



UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS  
CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

**ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS PARA TRATAMENTO  
DE ÁGUA SUBTERRÂNEA DE ÁREAS CONTAMINADAS  
POR HIDROCARBONETOS**

KARINA SCHU DOS SANTOS RESCHKE

São Leopoldo, Fevereiro de 2012.

## Ficha catalográfica

R431e Reschke, Karina Schu dos Santos  
Estudos microbiológicos para tratamento de água  
subterrânea de áreas contaminadas por hidrocarbonetos / por  
Karina Schu dos Santos Reschke. – 2012.  
100 f.: il., 30cm.

Dissertação (mestrado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil,  
2012.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Paulo Gomes.

1. Hidrocarbonetos. 2. Microbiologia. 3. Biorremediação.  
4. BTEX. 5. TPH. I. Título.

CDU 628.394  
579.26

KARINA SCHU DOS SANTOS RESCHKE

**ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS PARA TRATAMENTO DE  
ÁGUA SUBTERRÂNEA DE ÁREAS CONTAMINADAS POR  
HIDROCARBONETOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Paulo Gomes

**Banca examinadora:** Profa. Dra. Celia Regina Granhen Tavares  
Prof. Dr. Luis Alcides Schiavo Miranda

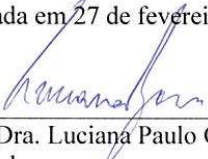
São Leopoldo, Fevereiro de 2012.

**KARINA SCHU DOS SANTOS RESCHKE**

**“ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS PARA TRATAMENTO DE  
ÁGUA SUBTERRÂNEA DE ÁREAS CONTAMINADAS POR  
HIDROCARBONETOS”**


Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Área de Concentração: Gerenciamento de Resíduos, da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS.


Aprovada em 27 de fevereiro de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Luciana Paulo Gomes  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Claudio de Souza Kazmierczak  
Coordenador do PPGEC/UNISINOS

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Celia Regina Granhen Tavares

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luis Alcides Schiavo Miranda

*“Somos todos, anjos com uma asa só. E só podemos voar quando abraçados uns aos outros”*

*Mário Quintana*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimentos sinceros a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

A Deus por ter me dado sabedoria e força para chegar até aqui.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Paulo Gomes, orientadora deste trabalho, pela maravilhosa orientação, pela paciência, apoio, por todos os minutos dedicados e pela confiança. Exemplo de profissionalismo e amor ao que faz. Obrigado!

A Projeconsult Engenharia Ltda pela oportunidade profissional. Em especial ao Diretor Eng. Carlos Júlio Lautert e ao Coordenador do Projeto Eng. Marcelo O. Caetano.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos, e a Projeconsult Engenharia Ltda, FIERGS, SEBRAE e FINEP pelo financiamento da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da Universidade do Vale dos Sinos – UNISINOS.

Aos colegas de mestrado pelo convívio.

Aos colegas do Laboratório de Saneamento Ambiental.

As inicialmente colegas, e agora amigas Joana e Simone, pelo apoio, pelas longas conversas, estudos e todos os momentos vividos.

Agradecimento especial ao meu marido Vinicio, que esteve comigo em todos os momentos, compreendendo as ausências e apoiando sempre. Obrigado!

A minha família: Mãe, Pai, Irmãs Cris e Carol, Obrigado por tudo!!!!

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1	<i>Objetivo Geral.....</i>	19
2.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
3.1	<i>Combustíveis derivados do Petróleo.....</i>	20
3.2	<i>Remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.....</i>	23
3.3	<i>Estudos microbiológicos em áreas contaminadas.....</i>	29
3.3.1	<i>Metodologias aplicadas em estudos microbiológicos.....</i>	30
3.3.2	<i>Biossurfactantes.....</i>	33
3.3.3	<i>Tratamento de áreas contaminadas.....</i>	34
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
4.1	<i>Descrição da área contaminada e coleta de amostras.....</i>	39
4.2	<i>Meio de cultura e fonte de carbono.....</i>	41
4.3	<i>Avaliação visual do crescimento microbiano.....</i>	42
4.3.1	<i>Avaliação visual nos tubos.....</i>	42
4.3.2	<i>Avaliação visual nas placas.....</i>	43
4.4	<i>Avaliação do parâmetro de TPH.....</i>	44
4.5	<i>Meio seletivo.....</i>	45
4.6	<i>Isolamento.....</i>	46
4.7	<i>Teste de detecção de ramnolipídios.....</i>	46
4.8	<i>Teste de degradabilidade.....</i>	46
4.9	<i>Ensaio.....</i>	47
<b>5</b>	<b>APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1	<i>Avaliação visual do crescimento microbiano.....</i>	50
5.1.1	<i>Avaliação visual dos tubos.....</i>	50
5.1.2	<i>Avaliação visual nas placas.....</i>	53
5.2.	<i>Avaliação quantitativa da degradação de diesel - parâmetro TPH.....</i>	77

5.3. Meio Seletivo .....	80
5.4. Detecção de ramnolipídios.....	82
5.5 Isolamento .....	82
5.6. Teste de degradabilidade .....	91
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
6.1 Sugestões para futuros trabalhos .....	96
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>



## LISTA DE TABELA

Tabela 1– Frações dos derivados de petróleo .....	22
Tabela 2 – Exemplos de gêneros de Fungos e Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos ...	38
Tabela 3 – Resultados da observação visual nos tubos do E1 com 20 dias de incubação .....	50
Tabela 4 – Resultados da observação visual nos tubos do E2 com 40 dias de incubação .....	50
Tabela 5 – Resultados da observação visual nos tubos do E3 com 40 dias de incubação .....	51
Tabela 6 – Resultados da observação visual nos tubos do E4 com 40 dias de incubação .....	51
Tabela 7 – Resultados da observação visual nos tubos do E5 com 40 dias de incubação .....	51
Tabela 8 – Resultados da observação visual nos tubos do E6 com 40 dias de incubação .....	52
Tabela 9 – Remoção total de TPH ao final de 40 dias (E2 e E3).....	77
Tabela 10 – Remoção total de TPH ao final de 40 dias Ensaio E4.....	78
Tabela 11 – Remoção total de TPH ao final de 40 dias Ensaio E5.....	78
Tabela 12 – Remoção total de TPH ao final de 40 dias Ensaio E6.....	79
Tabela 13 – Resultados meio Sabouraud .....	80
Tabela 14 – Resultados indicador redox E4.....	92
Tabela 15 – Resultados indicador redox E5.....	93
Tabela 16 – Resultados indicador redox E6.....	94

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Exemplo de técnicas de remediação .....	26
Quadro 2 – Alterações visuais verificadas nos tubos (cor, turvação e consumo de FC).....	42
Quadro 3 – Ensaio Preliminar (E1) .....	47
Quadro 4 – Ensaios para a avaliação quantitativa da degradação de diesel (TPH) e acompanhamento do crescimento microbiológico .....	48
Quadro 5 – Resultados da observação visual nas placas do E1 com 20 dias de incubação .....	54
Quadro 6 – Resultados da observação visual nas placas do E2 com 40 dias de incubação .....	56
Quadro 7 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas	60
Quadro 8 – Resultados da observação visual nas placas do E3 com 40 dias de incubação .....	61
Quadro 9 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas no ensaio 3 .....	64
Quadro 10 – Resultados da observação visual nas placas do E4 com 40 dias de incubação ...	65
Quadro 11 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas .....	69
Quadro 12 – Resultados da observação visual nas placas do E5 com 40 dias de incubação ...	70
Quadro 13 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas no E5.....	73
Quadro 14 – Resultados da observação visual nas placas do E6 com 40 dias de incubação ...	74
Quadro 15 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas .....	76
Quadro 16 – Resultados de caracterização dos isolados obtidos .....	83
Quadro 17 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas .....	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção Nacional de derivados do petróleo.....	20
Figura 2– Representação da estrutura química do BTEX.....	21
Figura 3- Fases de contaminação por LNAPL no subsolo.....	24
Figura 4 – Sistemática de Biorremediação .....	27
Figura 5 – Mapa de localização do Posto de Abastecimento.....	40
Figura 6 – Posto de abastecimento com identificação dos poços de monitoramento (flechas azuis).....	40
Figura 7 – Ponto de amostragem junto ao tanque de equalização .....	41
Figura 8 – Características visuais avaliadas nas colônias .....	44
Figura 9 – Incubação de tubos e placas durante os ensaios realizados .....	44
Figura 10 – Tubos com diferentes concentrações de fonte de carbono (diesel) monitorados a partir do Ensaio 4.....	49
Figura 11 – Coloração de Gram para microrganismos isolados (aumento 1000X), bactérias Gram negativa grupo 3 colônia bege. ....	64
Figura 12 – Coloração de Gram para diferentes grupos de microrganismos isolados (aumento 1000X), bactéria Gram negativa grupo 9 colônia amarela. ....	69
Figura 13 – Coloração de Gram para diferentes grupos de microrganismos isolados (aumento 1000X). (a) bactérias Gram positiva grupo 11 colônia branca (b) bactérias Gram positiva grupo 7 colônia laranja.....	73
Figura 14 – Ensaio 6, Coloração de Gram para diferentes grupos de microrganismos isolados (aumento 1000X). (a) bactérias Gram positiva grupo 3 colônia alaranjada (b) bactérias Gram negativa grupo 8 colônia bege. ....	76
Figura 15 – (a) Micélio (conjunto de hifas) da colônia preta filamentosa (aumento 5X), (b) hifas septadas da colônia preta filamentosa (aumento 40X), (c) hifas da colônia branca filamentosa (aumento 10X).....	81
Figura 16 –Coloração de Gram para diferentes microrganismos isolados do Quadro 16 (aumento 1000X). (a) Bactérias Gram negativa placa 5 colônia amarela , (b) Bactérias Gram positiva colônia bege placa 3, (c) Bactérias Gram negativa placa 1 colônia bege marrom, (d) Bactérias Gram negativa placa 5 colônia bege clara, (e) Bactérias Gram negativa placas 4 e 5 bege amarelado. ....	85

Figura 17 – Tubos no ensaio de degradabilidade. (a)Tubos completamente descoloridos na presença do indicador redox após decorridas 60 horas, (b) branco (azulado).....	94
Figura 18 – Tubos antes (azulados) e depois (descoloridos) de decorrido o período de incubação.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

BTEX – Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno

HTP – Hidrocarbonetos totais de petróleo

TPH – Total Petroleum hydrocarbon

FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental

SMAM – Secretaria Municipal do Meio Ambiente

CA – Carvão ativado

HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

LNAPL – Light non-aqueous phase liquids (Hidrocarbonetos em fase livre não miscível em água)

SVE – Extração de vapores do solo

VOCs – Voláteis Organics Composts

COVs – Compostos Orgânicos Voláteis

UFC – Unidades formadoras de colônias

pH – Potencial hidrogeniônico

SASC – Sistemas de armazenamento subterrâneos de combustíveis

BH – Bushnell-Haas (meio de cultura)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

NADH - Dinucleótido de nicotinamida-adenina

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ATP – Adenosina trifosfato

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ABNT – Associação Brasileira de Normas técnicas

PETROBRAS – Petróleo Brasileiro S/A

d - Dia (unidade de tempo pelo SI)

FC – Fonte de Carbono

GRO – Gasoline Range Organics

DRO – Diesel Range Organics

## RESUMO

RESCHKE, K.S.S. **Estudos microbiológicos para tratamento de água subterrânea de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.** . São Leopoldo, 2012. 100p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Unisinos, São Leopoldo.

Os compostos conhecidos como TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) e BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) são contaminantes oriundos de derivados do petróleo como a gasolina e o diesel. Eles são provenientes de problemas que ocorrem com o armazenamento subterrâneo de combustíveis, principalmente em postos de abastecimento. São encontrados em águas subterrâneas de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, que causam impacto ambiental. Exemplos destes impactos podem ser: inutilização dos pontos de captação de água potável, mortandade de flora e fauna aquática, inutilização de lavouras e plantações, impermeabilização de solos, redução de microrganismos do solo, morte de plantas e árvores, além de riscos de explosão devido à evaporação do produto. A presente pesquisa avaliou, por meio de métodos microbiológicos, como por exemplo: crescimento microbiano, meio seletivo para fungos, isolamento, detecção de ramnolipídios e teste de degradabilidade, os processos envolvidos com a recuperação de áreas degradadas por hidrocarbonetos através do isolamento e caracterização dos microrganismos presentes no local contaminado. Foram testadas diferentes concentrações de diesel (1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 30% e 50%) para avaliação do crescimento de microrganismos indígenas de áreas contaminadas de postos de combustíveis, além de verificar-se o potencial de degradação de hidrocarbonetos. Acompanhamentos visuais e microscópicos, além do monitoramento do decréscimo do parâmetro TPH em diversos ensaios foram realizados. Os resultados mostraram que foi possível isolar e caracterizar os microrganismos presentes no local contaminado, tendo sido verificado dois diferentes morfotipos: bactérias e fungos. No total dos ensaios realizados 81,8% eram bactérias Gram negativas, 4,5% bactérias Gram positivas e 13,7% fungos. Nos ensaios com menor concentração de diesel (1%) houve o melhor crescimento de microrganismos o que resultou em maior eficiência no decréscimo do parâmetro de TPH. Esses resultados indicam a possibilidade de degradação de diesel em áreas contaminadas por via biológica, com ressalvas para altas concentrações do hidrocarboneto, quando o crescimento microbiano, nas condições ensaiadas, foi afetado.

*Palavras chave:* BTEX, TPH, hidrocarbonetos, microbiologia, biorremediação;

## ABSTRACT

RESCHKE, K.S.S. **Microbiological studies for the treatment of groundwater contaminated areas by hydrocarbons.** São Leopoldo, 2012. 100p Dissertação (Master Degree in Civil Engineering) – Postgraduate Civil Engineering Program, Unisinos, São Leopoldo.

The compounds known as TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) and BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene) contaminants are derived from petroleum products like gasoline and diesel. They are problems that occur from the underground storage of fuels, especially in gas stations. They are found in areas of groundwater contaminated with hydrocarbons, which cause environmental impact. Examples of these impacts may include: destruction of the points of capitation of drinking water, the death of aquatic flora and fauna, destruction of crops and plantations, soil sealing, reduction of soil microorganisms, death of plants and trees, and hazards of explosion due to the evaporation of the product. This research evaluated through microbiological methods, such as: microbial growth, selective medium for fungi, isolation, detection ramnoli and biodegradability test, the processes involved in the recovery of degraded sites by hydrocarbons through at the isolation and characterization of microorganisms present on the site contaminated. Different concentrations of diesel oil (1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 30% and 50%) were tested to assess the growth of microorganisms indigenous of contaminated gas station, and to identify the potential degradation of hydrocarbons. Accompaniments visual and microscopic, in addition to monitoring the reduction of the parameter TPH in several tests were performed. The results showed that it was possible to isolate and characterize microorganisms in the contaminated site, where two different morphotypes were observed: bacteria and fungi, and 81.8% Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria 4.5% and 13.7% fungi. In tests with lower concentrations of diesel oil (1%) had the better growth of microorganisms resulting in greater efficiency in reduction of TPH. These results indicate the possibility of degradation of diesel in areas contaminated by biological, with exceptions for high concentrations of hydrocarbon, when microbial growth was affected.

*Keywords:* BTEX, TPH, hydrocarbons, microbiology, bioremediation;

# 1 INTRODUÇÃO

As contaminações ambientais provenientes de derrames de produtos derivados do petróleo junto a reservatórios de armazenamento e vazamentos em tanques e tubulações subterrâneas têm sido objeto de preocupação para a sociedade e o governo em função dos riscos associados a tais problemas, tanto para a segurança e saúde das populações, como para o meio ambiente. A contaminação por estes derivados está relacionada aos hidrocarbonetos aromáticos, destacando-se o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) e os hidrocarbonetos alifáticos, além dos hidrocarbonetos totais de petróleo.

Os efeitos danosos destes produtos na natureza podem ser exemplificados pela inutilização dos pontos de captação de água potável, mortandade de flora e fauna aquática, inutilização de lavouras e plantações, impermeabilização de solos, redução de microrganismos do solo, morte de plantas e árvores, além de riscos de explosão devido à evaporação do produto. Um dos grandes riscos e passivos ambientais reconhecidos refere-se a vazamentos de tanques de combustível em postos de abastecimento. Em grande parte destes postos, os tanques já possuem idade superior a 20 anos e mostram sinais de corrosão e rachaduras, o que provoca vazamentos do estoque. Com isto, os órgãos ambientais de fiscalização, no caso de Porto Alegre, a Fundação de Proteção Ambiental - FEPAM e a Secretaria Municipal de Meio Ambiente - SMAM tem demonstrado grande preocupação com a remediação dessas áreas (TEIXEIRA, 2007).

As ações ambientais neste sentido são diversas, desde legislações, como a do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução nº 273 de 29 de novembro de 2000, que exige a troca dos tanques antigos por tanques jaquetados (aço carbono revestido com fibra de vidro interno e externamente, com resina resistente a hidrocarbonetos e com sistema de detecção interno de vazamentos) até a recuperação das áreas degradadas. Existem várias formas de remedição deste tipo de passivo, porém todas utilizam tecnologia importada o que torna o processo altamente custoso e inacessível a muitas empresas. Outro fator é que os processos de remediação atualmente utilizados se baseiam apenas na remoção física destes contaminantes, ou ainda não levam em consideração todos os fatores para uma descontaminação eficiente. Ainda existe o fator operacional, que por muitas vezes pode ser limitante neste processo.



Uma das técnicas mais usadas são os filtros com meio adsorvente composto por carvão ativado. A questão é que o carvão ativado além de ser um processo que utiliza tecnologia cara, o que eleva o custo do produto; é um processo altamente impactante ao meio ambiente e à saúde da população devido a emissão de gases de efeito estufa e geração de efluentes tóxicos. Uma alternativa vislumbrada trata da utilização de cinza de casca de arroz como adsorvente desses contaminantes. Esse estudo integra o projeto maior aprovado pelo Edital de Subvenção Econômica do INOVA RS, financiado pelo Sistema FIERGS, SEBRAE e FINEP, intitulado: “Sistemas de remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, utilizando filtros para adsorção composto por recheio de cinza de casca de arroz”, e tem o objetivo de desenvolver um novo produto para utilização como meio adsorvente em sistemas de remediação em áreas contaminadas por hidrocarbonetos. Já o presente trabalho de mestrado acrescenta estudos microbiológicos para tratamento de água subterrânea de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

Baseado nisto, iniciou-se os estudos para desenvolver uma nova tecnologia para remediação ambiental, através de estudos microbiológicos, com o foco de utilizar microrganismos potenciais degradadores de hidrocarbonetos. O trabalho a seguir desenvolvido foi dividido em seis capítulos. No primeiro capítulo está apresentada a introdução do trabalho. No segundo capítulo está o objetivo geral e os objetivos específicos da pesquisa. O capítulo três apresenta a revisão bibliográfica sobre: combustíveis derivados do petróleo, remediação de áreas degradadas por hidrocarbonetos e estudos microbiológicos em áreas contaminadas. A metodologia está descrita no capítulo quatro e a apresentação, análise e discussão dos resultados no capítulo cinco. Por fim, são apresentadas as conclusões.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar processos microbiológicos envolvidos com a recuperação de áreas degradadas por hidrocarbonetos em um posto de abastecimento de combustível.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar os microrganismos presentes em local com contaminação por hidrocarbonetos, neste estudo um posto de abastecimento de combustível;
- Isolar microrganismos presentes no local com contaminação por hidrocarbonetos;
- Testar diferentes concentrações de fonte de carbono para crescimento microbiano;
- Avaliar a eficiência de degradação de hidrocarbonetos, neste estudo o diesel, por culturas mistas autóctones da área contaminada;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada a revisão bibliográfica focada no tema desta pesquisa que é estudar processos envolvidos com a recuperação de áreas degradadas por hidrocarbonetos através de microrganismos. Estas áreas, neste caso, são as águas subterrâneas contaminadas por combustíveis derivados do petróleo.

#### 3.1 Combustíveis derivados do Petróleo

Os combustíveis derivados do petróleo possuem um expressivo consumo no mundo todo, em especial a gasolina e o óleo diesel, e no Brasil não poderia ser diferente. No Brasil, são produzidos anualmente cerca de 2.012 barris por dia de óleo e derivados do petróleo (PETROBRÁS, 2011). A produção nacional de derivados está segmentada conforme a Figura 1.

