. T. Degradação de Pesticidas. *In*: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 440 p.

MORAN, A. C.; OLIVERA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J.L.; SENERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v. 11:, n. 1, p. 65-71 2000.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Universidade Federal de Lavras, p. 277-283, 2002.

MOSTAFA, F. I.; HELLING, C. S. Isolation and 16S DNA characterization of soil microorganisms from tropical soils capable of utilizing the herbicides hexazinone and tebuthiuron. **Journal of Environmental Science and Health. Part B**, v. 38, p. 783-797, 2003.

MOURÃO, L. P. **Seleção de células hospedeiras alternativas para a Engenharia Genética procedentes da flora bacteriana endofítica brasileira**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas/ Universidade Federal de São Carlos, Manaus, 2001. 136 p.

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

MULLIS, K.B.; FALLONA; F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155,p. 335-350, 1987.

MUTNURI, S. *et al.* Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.67, n.4, p.569-576, 2005.

NAKATANI, André S.; SIQUEIRA, José O.; SOARES, Cláudio Roberto F. S. & LAMBAIS, Márcio R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “landfarming” de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p.1501-1512, 2008.

NEDER, R.N. **Microbiologia: Manual de laboratório**. Nobel: São Paulo, 1992.

NETTO, A.D.P. *et al.* Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.

NEVES, E. B. **Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Bactérias**. Tese de doutorado– FEA, UNICAMP Campinas, 2002. 200p.

NEVES, Kilma Cristiane S.; PORTO, Ana Lúcia F.; TEIXEIRA, Maria Francisca S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36(3), p. 299 – 306. Manaus, 2006.

NEWMAN DK, BANFIELD JF. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, v. 296, p. 1071-77, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25 (5), p.772-776, 2002.

OJUMU, T.V.; BELLO, O.O; SONIBARE, J.A.; SOLOMON, B.O. Evaluation of microbial systems for bioremediation of petroleum refinery effluents in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 4 (1), p. 31-35, 2005.

OLIVEIRA, Fernando J. S. O. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001. 101p.

OLIVEIRA, Tereza C.S. **Caracterização de marcadores moleculares e uso de diferentes proxies para estudo do registro de combustão em sedimento na Amazônia Central (Coari-Manaus)**. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2007a. 193 p.

OLIVEIRA, Cristiane R.; VECCHIA, Isadora D. & MADUREIRA, Luiz A.S. **Avaliação da influência do pH e temperatura na biodegradação do pireno pela microbiota nativa do Manguezal de Ratonés, Florianópolis, SC.** Trabalho apresentado na 30<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007b.

PEDERZOLLI, Everton M.; FRONZA, Lice; GANDRA, Michel; SANCHES FILHO, Pedro José; RODRIGUES, Maria Regina A.; MACHADO, Maria Isabel. **Estudo do comportamento dos hidrocarbonetos alifáticos em ambientes rasos, após simulação de um derrame de petróleo.** Trabalho técnico científico apresentado no 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e gás, 2005.

PEDRALLI, G. Macrófitas aquáticas como bioindicadoras da qualidade da água: alternativas para usos múltiplos em reservatórios. In THOMAZ, S.M. & BINI, L.M. (Ed) **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas.** Edwen, Maringá.

PEIXOTO NETO, P.A. de S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. de. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.29, p.62-77, 2002.

PEIXOTO, Raquel S.; ROSADO, Alexandre S.; TAKETANI, Rodrigo G.. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. **Microbiologia Ambiental.** 2<sup>a</sup> Ed. Embrapa Meio Ambiente, 2008.

PEREIRA, J. O. **Fungos endófitos de hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendensis*.** Piracicaba-tese de Doutorado, 1993.

PEREIRA, J. O. ; SOUZA, A. Q. L. ; HANADA, R. E. . Diversidade de Microrganismos Endofíticos de Plantas da Amazônia Brasileira. In: In: Coata-Maia, L; Malosso, E.; Yano-melo, A . M.. (Org.), ed. Recife. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento.** 01 ed. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, v. 01, p. 141-148, 2007.

