



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOQUÍMICA:
PETRÓLEO E MEIO AMBIENTE-POSPETRO



EDUARDO GOMES VIEIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA GLICERINA BRUTA NA ESTIMULAÇÃO
DE BACTÉRIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS PARA
REMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR
HIDROCARBONETOS**

**Salvador-Bahia
2011**

EDUARDO GOMES VIEIRA DE MELO

AVALIAÇÃO DA GLICERINA BRUTA NA ESTIMULAÇÃO DE
BACTÉRIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS PARA
REMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR
HIDROCARBONETOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio ambiente, na Universidade Federal da Bahia, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente.

Orientador: Prof^o. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Orientador (a) Prof^o. Dra Cristina M. Quintella.

Orientador: Prof^o. Dr. Antonio Fernando de Souza Queiroz

Salvador-Bahia
2011

Melo. Eduardo Gomes Vieira,

Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos. 70f.: il. _ 2011.

Orientador: Prof. Paulo Fernando de Almeida

Orientadora Prof(a). Dr Cristina M. Quintella

Orientador Profº. Dr. Antonio Fernando de Souza Queiroz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, 2011.

EDUARDO GOMES VIEIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA GLICERINA BRUTA NA ESTIMULAÇÃO
DE BACTÉRIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS PARA
REMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR
HIDROCARBONETOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente – POSPETRO, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof^o. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Orientador (a) Prof^o. Dra Cristina M. Quintella.

Orientador: Prof^o. Dr. Antonio F. de Souza Queiroz

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^o Dr. Prof^o Dr. Paulo Fernando de Almeida

Pós-doutorado em Microbiologia (IFAS) e Biotecnologia (ICBR) da Universidade da Flórida, Coordenador do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos da UFBA, Professor Titular e Coordenador de disciplinas de Graduação (Microbiologia) Mestrado e Doutorado

Prof^o Dra. Cristina M. A. L. T. M. H. Quintella

Dra em Ciências Moleculares pela University of Sussex UK, coordenadora do LabLaser/IQ/UFBA, coordenadora do NIT-UFBA e coordenadora da Rede NIT-NE, professora associada III da Universidade Federal da Bahia.

Prof^o Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Atualmente é Professor Adjunto da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Prof^o. Dr. Juan Carlos Rossi Alva

Doutorado em Ciências com ênfase em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Atualmente é Professor Adjunto IV de Química e Bioquímica da Universidade Católica do Salvador (UCSAL) integra o corpo docente permanente do Mestrado Profissional em Planejamento Ambiental.

Salvador, ____ de _____ de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a meus queridos pais Walfrido Vieira de Melo e Miriam Gomes de Melo e Melo que juntos construíram o alicerce para que eu pudesse estar aqui hoje.

Aos meus irmãos Rodrigo e Daniela por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

A minha querida avó Luzia Costa Melo e minha tia Maria Creuza por terem me acolhido e ajudado nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus Orientadores Profa (a) Dra. Cristina Quintella, Dr. Paulo Almeida e Dr. Antonio Fernando por acompanharem todo meu processo de crescimento e amadurecimento ao longo destes dois anos.

Ao Sidnei por todo apoio e colaboração a este trabalho.

Ao Alexandre, Ícaro, Lilian por me ajudarem na etapa final deste trabalho.

A Aline Lefol por me acompanhar desde o início desta caminhada

Á Todos do Labem, que contribuíram para meu crescimento profissional.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, para que eu chegasse até aqui.

OBRIGADO!!!

"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las". (Aristóteles)

Melo, Eduardo Gomes Vieira, **Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos**. 70f.: il. _ 2011. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2010.

RESUMO

A indústria petrolífera movimenta anualmente trilhões de dólares e consolida-se como a principal fonte de energia mundial. Seus derivados têm intensa aplicação na geração de energia, bem como na indústria petroquímica. Apesar da importância econômica do segmento, a poluição ambiental causada pelos derivados de petróleo, óleos e graxas representa um problema de escala mundial que, a cada ano, aumenta consideravelmente. No Brasil, o óleo diesel é o derivado mais consumido e o país vive uma ascensão econômica inerente ao setor tendo despertado também a atenção da sociedade para impactos ambientais proporcionados pelos derramamentos de óleo. A glicerina bruta (GB) tem sido empregada experimentalmente na recuperação avançada de petróleo, mostrando-se promissora para remoção de parafinas lineares, ramificadas e com potencial para bioestimulação do metabolismo microbiano. O interesse industrial na biotecnologia e o reconhecimento de sua importância por todos os países industrializados tornam emergente a necessidade de novas tecnologias. Dessa forma, será maior o estímulo para estudo do crescimento de microrganismos na presença de hidrocarbonetos visando uma possível aplicação dos mesmos no tratamento da poluição do meio ambiente por compostos oleosos. O presente trabalho avaliou a biodegradabilidade do óleo diesel utilizando a GB na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Para este estudo foram utilizados a bactéria CCMICS 109 e microrganismos provenientes do diesel. Para analisar o crescimento bacteriano, foi preparado meio mínimo (M.M) contendo GB como bioestimulador e óleo Diesel como fonte de carbono. Métodos cromatográficos e medidas da tensão superficial foram utilizados para avaliação experimental da atividade microbiana sobre o óleo Diesel e hidrocarbonetos utilizados. Os resultados mostraram que houve a ocorrência da utilização de compostos como o Docosano-C22, Antraceno e Fenantreno pelo consórcio, o maior consumo observado foi para o Docosano. Após o vigésimo dia de análises, constatou-se a redução da tensão superficial. A significativa redução da mesma, atingida próxima a fase de morte celular microbiana, bem como o potencial para biodegradação principalmente de cadeias alifáticas e aromáticas do óleo diesel sugerem que o consórcio microbiano possui potencial para biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos.

Palavras-chave: Óleo diesel, biorremediação, microrganismos e consórcio microbiano.

Melo, Eduardo Gomes Vieira, **Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos**. 70 f.: il. _ 2011. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2010.