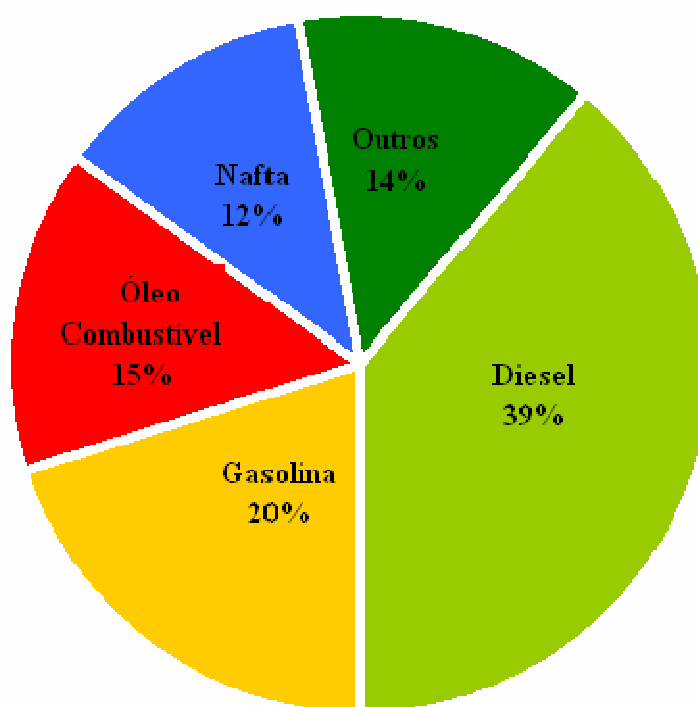


Figura 1 - Produção Nacional de derivados do petróleo

Fonte: PETROBRÁS, 2008

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de compostos como oxigênio, nitrogênio e enxofre (FETTER, 1993). A obtenção dos combustíveis derivados do

petróleo é realizada por meio de refino. O refino do petróleo consiste em uma série de beneficiamentos pelos quais passa o mineral bruto, para a obtenção desses derivados, estes sim, produtos de grande interesse comercial (MARIANO, 2001).

Os hidrocarbonetos são compostos constituídos apenas por hidrogênio e carbono (RUSSELL, 1994). Segundo pesquisa de Finotti et al. (2001) os derivados do petróleo são compostos basicamente de hidrocarbonetos já que estes compostos que apresentam traços de nitrogênio, enxofre ou oxigênio são removidos na quase totalidade dos derivados mais leves durante o processo de refinamento. Os hidrocarbonetos mais característicos da gasolina e do diesel são, além dos alifáticos, os compostos aromáticos simples e alguns polinucleados.

Os hidrocarbonetos monoaromáticos (Figura 2), benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três xilenos orto, meta e para, chamados compostos BTEX, são os constituintes da gasolina que têm maior solubilidade em água e, portanto, são os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático (CORSEUIL, 1992).

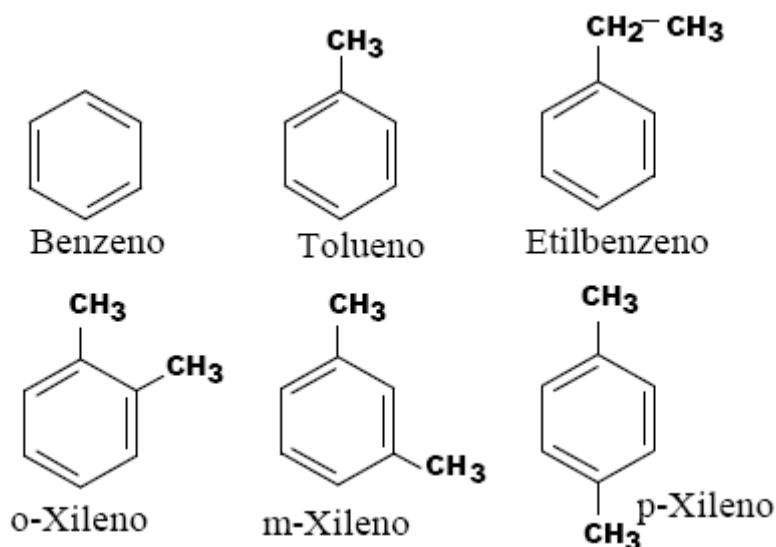


Figura 2– Representação da estrutura química do BTEX

Fonte: MAZZUCO, 2004

Os TPH (hidrocarbonetos totais do petróleo) são uma mescla de muitos compostos diferentes e todas as pessoas estão expostas a estes compostos de diferentes fontes, incluindo postos de gasolina, óleo derramado sobre os pavimentos e mesmo no ambiente de trabalho (ABDANUR, 2005). Entre os compostos deste grupo estão os monoaromáticos e poliaromáticos assim como também muitos outros derivados de petróleo (RUSSELL, 1994).

Os componentes do óleo diesel são hidrocarbonetos com 10 a 20 carbonos. Devido ao seu maior peso molecular os compostos do diesel são menos voláteis, menos solúveis em água e apresentam maior mobilidade ao ambiente do que aqueles que compõem a gasolina. A proporção dos compostos aromáticos é de 25 a 35%. As proporções de BTEX presentes no diesel são geralmente muito baixas (FINOTTI et al. 2001).

O óleo diesel é um hidrocarboneto produto da ebulição a temperatura entre 150°C e 400 °C, com comprimentos de cadeia de carbono de C15-C22 (Tabela1). No Brasil, para motores a diesel, é permitido um nível de enxofre de no máximo 0,5% (um pouco maior do que em muitos outros países). A redução do teor de enxofre pode permitir maior atividade microbiana. Uma variedade de aditivos que podem ser usados para melhorar a estabilidade do combustível, nesses incluem-se os compostos amino-alifáticos, agentes quelantes, detergentes e inibidores de corrosão, alguns dos quais podem atuar como uma fonte de nutrientes para microrganismos. O diesel é o combustível que sofre os mais variados problemas de contaminação microbiana (GAYLARDE et al. 1999).

**Tabela 1– Frações dos derivados de petróleo**

<b>Fração</b>	<b>Nº de átomos C</b>	<b>Peso Molecular (g/mol)</b>
Gás	1 – 4	16 – 58
Gasolina	5 – 12	72 – 170
Querosene	10 – 16	156 – 226
Diesel	15 – 22	212 – 294

Fonte: GAYLARDE, 1999

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu a Resolução nº273 de 29 de novembro de 2000, a qual considera que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais e para tanto estipula uma série de requisitos que devem ser atendidos pelas empresas que integram o setor de combustível no Brasil, entre os quais a obrigatoriedade do licenciamento ambiental e a certificação dos equipamentos de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e do Instituto Nacional de Medidas, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

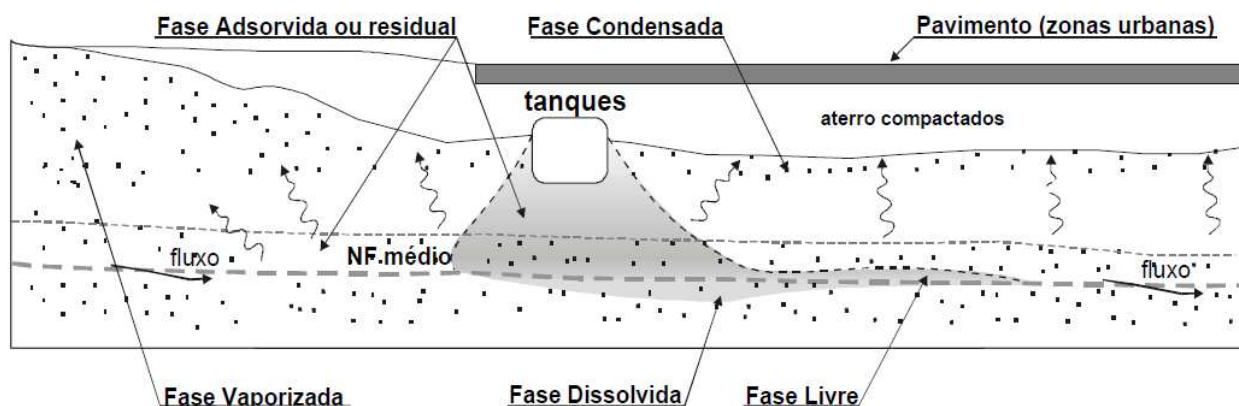
### 3.2 Remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos

De acordo com Abdanur (2005) a contaminação dos recursos hídricos aumentou em cinco vezes nos últimos anos e aponta 20 mil áreas contaminadas no Brasil com populações expostas à riscos de saúde. Apesar dos grandes investimentos dos países ricos e os investimentos iniciais de países em desenvolvimento, a recuperação das áreas contaminadas está longe de ser resolvida. As limitações, principalmente com relação aos altos custos envolvidos na remediação tornam o processo de recuperação inviável economicamente. Segundo o mesmo autor, um dos desafios da remediação está na localização e remoção da massa de contaminantes que estão servindo como fonte contínua de poluição nos solos e nas águas. Ao serem localizados, os contaminantes podem estar em áreas de difícil acesso ou em profundidades que dificultam a remoção, e em alguns casos a remoção parcial dos poluentes não acompanha proporcionalmente a melhoria na qualidade da água ou solo, pois o restante funciona como fonte de contaminação por muitos anos e se a dissolução for suficientemente grande ou rápida pode representar um perigo potencial ao meio ambiente.

Uma grande variedade de processos físico-químicos e biológicos tem sido utilizada na remoção de hidrocarbonetos de petróleo puros e dissolvidos em água subterrânea. Processos como extração de vapores do solo (SVE), recuperação de produto livre, bioventilação, extração com solventes, incineração, torres de aeração, adsorção em carvão ativado, biorreatores, biorremediação no local, entre outros, têm sido usados para remover contaminantes orgânicos de águas subterrâneas e sistemas de solo superficial. Estes processos podem ser implementados para controlar o movimento de plumas (contaminantes), tratar águas subterrâneas, e/ou descontaminar solos (CORSEUIL e WEBER, 1994). Os processos citados se caracterizam por apresentarem altos custos de instalação e manutenção, e também por estarem associados a longos períodos de tratamento.

Os contaminantes voláteis quando presentes no solo ou na água podem ser liberados em contato com o ar por uma variedade de processos físico-químicos, sendo que estas liberações ocorrem em resposta às alterações na saturação da água, do solo, às modificações na química da água e do gás, e às mudanças nas propriedades da superfície do solo ou sedimento (NRC, 2003 *apud* ABDANUR, 2005).

Na maioria dos casos de contaminação por combustíveis em postos de abastecimento, a preocupação do diagnóstico tem se pautado pela delimitação das fases adsorvida e livre, em que as ações de remediação podem ser mais efetivas. As típicas zonas de ocorrência de cada fase são apresentadas na Figura 3.



**Figura 3- Fases de contaminação por LNAPL no subsolo**

Fonte: AZAMBUJA et al. (2000)

Os pesquisadores AZAMBUJA et al. (2000), descrevem e classificam as fases de contaminação da seguinte forma:

a) Fase livre – Constitui-se em um véu sobre o topo do freático livre e que pode ser mais ou menos espesso, dependendo da quantidade de produto derramado e da dinâmica do sistema freático. A fase livre não é composta exclusivamente por hidrocarbonetos. Estudos experimentais referidos por Sauck (2000) *apud* Azambuja et al. (2000), demonstram que apenas 50% dos vazios do solo são ocupados por hidrocarbonetos, sendo que a outra metade é ocupada por água e ar. Por se tratar de uma mistura não existe um limite estrito entre a fase livre e as demais fases, mas uma banda de transição que pode ser mais ou menos espessa, de acordo com a viscosidade do hidrocarboneto, magnitude e frequência das oscilações freáticas, quantidade de oxigênio disponível, porosidade do solo e ainda o tempo transcorrido desde o vazamento, entre outros fatores intervenientes.

b) Fase adsorvida – esta fase também pode ser denominada fase residual, constitui-se no halo de dispersão entre a fonte e o nível freático e caracteriza-se por uma fina película de hidrocarbonetos envolvendo grumos de solo ou discontinuidades existentes no saprólito ou rocha, sendo mais importante para os produtos mais viscosos como o diesel. Esta fase pode ser mais ou menos significativa, dependendo da viscosidade do produto, da porosidade do solo e das oscilações do freático livre.

c) Fase dissolvida - Constitui em contaminações por dissolução de aditivos polares e por uma fração emulsionada de hidrocarbonetos que possui maior mobilidade e dissipa-se abaixo no nível freático livre, sendo mais importante para fluidos menos viscosos

como a gasolina. A quantidade de hidrocarbonetos dissolvidos depende das condições de degradação (ou bioconversão) do produto, estando muito mais relacionada à participação da fase adsorvida e muito menos ligada à espessura da fase livre propriamente dita.

d) Fase vaporizada - Constitui uma fase gasosa dos componentes voláteis dos combustíveis e que ocupa vazios do solo ou rocha, sendo mais importante para os hidrocarbonetos de menor ponto de vaporização, como aqueles que compõem a gasolina. Além da verdade, a fase gasosa dos hidrocarbonetos está presente em meio às demais fases, mas é mais significativa na região vadosa do subsolo.

e) Fase condensada - Aparece mais tipicamente em áreas urbanas onde a pavimentação do solo é intensa e pouco permeável, caracterizando-se pela acumulação de produtos condensados sob os pavimentos. Na verdade é semelhante à fase adsorvida, porém com composição diferente do produto original em virtude do fracionamento seletivo da vaporização.

Nos processos de remediação citados, quando se leva em consideração as fases de contaminação, em postos de combustíveis, tem-se dado atenção a investigação para que as fases livre e adsorvida sejam prioritariamente identificadas e limitadas, isto porque é exatamente nestas fases que as remediações possuem um melhor desempenho.

Dos compostos: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), o primeiro normalmente é um dos compostos que mais influenciam em avaliações de análises de risco (CETESB, 2001). Desta forma, segundo Abdanur (2005), por apresentar maior mobilidade no solo e ser carcinogênico, o benzeno, é normalmente prioritário nas ações de remediação em locais onde são detectados hidrocarbonetos de petróleo.

As técnicas de remediação podem ser realizadas “*ex situ*”, ou seja, por meio da retirada do material contaminado para posterior tratamento ou “*in situ*”, quando o material não é retirado (MARIANO, 2006). O Quadro 1 apresenta alguns exemplos de técnicas de remediação.



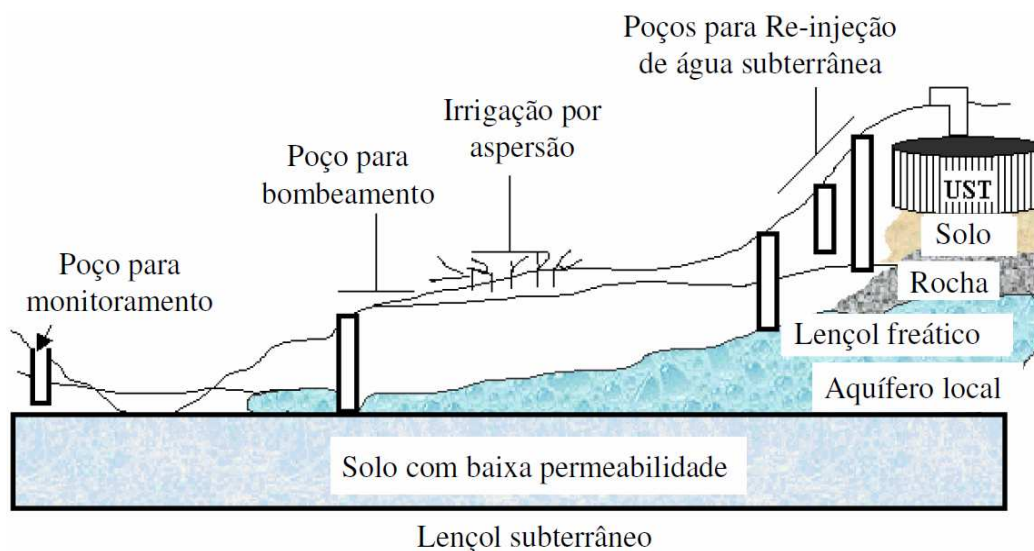
Quadro 1 – Exemplo de técnicas de remediação

Zona não-saturada	Tratamentos “ex-situ”	Lavagem de solo ( <i>soilwash</i> )
		Incineração
		Biorremediação: - reatores ( <i>slurryphase</i> ) - sistemas de tratamento de resíduos no solo (p.e. <i>landfarming</i> , biopilhas)
	Tratamento “in-situ”	Lavagem de solo ( <i>soil flushing</i> )
		Extração de compostos orgânicos voláteis ( <i>SVE</i> , <i>bioventing</i> )
		Biorremediação
Zona saturada	Tratamentos “ex-situ”	Adsorção de compostos
		Coluna de aeração ( <i>airstripping</i> )
		Biorremediação
	Tratamento “in-situ”	Bombeamento e tratamento ( <i>pumpandtreat</i> )
		Tratamentos químicos (injeção de oxidantes, barreiras reativas, etc.)
		Extração de compostos orgânicos voláteis ( <i>airsparging</i> , <i>bioventing</i> )
		Biorremediação

Fonte: MARIANO, 2006

Dentre os tratamentos de áreas degradadas por hidrocarbonetos, o processo de biorremediação é bastante utilizado. Segundo Morita (2006), as aplicações de biorremediação (*in-situ*) são principalmente para hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), compostos orgânicos semi-voláteis, não-halogenados e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) (Figura 4). As principais características são:

- ✓ Matriz do solo
- ✓ Necessidade de tratamento da água subterrânea
- ✓ Necessidade de dispor adequadamente o lodo
- ✓ Proveniente do tratamento da água subterrânea
- ✓ Entupimento devido ao crescimento bacteriano nos poços que introduzem nutrientes
- ✓ Fluxo preferencial de água em solos argilosos
- ✓ Altas concentrações de poluentes
- ✓ Baixas temperaturas
- ✓ Toxicidade do peróxido de hidrogênio (100 a 200 ppm)



**Figura 4 – Sistemática de Biorremediação**

Fonte: Morita (2006)

A mesma autora ainda cita que se pode utilizar a compostagem (*ex-situ*) como forma de biorremediação, com principal aplicação em compostos orgânicos biodegradáveis. As principais características são:

- ✓ Área requerida para a compostagem
- ✓ Escavação de solo
- ✓ Liberação de COV's
- ✓ Aumento do volume de solo a ser tratado
- ✓ Altas concentrações de metais pesados

Segundo a pesquisa de Azambuja et al. (2000), a migração dos contaminantes entre as fases no solo pode ser modelada através de mecanismos de transferência de massa, ou seja, advecção, dispersão e atenuação. Essa conceituação é que fundamenta os modelos analíticos ou numéricos que são empregados para prever ou avaliar a dinâmica dos contaminantes em um sistema. Esses mecanismos são assim descritos:

a) Advecção - Consiste no mecanismo onde os contaminantes seguem coincidentemente com os vetores de fluxo e guardam uma relação direta com a velocidade de percolação no solo. É o mecanismo preponderante na formação e na mobilização da fase livre de hidrocarbonetos.

b) Dispersão - Consiste no mecanismo responsável pela diminuição da concentração de contaminantes no fluido de percolação e que pode se dar através de dois processos: dispersão hidrodinâmica e difusão molecular. A dispersão hidrodinâmica acontece pela restrição de fluxo nos poros do solo que gera redução de velocidade da percolação dos componentes mais viscosos. A difusão molecular é, intrinsecamente, um fenômeno de diluição de componentes solúveis e é o principal processo formador da fase dissolvida, responsável pela maior mobilidade dos contaminantes. Este processo está associado à formação da fase adsorvida e também pela produção de uma fração de emulsões que podem compor a fase dissolvida.

c) Atenuação - Consiste na redução de contaminantes transportados pela advecção ou diluição através de reações químicas ou físico-químicas. A atenuação química é mais intensa em solos com maior capacidade de troca catiônica e atua reduzindo componentes das fases livre e adsorvida. Também nesse elenco de reações estão as reações de bioconversão, pelas quais parcelas dos hidrocarbonetos são transformadas em ácidos orgânicos ou mesmo são totalmente oxidadas.