PETROLEUM GEOSCIENCE TECHNOLOGY. **Geologia do Petróleo**. Disponível em [http://www.pgt.com.br/geologia\\_do\\_petroleo.pdf](http://www.pgt.com.br/geologia_do_petroleo.pdf). Acesso em 02/02/2007.

PIRÔLLO, Maria Paula S. **Estudo da produção de Biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2006.

POMPÊO, M. L. M.; MOSCHINI-CARLOS, VIVIANE. **Macrófitas Aquáticas e perífiton, aspectos ecológicos e metodológicos**. São Carlos: Rima, 2003.

PRINCE, R.C. Petroleum Spill Bioremediation in Marine Environments. **Critical Reviews Microbiology**, v.19, p. 217-242, 1996.

PROCÓPIO, Lorena C.; BRANDÃO, Felipe D.; LIMA, Tânia Maria S.; (2008); TÓTOLA, Rogério; SANTIAGO, Elson A. **Produção e Caracterização de Biossurfactante Produzido por *Arthrobacter oxydans* LBBMA 201 Isolado de Amostra de Borra Oleosa**. Trabalho apresentado na 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

PUCCI, O. H.; BAK, M. A.; PERESSUTTI, S. R.; KLEIN, I.; HARTIG, C.; ALVAREZ, H. M.; WUNSCH, L. Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina). **Acta Biotechnologica**, v.20, n.2, p.129-146, 2000.

QUINTELAS C, FERNANDES B, CASTRO J, FIGUEIREDO H, TAVARES T. Biosorption of Cr (VI) by a *Bacillus coagulans* biofilm supported on granular activated carbon (GAC). **Chemical Engineering Journal** (Online: 9 Abril 2007).

RAMBELOARISOA, E.; RONTANI, J. F.; GIUSTI, G.; DUVVNJAK, Z.; BERTRAND, J. C. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. **Marine Biology**, v. 83, p: 69 – 81, 1984.

RADWAN, S.S. & SORKHOH, N.A. Lipids of n-alkane-utilizing microorganisms and their application potential. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 29-90, 1993.

ROCHA, C.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. ; VIERMA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 125-128,1992.

RODRIGUES, R. S.; IRGANG, B. E. Potamogetonaceae Dumont no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, sér. Bot.**, v.56, 2001.p.3-9.

ROQUE, Milton R. A. & Melo, Itamar S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. **Scientia Agricola**, v.57, n.4, p.723-728, 2000.

RONDON, A.C.F. **Atividade Amilolítica de Fungos Endofíticos Isolados de *Manihot esculenta* Crantz**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil, 2003. 100p

ROSA JR.; Vicente E.; SOUZA, Silvana S. 2007. A engenharia genética e a biotecnologia na produção de novas variedades de cana-de-açúcar. **Revista Painel** p.11-14, ano X, nº 147, 2007.

ROSATO, Yoko Bomura. Biodegradação do Petróleo. *In* MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997.

ROSENBERG, Eugene & RON, Eiora Z. Bioremediation of petroleum contamination. *In* CRAWFORD, R.L. & CRAWFORD, D.L. **Bioremediation: principles and applications**. Great Britain: Cambridge University Press, 1996.

SALLES, J.F.; GITAHY, P.M.; Skøt, L.; BALDANI, J.I. 2000. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the cryA gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 31:155-161.

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JR.; N.; FREIRE, D.M.G. 2002. Production of biosurfactants from *pseudomonas aeruginosa* pa1 isolated in oil environments. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 19, N<sup>o</sup>. 02, p. 159 - 166, 2002.

SANTOS, Eunice S.. **Microorganismos para a degradação de compostos fenólicos bagaço-de-açúcar, lodo e águas residuais da agroindústria sucro-alcooleira**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2007.