ABSTRACT

The ambient pollution by derivatives of oil, oils and greases is a problem of world-wide scale and it increases considerably each year. The petroliferous sector expends into motion trillions of dollars annually and is consolidated as the main world-wide power plant. These derivatives have intense application in the energy generation, as well as in the petrochemical industry. In Brazil, the Diesel oil is the major consumed derivative and the country lives inherent the economic ancestry to the sector having also the attention of the society for proportionate ambient impacts for the oil spill. The crude glycerin (GB) has been used experimentally in the advanced recovery of oil, revealing promising for linear paraffin removal, ramified and with potential for stimulation of the microbial metabolism. The industrial interest in biotechnology and the recognition of its importance by all industrialized countries make emerging the need for new technologies. Greatest stimulus to the study of the growth of microorganisms in the presence of hydrocarbons is the possible use of these organisms in the treatment of environmental pollution by oily compounds. The present work has for objective to evaluate the biodegradation of the oil diesel using the GB in the stimulation of hydrocarbonoclastic bacteria for ground remediation contaminated with hydro-carbons. The isolated (CCMICS 109) and microorganisms proceeding from diesel for this study had been selected. To analyze bacterial growth, a half minimum medium was prepared (M.M) containing GB as biostimulator, and Diesel oil and selected hydrocarbons as carbon source. Chromatographic and surface tension methods were used to evaluate the microbial activity utilization or degradation of the hydrocarbons tested. The results had shown that Docosano-C22, Antraceno and Fenantreno were used by the microorganisms and the Docosano was the best consumed. After the tenth first day of analysis, the reduction of surface tension was evidenced. The significant same reduction of reached the next one the phase to microbial cellular death, as well as the potential for biodegradation mainly of aliphatic and aromatic chains of the oil diesel. Last results suggested the potential of this microbial process for remediation of ground contaminated with hydro-carbons.

KEYWORDS: Oil Diesel, Bioremediation, Micro-organisms and microbial consortium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 01- Mercado Mundial de biorremediação em milhões de dólares empregados para descontaminação de solos e águas subterrâneas

Quadro 02 – Benefícios econômicos da biorremediação em casos reais e principais diferenças entre tratamentos físico-químicos

Figura 01 – Microrganismos e sistemas enzimáticos

Figura 02 – Formulas estruturais de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Figura 03 – Degradação do antraceno por bactérias aeróbias

Figura 04 – Meio MM contendo glicerina bruta e óleo diesel. A) Agitador orbital a 180rpm e 30°C. B) Meio Inoculado.

Figura 05 – Produção de emulsificado

Figura 06 A) Nível de degradação do Antraceno ao longo de onze dias de análise.

Figura 07 B) Nível de degradação do Fenantreno ao longo de onze dias de análise.

Figura 08 Nível de degradação do Docosano-(C22) ao longo de onze dias de análise.

Figura 09 Perfil cromatográfico comparativo (Nível de degradação- Docasano (C22), Antraceno e Fenantreno em 2 e 11 dias das análises).

Figura 10 - Média da degradação dos compostos (Docosano, Antraceno e Fenantreno) respectivamente, pela linhagem (CCMICS 109) e microrganismos do diesel inoculados em Meio Mínimo.

Figura 11 - Consumo de Glicerina Bruta versus crescimento microbiano.

Figura 12 - Similaridade entre as variáveis: Índice de degradação do Fenantreno, Antraceno, Docosano, Glicerina Bruta, Biomassa Bacteriana e Tensão superficial.

Figura 13 - Similaridade entre as variáveis: Índice de degradação Glicerina Bruta, Biomassa Bacteriana, Produção de emulsificação e Tensão superficial.

Figura 14 - Análise de componentes principais da linhagem (CCMICS 109).

Figura 15 - Análise de componentes principais referente ao consorcio microbiológico.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BA	Bahia
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CG	Cromatografia Gasosa
CMC	Concentração Micelar Crítica
FeSO ₄	Sulfato de ferro
g/L	Gramas por Litro
GB	Glicerina Bruta
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
K ₂ HPO ₄	Fosfato de hidrogênio di-hidratado
KOH	Hidróxido de potássio
Labem	Laboratório de Microbiologia e Ecologia de Microrganismos
Lablaser	Laboratório de Cinética e Dinâmica Molecular (LabLaser)
mg/L	Miligramas por Litro
mL	Mililitros
MM	Meio Mínimo
MnSO ₄	Sulfato de manganês
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
NaCl	Cloreto de sódio
(NH ₄)SO ₄	Sulfato de amônio
nm	Nanômetro
Nh ₂ PO ₄	Fosfato de amônio
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotação por Minuto
SSA	Salvador
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFBA	Universidade Federal da Bahia
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Solo, microrganismos e Biorremediação.....	15
2.2 Geoquímica Ambiental	17
2.3 Glicerina: Características e Propriedades.....	18
2.3.1 Glicerina Bruta	19
2.3.2 Conversão Microbiológica do Glicerol	19
2.3.3 Biodiesel versus Glicerina Bruta no Brasil	20
2.4 Biorremediação de Hidrocarbonetos	20
2.4.1 Composição do Óleo Diesel	20
2.4.2 Caracterização e Biorremediação de Hidrocarbonetos Alifáticos	22
2.4.3 Caracterização e Biorremediação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	23
2.5 Surfactantes versus Biossurfactantes.....	25
2.5.1 Propriedades dos Biossurfactantes.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Microrganismos em Estudo	27
3.2 Preparo de Meios de Cultura.....	28
3.3 Reativação do Isolado.....	28
3.4 Pré-Inoculo e Inoculo/Densidade Ótica	29
3.5 Teste de Biorremediação	29
3.5.1 Análise Espectrofotométrica	30
3.5.2 Análise Cromatográfica	32
3.5.3 Substrato Alternativo	33
3.5.4 Determinação da concentração de glicerina bruta	34
3.6 Análises físico-químicas	34

3.6.1 Teste de Tensão Superficial	34
3.6.2 Índice de Emulsificação	35
3.7 Análise Estatística	36
4.Artigo Submetido.....	37
5. CONCLUSÃO.....	54
6. PERSPECTIVAS.....	55
7. REFERENCIAS.....	56
8. ANEXO.....	58
9. ANEXO	65

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por derivados de petróleo, óleos e graxas é um problema de escala mundial e a cada ano aumenta bruscamente a quantidade de resíduos oleosos emitidos por indústrias de diversos ramos (CARVALHO et al., 2005). O setor petrolífero movimenta anualmente trilhões de dólares e consolida-se como a principal fonte de energia mundial, gerando 40% de toda energia que alimenta o planeta. Seus derivados têm intensa aplicação na geração de energia, bem como na indústria petroquímica. No Brasil, o óleo Diesel é o derivado mais consumido, estimado a 34% do total. O país viveu um momento de crescimento econômico inerente ao setor e tem despertado atenção da sociedade com os impactos ambientais proporcionados pelos derramamentos de óleo decorrentes de atividades operacionais como extração, transporte e armazenamento (SHARLAND, 2001).