Pearson e Oudijk (1993) *apud* Mariano (2006) citam as principais causas de vazamentos relacionados aos sistemas de armazenamento subterrâneos de combustíveis (SASC) encontrados nos postos de combustíveis:

- Os tanques são freqüentemente instalados sem nenhum cuidado, podendo provocar algum tipo de dano nas paredes;

- Os tanques normalmente não sofrem nenhum tipo de manutenção, permitindo, assim, que a corrosão se instale e comprometa a integridade do material. Tanques que ficam em contato direto com o solo também irão corroer mais rapidamente por causa da umidade e precipitação;

- Quando os tanques ficam vazios ou parcialmente vazios, o lado de dentro do tanque pode corroer rapidamente;

- Os SASC são freqüentemente instalados sem a proteção catódica, e detectores de vazamentos;

- Os tanques são normalmente construídos de parede simples, sem revestimento com material anti-corrosivo;

- Quando os tanques são instalados em solos pedregosos e são cobertos com enchimentos reiterados ou com entulhos de construção, permitem rachaduras por pedras, que se expandem dentro de poucos anos;

- Oscilações do nível freático provocam condições mais favoráveis para a corrosão dos tanques e suas conexões quando são instalados na altura ou abaixo do nível freático. Água subterrânea com pH ácido pode acelerar a corrosão do tanque.

A análise da presença de hidrocarbonetos nas águas freáticas é realizada, tipicamente, através de poços de monitoramento, embora a participação de extratores pneumáticos adaptados em piezômetros craváveis ou mesmo em sondas CPT esteja crescendo de participação. É necessário ter-se presente que o objetivo da análise em água é identificar a fase dissolvida. Assim, a coleta de amostras deve evitar o contato com a fase livre que, normalmente se manifesta como uma espuma no topo do nível d'água. É importante destacar que a amostragem de água é mais delicada do que em solo, pois mínimos descuidos com a limpeza dos equipamentos implicam em contaminação cruzada. Isso se deve ao fato de que os padrões de controle das contaminações nos aquíferos são da ordem de  $\mu\text{g/litro}$  (AZAMBUJA et al. 2000).

### **3.3 Estudos microbiológicos em áreas contaminadas**

Estudar microrganismos significa entender suas estruturas, velocidades de crescimento, meio preferencial para a cultura, parâmetros para reprodução, etc. Para isto, existem diversas técnicas e metodologias para o estudo dos microrganismos. Neste capítulo serão abordados técnicas e métodos já utilizados para estudos microbiológicos que degradam hidrocarbonetos.

Os microrganismos são organismos altamente adaptáveis capazes de crescer, utilizando um elevado número de distintas fontes de carbono e nitrogênio e de ocupar uma variedade inesgotável de nichos ecológicos (HAVEN, 1999 *apud* ANDRADE, 2008).

Para o crescimento, multiplicação e desenvolvimento adequado de microrganismos fora de seu habitat normal são utilizados meios de cultura. São denominados meios sintéticos quando possuem composição química definida e complexos quando sua composição não é conhecida completamente (ANDRADE, 2008).

Raramente ocorre na natureza ambientes contendo apenas um tipo de microrganismo. Em vez disso, comunidades de microrganismos estão interagindo no

ambiente natural, por isso, métodos e procedimentos são desenvolvidos para isolar e cultivar o organismo de interesse (ATLAS e BARTHA, 1998).

### 3.3.1 Metodologias aplicadas em estudos microbiológicos

O método mais comum e usado para isolar e cultivar microrganismos é a técnica de enriquecimento de culturas. Nesta técnica um meio mineral e condições de incubação são escolhidas para selecionar o organismo alvo e eliminar os organismos indesejáveis. A estratégia do enriquecimento aumenta as chances de encontrar-se em uma amostra ambiental microrganismo de interesse que se adapte as condições escolhidas (BROCK, 2000).

Gaskin e Bentham (2005) descrevem que o enriquecimento de microrganismos é estabelecido através da escolha do inóculo apropriado em um meio seletivo. Muitas estratégias de enriquecimento podem ser desenvolvidas, entretanto ambos, o meio de cultura e as condições de incubação, são críticas para o sucesso do enriquecimento. Essa técnica auxilia no isolamento dos microrganismos que são capazes de metabolizar um determinado substrato e que podem estar presentes em pequena quantidade na amostra original. O meio precisa ter como fonte principal de carbono o composto que se deseja degradar. Após vários dias de incubação, uma alíquota da primeira amostra é transferida para um segundo frasco contendo a mesma constituição do primeiro. Esse processo é repetido várias vezes com o objetivo de eliminar toda a matéria orgânica que possa ter vindo com a amostra ambiental. Após a incubação do último frasco, o material é transferido para um meio solidificado contendo a mesma fonte de carbono utilizada no meio líquido. Após a incubação os microrganismos que se desenvolveram no ágar podem ser constituídos por organismos que degradam aquele substrato como fonte de carbono e/ou energia. O método mais prático e utilizado para obtenção de colônias isoladas consiste na semeadura em superfície, no meio de cultura, até o esgotamento do inóculo. Neste método, os microrganismos são inoculados na superfície de um meio de cultura sólido com o auxílio de uma alça de platina, fazendo-se estrias na superfície deste meio. O inóculo é progressivamente diluído, de modo a obter-se no final, células isoladas que darão origem a uma colônia pura (ANDRADE, 2008).

A enumeração de microrganismos, ou determinação de sua biomassa, é um dado fundamental para estudos microbiológicos. Sua avaliação em processos biológicos é de fundamental importância, pois estabelece a efetividade do sistema. Existem muitos métodos para determinar o crescimento bacteriano: a contagem celular por métodos diretos e indiretos, determinação da massa celular (por peso seco ou por turbidimetria) ou através da avaliação da

atividade celular (ANDRADE, 2008). Segundo a mesma autora, os dois métodos quantitativos mais comuns são aqueles que avaliam o número de células e aqueles que medem o peso celular. O número também pode ser determinado pelas medidas das quantidades dos vários constituintes celulares, como DNA, RNA, NADH, NADPH, ATP ou proteínas, bem como a quantidade de certos produtos metabólicos como CO<sub>2</sub> liberado na respiração.

Existem alguns fatores que influenciam para o sucesso da biodegradação durante a biorremediação, e estão relacionados à diversidade metabólica dos microrganismos e as limitações intrínsecas, do local, como nutrientes, pH, temperatura, além da concentração do combustível. Para a degradação das frações de hidrocarbonetos na gasolina é necessário a bioestimulação com nutrientes, onde se destacam o nitrogênio e o fósforo como os mais exigidos. Uma condição ótima para que ocorra que a biodegradação de combustíveis é a presença de nutrientes na relação C:N:P de 70:5:1 (TEIXEIRA, 2007).

Os microrganismos identificados como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* mostraram capazes de degradar compostos tóxicos monitorados na gasolina comercial (TEIXEIRA, 2007). A identificação, o isolamento, purificação e armazenamentos destes isolados foram realizadas após 3 transferências. A cultura crescida foi diluída em solução salina (NaCl 0,85%) e plaqueada em meio agar nutritivo, sendo as mesmas incubadas a 30°C por 24 horas. As colônias de bactérias crescidas nas placas que apresentaram diferenças morfológicas visuais tais como: aspecto, tamanho, coloração, forma e borda da colônia. Foram purificadas e armazenadas a 4°C em tubos de ensaio com meio inclinado, com repicagens quinzenais. Os isolados bacterianos foram identificados pelo sequenciamento de uma região de gene do rRNA 16S (TEIXEIRA, 2007).

As moléculas de hidrocarbonetos suscetíveis à oxidação microbiana podem estar sob a forma de cadeias alifática, aromáticas, longas, curtas, lineares ou ramificadas que são modificadas para obtenção de compostos usados no metabolismo celular. Os hidrocarbonetos de cadeia alifática possuem um grande potencial em termos de substrato para o crescimento de algumas espécies de microrganismos (WATLINSON e MORGAN, 1990).

Para a análise da degradação dos hidrocarbonetos, um dos métodos mais utilizados é a cromatografia gasosa. Atualmente, tem-se utilizado técnicas sofisticadas, como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e ionização de chama para o caso de compostos orgânicos que permite separar e quantificar misturas complexas através das áreas dos picos individuais. A amostragem que utiliza o *headspace* é bastante utilizada para análise de compostos orgânicos voláteis (COVs), na determinação das frações de

hidrocarbonetos que são consumidas pelos microrganismos durante o seu crescimento em combustíveis. Os picos cromatográficos podem ser identificados pelos tempos de retenção, medidos a partir do tempo de injeção da amostra até o tempo do máximo do pico (TEIXEIRA, 2007).

Segundo Andrade (2008), características morfológicas são fundamentais para a caracterização dos microrganismos. Algumas das características morfológicas a serem analisadas podem ser: cor, forma da borda, brilho e consistência da colônia, e a coloração diferencial de Gram, amplamente utilizada para identificar e classificar bactérias, porque reflete uma diferença fundamental na estrutura da parede celular. A caracterização morfológica das colônias de bactérias, embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas. O estudo de um maior número de representantes das populações pode tornar-se viável com o agrupamento morfológico de indivíduos semelhantes.

Souza et al. (2010) realizaram o isolamento dos microrganismos em meio BH sólido, suplementado com 1% de gasolina pela técnica de incorporação. As colônias isoladas foram estriadas em meios de cultura sólidos: TrypticSoy Agar (TSA) para bactérias e Sabouaud para fungos filamentosos e leveduras. Após o isolamento os fungos, leveduras e bactérias foram caracterizados morfolologicamente.

Souza et al. (2010) utilizaram a técnica que consiste no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) em meio mineral BH com derivado do petróleo em uma microplaca. O princípio deste teste é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato ou sulfato. Ao incorporar um aceptor de elétrons como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos microorganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança da cor de azul (oxidado) para incolor (reduzido).

Luz et al. (2011) também testaram o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) em meio mineral BH com derivado de petróleo e inóculo, porém com utilização de tubos de ensaio e com agitação constante das amostras, conforme metodologia descrita por Kubota et al. (2008).

Pirrôlo (2006) aplicou o teste de degradabilidade utilizando o mesmo indicador (DCPIP) modificando a metodologia original (HANDSON et al. (2003)) que utilizava placas multipoços e cultivo estático. O autor realizou o estudo utilizando tubos de ensaio com meio

BH, indicador, fonte de carbono e inóculo padronizado e manteve incubados a 30°C e 200 rpm até completa descoloração.

Segundo Souza et al. (2010) a análise microbiológica é necessária para uma averiguação do potencial de biodegradação de microrganismos autóctones para uma possível biorremediação de uma área contaminada. A mesma autora ressalta ainda que, mesmo que as empresas de remediação poucas vezes adotem práticas biológicas para reduzir uma contaminação, a biorremediação é um dos focos principais da era biotecnológica e visa contribuir com a gestão e a recuperação de áreas contaminadas.

### 3.3.2 Biossurfactantes

Os surfactantes são compostos de superfície capaz de reduzir a superfície e tensão interfacial nas interfaces entre líquidos, sólidos e gases, permitindo-lhes assim para misturar ou dispersar facilmente como emulsões em água ou outros líquidos. Estes geralmente são compostos tóxicos ao meio ambiente e não biodegradáveis (BANAT et al. 2000).

Biossurfactantes são compostos estruturalmente diversos, produzidos principalmente por hidrocarbonetos utilizando microorganismos que apresentam atividade de superfície. Os biossurfactantes são compostos formados por moléculas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que através de seu acúmulo nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) reduzem as tensões superficial e interfacial aumentando a área superficial de compostos insolúveis, permitindo o aumento da mobilidade, biodisponibilidade e subsequente biodegradação. São compostos com baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (BANAT et al. 2000).

Muitos tipos de biossurfactantes são estudados, entre eles, os ramnolipídios, que pertencem a classe glicolipídio ramnolipídio, predominantemente identificados de *Pseudomonas Aeruginosa* (TULEVA et al. 2002).

Ramnolipídios são compostos formados por uma ou mais moléculas de raminose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecânico, sendo os glicolipídios mais bem estudados (DESAI e BANAT, 1997).



Biossurfactantes são compostos anfifílicos<sup>1</sup> de origem microbiana, com considerável potencial em aplicações comerciais em diversas indústrias. Eles têm vantagens sobre os seus produtos químicos homólogos quanto a biodegradabilidade e eficácia em situações extremas de temperatura ou pH e com menor toxicidade. Atualmente, biossurfactantes são utilizados principalmente em estudos sobre recuperação avançada de petróleo e de biorremediação de hidrocarbonetos (BANAT et al. 2000).

Os compostos biossurfactantes possuem várias vantagens sobre os surfactantes químicos, tais como: menor toxicidade, maior degradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior formação de espuma, alta seletividade e atividade específica em temperaturas extremas, pH e salinidade e ainda possuem a capacidade de ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (DESAI e BANAT, 1997).

### 3.3.3 Tratamento de áreas contaminadas

A utilização de processos biológicos para a descontaminação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos tem se tornado uma solução viável e de resultados positivos. O uso de microrganismos é uma alternativa ambiental, que gera a sustentabilidade, visando a minimização dos impactos ambientais gerados pelos tratamentos convencionais. Os principais microrganismos degradadores de hidrocarbonetos são as bactérias e fungos. Geralmente os compostos orgânicos são degradados com maior eficiência em ambientes contendo muitas espécies do que em culturas puras de um único microrganismo, pois o produto da degradação parcial de um organismo serve como substrato para outro microrganismo. Uma comunidade microbiana também é mais resistente do que uma cultura pura a produtos tóxicos resultantes da biodegradação, pois um de seus indivíduos pode ser capaz de detoxificá-lo (ARAÚJO, 2002).

A microbiota é a principal responsável por essas modificações ao longo do tempo. As comunidades naturais de microrganismos têm uma incrível versatilidade fisiológica, sendo capazes de metabolizar e às vezes mineralizar um enorme número de compostos orgânicos. Provavelmente todos os compostos naturais, sem considerar sua complexidade, serão degradados por uma ou outra espécie em algum ambiente particular. Por exemplo, algumas

---

<sup>1</sup> Segundo George Georgiou, compostos anfifílicos consistem em moléculas que possuem grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos, os hidrofóbicos freqüentemente são uma cadeia de hidrocarbonetos. Possuem elevada atividade superficial e emulsificante.

espécies de *Pseudomonas* podem degradar mais de 100 substratos utilizando-os como fonte de carbono (ALEXANDER, (1994) *apud* ANDRADE, 2008).

Existem substâncias resistentes à biodegradação, chamadas recalcitrantes ou bioimunes. Muitas destas substâncias, como muitos compostos orgânicos, biodegradam-se apenas parcialmente, em vez de mineralizar-se completamente. Elas são transformadas em compostos orgânicos, alguns dos quais podem ser bioimunes ou mesmo mais tóxicos que as substâncias originais (ANDRADE, 2008).

A remediação biológica (Biorremediação *in situ*) realizada no local da poluição utiliza a microflora original presente no ambiente, partindo da idéia de que os microrganismos presentes já estão adaptados aos contaminantes existentes. Já a Bioestimulação é realizada através da adição de nutrientes e/ou surfactantes diretamente no local contaminado com o objetivo de aumentar a atividade de populações de microrganismos autóctones degradadores ou a biodisponibilidade do poluente (IQSC, 2006).

Na bibliografia mundial existem trabalhos que estudaram a remedição de áreas contaminadas por hidrocarbonetos utilizando microrganismos, a seguir resumidamente descritos.

O trabalho realizado por Araújo e Lemos (2002), por exemplo, diz respeito ao isolamento e identificação de fungos filamentosos extraídos de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Através do isolamento, feito a partir de solo do local da contaminação foram obtidas 75 colônias, dentre as quais 60 apresentaram capacidade de degradação de hidrocarbonetos em meio sintético. Os meios de cultura utilizados foram Sabouraud, Batata Dextrose Agar (BDA) e Czapeck com intuito de oferecer opções nutricionais apropriadas para o desenvolvimento dos diversos fungos presentes nas amostras. A metodologia utilizada para a caracterização foi a técnica de esgotamento de semeadura feita por estrias em uma seqüência de três etapas. Neste mesmo estudo as linhagens isoladas foram identificadas de acordo com a metodologia descrita por Gerlach e Nirenberg (1982), utilizando meio nutritivo sintético agarizado-SNA e BDA, aplicando a técnica do microcultivo. Como resultados deste estudo as linhagens selecionadas foram submetidas à identificação, que resultaram na divisão dos microrganismos em 4 gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*. Estes gêneros foram subdivididos nas seguintes espécies: *Aspergillus Niveus*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Versicolor*, *Aspergillus Terreus*, *Aspergillus Fumigatus*, *Penicillium Corylophilum*, *Paecilomyces Variotti*, *Paecilomyces Niveus* e *Fusarium sp.*

Já Souza et al. (2005), desenvolveu um estudo com o enriquecimento das amostras, utilizando meio mineral Bushnell Haas – BH, contendo um dos petroderivados como fonte de carbono 1%. O isolamento foi realizado em meio BH sólido, adicionando-se as fontes de carbono (óleo Diesel, gasolina, *bunker* e querosene) pela técnica de nebulização ou por incorporação sobre o meio semeado com as amostras previamente enriquecidas. As colônias isoladas foram purificadas por estrias em placas de Petri, contendo os meios sólidos TrypticSoy Agar - TSA (meio pronto da Oxoid) para bactérias e Sabouraud – SAB para fungos filamentosos e leveduras. Passado o período de incubação a 35°C (bactérias) e 30°C (leveduras e fungos filamentosos), as colônias foram transferidas para tubos de ensaio, contendo os referidos meios sólidos. Posteriormente os microrganismos foram preliminarmente identificados, sendo sua morfologia analisada através da microscopia óptica para a caracterização dos diferentes grupos microbianos. A seleção de bactérias e leveduras conforme a potencialidade de degradação foi avaliada em placas multiploços. Já a seleção de fungos foi realizada pelo potencial degradador dos fungos segundo a metodologia de Gomes (2004). Todo este estudo resultou na identificação e seleção de microrganismos com potencialidade para os derivados de petróleo estudados e citados anteriormente, onde foram testadas 86 linhagens, dentre as quais 40 eram bactérias, 23 eram leveduras e 23 eram fungos filamentosos.

Por fim, Jacques et al. (2007), descreve a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's). Várias vias metabólicas de degradação dos HAPs já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são as do metabolismo aeróbio realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos. Também foi estudado que os fungos também podem metabolizar os HAPs. São duas as principais vias descritas na literatura: a primeira está relacionada aos fungos não-lignolíticos e a segunda aos fungos lignolíticos. Os autores citam também que a compostagem é uma técnica *ex situ* que pode ser utilizada para o tratamento do solo contaminado com HAPs, sendo este normalmente removido do local de origem e colocado na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas. Neste solo, é desencadeado um processo em que os microrganismos aeróbios degradaram os contaminantes orgânicos, transformando-os em material orgânico estabilizado, CO<sub>2</sub> e água. Como conclusão do estudo os autores reforçam que a biorremediação é uma alternativa para a remoção dos HAPs do solo, na qual os microrganismos degradadores transformam-os em substâncias inertes, CO<sub>2</sub> e água.

Algumas das formas mais comuns de degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos são a Degradação química, chamada Fotodegradação e a Volatilização. A biodegradação é uma das principais vias de eliminação dos hidrocarbonetos do solo.

A biodegradação dos compostos BTEX pode ser representada por uma reação química onde os hidrocarbonetos, em presença de um aceptor de elétrons, nutrientes e microrganismos são transformados em água, dióxido de carbono e mais microrganismos. Os aceptores de elétrons, compostos que recebem elétrons e são portanto, reduzidos, são principalmente o oxigênio, nitrato, ferro férrico e sulfato (CORSEUIL et al. 1996 *apud* CORSEUIL, 1997).

Banat et al. (2000), apresentam alguns microorganismos capazes de produzir biossurfactantes, entre eles: *Pseudomonasaeruginosa GL-1* e *Pseudomonasaeruginosa UW-1*, que produzem biossurfactante do tipo ramnolipideos.

Golveia et al. (2003) isolou 13 linhagens caracterizadas como produtoras de biossurfactantes ramnolipídios, sendo que 11 destas deram resultados positivos após 72h de cultivo e formaram halo azul quando testado com azul de metileno.