SAVERGNINI, Fernanda; GUERRA, Leandro V.; BARCELOS, Mabel A.; CRAPEZ, Mirian A.C. **Produção de surfactante por consórcios bacterianos isolados de substratos marinhos sob a influência de compostos aromáticos**. Trabalho técnico científico apresentado no 3<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2004.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. **Biodegradation**, v.12, p. 311–316, 2001.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

SEABRA, Paulo N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. **Microbiologia Ambiental**. 2<sup>a</sup> ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

SICILIANO, S. D.; FORTIN, N.; MIHOC, A.; WISSE, G.; LABELLE, S.; BEAUMIER, D.; OUELLETTE, D.; ROY, R.; WHYTE, L. G.; BANKS, M. K.; SCHWAB, P.; LEE, K.; GREER, C. W. Selection of specific endophyticbacterial genotypes by plants in response to doil contamination. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p. 2469-2475, 2001.

SILVA, C.M.M.S.; VIEIRA, R.F.; FAY, E.F.; OLIVEIRA, C. DE S. Efeito do paclobutrazol sobre a microbiota do solo. In \_\_\_\_\_, C.M.M.S.; FAY, E.F.

**Impacto ambiental do regulados de crescimento paclobutrazol.**  
Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003a.

SILVA, Frederico S.; CRAPEZ, Mirian A. C.; BISPO, Maria das Graças S;  
KREPSKY, Natascha; FONTANA, Luiz F.; PIMENTA, Alessandro L.;  
SAVERGNINI, Fernanda; VASCONCELOS, Marcelo A.; TEIXEIRA, Valéria L.  
**Produção de surfactante por bactérias coletadas em três substratos marinhos.** Trabalho técnico científico apresentado no 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2003b.

SILVA, Maicon G. **Biorremediação de solo contaminado por petróleo por diferentes técnicas de bioestimulação.** Dissertação apresentada à Fundação Universidade do Rio Grande, 2007.

SILVA, Célia Maria M. de S.; VIEIRA, Rosana F. Impacto de xenobióticos e metais pesados na microbiota do solo. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. **Microbiologia Ambiental.** 2ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

SLOAN, N.A. **Oil impacts on cold-water marine resources: a review relevant to Parks Canada`s evolving marine mandate.** (1999). Disponível em  
[http://parkscanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/ocasional\\_paper11\\_e.PDF](http://parkscanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/ocasional_paper11_e.PDF) . Acesso em 16 Abr.2002.

SMITH-GREINER, L.L.; ADKINS, A. Isolation and characterization of soil microorganisms capable of utilizing the herbicide diclofop-methyl as a sole source of carbon and energy. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p.221-226, 1996.

SOBRAL JK. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta.** Tese de Doutorado,

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003. 174 pp.

SOUZA, Antonia Q. L.; SOUZA, Afonso Duarte Leão; ASTOLFI FLHO, Spartaco; PINHEIRO, Maria Lúcia B.; SARQUIS, Maria Inez de M.; PEREIRA, José Odair. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **ACTA AMAZONICA**. v. 34(2), p. 185 – 195, 2004a.

SOUZA , Cynthia S.; MIRANDA, Rita de Cássia M.; SENA, Kêsia X.F.R.; ARAÚJO, Janete M.; CHIAPPETA, Alda de A.; SOUSA, Maria de Fátima V.Q.. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo**. Trabalho técnico científico apresentado no 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2004b.

SOUZA, A. Q. L; PEREIRA, José Odair; DEMOSTHENES, L.C.R.; BENTES, J.L.S.; AMARO-BIANCO, E.; SOUZA, A.D.L. **Antibioses de extratos de fungos endofíticos de *Victoria amazonica* contra a bactéria fitopatogénica *Ralstonia solanacearum***. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador, 2008.

SPIES, R.B.; RICE,S.D.;WOLFE,D.A.; WRIGHT,B.A. The effects of Exxon Valdez oil spill on de Alaskan coastal environment. In: **EXXON VALDEZ Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium**. Bethesda: American Fisheries Society Symposium, 1996.v.18, p.1-16.

SPINDOLA, Luciana A. **Macrófitas aquáticas em duas lagoas marginais do Rio Taquari, Coxim, MS**. Dissertação de Mestrado (Biologia Vegetal)- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2007.

STROBEL, G.; Daisy, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products; **Microbiol. Mol. Biol.** v. 67, p. 491–502, 2003.

SUCHANEK,T.H. Oil impacts on marine invertebrate populations and communities. **American Zoologist**, v.33, p.510-523, 1993.