O interesse industrial na biotecnologia e o reconhecimento de sua importância por todos os países industrializados possibilitam modificações no tratamento de efluentes e torna emergente a necessidade de novas tecnologias. Sendo assim o maior estímulo para o estudo do crescimento de microrganismos na presença de hidrocarbonetos consiste na possível utilização destes organismos no tratamento da poluição do meio ambiente por compostos oleosos (CARVALHO et al., 2005).

A glicerina bruta (GB) tem sido empregada experimentalmente na recuperação avançada de petróleo mostrando-se como um método promissor para remoção de parafinas lineares e ramificadas. O uso da GB para remoção de parafinas pode viabilizar comercialmente as energias renováveis, pois o mesmo possui uma capacidade limitada de absorção em grandes quantidades pelos mercados tradicionais. Outra alternativa seria a descoberta de novas aplicações da GB a partir do metabolismo microbiano para a produção de compostos bioativos, como surfactantes, polímeros, dentre outros, o que possibilitaria novas aplicações para o aproveitamento da GB, garantindo a sustentabilidade da operação do biodiesel.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água como os hidrocarbonetos, gorduras, óleos e graxas, usualmente produzem biosurfactantes que auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana através das emulsões formadas (CARVALHO et al., 2005).

Surfactante significa literalmente, agente de atividade superficial (SINGH, CAMEOTRA, 2004). Os primeiros relatos envolvendo a utilização de biossurfactantes datam de 1949, quando Jarvis e Johnson detectaram as atividades antibióticas e hemolíticas de um raminolípido, e de 1968, quando Arima e colaboradores descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, o qual foi denominado surfactina devido à sua grande atividade superficial, tendo, posteriormente, sua estrutura elucidada. Mais tarde, foi registrada a produção de biossurfactante em meios hidrofóbicos, o que levou a estudos de sua aplicação em tratamento de resíduos de petróleo, recuperação de petróleo, biorremediação e dispersão no derramamento de óleos. Apesar da elucidação de diversas propriedades da surfactina na década de 60, somente nos anos 80 chamou a atenção de diversos pesquisadores como uma alternativa eficaz para substituir os surfactantes sintéticos, os quais podem ser mais danosos ao ambiente. A indústria petrolífera era o grande mercado para biossurfactantes até a década de 90, porém a diversidade química destas moléculas fornece uma ampla variedade de compostos com propriedades específicas, que permitem aplicações comerciais em diversos setores industriais (SINGH, CAMEOTRA, 2004).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (NITSCHKE, PASTORE, 2002). Os biossurfactantes estruturalmente apresentam combinações diversas, principalmente aqueles produzidos por microrganismos na presença de hidrocarbonetos, sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana (LANG, WULLBRANDT, 1999; DYKE, 2000).

Segundo Karanth e colaboradores (1999), os surfactantes microbianos de baixo peso molecular são frequentemente glicolipídicos, os de alto peso molecular são heteropolissacarídeos polianiônicos ou complexos glicoprotéicos. O rendimento do surfactante microbiano varia de acordo com o substrato utilizado para a produção do crescimento microbiano e da linhagem utilizada.

O trabalho tem por objetivo avaliar a biodegradabilidade do óleo diesel utilizando a glicerina Bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Solos, Microrganismos e Biorremediação

O solo é um ecossistema, do ponto de vista físico, composto basicamente por material mineral (argila, silte e areia), poros cheios de ar ou água e matéria orgânica. A matéria orgânica é um componente ativo e importante, no qual grosseiramente três frações podem ser delimitadas (MELO, 2000). Segundo CURY (2002) este se apresenta como um sistema vivo composto de muitas associações microbianas possui uma microbiota variada, sendo estas sensíveis a modificações físicas e químicas que podem afetar de maneira efetiva o seu equilíbrio. Desta forma os hidrocarbonetos podem afetar de maneira efetiva o solo. Como os hidrocarbonetos são compostos formados de C e H, e se os microrganismos utilizam elementos, como o C, como fonte de energia pode-se inferir que existem microrganismos que são capazes de degradar estes compostos e seus derivados. Este processo recebe o nome de biodegradação que é um processo biológico de nutrição e respiração. Os microrganismos utilizam a matéria orgânica constituinte de um resíduo sólido ou líquido, utilizando uma pequena parte dela para autoconstrução e reprodução, e oxidando o restante através da fermentação ou respiração, aproveitando sua energia e restituindo ao meio, elementos na forma de subprodutos do seu metabolismo. Dessa forma, C, N, P, etc. que faziam parte das moléculas orgânicas do resíduo são devolvidas ao meio (água, ar, solo) na forma de compostos mais simples, tais como: gás carbônico, nitratos, fosfatos (LIMA, 2001).

A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é apresentada por diversos microrganismos, principalmente fungos e bactérias (RODRIGUES, 2002). A biodegradação do óleo resulta em uma diminuição em seu índice de hidrocarboneto e um aumento na densidade, índice de enxofre, acidez e viscosidade (ROLING, 2003). A microbiologia de degradação de hidrocarbonetos constitui um campo de pesquisa em pleno desenvolvimento. Tal interesse deve-se ao impacto que estes compostos podem causar no meio ambiente, e a crescente utilização de procedimentos microbiológicos de descontaminação de solos, em razão de derramamentos acidentais (LEMOS, BARROS, OLIVEIRA, REICHE, 2008; BONAVENTURA, JOHNSON, 1997), portanto o mercado mundial no que diz respeito a modelos para biorremediação segue uma rota direcionada pelas agências ambientais dos próprios países que se utilizam das tecnologias inovadoras de tratamento. Tendo os Estados Unidos como principal responsável pelo mercado mundial respondendo com cerca de 40% no que diz respeito a

tratamentos de biorremediação, sendo o mesmo detentor, do mais completo modelo de controle ambiental em execução no mundo como se pode observar na figura 1. Segundo levantamento realizado pela USEPA, em um estudo denominado Innovative Technology Evaluation Report de 1995, mais de 95% dos processos de biorremediação são empregados para descontaminação de solos e águas subterrâneas.

Quadro 01. Mercado Mundial de biorremediação em milhões de dólares empregados para descontaminação de solos e águas subterrâneas.

	1994	1997	2000	2005
USA	160-210	220-270	400-500	500-700
Europa	105-175	180-270	450-550	600-800
Mundo	430-460	500-600	1,000-1,300	1,300-1,600

Fonte: Fernandes e Alcântara, 1998.

Quadro 02. Benefícios econômicos da Biorremediação em casos reais e principais diferenças entre tratamentos físico-químicos.