Ramos et al. (2010), também citam que diversas tecnologias ativas e passivas são utilizadas para recuperar áreas impactadas por derivados de petróleo. Dentre as tecnologias ativas, a bioestimulação anaeróbia baseia-se na utilização de receptores de elétrons alternativos (nitrato, ferro, sulfato) e consiste na introdução de nutrientes em forma de fertilizantes orgânicos ou inorgânicos num sistema contaminado, no qual se dá o aumento da população de microrganismos naturalmente presentes no solo contaminado. O uso de receptores de elétrons no meio impactado pode ser caracterizado pelo conceito de seqüência de potenciais de oxidação-redução, o qual auxilia a delimitação de zonas de oxidação-redução nas águas subterrâneas.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são agentes transformadores eficazes face a sua habilidade em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias. Por assimilarem tais substâncias, como fonte de carbono e/ou de energia, os microrganismos vêm se apresentando como poderosa alternativa aos métodos convencionais de tratamento, sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais (URURAHY, 1998).

Teixeira (2007) avaliou isolados degradadores de gasolina segundo a morfologia das colônias segundo aspectos visuais (tamanho, coloração, forma e borda da colônia) e para

células (teste de coloração de Gram). Nos resultados encontrados por Andrade (2008) as colônias estudadas apresentaram formas, bordas, aspectos e consistência bastante variadas. Foram observadas formas fusiformes, circulares, irregulares, puntiformes e filamentosas e as bordas das colônias variaram em irregulares, lisas, lobadas e erodida. Colônias de aspecto brilhoso, transparente e opaca foram observadas, e a consistência variou entre viscosa e seca. As bactérias apresentaram três formas diferentes: esféricas (cocos), alongadas (bacilos) e uma forma intermediária denominada coco-bacilo quando o comprimento não atinge duas vezes o diâmetro.

Um dos gêneros de bactérias mais estudados até hoje é *Pseudomonas* (URURAHY, 1998), frequente objeto de estudo da engenharia genética. A Tabela 02 apresenta alguns gêneros de fungos e bactérias que possuem capacidade de degradar hidrocarbonetos.

**Tabela 2 – Exemplos de gêneros de Fungos e Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos**

<b>Fungos</b>	<b>Bactérias</b>
<i>Aspergillus, Aureobasidium, Beaveria, Cândida, Chrysosporium, Clasdosporium, Cochkiobolus, fusarium, Geotrichum, Glicocladium, Minilia, Mortierella, Penicillium, Phoma, rhodotorula, Saccharomyces, Sprotrichum, Tolypocladium, trichoderma, Verticillium.</i>	<i>Acinetobacter, Acromobacter, Alcaligenes, Arthobacter, Bacillus, Choromobacteruim, corynebacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Proteus, Pseudomonas, Sarcina, Spirillum, Streptomyces, Vibrio, Xxanthomonas</i>

Fonte: URURAHY, (1998)

No estudo realizado por Souza et al. (2004) foram testadas amostras poluídas por petroderivados e destes 86 morfotipos isolados, 23 foram fungos filamentosos, que apresentaram potencialidade de degradar os derivados do petróleo.

## **4 METODOLOGIA**

Neste capítulo está descrita a metodologia desenvolvida para realizar os estudos de acompanhamento microbiológico realizados com amostras de água subterrânea de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

Foram realizados acompanhamentos visuais do crescimento microbiológico e avaliação quantitativa da degradação de diesel por meio de ensaio cromatográfico de TPH. Também foram realizados testes de degradabilidade, utilização do indicador redox e produção de ramnolipídios.

A avaliação do crescimento microbiano foi realizada de forma indireta, por meio de acompanhamentos visuais da cor (aumento da cor – amarela), da turvação (formação de material próximo ao anel da fonte de carbono (FC)) e consumo da FC (diminuição do anel de diesel imiscível no meio de cultura – redução da espessura em relação ao início) verificados nos tubos. Nas placas, a observação também foi visual, pelo acompanhamento do crescimento de colônias e suas características morfológicas (coloração, forma, forma da borda, aspecto e consistência) e com auxílio do microscópio a forma da célula e coloração diferencial de Gram (para bactérias).

### **4.1 Descrição da área contaminada e coleta de amostras**

A água subterrânea contaminada por hidrocarbonetos é oriunda de um posto de abastecimento de combustíveis localizado em Porto Alegre (Figuras 5 e 6). Este posto de combustível, segundo avaliação ambiental, está contaminado por diesel e possui traços de gasolina. Essa contaminação está relacionada a vazamentos ocorridos nos tanques subterrâneos de estocagem e a vazamentos acidentais e em linhas de transporte (PROJECONSULT, 2009).



**Figura 5 – Mapa de localização do Posto de Abastecimento**

Legenda: A – Posto de abastecimento de combustível estudado

Fonte: <http://maps.google.com.br/>

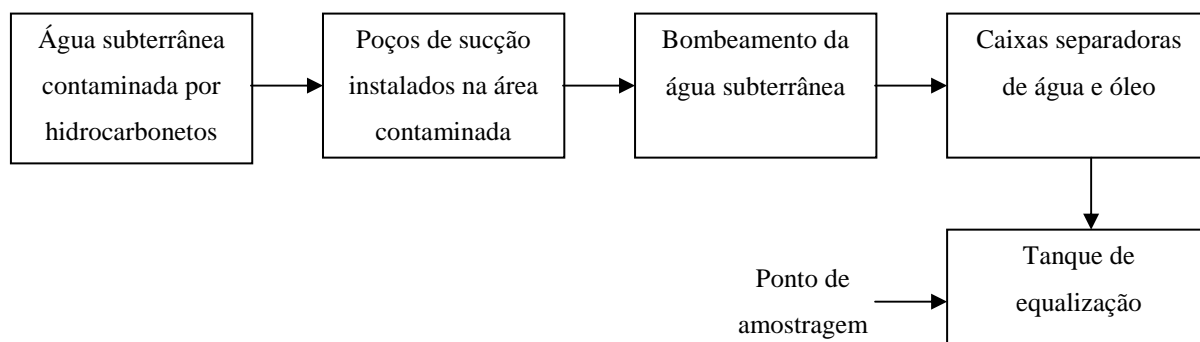


**Figura 6 – Posto de abastecimento com identificação dos poços de monitoramento (flechas azuis)**

Fonte: Projeconsult, 2009

A água contaminada por hidrocarbonetos foi retirada do lençol freático, por meio de bombeamento e levada até o sistema de remediação. A amostragem para esse trabalho ocorre antes dos filtros e tratamento instalado no Posto de Combustíveis. O sistema de

remediação instalado é composto por combinação de “pump-and-treat”, separação de água e óleo e adsorção por carvão ativado e/ou cinza de casca de arroz. A Figura 7 ilustra estes processos em formato de fluxograma.



**Figura 7 – Ponto de amostragem junto ao tanque de equalização**

A amostra foi coletada em recipiente de vidro âmbar estéril de 1 litro, sendo encaminhada para a universidade em caixa de isopor para manutenção de temperatura. Durante o período de pesquisa a amostra foi mantida no laboratório sob refrigeração, sendo realizada uma única amostragem para o desenvolvimento do estudo.

#### 4.2 Meio de cultura e fonte de carbono

O meio de cultura utilizado foi o Bushnell-Haas (BH), o qual é preparado com: 1,0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05g/L  $\text{FeCl}_3$  e 0,02 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Para a preparação do meio de cultura foi utilizada água destilada. Como fonte única de carbono foi utilizado o diesel (em concentrações diferentes, descritas a seguir). Este diesel foi coletado no Posto de Combustíveis citado anteriormente, em um recipiente de vidro âmbar estéril de 1 litro, o mesmo não foi auto-clavado nem filtrado para os ensaios.


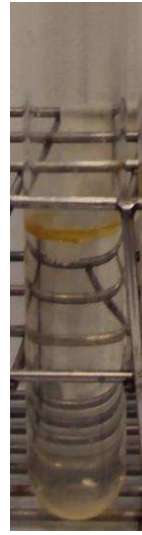




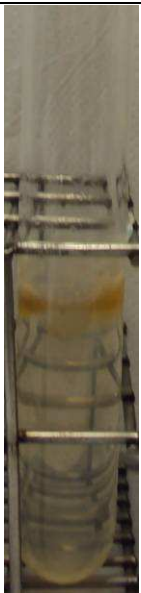



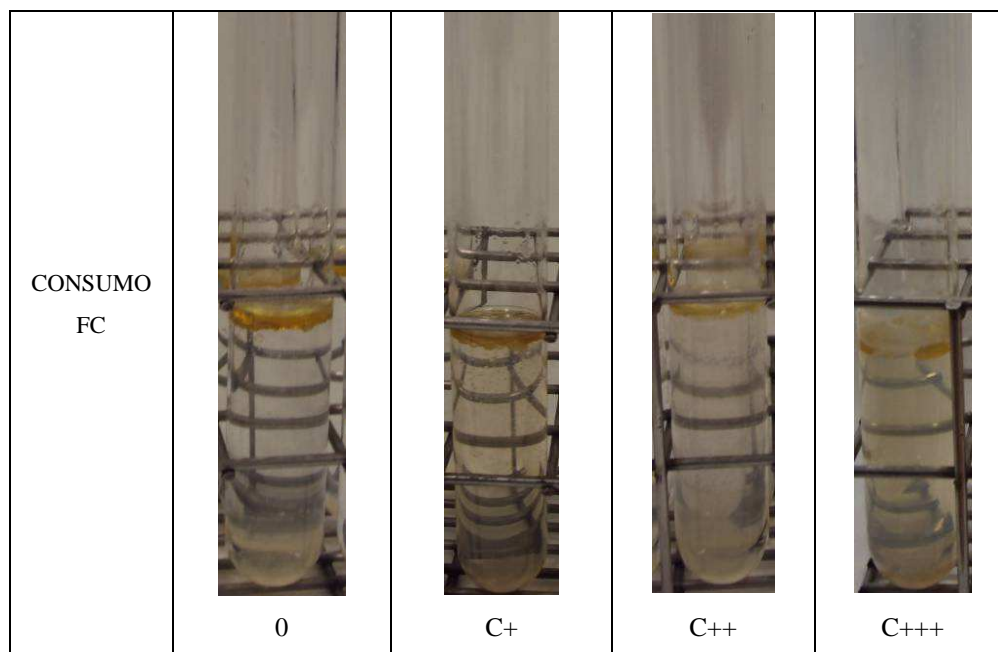
### 4.3 Avaliação visual do crescimento microbiano

#### 4.3.1 Avaliação visual nos tubos

O crescimento microbiano nos tubos foi avaliado de forma visual em que foram verificadas as alterações de cor (aumento da cor – amarela), da turvação (o diesel é imiscível no meio de cultura, forma um “anel” na parte superior, característica que foi monitorada visualmente). Os tubos foram incubados a 30°C no período de 40 dias. O Quadro 2 foi elaborado para demonstrar como foi realizada a avaliação visual em todos os ensaios, reproduzindo a comparação visual com os caracteres apresentados nas tabelas de resultados dos ensaios.

**Quadro 2 – Alterações visuais verificadas nos tubos (cor, turvação e consumo de FC)**

COR	 <p>0</p>	 <p>A+</p>	 <p>A++</p>	 <p>A+++</p>
TURVAÇÃO	 <p>0</p>	 <p>T+</p>	 <p>T++</p>	 <p>T+++</p>



#### 4.3.2 Avaliação visual nas placas

Foi realizado o acompanhamento do crescimento microbiano de colônias em placas de Petri de forma visual. Foi verificado o crescimento de colônias e suas características morfológicas (coloração, formada colônia, forma da borda, aspecto e consistência) e com auxílio do microscópio a forma da célula e coloração diferencial de Gram (para bactérias). A técnica de Gram foi realizada conforme instruções do fabricante (Laborclin Produtos para Laboratório Ltda), e somente para bactérias. As placas foram incubadas a 30°C no período de 40 dias. Na Figura 8 é possível visualizar como as características visuais foram avaliadas. A Figura 09 ilustra como as amostras foram incubadas em meio líquido e sólido.

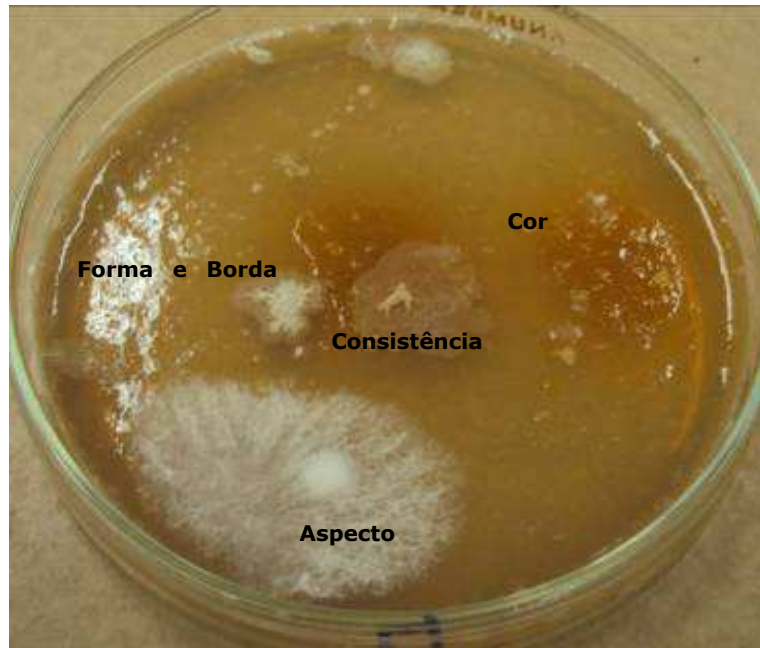


Figura 8 – Características visuais avaliadas nas colônias



Figura 9 – Incubação de tubos e placas durante os ensaios realizados

#### 4.4 Avaliação do parâmetro de TPH

Para avaliação da capacidade de degradação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos foi utilizada a cromatografia gasosa, procedimento utilizado também por Teixeira (2007).

Para o ensaio preliminar não foi realizada a avaliação quantitativa da degradação de diesel, pois o objetivo inicial foi verificar a existência de microrganismo nas amostras. As amostras para o ensaio de TPH foram enviadas para análise nos tempos: t=0 dia, t=20 dia e t=40 dia. Para os Ensaio 2 e 3 realizou-se uma composição dos tubos para a obtenção dos

resultados nos tempos estudados (as amostras em t=0 dia e t=40 dia vieram do Ensaio 3; a amostra no tempo t=20 dia do Ensaio 2).

A partir do Ensaio 4 todos os tubos foram preparados em conjuntos (um conjunto de tubos para observação visual e outros 3 para coleta de amostras nos tempos de incubação: t=0 dia, t=20 dia e t=40 dia). Os tubos para o ensaio de TPH foram preparados conforme o Quadro 4.

Os hidrocarbonetos totais de petróleo incluem frações orgânicas oriundas da gasolina (GRO) e do diesel (DRO), neste estudo a fração avaliada é a oriunda do diesel que abrangem os hidrocarbonetos de C<sub>10</sub> – C<sub>28</sub>. A metodologia para determinação do TPH DRO seguiu os procedimentos EPA 3510-d e EPA 8015-d. Essa metodologia prevê uso de 500 mL de amostra, contudo testou-se previamente a possibilidade de diminuir-se esse valor para 10mL (volume dos tubos ensaiados). O teste foi realizado nas mesmas condições para a amostra com 500 mL e 10 mL, que foi verificada a recuperação do padrão surrogate, o teste obteve uma recuperação de 81,5% para extração com 500mL e 69,02% para extração com 10mL. Mesmo com menor volume de amostra, a metodologia foi validada em função da recuperação do padrão ter ficado dentro da faixa aceitação determinada pelo método, que é de 60-120% de recuperação do padrão.

O ensaio cromatográfico inicia pela extração da amostra que foi realizada com diclorometano, seguida de concentração em banho-maria entre 35 °C à 45 °C, até 1,0 mL. A seguir a amostra é injetada, o equipamento foi operado com as seguintes condições: temperatura do injetor = 250°C, temperatura do detector FID = 300°C, programação do forno foi de 45°C – 3min, 275°C – 5min, 300°C – 3,5min, a 10°C/min, tempo total de análise = 37min, coluna BP1, marca SGE, 100% dimetilpolisiloxano, 30 metros, 0,25mm de diâmetro interno e 1µm de filme.

#### **4.5 Meio seletivo**

Para testar o crescimento de algumas espécies, foi utilizado o meio seletivo Sabouraud – SAB, em que a preferência é pelo crescimento de fungos filamentosos e leveduras (ATLAS, 1995). Ao meio Sabouraud – SAB (40g/L peptona, 10g/L glicose, 15g/L agar) foi adicionada, com alça de platina, amostra crescida em BH (24h). As placas foram incubadas a 30°C por um período de 2-3 dias.

#### **4.6 Isolamento**

O isolamento foi realizado em meio BH sólido com adição das diferentes concentrações de diesel citadas anteriormente. As colônias isoladas foram purificadas por meio da técnica de esgotamento por estrias em placa de Petri, sendo necessárias três repetições placa/tubo/placa. A incubação foi realizada a 30°C e os repiques a cada 48 horas. A morfologia dos isolados foi verificada visualmente e com ajuda de microscópio. Foi realizada a técnica de Gram (bactérias) e teste com indicador redox (2,6-diclorofenol indofenol).

#### **4.7 Teste de detecção de ramnolipídios**

A produção de ramnolipídios foi verificada por meio de teste visual, em que foi observado o crescimento dos isolados em meio Azul de metileno (10g/L peptona, 10g/L lactose, 2g/L KHPO<sub>4</sub> e 0,065g/L azul de metileno), específico para biossurfactantes aniônicos que consiste na detecção de ramnolipídios extracelulares. As placas contendo o meio Azul de metileno foram inoculadas em superfície com alça de platina a 30°C por 24h, utilizando como inóculo colônias de 24h dos isolados de ágar nutritivo (3g/L extrato de carne, 5g/L peptona, 15g/L ágar).

#### **4.8 Teste de degradabilidade**

A avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos, em especial diesel, foi testada utilizando-se o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (KUBOTA et al. 2008; LUZ et al. 2011 e a técnica modificada por PIROLLO, 2006). O ensaio foi realizado utilizando tubos de ensaio com 7,5mL de meio BH, 7,5µg/mL do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol, 50µL de diesel e 125 µL de inóculo crescido em meio BH sólido. Os tubos foram agitados com agitador mecânico por cerca de 1 minuto, mantidos a 30°C e observados com frequência até o desaparecimento da coloração azul. Foi realizada agitação diária com agitador mecânico. Neste estudo o teste foi modificado, pois não foi mantida agitação constante durante o período de incubação. Os resultados foram avaliados por meio de acompanhamentos visuais, sendo que a perda da coloração azul indica que o microrganismo possui capacidade de degradar hidrocarbonetos. O teste de degradabilidade foi realizado nos ensaios E4, E5, E6 e para os isolados obtidos.

#### 4.9 Ensaio

Foram realizados 06 ensaios, sendo que o ensaio 1 (E1) foi considerado preliminar, o qual definiu a metodologia empregada nos demais ensaios.

O Ensaio preliminar (E1) foi realizado em tubos de ensaio contendo 9 mL do meio de cultura, 1 mL da amostra e as diferentes concentrações de fonte de carbono. Os tubos foram agitados (agitação mecânica) e incubados por 20 dias a 30 °C em estufa bacteriológica. Foram realizados acompanhamentos semanais até o vigésimo dia. Os parâmetros visuais verificados foram: cor, turvação e consumo da fonte de carbono (o diesel é imiscível no meio de cultura, forma um “anel” na parte superior, característica que foi monitorada visualmente).

Ao mesmo tempo, foi realizado um acompanhamento do crescimento de colônias em placas de Petri. O meio de cultura utilizado foi o mesmo BH com adição de ágar nutriente. Foi preparada uma placa para cada concentração testada e a incubação foi similar aos tubos: 20 dias a 30 °C em estufa bacteriológica. Foram realizados acompanhamentos semanais até o vigésimo dia. Os parâmetros visuais verificados foram: cor, forma da colônia, forma da borda, brilho, consistência (textura) e crescimento das colônias.

Tanto para os tubos como para as placas foram preparados Brancos, assim denominados: Branco 1 (B1) = meio de cultura + diesel (sem amostra) e Branco 2 (B2) = meio de cultura + amostra (sem diesel).

O Quadro 3 resume as características de cada tubo (e placa) utilizados nesse Ensaio (E1).