TEIXEIRA, Wilson *et al.* [org.]. **Decifrando a Terra**. São Paulo: Oficina de textos, 2001.

TEIXEIRA, M.A. **Diversidade de bactérias endofíticas de mandioca (*Manihotis esculenta* Crantz) coletada de diferentes regiões do Brasil**. Tese de Doutorado-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. 102f.

TISSOT, B.P. & WELTE, D. H. **Petroleum formation and occurrence**. Berlim: Springer-Verlag, 1978.

VANZO, Leciana R.C.; BRYK, Agostinho; KOMATSU, Maria Cláudia G, MOREIRA JUNIOR, Carlos Augusto. Crescimento bacteriano em perfluorocarbonos líquidos: estudo “in vitro”. **Arq Bras Oftalmol**; v. 64, p. 329-31, 2001.

VEGA, Fernando E.; PAVA-RIPOLL, Monica; POSADA, Francisco; BUYER, Jeffreys. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic Microbiology**. **45** , v. 5, p. 371–380, 2005.

VENOSA, A. D. NRT Fact Sheet: **Biorremediation in Oil Spill Response**. Disponível em <http://www.epa.gov/oilspill/docs/biofact.pdf>. Acesso em 01/06/2001.

VIANA, Sabrina M. **Riqueza e distribuição de macrófitas aquáticas no Rio Mojilinho e tributários (São Carlos-SP)**. Dissertação de Mestrado- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2005.

VIEIRA, Thaís Maitan; SILVA, Enikson Pontes; ANTONIOSI FILHO, Nelson Roberto & VIEIRA, José Daniel Gonçalves. **Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma**. In: I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2006, Brasília. I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2006.

VIEIRA, Lisandro J.S. **Biodiversidade Amazônica**. Disponível em [http://www.bibliotecadafloresta.ac.gov.br/biblioteca/docs\\_expo/Biodiversidade.pdf](http://www.bibliotecadafloresta.ac.gov.br/biblioteca/docs_expo/Biodiversidade.pdf) . Acesso em 10/09/2008.

VOLPATO, Giandra & AYUB, Marco A. Z. **Seleção de microrganismos produtores de lipase e avaliação da utilização de glicerol como fonte de carbono para uso na síntese de biodiesel**. Seminário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – V-Oktober Fórum-PPGEQ- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

WANG, X.; YU, W.; BARTHA, R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons residues in soil. **Environmental & Science Technology**. v. 24, p. 1086-1089, 1990.

WATANABE, K.; BAKER, P.W. Environmentally relevant microorganisms. **Journal of bioscience an bioengineering**. V. 89, p. 1-11, 2000;

ZHANG, Y. M. *et al.* Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. **Environmental Science and Technology, Washington**, v.31, n.8, p.2211-2217, 1997.

ZHANG, H. W., SONG YC & TAN RX. **Biology and chemistry of endophytes**. v. 23, p. 753–771, 2006.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriol. Rev.** v.10, p.1-49, 1946.

ZOBELL, C. E. Assimilation of hydrocarbons by microorganisms. **Adv. Enzymol.** v.10, p. 443-486. 1950.

ZOBELL, C. E. The occurrence, effects and fate of oil polluting the sea. **Adv. Water Pollut.** v. 3, p. 85-118. 1964.

ZOBELL, C. E. Microbial modification of crude oil in the sea, In **Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills**. American Petroleum Institute, Washington, D.C, p. 317-326. 1969.

ZOBELL, C. E. Sources and biodegradation of carcinogenic hydrocarbons, p. 441-451. In **Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills**. American Petroleum Institute, Washington, D.C, 1971.

ZOBELL, C. E. Bacterial degradation of mineral oils at low temperatures, p. 153-161. In D. G. Ahearn and S. P. Meyers (ed.), **The microbial degradation of oil pollutants**. Publication no. LSU-SG-73-01, Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, 1973a.

ZOBELL, C. E. Microbial degradation of oil: present status, problems and perspectives, In D. G. Ahearn and S. P. Meyers (ed.), **The microbial degradation of oil pollutants**. Publication no. LSU-SG-73-01. Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, p. 3-16, 1973b.