Aplicação	Tratamento físico e/ou químico	Biorremediação	Diferença do benefício em dólares
Solo contaminado por hidrocarbonetos (<i>brownfield</i> urbano)	Escavação e transporte Custo: \$3 milhões	<i>Bioventing on site</i> \$0,2 milhões	\$2,8 milhões
Lençol freático contaminado por derrame de gasolina	Bombeamento, tratamento por <i>air stripping</i> e <i>skimming</i> Custo: \$2 milhões	<i>Soil vapor extraction</i> e <i>bioventing</i> \$0,25 milhões	\$1,75 milhões
Contaminação múltipla (<i>superfund site</i>)	Encapsulamento Custo: \$25 milhões	Biorremediação <i>in situ</i> \$5 milhões	\$20 milhões
Contaminação múltipla Com BTEX e arsênio (<i>superfund site</i>)	Bombeamento e tratamento. Encapsulamento. Custo \$50 milhões	Bioestimulação <i>in situ</i> <i>Bioventing</i> e <i>air sparging</i> Imobilização biológica de metais \$5 milhões	\$48 milhões
Derrame de óleo cru no mar	Lavagem: Custo \$1,1 milhões por km de costa afetada	Bioestimulação com fertilizantes: \$0,005 milhões por km de costa afetada	Mais de \$1 milhão por km de costa

Fonte: adaptado de Gallego e Martín, 2003.

Outro tratamento que vem ganhando notoriedade nos últimos anos são as pesquisas relacionadas à glicerina, gerada da produção de biodiesel. Novas alternativas biotecnológicas estão sendo estimuladas para contribuir na redução do acúmulo da glicerina (CHAVEZ, 2008; ITO et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2006; ZHAO, CHEN, YAO, 2006; CHENG et al., 2007) bem como na utilização desta como fonte de carbono para microrganismos já que a glicerina bruta contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são altamente assimiláveis por microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos.

2.2 Geoquímica Ambiental

A geoquímica ambiental oferece mecanismos capazes de discriminar, nos vários sistemas (solos, rios lagos e atmosfera), contaminações químicas de origem natural das consideradas de origem antrópica, contribuindo, portanto para o reconhecimento dos mecanismos de transporte dos elementos essenciais e dos tóxicos da geosfera (litosfera, hidrosfera e atmosfera) a biosfera (GURGEL, 2007 apud CORTECCI, 2002).

Além das contribuições para mecanismos de transporte, os dados geoquímicos podem indicar se a biodegradação está ocorrendo no momento, se já ocorreu no passado, ou ainda, se os receptores de elétrons estão disponíveis para sustentar a biodegradação no futuro, portanto Para que seja possível a biodegradação dos hidrocarbonetos é essencial uma reação de oxi-redução, em que o hidrocarboneto é oxidado e um aceptor de elétron é reduzido. Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétrons, entre eles o oxigênio, o nitrato, os óxidos de Fe, o sulfato. Assim sendo, mediante o acompanhamento da evolução espacial e temporal da concentração desses indicadores geoquímicos presentes principalmente na água, é possível verificar se está ocorrendo a biorremediação. Além dos aceptores de elétrons, outras variáveis podem ser relacionadas a processos biológicos, como o pH e o potencial redox (BONOTTO, ANGELIS, MARIANO, 2007; apud VROBLESKY, CHAPELLE, 1994; BORDEN et al., 1995; CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; WALT, MCNAB, 1999; KEELEY et al., 1999; KAO, WANG, 2000; SILVA et al., 2002; BHUPATHIRAJU et al., 2002; RÖLING, VERSEVEL, 2002; HUNKELER et al., 2002, CHEON et al., 2004).

A verificação da ocorrência da biorremediação exige principalmente a caracterização da ecologia microbiana, e também o conhecimento de processos

biogeoquímicos (BONOTTO, ANGELIS, MARIANO, 2007 apud CUNHA, LEITE, 2000).

Contaminantes como, por exemplo, hidrocarbonetos derivados do petróleo, preservantes de madeira (creosoto e pentaclorofenol), solventes halogenados e os pesticidas funcionam como fonte de carbono para os microrganismos, sendo necessário o fornecimento de outros nutrientes como nitrogênio e fósforo, além de outros elementos específicos para cada contaminante (GURGEL, 2007 apud CORTECCI, 2002).

Os microrganismos estão presentes na natureza em todos os locais, nos solos, em águas subterrâneas, e nos oceanos, sendo parte integrante dos processos naturais de detoxificação. Portanto os parâmetros analisados em campo e em laboratório estão relacionados com os problemas ambientais direta ou indiretamente e por isso a importância de sua análise fazendo-se necessário a realização de ensaios para biodegradação relacionadas principalmente a áreas contaminadas por hidrocarbonetos derivados de petróleo, sendo então fundamental as análises geoquímicas da água disponibilizada para crescimento microbiano (GURGEL, 2007 apud SOARES et al., 2004; MARCARENHAS et al., 2004; MENEGOL et al., 2001).

2.3 Glicerina: Características e Propriedades

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (OECD-SIDS, 2002) Na natureza, a glicerina existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos (CHAVEZ, 2008 apud THOMPSON, 2006). A glicerina é um composto fundamental para o sistema metabólico de microrganismos; atuando como precursor de diversos compostos, e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (CHAVEZ, 2008 apud BRISSON et al.; 2001; MOAT, FOSTER, SPECTOR, 2002).

2.3.1 Glicerina Bruta

A glicerina bruta apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, álcool (metanol ou etanol), monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água (CHAVEZ, 2008 apud YONG et al., 2001). A porcentagem de glicerina na mistura pode variar entre 40 a 70 % (p/p). Dessa forma, o aspecto da glicerina bruta encontra-se intimamente relacionada ao conteúdo de sabão e dos sais precipitados durante o processo de tratamento, que proporciona aparência de viscoso e escuro (CHAVEZ, 2008 apud THOMPSON, 2006).

As características físicas, químicas e nutricionais da glicerina bruta dependem do tipo de ácido graxo e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel (CHAVEZ, 2008 apud THOMPSON, 2006).

2.3.2 Conversão Microbiológica do Glicerol

A glicerina é considerada uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas (GANCEDO, 2001; DILLIS et al., 1980; TANI, YAMADA, 1987), sendo um dos poucos substratos capazes de atravessar a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas. Em bactérias como *Escherichia coli*, a proteína do tipo poro-canal-G1Pf atua por sensibilidade mecânica sem gasto energético na presença de glicerina. Este facilitador permite a assimilação, além de glicerina, de pequenas moléculas de polihidroxi alcóis, uréia e glicina, mas exclui moléculas carregadas com gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (CHAVEZ, 2008 apud MOAT, FOSTER, 2002).