**Quadro 3 – Ensaio Preliminar (E1)**

TUBO/PLACA	MC (mL)	FC (mL)	A (mL)	FC (%)
B1	9	1	0	1
B2	9	0	1	0
1	9	0,1	1	1%
2	9	0,2	1	2%
3	9	0,3	1	3%
4	9	0,5	1	5%
5	9	1	1	10%

Legenda:

MC – meio de cultura

FC – fonte de carbono (diesel)

A – amostra

B1 – Branco (sem amostra)

B2 – Branco (sem diesel)

Os ensaios E2, E3, E4, E5 e E6 foram realizados de forma similar ao ensaio E1, contudo modificou-se: as concentrações de fonte de carbono (Quadro 4 e Figura 10), os tubos agora foram agitados com agitação mecânica e mantidos por 40 dias a 30 °C em estufa bacteriológica. Nesses ensaios foram realizados acompanhamentos diários nos primeiros 5 dias e a cada 48 h até o quadragésimo dia. Os parâmetros visuais analisados foram os mesmos do E1. Para todos esses ensaios mais um branco foi acrescentado: o B3, o qual continha apenas meio de cultura, sem diesel nem amostra.

A partir do Ensaio 4 foram acrescentadas as concentrações de 30 % e 50 % de diesel. No ensaio 4 as placas não receberam diesel, exceto aquelas quantidades que vieram junto com a amostra coletada com a alça de platina nos tubos ensaiados. A partir do ensaio 5 as concentrações de diesel indicadas no Quadro 3 foram acrescentadas nas placas de forma similar aos tubos. Neste caso as placas não foram mais incubadas invertidas.

**Quadro 4 – Ensaios para a avaliação quantitativa da degradação de diesel (TPH) e acompanhamento do crescimento microbiológico**

TUBO/PLACA	MC (mL)	FC (mL)	A (mL)	FC (%)
B1	9	0,5	0	1%
B2	9	0	1	0
B3	9	0	0	0
1	9	0,1	1	1%
2	9	0,2	1	2%
3	9	0,3	1	3%
4	9	0,5	1	5%
5	9	1	1	10%
6	9	4,3	1	30%
7	9	10	1	50%

Legenda:

MC – meio de cultura

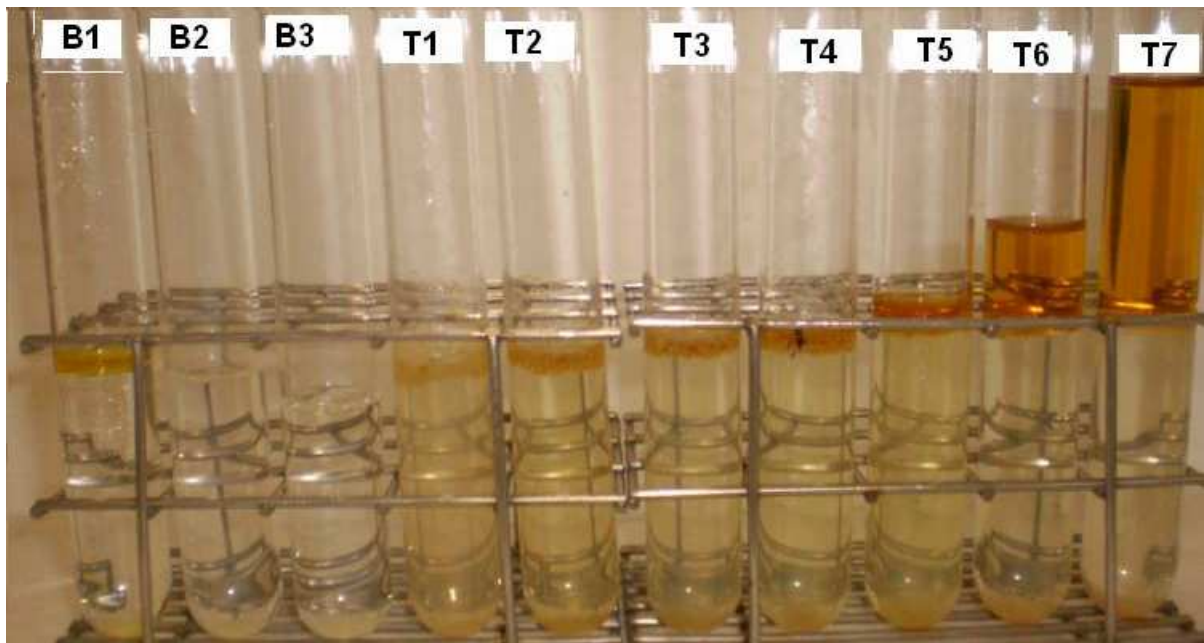
FC – fonte de carbono (diesel)

A – amostra

B1 – Branco (sem amostra)

B2 – Branco (sem diesel)

B3 – Branco (sem amostra e sem diesel)



**Figura 10 – Tubos com diferentes concentrações de fonte de carbono (diesel) monitorados a partir do Ensaio 4**



## 5 APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados deste estudo, na ordem em que as etapas metodológicas foram anteriormente descritas.

### 5.1 Avaliação visual do crescimento microbiano

#### 5.1.1 Avaliação visual dos tubos

Os resultados foram obtidos por meio de avaliações visuais conforme descrito na metodologia. As Tabelas 3, 4, 5, 6, 7, 8 apresentam os resultados para todos os ensaios realizados, respectivamente E1, E2, E3, E4, E5 e E6.

**Tabela 3 – Resultados da observação visual nos tubos do E1 com 20 dias de incubação**

TUBO	FC (%)	COR	TURVAÇÃO	CONSUMO FC
B1	1%	0	0	0
B2	0	0	0	0
1	1%	A++	T+	C+
2	2%	A++	T+	C+
3	3%	A+	T+	C+
4	5%	A++	T++	C++
5	10%	A+++	T+++	C++

Legenda: O maior número de sinais “+” indica maior resultado da característica avaliada

A – Amarelado; T – Turvo; C – Consumo FC

**Tabela 4 – Resultados da observação visual nos tubos do E2 com 40 dias de incubação**

TUBO	FC (%)	COR				TURVAÇÃO				CONSUMO FC			
		0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d
B1	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1%	0	A+	A++	A+++	0	T+	T++	T+++	0	C+	C++	C+++
2	2%	0	0	A+	A+	0	0	T+	T+	0	0	C+	C+
3	3%	0	0	A+	A+	0	0	T+	T+	0	0	C+	C+
4	5%	0	0	A+	A++	0	T+	T+	T++	0	0	C++	C++
5	10%	0	A+	A++	A+++	0	T+	T++	T+++	0	C+	C++	C+++

Legenda: O maior número de sinais “+” indica maior resultado da característica avaliada

A – Amarelado; T – Turvo; C – Consumo FC

**Tabela 5 – Resultados da observação visual nos tubos do E3 com 40 dias de incubação**

TUBO	FC (%)	COR				TURVAÇÃO				CONSUMO FC			
		0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d
B1	1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1%	0	A+	A++	A+++	0	T+	T++	T+++	0	C+	C++	C+++
2	2%	0	A+	A+	A++	0	T+	T+	T+++	0	0	C+	C++
3	3%	0	A+	A+	A++	0	T+	T+	T++	0	0	C+	C++
4	5%	0	0	A+	A+	0	0	T+	T++	0	0	C+	C+
5	10%	0	0	A+	A++	0	0	T+	T++	0	0	C+	C+

Legenda: quanto mais sinais “+” maior, comparativamente, a característica avaliada

A – Amarelado; T – Turvo; C – Consumo FC

**Tabela 6 – Resultados da observação visual nos tubos do E4 com 40 dias de incubação**

TUBO	FC (%)	COR				TURVAÇÃO				CONSUMO FC			
		0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d
B1	1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1%	0	A+	A++	A+++	0	T+	T++	T+++	0	C+	C++	C+++
2	2%	0	0	A+	A++	0	0	T+	T++	0	0	C+	C++
3	3%	0	A+	A+	A+++	0	0	T+	T+++	0	0	C+	C++
4	5%	0	0	A+	A+	0	0	T+	T++	0	0	C+	C+
5	10%	0	A+	A+	A++	0	0	T+	T++	0	0	C+	C++
6	30%	0	0	A+	A+	0	0	0	T+	0	0	0	C+
7	50%	0	0	A+	A+	0	0	0	T+	0	0	0	C+

Legenda: quanto mais sinais “+” maior, comparativamente, a característica avaliada

A – Amarelado; T – Turvo; C – Consumo FC

**Tabela 7 – Resultados da observação visual nos tubos do E5 com 40 dias de incubação**

TUBO	FC (%)	COR				TURVAÇÃO				CONSUMO FC			
		0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d
B1	1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1%	0	A+	A++	A+++	0	T+	T++	T++++	0	C+	C++	C+++
2	2%	0	A+	A++	A+++	0	T+	T++	T+++	0	0	C++	C+++
3	3%	0	A+	A+	A+++	0	T+	T+	T+++	0	0	C+	C++
4	5%	0	A+	A+	A++	0	T+	T++	T++	0	0	C+	C++
5	10%	0	A+	A+	A++	0	T+	T++	T+++	0	0	C+	C++
6	30%	0	A+	A+	A++	0	0	T+	T++	0	0	0	C+
7	50%	0	0	A+	A+	0	0	T+	T++	0	0	0	C+

Legenda: quanto mais sinais “+” maior, comparativamente, a característica avaliada

A – Amarelado; T – Turvo; C – Consumo FC

**Tabela 8 – Resultados da observação visual nos tubos do E6 com 40 dias de incubação**

TUBO	FC (%)	COR				TURVAÇÃO				CONSUMO FC			
		0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d	0 d	10 d	20 d	40 d
B1	1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1%	0	A+	A+++	A++++	0	T+	T++	T+++	0	C+	C++	C+++
2	2%	0	A+	A++	A+++	0	T+	T++	T+++	0	C+	C+	C++
3	3%	0	A+	A++	A+++	0	T+	T+	T++	0	0	C+	C++
4	5%	0	A+	A+	A+++	0	T+	T+	T++	0	0	C+	C+
5	10%	0	A+	A+	A++	0	T+	T+	T++	0	0	C+	C+
6	30%	0	A+	A+	A++	0	0	T+	T++	0	0	C+	C+
7	50%	0	0	A+	A++	0	0	T+	T++	0	0	C+	C+

Legenda: quanto mais sinais “+” maior, comparativamente, a característica avaliada

A – Amarelado; T – Turvo; C – Consumo FC

No ensaio preliminar (E1) a avaliação das alterações visual dos parâmetros de cor, turvação e consumo de FC foi diretamente proporcional à concentração de diesel adicionada, ou seja, o maior crescimento foi verificado no tubo 5, aquele com 10% de fonte de carbono. Os resultados positivos foram verificados com 20 dias (em todos os tubos). Os parâmetros cor e turvação foram os que demonstraram maior alteração no decorrer do período de observação.

Nos demais ensaios as alterações visuais nos tubos foram notadas a partir do quinto dia de incubação, sendo mais perceptíveis em todos os ensaios no tubo 1, referente a 1% de FC, conforme as Tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8. No entanto também constatou-se que nas demais concentrações de FC testadas houve alterações visuais, indicativo de crescimento microbiano. Os melhores resultados para 1% sugerem que em menores concentrações de FC o crescimento microbiano é facilitado. Essa relação da modificação visual com o crescimento microbiano foram também sugeridas por Andrade (2008), Ururahy (1998) e Araújo e Lemos (2002).

As avaliações visuais realizadas nos tubos neste estudo também foram semelhantes àquelas realizadas por Bento e Gaylard (2001) que observaram visualmente, durante a manutenção do diesel em meio BH enriquecido por sais, três diferentes estágios: 1) aumento da turbidez na fase aquosa e, ao mesmo tempo, crescimento das bactérias em placas; 2) formação de uma escura camada/membrana (halo) na interface óleo/água; 3) escurecimento do óleo em si.

Isto pode ter ocorrido em função de quando existe um excesso de FC isto pode se transformar em um ‘veneno’ para o crescimento dos microrganismos, e acabar por inibir o crescimento dos mesmos. O contrário também ocorre quando em menores concentrações de FC o crescimento microbiano é facilitado em função de condições apropriadas para o crescimento. Essa afirmação é confirmada por Andrade (2008) o qual testou diferentes concentrações de gasolina comercial (0,05% a 1%). Nesse trabalho a concentração de 0,2% demonstrou um maior rendimento do crescimento microbiano e ainda foi verificado que as concentrações maiores inibiram o crescimento microbiano.





Os brancos 1 (sem amostra), 2 (sem FC) e 3 (somente MC) não apresentaram alterações visuais, confirmando a necessidade de um conjunto de fatores: presença de amostra e FC.

### **5.1.2 Avaliação visual nas placas**


O crescimento microbiano verificado nas placas em todos os ensaios realizados encontram-se nos quadros 5, 6, 9, 10, 12 e 14, respectivamente para os ensaios E1, E2, E3, E4, E5, e E6.

Nas placas as alterações foram observadas a partir do segundo dia de incubação, com a formação de colônias. Cabe ressaltar que as alterações (crescimentos) foram verificadas primeiro nas placas e depois nos tubos. Nas placas as alterações ocorrem mais significativamente no início da incubação, enquanto nos tubos notou-se o contrário, sendo as alterações mais perceptíveis ao final do período de incubação.

Quadro 5 – Resultados da observação visual nas placas do E1 com 20 dias de incubação

PLACA	FOTO	FC (%)	COR	FORMA E BORDA	BRILHO	CONSISTÊNCIA
B1	-	1%	Amarela	Circular e lobada	Opaca	Viscosa
B2	-	0	Amarela	Circular e lisa	Opaca	Viscosa
			Marrom	Irregular e lobada	Opaca	Viscosa
1		1%	Amarela	Circular e lisa	Opaca	Viscosa
			Marrom	Irregular e lobada	Opaca	Viscosa
			Amarela	Irregular e lobada	Opaca	Viscosa
2		2%	Amarela	Circular e lisa	Opaca	Quebradiça
			Marrom	Irregular e lobada	Opaca	Viscosa
3		3%	Amarela	Circular e lisa	Opaca	Quebradiça
			Marrom	Irregular e lobada	Opaca	Viscosa
			Amarela	Circular e lisa	Opaca	Viscosa
4		5%	Amarela	Irregular e Irregular	Brilhante	Viscosa

Continuação Quadro 05

PLACA	FOTO	FC (%)	COR	FORMA E BORDA	BRILHO	CONSISTÊNCIA
5		10%	Amarela	Circular e lisa	Opaca	Viscosa
			Marrom	Irregular e lobada	Opaca	Viscosa

Legenda:

MC – meio de cultura

FC – fonte de carbono (diesel)

B1 – Branco (sem amostra)




B2 – Branco (sem diesel)

Observação: as fotos foram tiradas sem qualquer aumento ou redução. Para comparação, as placas de Petri possuem 10 cm de diâmetro.




Neste ensaio foram observadas 14 colônias crescidas. Foi possível agrupar as colônias em função das suas características morfológicas, como: cor, forma da colônia e borda, consistência e aspecto em 6 grupos diferentes, indicados no Quadro 5: 1) amarela, circular e lobada, opaca, viscosa; 2) amarela, circular e lisa, opaca, viscosa; 3) marrom, irregular e lobada, opaca, viscosa; 4) amarela, circular e lisa, opaca, quebradiça; 5) amarela, circular e lobada, brilhante, viscosa; 6) amarela, irregular e lobada, opaca, viscosa.

O crescimento microbiano nos tubos foi confirmado quando houve o crescimento de diferentes colônias nas condições ensaiadas.

**Quadro 6 – Resultados da observação visual nas placas do E2 com 40 dias de incubação**


Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
B1		bastão	G-	bege	Arredondada/irregular e lobada	opaca	viscosa
		bastão	G-	branca	Irregular e lobada	opaca	viscosa
B2		bastão	G-	amarela	Circular e lisa	opaca	viscosa
		bastão	G-	branca	Irregular e lobada	opaca	viscosa
		bastão	G-	bege	Circular e lisa	opaca	Quebradiça
		bastão	G-	bege	Arredondada e lobada	brilhante	lisa
B3	-	-	-	-	-	-	-
1		filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	opaca	X
		bastão	G-	branca	Irregular e lobada	opaca	Viscosa
		X	G-	alaranjada	irregular e irregular	Brilhante	viscosa
		X	G-	alaranjada	Arredondada e irregular	brilhante	Lisa
		bastão	G-	Bege	Arredondada e lobada	opaca	Viscosa

Continuação Quadro 06

Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
2		filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	opaca	X
		bastão	G-	branca	Irregular e lobada	opaca	Viscosa
		X	G-	alaranjada	irregular e irregular	brilhante	Viscosa
		X	G-	alaranjada	Arredondada e irregular	brilhante	Lisa
		bastão	G-	bege	Arredondada e lobada	opaca	Viscosa
		bastão	G-	amarela	Circular e lisa	opaca	Viscosa
		bastão	G-	bege	Arredondada e lobada	brilhante	Lisa
3		bastão	G-	bege	Arredondada/irregular e lobada	opaca	Viscosa
		bastão	G-	bege	Circular e lisa	opaca	Quebradiça
		bastão	G-	amarela	Circular e lisa	opaca	Viscosa
4		filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	opaca	X
		bastão	G-	bege	Arredondada/irregular e lobada	opaca	Viscosa
		X	G-	alaranjada	irregular e irregular	brilhante	Viscosa
		X	G-	laranja	Arredondada e irregular	brilhante	Lisa
		bastão	G-	amarela	Circular e lisa	opaca	Viscosa



Continuação Quadro 6

Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
5		bastão	G-	amarela	Circular e lisa	opaca	Viscosa
		bastão	G-	branca	Irregular e lobada	opaca	Viscosa
		bastão	G-	bege	Arredondada/irregular e lobada	opaca	Viscosa
		bastão	G-	bege	Circular e lisa	opaca	Quebradiça

Legenda:

MC – meio de cultura

FC – fonte de carbono (diesel)

B1 – Branco (sem amostra)

B2 – Branco (sem diesel)

B3 – Branco (somente MC)

X – Não identificada



Houve o crescimento de colônias amarelas, brancas, beges e alaranjadas de diferentes formas e tamanhos, conforme mostra o Quadro 6. Nas placas as alterações ocorrem mais significativamente no início da incubação, ou seja, nos primeiros dez/quinze dias.



Neste ensaio foram verificadas 30 colônias crescidas. Após o agrupamento delas em função das suas características, verificaram-se 10 grandes grupos, conforme Quadro 7. Verifica-se assim que as diferentes colônias crescidas se repetem nas diferentes condições fornecidas. Nota-se o crescimento de dois tipos de microrganismos (fungos e bactérias) dentre os 30 morfotipos, 90% são bactérias Gram negativas e 10% fungos.

**Quadro 7 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas**




<b>Grupo</b>	<b>Forma da célula</b>	<b>Gram</b>	<b>Coloração</b>	<b>Forma e borda</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Consistência</b>
1	Bastão	G-	bege	Arredondada/irregular e lobada	opaca	viscosa
2	Bastão	G-	branca	Irregular e lobada	opaca	viscosa
3	Bastão	G-	amarela	Circular e lisa	opaca	viscosa
4	Bastão	G-	bege	Circular e lisa	opaca	quebradiça
5	Bastão	G-	bege	Arredondada e lobada	brilhante	lisa
6	Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	opaca	X
7	X	G-	alaranjada	irregular e irregular	brilhante	viscosa
8	X	G-	alaranjada	Arredondada e irregular	brilhante	lisa
9	X	G-	laranja	Arredondada e irregular	brilhante	lisa
10	Bastão	G-	bege	Arredondada e lobada	opaca	viscosa

Legenda: X – não identificado.


Quadro 8 – Resultados da observação visual nas placas do E3 com 40 dias de incubação

Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
B1		X	X	bege	Circular e lisa	brilhante	Viscosa
B2	-	X	G-	amarela	Circular e lisa	opaca	Viscosa
1		bastão	G-	amarela	Circular e lobada	opaca	Viscosa
		X	G-	bege	Circular e lisa	opaca	Quebradiça
		X	G-	bege	Circular e lisa	brilhante	Viscosa
		X	X	marrom	Arredondada e irregular	brilhante	Viscosa

Continuação Quadro 8

Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
2		bastão	G-	bege	Circular e lisa	brilhante	viscosa
		Filamentosa	X	branca esverdeada	filamentosa e irregular	opaca	X
		bastão	G-	amarela	Circular e lobada	opaca	viscosa
3		Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	opaca	X
		X	G-	alaranjada	Arredondada e irregular	brilhante	Lisa
		bastão	G-	bege	Arredondada e lobada	opaca	Viscosa
4		bastão	G-	bege	Irregular e lisa	brilhante	Viscosa
		X	X	marrom avermelhada	Irregular alongada e lobada	brilhante	Viscosa

Continuação Quadro 8

Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
5		bastão	G-	bege	Circular e lisa	brilhante	Viscosa
		X	G-	Bege (pintas bege claro)	Circular e lobada	opaca	Quebradiça

Legenda:

MC – meio de cultura

FC – fonte de carbono (diesel)

B1 – Branco (sem amostra)

B2 – Branco (sem diesel)

B3 – Branco (somente MC)

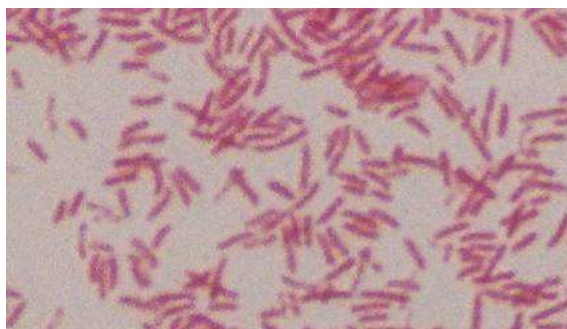
X – Não identificada

No ensaio 3 observou-se o crescimento de 17 colônias de diferentes morfotipos, Quadro 8. Quando realizou-se o agrupamento das mesmas em função de algumas de suas características, as mesmas foram agrupadas em 12 grupos diferentes, conforme Quadro 9. Com isto, novamente, pode-se verificar que as diferentes colônias crescidas se repetem nas diferentes situações oferecidas neste ensaio. Das 17 colônias crescidas 70,6% são Gram negativas, 11,8% fungos e 17,7% não identificadas. Na Figura 11 pode-se visualizar a caracterização microscópica de uma bactéria Gram-negativa.

**Quadro 9 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas no ensaio 3**




Grupo	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
1	X	X	bege	Circular e lisa	brilhante	viscosa
2	X	G-	amarela	Circular e lisa	opaca	viscosa
3	Bastão	G-	bege	Arredondada e lobada	opaca	viscosa
4	Bastão	G-	amarela	Circular e lobada	opaca	viscosa
5	X	G-	bege	Circular e lisa	opaca	quebradiça
6	X	X	marrom	Arredondada e irregular	brilhante	viscosa
7	filamentosa	X	branca esverdeada	filamentosa e irregular	opaca	X
8	filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	opaca	X
9	X	G-	alaranjada	Arredondada e irregular	brilhante	lisa
10	Bastão	G-	bege	Irregular e lisa	brilhante	viscosa
11	X	X	marrom avermelhada	Irregular alongada e lobada	brilhante	viscosa
12	X	G-	Bege (pintas bege claro)	Circular e lobada	opaca	quebradiça

Legenda: X – não identificado.



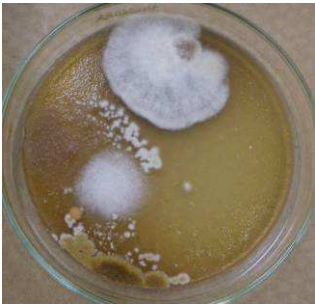


**Figura 11 – Coloração de Gram para microrganismos isolados (aumento 1000X), bactérias Gram negativa grupo 3 colônia bege.**

Quadro 10 – Resultados da observação visual nas placas do E4 com 40 dias de incubação



Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
B1		Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	Opaca	X
		Bastão	G-	Bege	Arredondada e lobada	Opaca	viscosa
B2		X	X	Preta	filamentosa e irregular	Opaca	X
		X	G-	Amarela	Circular e lisa	Opaca	viscosa
		Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	Opaca	X
		Bastão	G-	Bege	Arredondada e lobada	Opaca	viscosa
B3	-	-	-	-	-	-	-
1		X	X	Preta	filamentosa e irregular	Opaca	X
		Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	Opaca	X
		X	G-	Amarela	Circular e lisa	Opaca	viscosa
		X	G-	Bege	Circular e lisa	Brilhante	viscosa



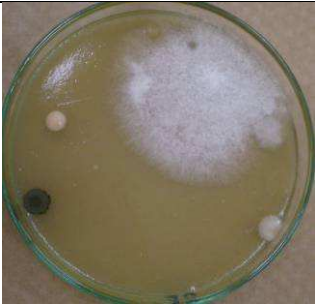
Continuação Quadro 10

Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
2		Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	Opaca	X
		X	G-	Alaranjada	Arredondada e irregular	Brilhante	lisa
		Filamentosa	X	branca esverdeada	filamentosa e irregular	Opaca	X
		X	G-	Bege	Circular e lisa	Brilhante	viscosa
3		Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	Opaca	X
		X	G-	Bege (preta no meio)	Circular e lisa	Opaca	quebradiça
		Bastão	G-	Amarela	Circular e lobada	Opaca	viscosa
4		Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	Opaca	X
		X	G-	Bege avermelhada	Circular e lisa	Opaca	X
		X	G-	Bege	Circular e lisa	Brilhante	viscosa

Continuação Quadro 10

Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
5		X	X	Preta	filamentosa e irregular	Opaca	X
		Filamentosa	X	branca	filamentosa e lobada	Opaca	X
		Bastão	G-	Amarela	Circular e lisa	Opaca	viscosa
		X	G-	Bege	Circular e irregular	Brilhante	X
6		Filamentosa	X	branca	Circular e lobada	Opaca	X
		Bastão	G-	Amarela	Circular e lisa	Opaca	viscosa
		X	G-	Bege	Circular e irregular	Brilhante	viscosa
		X	G-	Bege	Circular e irregular	Brilhante	viscosa
		X	G-	Alaranjada	Arredondada e irregular	Brilhante	lisa

Continuação Quadro 10

Placa	Foto	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
7		X	X	Preta	filamentosa e irregular	Opaca	X
		Filamentosa	X	branca	filamentosa e irregular	Opaca	X
		X	G-	Bege	Circular e lobada	Brilhante	Viscosa

Legenda:

MC – meio de cultura

FC – fonte de carbono (diesel)

B1 – Branco (sem amostra)

B2 – Branco (sem diesel)

B3 – Branco (sem amostra e sem diesel)

X – Não identificada

Neste ensaio foram verificadas 32 colônias crescidas, por similaridade de suas características as mesmas foram agrupadas em 13 grupos diferentes, demonstrados no Quadro 11. A partir destes resultados verifica-se que mesmo com condições diferentes para o crescimento, os grupos se repetem ao longo do período de incubação. Dos 32 morfotipos crescidos 56,25% são bactérias Gram negativas e 43,8% fungos. A Figura 12 ilustra morfotipo verificado microscopicamente como Gram negativo.

**Quadro 11 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas**




Grupo	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
1	Filamentosa	X	Branca	filamentosa e irregular	Opaca	X
2	Bastão	G-	Bege	Arredondada e lobada	Opaca	viscosa
3	X	X	preta	filamentosa e irregular	Opaca	X
4	X	G-	Amarela	Circular e lisa	Opaca	viscosa
5	Filamentosa	X	branca esverdeada	filamentosa e irregular	Opaca	X
6	X	G-	Alaranjada	Arredondada e irregular	Brilhante	lisa
7	X	G-	Bege (preta no meio)	Circular e lisa	Opaca	quebradiça
8	X	G-	Bege avermelhada	Circular e lisa	Opaca	X
9	Bastão	G-	Amarela	Circular e lisa	Opaca	viscosa
10	X	G-	Bege	Circular e irregular	Brilhante	X
11	X	G-	Bege	Circular e irregular	Brilhante	viscosa
12	X	G-	Alaranjada	Arredondada e irregular	Brilhante	lisa
13	X	G-	Bege	Circular e lobada	Brilhante	viscosa

Legenda: X – não identificado.






**Figura 12 – Coloração de Gram para diferentes grupos de microrganismos isolados (aumento 1000X), bactéria Gram negativa grupo 9 colônia amarela.**

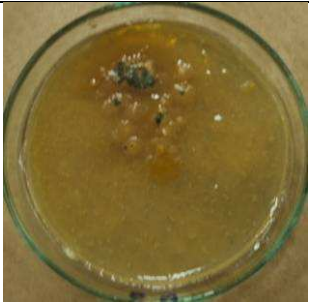

Quadro 12 – Resultados da observação visual nas placas do E5 com 40 dias de incubação

Placa	Tipo de colônias	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
B1		filamentosa	X	branca	Filamentosa/circular e irregular	Opaca	X
B2		filamentosa	X	branca	Filamentosa/circular e irregular	Opaca	X
		X	G-	bege	Irregular e irregular	Opaca	quebradiça
		Bastão	G-	bege	Circular e lisa	brilhante	viscosa
		filamentosa	X	rosada	Circular e irregular	Opaca	X
B3	-	-	-	-	-	-	-
1		Bastão	G-	bege	Circular e lobada	brilhante	viscosa
		Bastão	G-	alaranjada	Circular e irregular	brilhante	viscosa
		Bastão	G-	bege	Circular e lobada	Opaca	quebradiça
		Bastão	G-	bege escuro	Circular e lobada	brilhante	viscosa

Continuação Quadro 12

Placa	Tipo de colônias	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
2		Cocos	G+	laranja	Circular/oval e irregular	brilhante	viscosa
		Bastão	G-	marrom	irregular	Opaca	quebradiça
		filamentosa	X	branca	Circular e lisa	Opaca	X
3		Bastão	G-	laranja	Circular e irregular	brilhante	viscosa
		Filamentosa (verde)	X	Bege alaranjado com o meio verde	Irregular e irregular	Opaca	X (verde) Quebradiça (bege)
		Cocos	G+	Branca	circular e lisa	brilhante	viscosa
		Bastão	G-	bege	circular e lisa	brilhante	viscosa
4		Filamentosa	X	Bege alaranjado com o meio verde	Irregular e irregular	Opaca (verde) brilhante (bege)	X (verde) viscosa (bege)
		bastão	G-	Bege alaranjado	Irregular e irregular	brilhante	Viscosa

Continuação Quadro 12

Placa	Tipo de colônias	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
5		Filamentosa	X	Bege alaranjado com o meio verde	Irregular e irregular	Opaca (verde) brilhante (bege)	X (verde) viscosa (bege)
		Cocos	G+	Bege alaranjado	Irregular e irregular	brilhante	viscosa
6		bastão	G-	Bege	Circular e lisa	Opaca	Quebradiça
7	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

MC – meio de cultura

FC – fonte de carbono (diesel)

B1 – Branco (sem amostra)

B2 – Branco (sem diesel)

B3 – Branco (somente MC)

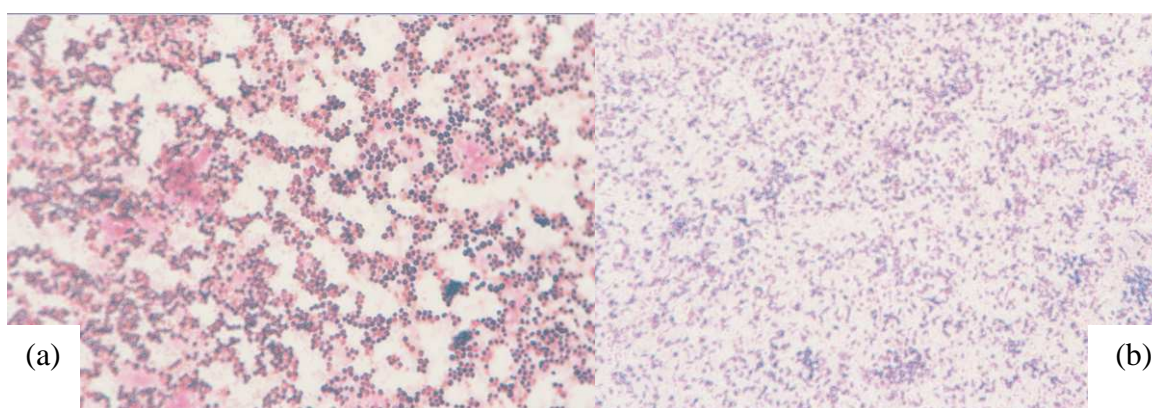
X – Não identificada

O Quadro 12 mostra os 22 tipos de colônias crescidas no E5, quando realizado o agrupamento por semelhança de características reduz-se a 14 grupos, conforme Quadro 13. Dos 22 morfotipos, 47,6% são bactérias Gram negativas, 14,3% são bactérias Gram positivas, 33,3% são fungos e 4,7% não identificadas. Na Figura 13 pode-se visualizar a caracterização de Gram para alguns isolados.

**Quadro 13 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas no E5**

Grupo	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
1	filamentosa	X	branca	Filamentosa/circular e irregular	Opaca	X
2	X	G-	bege	Irregular e irregular	Opaca	quebradiça
3	bastão	G-	bege	Circular e lisa	brilhante	viscosa
4	filamentosa	X	rosada	Circular e irregular	Opaca	X
5	bastão	G-	alaranjada	Circular e irregular	brilhante	viscosa
6	bastão	G-	bege escuro	Circular e lobada	brilhante	viscosa
7	cocos	G+	laranja	Circular/oval e irregular	brilhante	viscosa
8	bastão	G-	marrom	irregular	Opaca	quebradiça
9	bastão	G-	laranja	Circular e irregular	brilhante	viscosa
10	Filamentosa (verde)	X	Bege alaranjada com o meio verde	Irregular e irregular	Opaca	X (verde) Quebradiça (bege)
11	cocos	G+	Branca	circular e lisa	brilhante	viscosa
12	bastão	G-	Bege alaranjado	Irregular e irregular	brilhante	viscosa
13	Cocos	G+	Bege alaranjado	Irregular e irregular	brilhante	viscosa
14	bastão	G-	Bege	Circular e lisa	Opaca	quebradiça

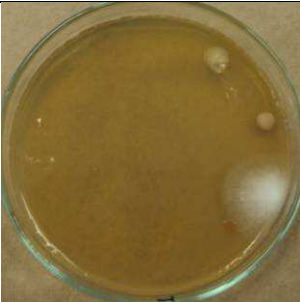


Legenda: X – não identificado.





**Figura 13 – Coloração de Gram para diferentes grupos de microrganismos isolados (aumento 1000X). (a) bactérias Gram positiva grupo 11 colônia branca (b) bactérias Gram positiva grupo 7 colônia laranja.**



Quadro 14 – Resultados da observação visual nas placas do E6 com 40 dias de incubação

Placa	Tipo de colônias	Forma da célula	Gram	Colônias			
				Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
B1	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-
1		filamentosa	ENR	Branca	Circular e irregular	opaca	X
		Cocos	G-	Bege	circular e lisa	opaca	Quebradiça
		bastão	G+	Alaranjada	circular e lisa	opaca	Viscosa
		bastão	G-	Amarelada	circular e lisa	brilhante	X
2		filamentosa	ENR	Branco/marrom (com meio preto)	circular e irregular	opaca	X
		bastão	G-	bege marrom	Circular e lisa	brilhante	Viscosa
3		filamentosa	ENR	Amarela	circular e lobada	opaca	X
		filamentosa	ENR	Branca	circular e lobada	opaca	X
		bastão	G-	Bege	circular e lisa	brilhante	Viscosa

Continuação Quadro 14

Placa	Tipo de colônias	Forma da célula	Gram	Colônias	Forma e borda	Aspecto	Consistência
				Coloração			
4		bastão	G-	bege (alaranjado ao redor)	circular e irregular	brilhante	X
5		filamentosa	X	Branca	circular e irregular	opaca	X
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

MC – meio de cultura

FC – fonte de carbono (diesel)

B1 – Branco (sem amostra)

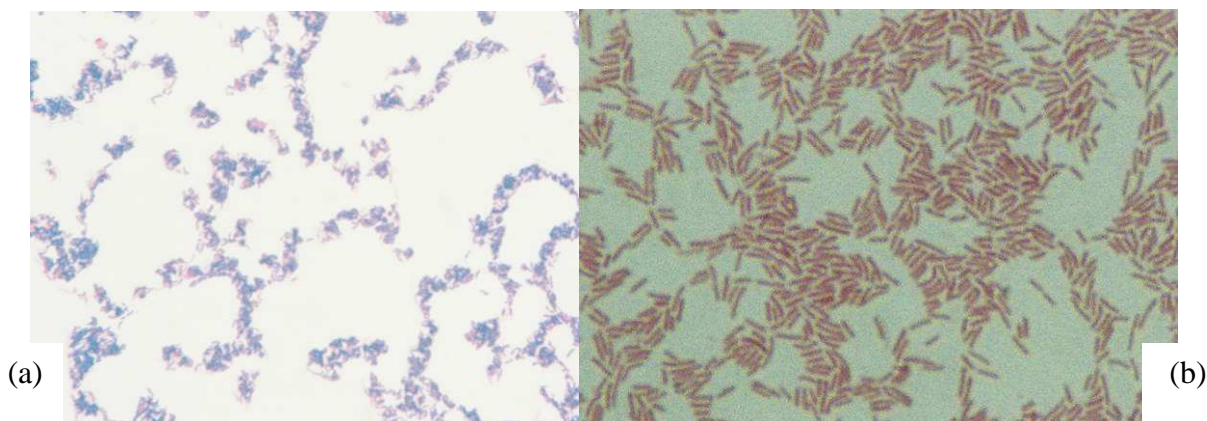
B2 – Branco (sem diesel) B3 – Branco (somente MC) X – Não identificada

Para o E6 foi verificado o crescimento de 11 diferentes morfotipos. O agrupamento das colônias crescidas neste ensaio ocorreu de forma menos significativa, sendo que das 11 colônias crescidas o agrupamento resultou um total de 9 grupos diferentes, neste caso, não houve grande repetibilidade de colônias crescidas sob as diferentes condições testadas, verificados no Quadro 15. No geral foram identificadas 45,5% são bactérias Gram negativas, 9,1% são bactérias Gram positivas e 45,5% fungos, características que podem ser verificadas na Figura 14.

**Quadro 15 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas**

Grupo	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
1	filamentosa	ENR	Branca	Circular e irregular	opaca	X
2	Cocos	G-	Bege	circular e lisa	opaca	Quebradiça
3	bastão	G+	Alaranjada	circular e lisa	opaca	Viscosa
4	bastão	G-	Amarelada	circular e lisa	brilhante	X
5	filamentosa	ENR	Branco/marrom (com meio preto)	circular e irregular	opaca	X
6	bastão	G-	bege marrom	Circular e lisa	brilhante	Viscosa
7	filamentosa	ENR	Amarela	circular e lobada	opaca	X
8	bastão	G-	Bege	circular e lisa	brilhante	Viscosa
9	bastão	G-	bege (alaranjado ao redor)	circular e irregular	brilhante	X

Legenda: X – não identificado.



**Figura 14 – Ensaio 6, Coloração de Gram para diferentes grupos de microrganismos isolados (aumento 1000X). (a) bactérias Gram positiva grupo 3 colônia alaranjada (b) bactérias Gram negativa grupo 8 colônia bege.**

Em todos os ensaios houve o crescimento de colônias nas diferentes concentrações de FC. Verifica-se nos resultados apresentados, que para concentrações mais elevadas de FC o crescimento de colônias não foi significativo nos ensaios 5 e 6, porém no ensaio 4 houve o crescimento de colônias nestas concentrações. A concentração referente a 1% foi a que demonstrou resultados mais significativos e similares em todos os ensaios realizados. Pode-se também perceber que o crescimento microbiano que ocorreu em todos os ensaios comprova a existência de microrganismos no meio contaminado.

Pode-se verificar que em todos os ensaios realizados houve o crescimento microbiano de colônias de diferentes tamanhos, coloração, formatos, consistência e aspecto, confirmando o crescimento que foi observado nos tubos. Verificou-se também que as placas que tiveram maior variedade de colônias crescidas foram aquelas com menor concentração de FC, confirmando que para menores concentrações de FC o crescimento de microrganismos é facilitado.

## 5.2. Avaliação quantitativa da degradação de diesel - parâmetro TPH

A seguir são apresentados os resultados do parâmetro de TPH para os ensaios E2, E3, E4, E5 e E6, respectivamente Tabelas 9,10, 11 e 12.