2.3.3 Biodiesel versus Glicerina bruta no Brasil

No Brasil, a produção de biodiesel vem aumentando consideravelmente e a quantidade de glicerina bruta gerada encontra-se em crescimento vertiginoso, o que acaba representando um possível problema, onde a busca de novas soluções para sua utilização será de fundamental importância (FRIEDRICH, 2004; PNPB, 2006; MME, 2007; BIODIESELBRASIL, 2007). No Brasil, a maioria das plantas industriais de biodiesel não valoriza efetivamente a glicerina. A projeção do volume de glicerina no país para o ano 2010 foi de 330 milhões de reais e as perspectivas, nesse sentido, não

são muito animadoras (MME, 2006; OLIVEIRA, 2008). Nos Estados Unidos, o valor da glicerina diminuiu de 1048 R\$/t em 2004 para aproximadamente 125 R\$/t no ano 2006 (YAZDANI, GONZÁLEZ, 2007). No Brasil, nos dias de hoje o preço da glicerina bruta varia de 200 a 400 R\$/t, sendo o valor da glicerina loira (glicerina parcialmente tratada para remoção de impurezas) de 600 a 800 R\$/t. Considerando a real situação e as possíveis projeções para os próximos anos, a utilização da glicerina como substrato para os microrganismos poderá torna-se extremamente vantajoso em relação ao preço quando comparado a outros resíduos tradicionalmente utilizados como fonte de carbono para a obtenção de bioprodutos (BIODIESELBRASIL, 2007; PCB, 2006).

2.4 Biorremediação de Hidrocarbonetos

Ao longo de muitos anos, as pesquisas sobre a utilização de hidrocarbonetos por microrganismos restringiam-se ao campo acadêmico, até o acidente ocorrido em 1967 com o navio Torrey Canyon, despertando então preocupação pública sobre efeitos ecológicos da poluição do óleo e o interesse científico em utilizar microrganismos para remoção do óleo no meio ambiente (BROWN, 2001).

Atualmente mais de 100 espécies microbianas representativas de 30 gêneros distintos são capazes de degradar hidrocarbonetos. Dentre os gêneros bacterianos destacam-se *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e organismos do grupo Corineformes.

A notável habilidade dos microrganismos para degradar compostos recalcitrantes é consequência de um vasto aparato enzimático de células procariontes e eucariontes, que coexistem a bilhões de anos, com espantosa variedade de substâncias naturais de diferentes origens. A diversidade de substrato resultou no aparecimento de enzimas capazes de realizar transformação de moléculas orgânicas com estruturas bastante distintas como se pode perceber na (figura 01) (JACQUES, 2005).

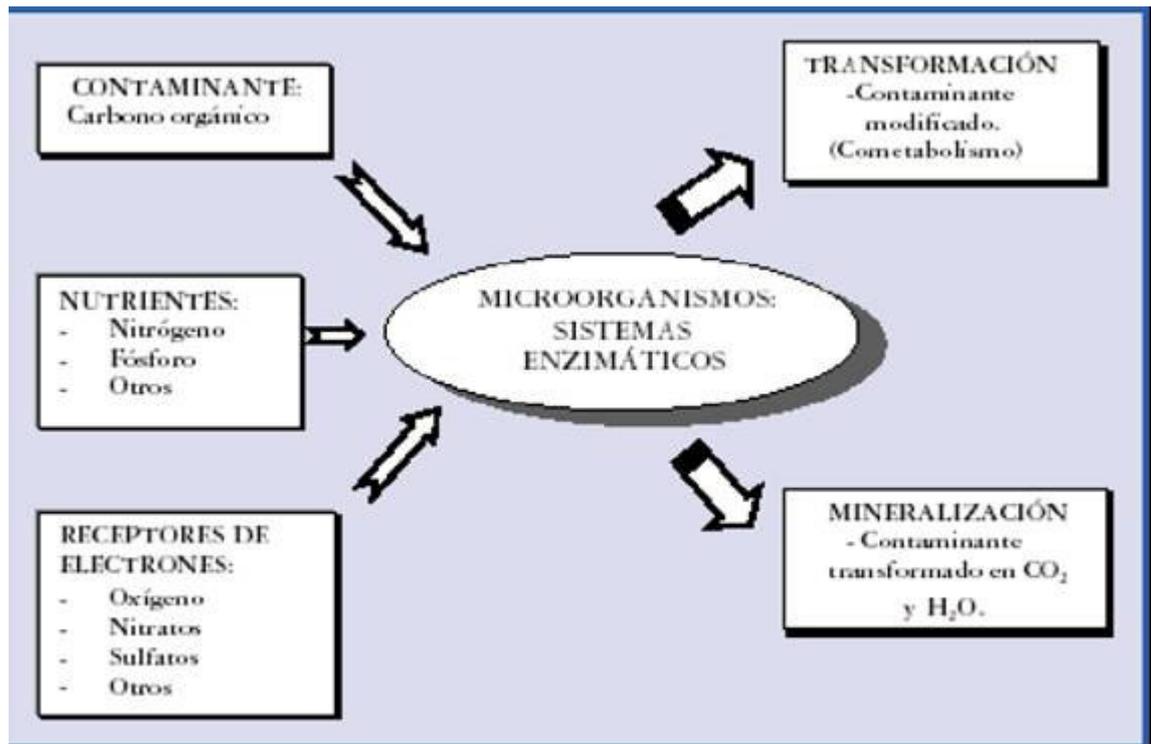


Figura 01. Microrganismos e Sistemas Enzimáticos.

Fonte adaptada: Lemos et al. (2008) apud Martin, Galego (2003).

2.4.1 Composição do Óleo Diesel

O petróleo e seus constituintes são um emaranhado de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos sendo formados em sua grande maioria por carbono e hidrogênio, com ínfimas quantidades de nitrogênio, oxigênio e enxofre (CEPETRO, 2002).

A grande maioria dos hidrocarbonetos possui baixa solubilidade em água o que proporciona baixas taxas de metabolização do poluente. A depender do tipo de ligação entre átomos de carbono, os hidrocarbonetos alifáticos podem ser classificados em alcanos, alcenos e alcinos, os que possuem anéis são conhecidos como alicíclicos.

Segundo Domingues (2005), um litro de óleo pode esgotar o oxigênio de um milhão de litros de água, formando, em poucos dias, uma fina camada sobre a superfície de 1000 m², bloqueando assim a passagem de água e luz, impedindo a respiração e a fotossíntese.

O óleo Diesel, em especial, é uma mistura complexa de n-parafinas, parafinas ramificadas, cicloparafinas e hidrocarbonetos aromáticos, como se percebe na (Tab 01).