**Tabela 9 – Remoção total de TPH ao final de 40 dias (E2 e E3)**

<b>Tubo</b>	<b>TPH µg/L (t=0dias)</b>	<b>TPH µg/L (t=20dias)</b>	<b>TPH µg/L (t=40dias)</b>	<b>Remoção total de TPH (%)</b>
B1	16.822	11.563	85.000	SR
B2	424	431	756	SR
B3	ENR	ENR	ENR	ENR
1	11.898	10.131	3.138	73,6
2	ENR	ENR	ENR	ENR
3	ENR	ENR	ENR	ENR
4	75.152	20.362	58.613	22,0
5	93.171	12.475	34.909	62,5

Legenda: n.d – não detectado no ensaio; SR – sem remoção; ENR – Ensaio não realizado

**Tabela 10 – Remoção total de TPH ao final de 40 dias Ensaio E4**

<b>Tubo</b>	<b>TPH µg/L (t=0dias)</b>	<b>TPH µg/L (t=20dias)</b>	<b>TPH µg/L (t=40dias)</b>	<b>Remoção total de TPH (%)</b>
B1	AP	AP	AP	SR
B2	475	1052	n.d	SR
B3	n.d	n.d	n.d	SR
1	6.832	5.688	846	87,6
2	ENR	17.056	10.062	41,0
3	2.054.651	n.d	7.612	99,6
4	841.058	82.371	67.443	92,0
5	3.363.943	338.285	137.987	95,9
6	6.330.719	39.394	463.077	92,7
7	5.858.510	73.799	487.896	91,7

Legenda: n.d – não detectado no ensaio; SR – sem remoção; AP – amostra perdida;

**Tabela 11 – Remoção total de TPH ao final de 40 dias Ensaio E5**

<b>Tubo</b>	<b>TPH µg/L (t=0dias)</b>	<b>TPH µg/L (t=20dias)</b>	<b>TPH µg/L (t=40dias)</b>	<b>Remoção total de TPH (%)</b>
B1	n.d	188.613	45.970	24,4
B2	n.d	n.d	n.d	n.d
B3	n.d	n.d	n.d	n.d
1	54.965	2.108	577*	98,9
2	64.286	3.009	19.463	69,7
3	72.692	29.381	11.571	84,1
4	271.451	17.520	93.128	65,7
5	337.077	6.866	9.645.351	SR
6	642.211	2.388.605	57.342	91,0
7	560.796	1.840.817	2.469.983	SR

Legenda: n.d – não detectado no ensaio; SR – sem remoção; \*valor abaixo do valor de intervenção

Verificou-se que apenas no ensaio 5, na concentração 1% de FC, houve remoção de TPH que atingiu os padrões de intervenção aceitáveis, ficando menor que 600 µg/L conforme Lista Holandesa (CETESB, 1999).

**Tabela 12 – Remoção total de TPH ao final de 40 dias Ensaio E6**

<b>Tubo</b>	<b>TPH µg/L (t=0dias)</b>	<b>TPH µg/L (t=20dias)</b>	<b>TPH µg/L (t=40dias)</b>	<b>Remoção total de TPH (%)</b>
B1	96.121	94.083	64.028	33,4
B2	n.d	n.d	n.d	SR
B3	n.d	n.d	n.d	SR
1	65.362	11.654	9.855	84,9
2	34.961	31.827	18.415	47,3
3	191.198	7.926	38.323	80,0
4	194.547	16.296	21.249	89,1
5	184.741	629.422	191.258	SR
6	181117	185444	2.473.988	SR
7	198.184	319.181	2.641.946	SR

Legenda: n.d – não detectado no ensaio; SR – sem remoção

Nas avaliações visuais e de crescimento (placas e tubos) anteriores para os Ensaios E2, E3 e E5 já se havia identificado os maiores crescimentos microbianos nas concentrações de 1% e 2%. Esses resultados foram confirmados pelo consumo de diesel medido indiretamente pelo decréscimo de TPH.

No Ensaio 4 os resultados em todas as concentrações ensaiadas foram positivos, com decréscimos de TPH em faixas altas (Tabela10), não havendo uma correlação direta com o crescimento microbiano verificado anteriormente para esse ensaio.

No Ensaio 6, principalmente para as altas concentrações, as determinações de TPH não foram conclusivas. Na pesquisa realizada por Ururahy (1998) com altas concentrações as populações microbianas sofreram inibição pelo efeito tóxico do poluente. O aumento da concentração da gasolina diminuiu o crescimento dos microrganismos devido ao seu efeito tóxico, representado principalmente pelos compostos aromáticos BTEX. Da mesma forma no presente estudo, as altas concentrações de FC podem ter inibido o crescimento microbiano, dificultando a degradação e conseqüentemente a avaliação do parâmetro de TPH.

Neste estudo foi possível confirmar, por meio dos ensaios de TPH e por observações visuais dos tubos e placas, que na amostra analisada existem culturas mistas que possuem a capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo (diesel). Esse resultado semelhante ao do estudo realizado por Luz et al. (2011), que investigaram o processo de biodegradação por consórcio microbiano ao longo de 21 dias, sendo que os resultados

mostraram que houve uma maior diminuição na concentração de compostos na presença deste consórcio, chegando a 35% ao final do período.

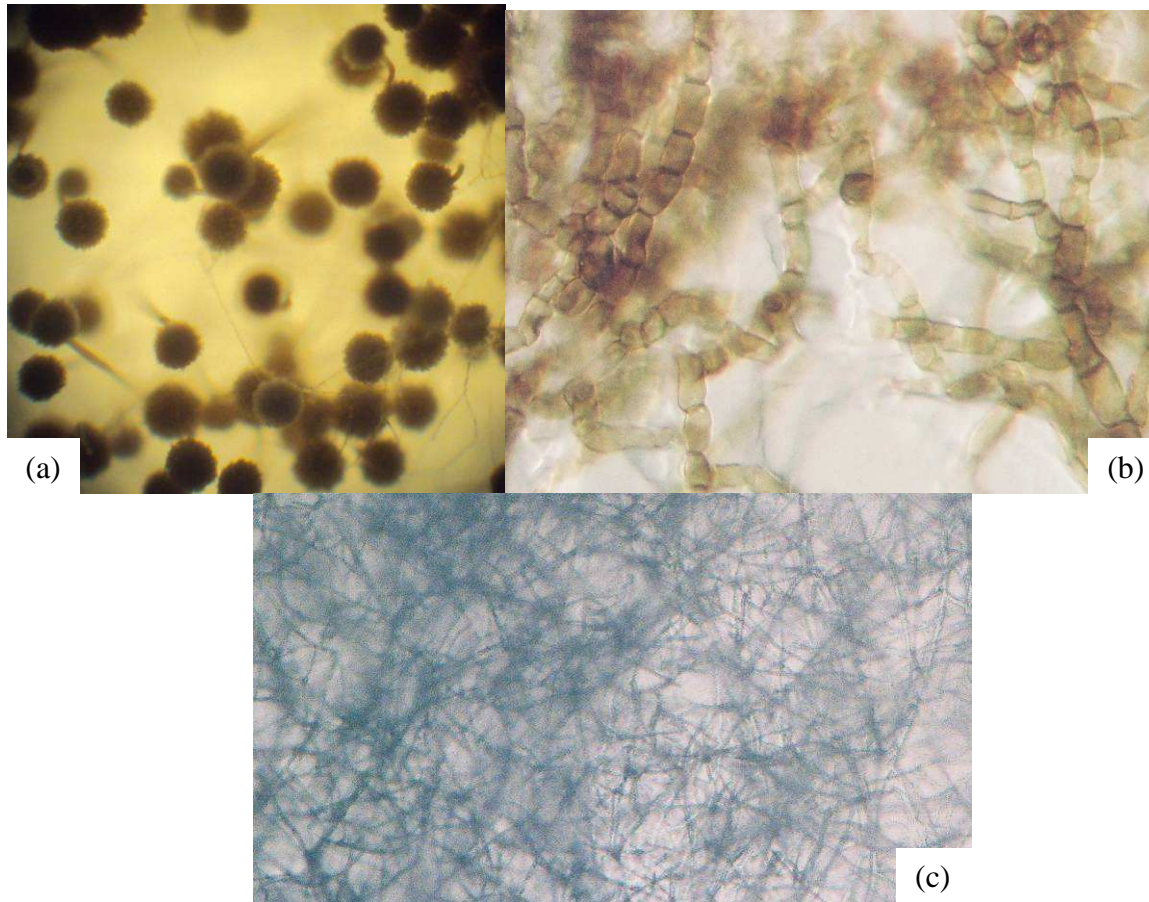
Nota-se que o tubo correspondente a 1% FC apresentou bons resultados de degradação, ficando sempre acima dos 70% de remoção final de TPH, com média de 86%, bem como sempre apresentou alterações mais significativas de cor, turvação e consumo de FC, assim como crescimento de diversos morfotipos. Isto indica que baixas concentrações de FC oferecem provavelmente condições adequadas para o crescimento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Nessa linha de raciocínio, Bento et al. (2005) também testaram a degradação de TPH pelo método EPA 8015 modificado, na comparação entre bioaumento, bioestimulação e atenuação natural com diesel como fonte de carbono, e chegaram a média de 70% de redução de TPH. Verificaram ainda que para biorremediação os melhores resultados foram quando o inóculo de microrganismos foram pré-selecionados a partir do seu próprio ambiente.

### 5.3. Meio Seletivo

Para verificação do crescimento específico de um morfotipo, foi realizado o teste em meio seletivo para crescimento de fungos filamentosos e leveduras utilizando-se o meio de cultivo sólido Sabouraud. Os resultados mostraram que houve o crescimento de fungos filamentosos no meio testado em 03 dias, conforme Tabela 13 e Figura 15.

**Tabela 13 – Resultados meio Sabouraud**

<b>Coloração</b>	<b>Forma e borda da colônia testada</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Consistência</b>	<b>Indicador redox Tempo (h)</b>
Preta	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa	48
branca	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa	48
branca	circular	opaca	bastante filamentosa	48



**Figura 15 – (a) Micélio (conjunto de hifas) da colônia preta filamentosa (aumento 5X), (b) hifas septadas da colônia preta filamentosa (aumento 40X), (c) hifas da colônia branca filamentosa (aumento 10X)**

Verifica-se que nos resultados obtidos o crescimento de fungos no meio de cultura seletivo foi positivo, indicando que na amostra testada existe a presença deste morfotipo. Também pode-se confirmar através da visualização microscópica a presença de micélios e hifas septadas, característicos de fungos filamentosos.

Nos estudos realizados por Lemos e Araújo (2002), utilizando meio específico Sabouraud e BDA, foram isolados 4 gêneros de fungos, subdivididos nos seguintes espécies: *Aspergillusterreus*, *Aspergillusfumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillusniger*, *Penicilliumcorylophilum*, *Parcilomycesvariotti*, *Paecilomycesniveuse* *Fusarium sp.* Neste estudo também foram isolados alguns fungos, porém o gênero e espécie não foi possível identificar.



#### 5.4. Detecção de ramnolipídios




A detecção de ramnolipídios foi verificada na amostra em questão através do crescimento em meio azul de metileno, sendo positiva a produção de ramnolipídios caso haja o surgimento de halos ao redor das colônias crescidas. Para a amostra testada não foi possível visualizar halos ao redor das colônias, o que pode significar que não houve a produção de ramnolipídios. Neste caso, a possibilidade de dentre os microrganismos existir o gênero *Pseudomonas* é remoto, tendo em vista que em quase todos os casos este tipo de microrganismo produz biossurfactantes do tipo ramnolipídio. Esse método foi aplicado com sucesso por Teixeira (2007) que isolou cinco bactérias identificadas como *Pseudomonas Aeruginosa*.

Também Gouveia et al. (2003) estudando bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídico, testaram 20 linhagens Gram negativas na presença do meio azul de metileno e isolaram 12 morfotipos produtores de ramonolipídeos, identificados como as espécies *Pseudomonas Aeruginosa* e *Pseudomonas*.



#### 5.5 Isolamento

Com aplicação da técnica de esgotamento por estrias e utilização de diferentes concentrações de FC, conforme já testadas nos ensaios anteriores, foram isolados 22 morfotipos de diferentes grupos microbianos (bactérias e fungos). No Quadro 16 é possível visualizar as características destes grupos microbianos. Para o isolamento não foi utilizada as concentrações de FC referente a 30% e 50% devido aos resultados obtidos nos ensaios 5 e 6 não serem significativos para estas concentrações.

Quadro 16 – Resultados de caracterização dos isolados obtidos

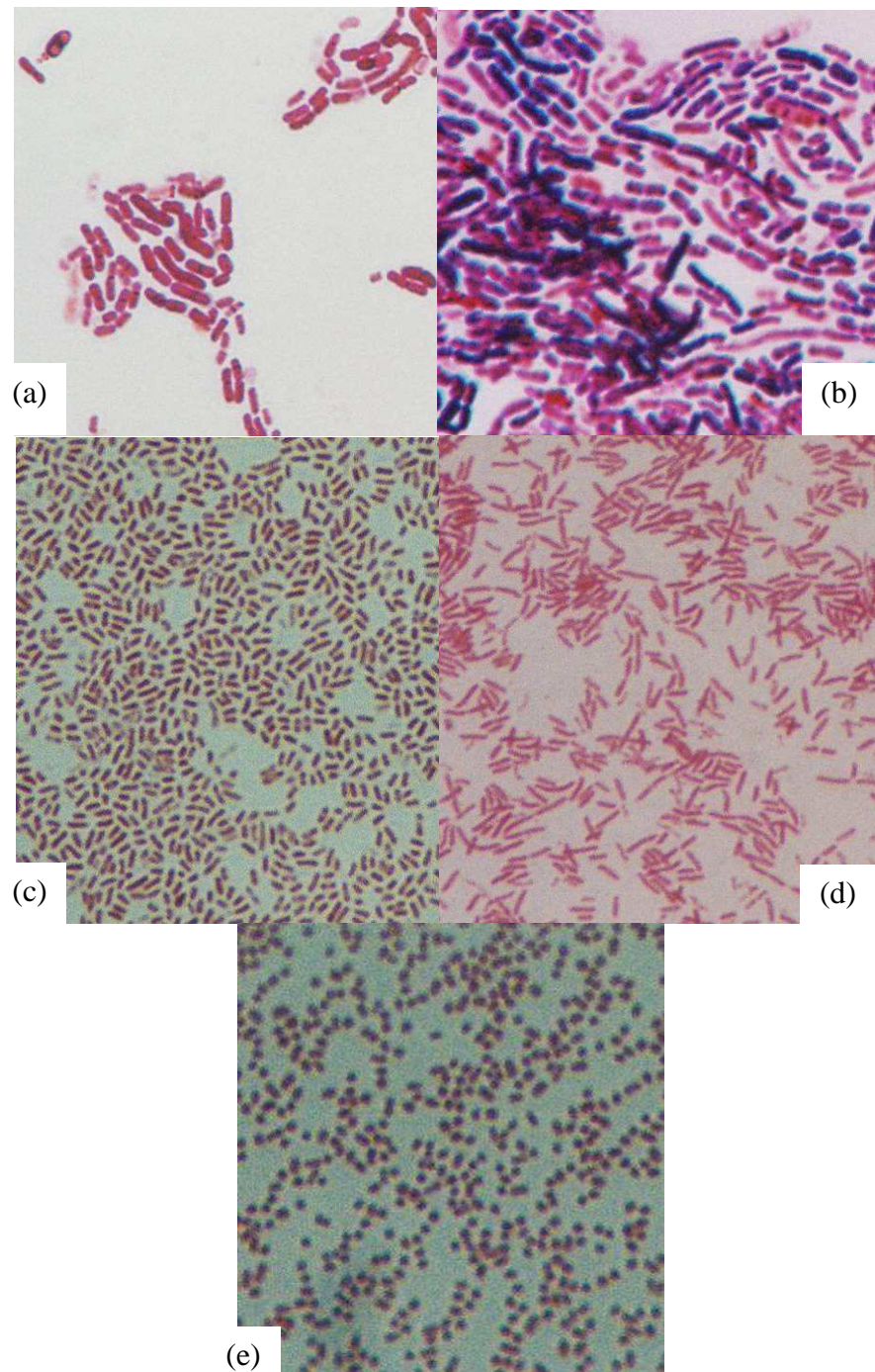
Placa	% FC	Foto	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência	Indicador redox Tempo (h)
1	1		bastão	-	Bege	circular e lobada	opaca	quebradiça	48
			bastão	-	bege marrom	irregular e irregular	opaca	quebradiça	48
			bastão	-	amarela	Circular e lisa	opaca	viscosa	48
			bastão	-	alaranjada	Arredondada e irregular	opaca	viscosa	48
			filamentosa	X	Preta	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa	48
			filamentosa	X	branca	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa	48
			filamentosa	X	branca	circular	opaca	bastante filamentosa	48
2	2		bastão	-	Bege	irregular e lisa	brilhante	viscosa	48
			bastão	-	Bege	irregular e lisa	opaca	quebradiça	48
			bastão	-	bege escuro	circular e lisa	brilhante	viscosa	48
3	3		bastão	-	Bege	circular e lisa	brilhante	viscosa	48
			bastão	-	bege escuro	circular e lisa	brilhante	viscosa	48
			bastão	+	Bege	circular e lisa	brilhante	viscosa	48

Continuação Quadro 16

Placa	% FC	Foto	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência	Indicador redox Tempo (h)
4	5		cocos	-	Bege amarelada	circular/irregular e lisa	brilhante	viscosa	60
			bastão	-	Bege	circular e lisa	brilhante	viscosa	60
			bastão	-	bege opaca	irregular e lobada	opaca	quebradiça	60
			bastão	-	bege com verde no meio	circular e irregular	opaca	quebradiça	60
5	10		cocos	-	Bege amarelada	circular e lisa	brilhante	viscosa	60
			bastão	-	bege clara	irregular e lisa	brilhante	viscosa	48
			bastão	-	Bege	circular e lisa	brilhante	viscosa	60
			bastão	-	Bege	irregular e lobada	opaca	quebradiça	48
			bastão	-	amarela	circular e lobada	opaca	quebradiça	48





Legenda: X – não identificado; FC – fonte de carbono

Os isolados obtidos neste estudo foram agrupados em 12 subgrupos com base nas suas características morfológicas e técnica diferencial de Gram, conforme o Quadro 17. Destes 81,8% são bactérias Gram negativas, 4,5% são bactérias Gram positivas e 13,7% são fungos. Alguns destes morfotipos foram ilustrados na Figura 16.





**Figura 16 –Coloração de Gram para diferentes microrganismos isolados do Quadro 16 (aumento 1000X). (a) Bactérias Gram negativa placa 5 colônia amarela , (b) Bactérias Gram positiva colônia bege placa 3, (c) Bactérias Gram negativa placa 1 colônia bege marrom, (d) Bactérias Gram negativa placa 5 colônia bege clara, (e) Bactérias Gram negativa placas 4 e 5 bege amarelado.**

Quadro 17 – Agrupamento realizado nas colônias em função das características morfológicas



Grupo	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência	FOTO	Tentativa de Identificação
1	bastão	-	Bege	circular e lobada	opaca	quebradiça		
2	bastão	-	amarela	Circular e lisa	opaca	viscosa		
3	bastão	-	alaranjada	Arredondada e irregular	opaca	viscosa		
4	filamentosa	X	Preta	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa		


Continuação Quadro 17

Grupo	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência	FOTO	Tentativa de Identificação
5	filamentosa	X	branca	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa		Ururahy (1998) isolou de resíduo oleoso, 2 fungos filamentosos identificados como <i>Cândida sp.</i> e <i>Monascus sp.</i> , ambos também cresceram em meio Sabouraud. A espécie <i>Cândida sp.</i> apresentou as seguintes características morfológicas: circular, filamentosa, irregular, cor branca/creme, já a espécie <i>Monascus sp.</i> foi circular, filamentosa (algodonosa), irregular, branca/cinza.
6	filamentosa	X	branca	circular	opaca	bastante filamentosa		Ururahy (1998) isolou de resíduo oleoso, 2 fungos filamentosos identificados como <i>Cândida sp.</i> e <i>Monascus sp.</i> , ambos também cresceram em meio Sabouraud. A espécie <i>Cândida sp.</i> apresentou as seguintes características morfológicas: circular, filamentosa, irregular, cor branca/creme, já a espécie <i>Monascus sp.</i> foi circular, filamentosa (algodonosa), irregular, branca/cinza.



7	Bastão	-	bege escuro	circular e lisa	brilhante	Viscosa		
---	--------	---	-------------	-----------------	-----------	---------	---	--

Continuação Quadro 17

Grupo	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência	FOTO	Tentativa de Identificação
8	Bastão	+	Bege	circular e lisa	brilhante	Viscosa		Souza et al. (2010) o isolou de microorganismos, amostra contaminada por gasolina comercial, 10 morfotipos dos diferentes grupos microbianos: bactérias (4) e leveduras (6), estes morfotipos foram caracterizados microscopicamente e macroscopicamente, como o M1 que apresentou cor marrom clara, forma da célula bacilo e bactéria Gram positiva.
9	Cocos	-	Bege amarelada	circular/irregular e lisa	brilhante	viscosa		

10	Bastão	-	bege com verde no meio	circular e irregular	opaca	quebradiça		
----	--------	---	------------------------	----------------------	-------	------------	---	--

Continuação Quadro 17

Grupo	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência	FOTO	Tentativa de Identificação
11	bastão	-	bege clara	irregular e lisa	brilhante	viscosa		
12	bastão	-	Amarela	circular e lobada	opaca	quebradiça		

Legenda: X – não identificado



Com esses resultados, comparou-se essa pesquisa com outros trabalhos, a seguir referidos.

Urrahy (1998) isolou em sua pesquisa, com resíduo oleoso, 2 fungos filamentosos identificados como *Cândida sp.* e *Monascus sp.*, ambos também cresceram em meio Sabouraud. A espécie *Cândida sp.* apresentou as seguintes características morfológicas: circular, filamentosa, irregular, cor branca/creme. Já a espécie *Monascus sp.* foi circular, filamentosa (algodonosa), irregular, branca/cinza. Algumas das espécies microbianas encontradas neste estudo muito se assemelham as características descritas por Urrahy (1998), podendo pertencer as espécies dos grupos 5 e 6 do Quadro 17.

Andrade (2008) estudou e isolou 37 microrganismos, destes houve uma dominância das bactérias Gram negativas que representaram 86% dos isolados, apenas uma bactéria Gram positiva foi verificada. Neste estudo também as bactérias foram predominantes.

Souza et al. (2004) isolaram 86 microrganismos com potencialidade de degradar óleo diesel, gasolina, *bunker* e querosene, sendo 26% bactérias Gram negativas, 20% bactérias Gram positiva, 27% fungos filamentosos e 27% leveduras, utilizando BH sólido como meio de cultivo.

Também Lemos e Araújo (2002) isolaram de solo contaminado de Guararema, 75 colônias, destas 60 apresentaram capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo, que foram identificadas em 4 gêneros fúngicos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*).

Nos estudos realizados por Souza et al. (2010) o isolamento de microrganismos foi de amostra contaminada por gasolina comercial e foram obtidos 10 morfotipos dos diferentes grupos microbianos: bactérias (4) e leveduras (6), estes morfotipos foram caracterizados microscopicamente e macroscopicamente, como o M1 que apresentou cor marrom clara, forma da célula bacilo e bactéria Gram positiva, características semelhantes as que foram apresentadas no Quadro 17, grupo 8.

Teixeira (2007) isolou de solo contaminado, utilizando gasolina como única fonte de carbono, 37 isolados bacterianos, posteriormente avaliados quanto a morfologia e aspectos visuais das colônias (aspecto, tamanho, coloração, forma e borda da colônia) e das células (teste de coloração de Gram), os quais agrupando-se obteve-se 10 isolados, 7 Gram negativos e forma da célula bastonete, 3 Gram positivos e forma da célula cocos, dentre outros, foram identificadas espécies tipo *Pseudomonas Aeruginosa* e *Pseudomonas Putida*. Da mesma

forma, como apresentado no Quadro 16, foi possível isolar da água contaminada com hidrocarbonetos, utilizando diesel como FC, 22 diferentes morfotipos.

Pedroti (2007) isolou 19 bactérias de solo contaminado com hidrocarbonetos, verificou através de caracterização morfológica que a maioria das cepas são Gram negativas, sendo somente uma cepa é Gram positiva, bem como a maioria das células são cocos, sendo apenas uma identificada como bacilo. A mesma autora ainda concluiu que os testes morfológicos e bioquímicos realizados nas cepas foram insuficientes para a classificação das bactérias isoladas. De forma semelhante, os resultados obtidos neste estudo, não se demonstraram suficientes para a identificação dos gêneros dos morfotipos isolados da amostra contaminada.

Vaz (2010) isolou de tanques de armazenamento de combustível do setor de transporte, 12 bactérias e as caracterizou morfológicamente obtendo 8 bactérias Gram positivas com forma da célula cocos e bacilo e 4 bactérias Gram negativas com forma da célula bastonete. No mesmo estudo algumas das bactérias foram identificadas como: *Bacillusvallismortis*, *Lysinibacillusphaericus*, *Bacilluslicheniformis*, *Bacillusthuringiensis*. Para esta pesquisa as caracterizações realizadas não foram suficientes para a identificação dos gêneros dos morfotipos isolados.

Souza et al. (2004) testou amostras poluídas por petroderivados e dos 86 morfotipos isolados, 23 foram fungos filamentosos, que apresentaram potencialidade de degradar os derivados do petróleo. No presente trabalho, resultados semelhantes foram verificados, conforme Quadro 16.

## **5.6. Teste de degradabilidade**

A seguir são apresentados os resultados do Teste de degradabilidade para os ensaios E4, E5, E6, respectivamente Tabelas 14, 15 e 16, e para os isolados obtidos.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 14, para o E4, pode-se verificar que todos os microrganismos identificados possuem a capacidade de degradação de hidrocarbonetos, pois todos tiveram o poder de descolorir o meio na presença do indicador redox. Este teste possui resultado positivo na verificação da capacidade de degradação por meio de descoloração do meio que inicialmente é azul.

Tabela 14 – Resultados indicador redox E4

Placa	Coloração da colônia testada	Tempo para descoloração do tubo (horas)	Placa	Coloração da colônia testada	Tempo para descoloração do tubo (horas)
B1	branca	48	5	preta	48
	Bege	48	5	branca	48
B2	preta	48	5	Amarela	48
	Amarela	48	5	Bege	48
B2	branca	48	6	branca	48
B2	Bege	48	6	Amarela	48
1	preta	48	6	Bege	48
1	branca	48	6	Bege	60
1	Amarela	48	6	Alaranjada	48
1	Bege	48	7	preta	48
2	branca	48	7	branca	48
2	Alaranjada	48	7	Bege	48
2	branca esverdeada	48			
2	Bege	48			
3	branca	48			
3	Bege (preta no meio)	48			
3	Amarela	48			
4	branca	48			
4	Bege avermelhada	60			
4	Bege	60			

No ensaio 5 as colônias crescidas testadas com indicador redox demonstraram capacidade de degradação através do desaparecimento da coloração azul inicial em até 60 horas de observação, alguns morfotipos descoloriram o meio em 48h, conforme visualizado na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados indicador redox E5

Placa	Coloração da colônia testada	Tempo para descoloração dos tubos (horas)
B1	branca	48
B2	branca	48
B2	bege	48
B2	bege	48
B2	rosada	48
1	bege	48
1	alaranjada	48
1	bege	48
1	bege escuro	48
2	laranja	48
2	marrom	48
2	branca	48
3	laranja	48
3	Bege alaranjada com o meio verde	60
3	Branca	48
3	Bege	48
4	Bege alaranjado com o meio verde	60
4	Bege alaranjado	60
5	Bege alaranjado com o meio verde	60
5	Bege alaranjado	60
6	Bege	60

O teste de degradabilidade realizado para o ensaio 6 apresentou resultados conforme mostra a Tabela 16 e Figura 17.

Os morfotipos identificados neste ensaio foram testados com indicador redox e 100% destes demonstraram potencial para degradar diesel, através do desaparecimento completo da coloração azul inicial em até 60 horas de observação, alguns morfotipos descoloriram completamente o meio em 48 horas de incubação.

Tabela 16 – Resultados indicador redox E6

Placa	Coloração da colônia testada	Tempo para descoloração dos tubos (horas)
1	Branca	48
1	Bege	48
1	Alaranjada	48
1	Amarelada	48
2	Branco/marrom (com meio preto)	60
2	bege marrom	48
3	Amarela	48
3	Branca	48
3	Bege	48
4	bege (alaranjado ao redor)	60
5	Branca	48

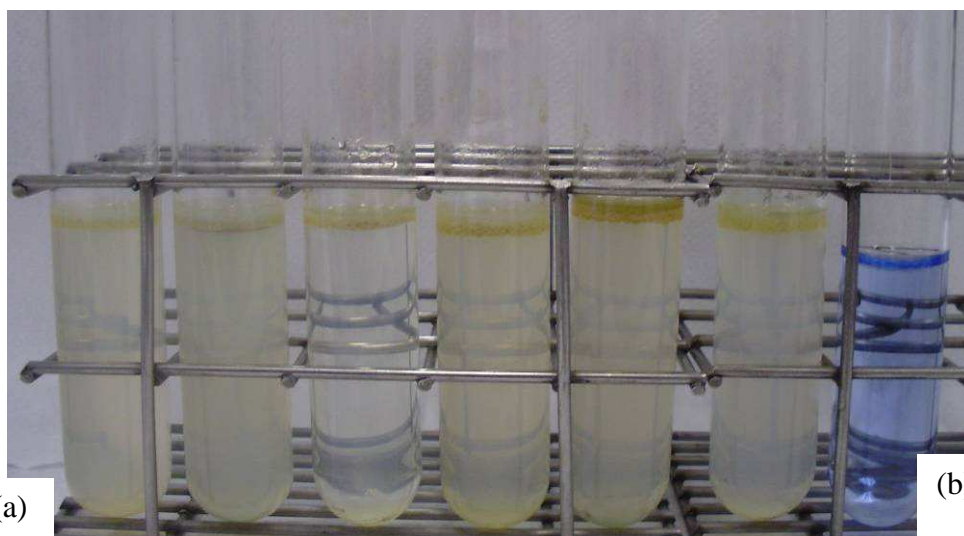


Figura 17 – Tubos no ensaio de degradabilidade. (a) Tubos completamente descoloridos na presença do indicador redox após decorridas 60 horas, (b) branco (azulado).

No isolamento também foi realizado o teste de degradabilidade. Todos os grupos microbianos testados apresentaram resultados positivos (Figura 18), estes resultados foram obtidos a partir da observação visual da completa descoloração do meio após 60h de incubação, alguns destes microrganismos, conforme mostra o Quadro 16, descoloriram o meio por completo após 48h. Isto indica que todas as espécies microbianas testadas

demonstraram resultado positivo no teste de degradabilidade, ou seja, potencialmente possuem a capacidade de degradar diesel.

Para comparar os resultados obtidos, em termos do uso do indicador redox, cita-se o trabalho de Pirrôlo (2006) que testou a linhagem de *Pseudomonasaeruginosa* LBI, utilizando o método indicador redox em meio de cultivo BH, que apresentou resultados positivos, obtidos a partir de observação visual da descoloração do meio, para óleo diesel e petróleo após 23h, querosene após 68h e descoloração parcial para borra oleosa após 72h.

Outro trabalho que usou o indicador redox foi o de Luz et al. (2011) que investigaram a presença de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos utilizando o 2,6-diclofenol indofenol como indicador e diesel como fonte de carbono, o consórcio microbiano apresentou resultado positivo, obtido a partir da observação visual da completa descoloração do meio após 96h.



**Figura 18** – Tubos antes (azulados) e depois (descoloridos) de decorrido o período de incubação

## 6 CONCLUSÕES

Os objetivos “Caracterizar os microrganismos presentes em local com contaminação por hidrocarbonetos, neste estudo um posto de abastecimento de combustível” e “Isolar microrganismos presentes no local com contaminação por hidrocarbonetos” foram atendidos na medida em que foi possível isolar e caracterizar microrganismos com potencial de degradação de hidrocarbonetos a partir de água subterrânea contaminada com hidrocarbonetos oriunda de posto de abastecimento de combustível, nas condições de estudo. Também quando foram isolados da amostra do meio contaminado com hidrocarbonetos 22 diferentes morfotipos, entre essas bactérias e fungos. Esses morfotipos isolados foram caracterizados como 81,8% bactérias Gram negativas, 4,5% bactérias Gram positivas e 13,7% fungos.

O objetivo de “Testar diferentes concentrações de fonte de carbono para crescimento microbiano” foi cumprido quando das diferentes concentrações de diesel testadas foi nas menores concentrações (1%) que verificou-se maior crescimento microbiano e melhores eficiências de degradação de hidrocarbonetos.

Por fim, o objetivo de “Avaliar a eficiência de degradação de hidrocarbonetos, neste estudo o diesel, por culturas mistas autóctones da área contaminada” foi respondido na medida em que todos os microrganismos isolados neste estudo apresentaram potencialidade de degradar hidrocarbonetos derivado do petróleo, neste caso o diesel. E que o crescimento microbiano verificado resultou em maior eficiência no decréscimo do parâmetro de TPH.

### 6.1 Sugestões para futuros trabalhos

- Identificar os isolados obtidos através de técnicas moleculares;
- Avaliar a produção de biossurfactantes pelos microrganismos durante a degradação dos hidrocarbonetos.
- Utilização de meios seletivos para bactérias, meio sólido TrypticSoy Agar (TSA).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDANUR, A. **Remediação de Solo e Água Subterrânea Contaminados Por Hidrocarbonetos de Petróleo: Estudo de caso na refinaria Duque de Caxias/RJ.** 2005. 156p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Pós-Graduação em Ciência do Solo. Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- ANDRADE, D. M. **Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina.** 2008. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.
- ARAÚJO, F. S. M.; LEMOS, J. L. S. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. **X Jornada de Iniciação Científica do CETEM**, Rio de Janeiro, Julho de 2002.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals And Applications.** 4ed. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. Califórnia, 1998.
- AZAMBUJA, E.; CANCELIER, D.B.; NANNI, A.S. Contaminação dos Solos por LNAPL: discussão sobre diagnóstico e remediação. **Anais do Simpósio de Prática de Engenharia Geotécnica da Região Sul**, 2, 2000, Porto Alegre. 2000. p.185 – 202.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. **Potential commercial applications of microbial surfactants.** ApplMicrobiolBiotechnol, 53, 495-508, 2000.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. **Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil.** International Biodeterioration& Biodegradation, Ed. 47, p.107–112, 2001.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. **Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural ttenuation, biostimulation and bioaugmentation.** Bioresource Technology, Ed. 96, p.1049–1055, 2005.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. **Biology of Microorganisms.** Prentice Hall, EnglewoodClifs, New Jersey 9ed., 2000.
- CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental). Lista Holandesa de valores 6530 (Projeto Cestesb), SP, 1999.
- CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental). **Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo- Série Relatórios Ambientais.** São Paulo. 2001.
- CORSEUIL, H. X. **Enhanced degradation of monoaromatic hydrocarbons in sandy aquifer materials by inoculation using biologically active carbon reactors.** Ann. Arbor; University Microfilms International, 1992. Dissertação (Mestrado). 1992
- CORSEUIL, H. X., WEBER Jr., W. J. Potential biomass limitations on rates of degradation of monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Water Research, Oxford**, v. 28, n. 6, p. 1415-1423, 1994.



CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: O problema é grave? **Engenharia Sanitária**, v. 2, p.50-54, 1997.

COSTA, A.E. **Adsorção e purificação de corantes naturais com sílica amorfa**. 2005.Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2005.

CMMAD, Comissão mundial sobre meio ambiente e desenvolvimento. **Relatório Brundtland**, 1987. Disponível em <<http://www.un.org/>>. Acesso em 12 dez. 2010.

DESAI, J.D.; BANAT I. M. **Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential**. Microbiology and molecular biology reviews, p. 47–64, 1997.

FETTER, C. W. **Contaminant Hydrogeology**. 2ed, New York: Macmillan, 1993.

FINOTTI, A. R.; CAICEDO, N. O. L.; RODRIGUEZ, M. T. R. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados do petróleo: toxicidade e a legislação Brasileira. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.6, n. 2, Abr/Jun 2001, p29-46.

FOLETTI, L. F.; HOFFMANN, R.; HOFFMANN, R.S.; PORTUGAL JUNIOR, U.L.; JAHN, S.L. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz.**Química Nova**, v. 28, n. 6, 2005, p. 1055-1060.

FRANCISCHETTI, J. **Remoção de Metais Pesados em Efluentes Líquidos Através da Filtração Adsorptiva**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2004.

GASKIN, S.; BENTHAM, R. Comparison of enrichment methods for the isolation of purene-degrading bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 56: 80-85, 2005.

GEORGIU, G. LIN, SC. SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, 60-65, 1992.

GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control.**Revista Microbiologia**, v.30, p.1-10, 1999.

GOMES, R. V.; MARTINS, S. C. S.; MELO, V. M. M. Produção de biossurfactante por *Staphylococcus aureus* isolado de uma amostra de petróleo pesado. **IN: IX ENAMA – Encontro Nacional de microbiologia ambiental**, Curitiba, 2004.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, L. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes (Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo)**.Revista biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Ed. 30, p.39-45, 2003.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Outubro 2002**. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br> > Acesso em 12 nov. 2010.

IQSC – INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS. 2006. Disponível em: <[www.iqsc.usp.br](http://www.iqsc.usp.br)> Acesso em 12 nov. 2010.

JACQUES, R. J. S., BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura**, UFSM, 29 (1): 7 - 24, 2007.

KIELING, A. G. **Influência da segregação no desempenho de cinzas de casca de arroz como pozolanas e material adsorvente**. 2009.131p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade do vale do rio dos sinos, São Leopoldo, RS. 2009.

KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y.; CHUNG, S-Y.; KUBO, M.; **Biodegradation**, 2008, 19, 749.

LUZ, C. C.; SANTOS, E. A.; SANTOS, M. O. S.; MUSSY, M. Y.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W. R. **Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia**. Química Nova, Vol. 35, Nº 5, p. 775-779, 2011.

MARIANO, A. P. **avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162p. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2006

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino do petróleo**. 2001. 289p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético) – Programa de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2001.

MAZZUCO, L. M. **Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel**. 2004. 83p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2004.

MORITA, D. M. **Tecnologias de Remediação de Áreas Contaminadas**. 2006. Aula de Remediação de áreas contaminadas. Disponível em <[www.poli.usp.br/](http://www.poli.usp.br/)> Acesso em 11 nov. 2010.

RAMOS, S. M.; NUMES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina E10 com o uso de sulfato. 2010. **Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Maceió, Alagoas, AL. 2010

RUSSELL, J. B. **Química Geral**. Tradução: M. Guekezian, 2.ed., v.I, São Paulo: Makron Books, 1994.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. 2007. 120p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2007.

PELCZAR, M J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, v1.,1997.

PETROBRÁS. Disponível em <<http://www2.petrobras.com.br>> Acesso em: 23 nov. 2011.

PIRRÔLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006. 73p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área: Microbiologia Aplicada) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2006.

PROJECONSULT, Projeconsult Engenharia Ltda. **Relatório de Avaliação Ambiental**. 17p. 2009.

PRUDÊNCIO J. R.; SANTOS, S.; DAFICO, D. A. Cinza da casca de arroz. **Coletânea Habitare** – v.4, 2003 - Utilização de Resíduos na Construção Habitacional. c.8. p.240-261. 2003.

SANTIAGO, B.H.S.; FRANÇA, G.H.C.; FERNADES, R.; SELVAM, P.V.P. Estudo de viabilidade tecno-economica preliminar para produção de carvão ativado no Brasil a partir dos resíduos do coco: estudo comparativo de cenários de produção. **Revista Analytica**, n.17, 2005, p. 52-55.

SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. R. S; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A. A.; SOUSA, M. F. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo**. Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2005.

SOUZA, D. B.; BRITO, G. C. B.; VASCONCELOS, F. C. W.; BRAGA, L.C.; **Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial**. Revista de estudos ambientais (online), v.12, n. 2, p. 38-46, 2010.

TEIXEIRA, A. S. **Isolamento e Caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. 2007. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R; CHRISTOVA N. E. **Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strain**. Z. Naturforsch. 57c, p.356-360, 2002.

URURAHY, A. F. P. **Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes da Refinaria de Petróleo**. 1998. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1998.

VAZ, F.S. **Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de Armazenamento**. 2010. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Área: Microbiologia) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2010.

WATKINSON, R.J; MORGAN, P. **Physiology of aliphatic Hydrocarbon-degrading microorganisms**, 1990.