Tabela 01. Componentes do óleo diesel, Frações Alifática e Aromática.

FRAÇÃO ALIFÁTICA		FRAÇÃO AROMÁTICA
Nonano	Nonadecano	Trimetilbenzeno
Decano	Eicosano	Tetrametilbenzeno
Undecano	Heneicosano	Naftaleno
Dodecano	Docosano	Dimetilnaftaleno
Tridecano	Tricosano	Fenantreno
Tetradecano	Tetracosano	Dimetilfenantreno
Pentadecano	Pentacosano	
Hexadecano	Hexacosano	
Heptadecano	Heptacosano	
Octadecano	Nonadecano	

Fonte: Santos (2002) apud Richard, Vogel (2001).

2.4.2 Caracterização e Biorremediação dos Hidrocarbonetos Alifáticos

Os hidrocarbonetos de cadeia carbônica linear e de comprimento intermediário como o Docosano, são mais susceptíveis a biodegradação do que os de maior tamanho ou de cadeias anelares, com o aumento da cadeia carbônica, estes compostos tornam-se menos disponíveis ao ataque microbiano devido à hidrofobicidade, dificultando assim a biodegradação (BALBA et al.; 2001). A biodegradação aeróbia dos alcanos lineares envolve a ação de enzimas denominadas de monoxigenases capazes de transformar estes compostos em alcoóis correspondentes pela oxidação do grupo terminal, conseqüentemente os alcoóis produzidos são oxidados a aldeídos e posteriormente, a ácidos graxos os quais são degradados, pela via da β -oxidação.

2.4.3 Caracterização e Biorremediação dos hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAS) são compostos químicos formados natural ou antropogênicamente durante a combustão incompleta, de substâncias orgânicas como carvão mineral e vegetal, óleo cru, gás madeira, lixo, etc (SANTOS, 2002 apud PRINCE, 2003). Sua composição basicamente são átomos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Segundo a

União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) existe atualmente mais de 100 HPAS reconhecidos, mas somente 18 são considerados em função das informações físico-químicas, toxicológicas, ambientais e industriais existentes. São eles acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(e)pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)pireno, benzo(j)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(um,2,3-c,d)pireno, naftaleno e pireno (SANTOS, 2002 apud PRINCE, 2003). O antraceno é um HPA de produção industrial, determinado a partir do carvão, conhecido vulgarmente como óleo de antraceno ou ainda como óleo verde. O antracino ou ainda paranaftaleno, como também é conhecido, é formado por três anéis aromáticos, arranjados de forma linear, apresentando massa molecular de 178,2g (JACQUES, 2005). O antraceno tem sido bastante utilizado como modelo para estudos envolvendo a dinâmica destes compostos no ambiente, devido ao fato de ser menos tóxico quando comparado aos demais HPAS (JACQUES, 2005). O fenantreno é utilizado na produção de corantes e explosivos do ponto de vista industrial. É um isômero do antraceno, com um dos três anéis aromáticos rearranjado de forma não linear em relação aos demais (figura 02), conhecido ainda como fenantrin, apresenta massa molecular de 178,2g (VERSCHUEREN, 2001).

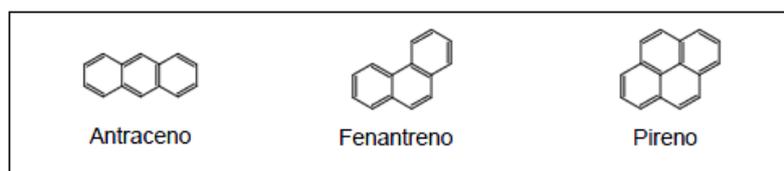


Figura 02. Fórmulas estruturais de alguns Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

A degradação dos HPAS no meio ambiente pode ocorrer tanto de forma biótica quanto abiótica, neste último estariam envolvidos tanto processos químicos quanto físicos. As excitações dos átomos por efeito da luz e da temperatura promovem a desestabilização das estruturas moleculares e o rompimento das ligações, o principal agravante desta via de degradação está relacionado à geração de intermediários mais tóxicos que as moléculas originais. Assim a biodegradação é a principal via de

eliminação dos HPAS no solo (PRINCE, DRAKE, 1999). A degradação biótica dos HPAS envolve uma serie de microrganismos, dentre estes se destaca, os complexos enzimáticos utilizados pelo metabolismo bacteriano. Estas enzimas podem ser divididas em dois grupos: periféricas e de fissão. As enzimas periféricas têm a função de reconhecer e converter os HPAS em moléculas degradáveis pelas enzimas de fissão, estas por sua vez farão com que as moléculas possam entrar nas rotas comuns de geração de energia e de carbono nas células microbianas (MISHARA et al.; 2001). Como exemplo pode-se acompanhar na (figura03).

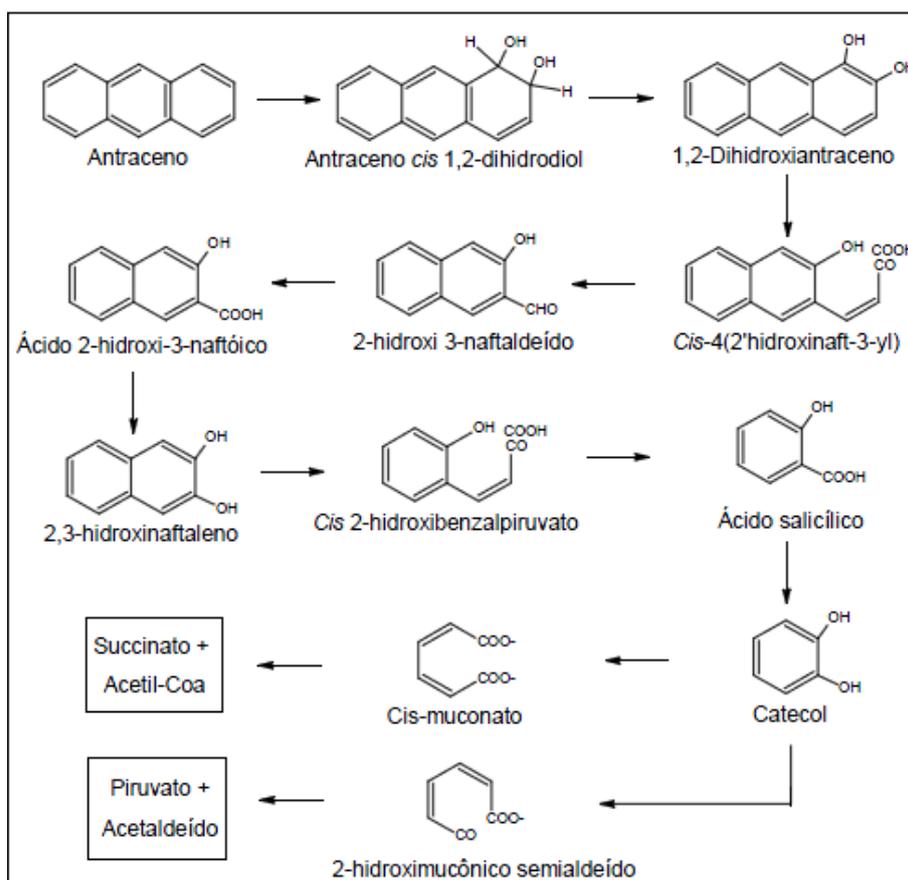


Figura 3. Rota de degradação do Antraceno.
Fonte: Evans et al. (1965); Cemiglia (1984); Caldwell (2000).

2.5 Surfactantes *versus* Biosurfactantes

Os surfactantes são compostos formados por moléculas que possuem uma parte hidrofóbica e uma hidrofílica, que tendem à separação preferencialmente na interface entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tais como interfaces óleo/água ou ar/água. Atuam nas tensões superficiais e interfaciais e formam Microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água e vice

versa. A eficácia dos surfactantes é determinada através da capacidade de reduzir a tensão superficial. A tensão superficial correlaciona-se com a concentração dos compostos tensoativos até o momento em que a concentração micelar crítica (CMC) é alcançada. Surfactantes eficientes apresentam baixa concentração micelar crítica. Com estas características os surfactantes são considerados um dos produtos químicos mais versáteis e utilizados nos diversos setores industriais. Entretanto, estes compostos químicos são prejudiciais ao meio ambiente, pois são tóxicos e não apresentam biodegradabilidade (PIRÔLLO, 2006).

O uso de bactérias para monitorar contaminações de solos e águas vem sendo amplamente estudado. Este monitoramento ocorre por ação de compostos de origem microbiana que contenha propriedades surfactantes, chamados surfactantes biológicos ou biossurfactantes (NITSCHKE, PASTORE, 2002). Os microrganismos produzem moléculas de biossurfactantes através da degradação de vários substratos incluindo açúcares, óleos, alcanos, e resíduos (MESQUITA, 2004). Os biossurfactantes são compostos produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de microrganismos em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes (PIRÔLLO, 2006).

São muitas as vantagens apresentadas pelos biossurfactantes quando comparado aos de origem sintética, tais como:

- Atividade superficial e interfacial: são mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois são mais efetivos em reduzir a tensão superficial em menores concentrações;
- Tolerância à temperatura e pH e força iônica; elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizado em ambientes com condições mais drásticas;
- Biodegradabilidade: diferentes dos surfactantes químicos os surfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo;
- Baixa toxicidade: a sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (efeitos alérgicos).

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (NEVE *et al.*; 2004).

2.5.1 Propriedades dos Biossurfactantes

Os surfactantes sintéticos apresentam características que proporcionaram avanços nos mais diversos ramos da indústria, contudo a utilização de surfactantes biológicos apresenta vantagens por serem menos tóxicos, menos alergênicos, biodegradáveis, o que implica menor impacto biológico (TURKOVSKAYA *et al.*, 1999).

Segundo Bognolo (1999), os surfactantes naturais apresentam vantagens em relação aos sintéticos: atividade de superfície e interface, os biossurfactantes são bastante eficientes quando comparados, por exemplo, a sulfonatos aniônicos, haja vista que tem a capacidade de reduzir a tensão superficial mais rapidamente; a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente (NITSCHKE, PASTORE, 2002). Alguns biossurfactantes não são afetados mesmo a temperaturas elevadas, não precipitam em soluções salinas de até 10%, enquanto que soluções de 2-3% de sal são suficientes para incapacitar os surfactantes de origem química; os biossurfactantes são facilmente degradados tanto em água como em solo e o seu potencial de aplicação é baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades fornecem potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, agrícola, construção, bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêutica, cosmética (NITSCHKE, PASTORE, 2002; MULLIGAN *et al.*, 2001; BOGNOLO, 1999; FIECHTER, 1992 apud CASTIGLIONI 2006, p. 25).

É eximia a potencialidade antiviral de determinados surfactantes por conseguir interações físico-químicas eficazes com a membrana viral lipídica, promovendo ruptura total das mesmas (SINGH, CAMEOTRA, 2004 apud CASTIGLIONI 2006, p. 25). Um dos usos para os biossurfactantes que tem recebido constante atenção é conhecido por MEOR (Microbial-Enhanced Oil Recovery), cujo processo envolve a introdução de microrganismos em reservatórios de óleo cru para melhorar a extração da borra oleosa e recuperar frações de hidrocarbonetos. Este método também está sendo proposto e

testado em algumas partes do mundo, para combater a poluição ambiental gerada por derramamentos acidentais de óleo. O principal uso comercial dos biossurfactantes está na remediação, por causa de sua capacidade em estabilizar emulsões. Isto faz com que ocorra um aumento na solubilidade e na disponibilidade de contaminantes hidrofóbicos, aumentando o potencial para biodegradação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais com microrganismos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM) da UFBA, as análises cromatográficas, foram realizados no Laboratório de Cinética e Dinâmica Molecular (Lablaser) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

As análises em agitador orbital foram realizadas no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA, situado na Universidade Católica do Salvador (UCSal), no campus de Pituáçu, Salvador – (Bahia).

3.1 Microrganismos em estudo

Neste trabalho foi realizado um estudo para analisar a possibilidade entre um consorcio microbiológico e a linhagem de *Pseudomonas Fluorescens* (CCMICS 109). (GenBank, Access No. AF125317) cedida pelo banco de microrganismos do LABEM, isolada do solo rizosférico de *Actinocephalus* spp, no Parque Municipal de Mucugê, Município de Mucugê, Bahia, Brasil e microrganismos encontrados no óleo diesel, como bactérias e alguns tipos de fungos, que tiveram de certo modo alguma participação no processo aqui descrito. Dessa forma, seria conveniente, em outro trabalho, explorar melhor o papel desses microrganismos no processo de biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos.

3.2 Preparo de Meios de Cultura

Os meios de cultura foram preparados e colocados em beckers, adicionando-se água destilada até atingir 70% do volume final. O meio foi homogeneizado e transferido para proveta de volume próximo ao volume final desejado a fim de completar com água; o meio foi novamente homogeneizado, e transferido para erlenmeyers (com uma capacidade no mínimo 30% maior que o volume final). Os quais foram fechados com rolhas de gaze e algodão e envolvidos com papel alumínio. Após essa etapa os meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

Após a autoclavagem os meios foram vertidos em placas de Petri e incubados na estufa a 30°C por 24h para o teste de esterilização, a fim verificar a presença ou não de

contaminações nos meios (MARRAY et al., 2002). O meio TSA (Tryptic Soy Agar), utilizado neste trabalho, é um meio não seletivo onde crescem diversos tipos de bactérias. O meio TSB (tryptic soy broth) usado para estes estudos também é um meio não seletivo onde crescem diversos tipos de bactérias, sendo neste caso utilizado para garantir o crescimento da (CCMICS 109).

O meio mínimo (MM) tem em sua composição: 0,5% de NaCl, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,1% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,1% de $CaCl_2$, 0,01% de $FeSO_4$, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,2% de $MnSO_4$ e 5 % de extrato de levedura acrescido de (1% e 3%) de glicerina bruta (soja) e óleo diesel respectivamente.

3.3 Reativação da linhagem (CCMICS 109).

A linhagem bacteriana foi mantida no meio tryptic soy broth (TSB) com 15% de glicerol a $-80^\circ C$, no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos da Universidade Federal da Bahia.

Para reativação, retirou-se o mesmo do freezer ($-80^\circ C$) deixando por mais 30 minutos em geladeira a ($-20^\circ C$) e posteriormente mais 20 minutos na geladeira a ($4^\circ C$). Transferiu-se 500 microlitros do isolado para 9,5 mililitros de (TSB) deixando a solução na estufa por 24 horas a $30^\circ C$, observando crescimento bacteriano através da turvação do meio. Em seguida retirou-se um mililitro do pré-inoculo e com auxílio de alças descartáveis semeou-se em placas de petri contendo TSA, novamente permanecendo em estufa a $30^\circ C$ por 24 horas, sendo em seguida realizados dois repiques em TSA para manutenção e purificação da colônia.

3.4 Pré-Inoculo e Inoculo/Densidade Ótica

Com auxílio da alça de platina foi retirado uma alçada dos microrganismos semeados anteriormente nas placas com TSA, sendo em seguida transferidos para erlenmeyers de 300 mililitros contendo 50 mililitros de meio TSB, garantindo uma aeração de 1/6, sendo em seguida incubados em Agitador Orbital a $30^\circ C$ e 120 rpm por 24 horas. Após esse procedimento, um volume de 1 ml constituiu o inoculo que foi adicionado a erlenmeyers de 500 mililitros contendo 250 mililitros de meio mínimo (M.M). Durante esse ensaio foram realizados testes preliminares de espectrofotometria

que visavam comprovar ou não a existência de um consórcio entre a CCMICS 109 e microrganismos provenientes do óleo diesel.

3.5 Testes de Biodegradação

Para os ensaios de biodegradação com o consorcio microbiano foram estipulados valores fixos de Glicerina Bruta e Óleo Diesel guardando sempre as proporções de 1 e 3 % respectivamente para valores totais para o primeiro ensaio, sem adição da (CCMICS 109). Foram realizados testes envolvendo apenas meio mínimo (242,5mL) e óleo diesel não esterilizado (7,5 mL) No segundo ensaio utilizou-se meio mínimo (242,5mL), óleo diesel não estéril (7,5 mL) inoculado com a bactéria (CCMICS 109), no terceiro ensaio utilizou-se meio mínimo (240mL), Diesel não estéril (7,5mL) e GB estéril (2,5mL).

Todos estes ensaios foram incubados em agitador orbital a 30°C e 180 rpm durante 11 dias, de onde foram retiradas alíquotas (25mL), a intervalos regulares, para as análises cromatográficas, de tensão superficial, dosagem indireta de glicerol, densidade ótica e índice de emulsificação. O crescimento do isolado foi monitorado através da determinação da densidade ótica em espectrofotômetro modelo 850M, região espectral (325 a 1000 nm) e seletividade de comprimento de onda em 2nm. As amostras foram levadas a uma cubeta (Plastibrand) para leitura da densidade ótica em 600 nm, utilizando (M.M, GB, O. Diesel) como branco. As densidades óticas das soluções contendo (CCMICS 109, M.M, G.B e O. Diesel) e (CCMICS 109, bactérias do diesel, M.M, G.B e O. Diesel) para análises de tensão superficial foram realizadas ensaios em 1,2,3,5,8 e 11 dias.

3.5.1 Analise Espectrofotométrica

Os testes de espectrofotometria visaram avaliar a biomassa bacteriana, bem como consumo da glicerina bruta. Os testes foram realizados respeitando a seqüência das amostras em Agitador Orbital. As amostras para o teste foram inoculadas em microplacas seguindo uma determinação alfabético-numérica.

3.5.2 Análise Cromatográfica

O processo de degradação de alcanos foi avaliado por cromatografia gasosa capilar (Varian 3900GC) acoplada a um detector por ionização em chama (FID). O fluxo do gás do injetor, hidrogênio, foi mantido a vazão de 5,0 mL.min⁻¹, a coluna

capilar usada foi CP-SIL 5 CB (CP 8741) a 100% de polidimetilsiloxano. A temperatura do injetor foi mantida a 180°C e do detector a 250°C, a temperatura inicial do forno foi de 150°C, com uma taxa de aquecimento de 50°C/ min, chegando a 300°C. O tempo total de cada corrida cromatográfica foi de 6,5 minutos.

As amostras que seguiram para análise cromatográfica foram submetidas à centrifugação por 30 minutos a 4000 rpm a fim de eliminar todo o precipitado formado durante o processo, estas foram diluídas em 0,5 ml de heptano, mantendo as devidas proporções para cada amostra.

A injeção de 1 mL da amostra foi feita através de microseringa, sendo realizado inicialmente um controle (0,5mL de diesel + 0,5mL de heptano) para padronização do método. Os testes foram realizados em triplicata.

3.5.3 Substrato Alternativo

A amostra de glicerina bruta utilizada neste trabalho teve origem do processo de produção de biodiesel com óleo de soja como matéria-prima, proveniente da usina Petrobras Biocombustível S.A. (Candeias, Bahia, Brasil). A Glicerina de soja foi utilizada como substrato paralelo ao óleo diesel, para bioestimulação microbiana, com porcentagem estipulada em 1% em meio de cultura M.M. Neste, foi inoculado uma alçada da linhagem de CCMICS 109, sendo incubado em agitador orbital a 30°C e 180 rpm como mostrado na (figura 04).

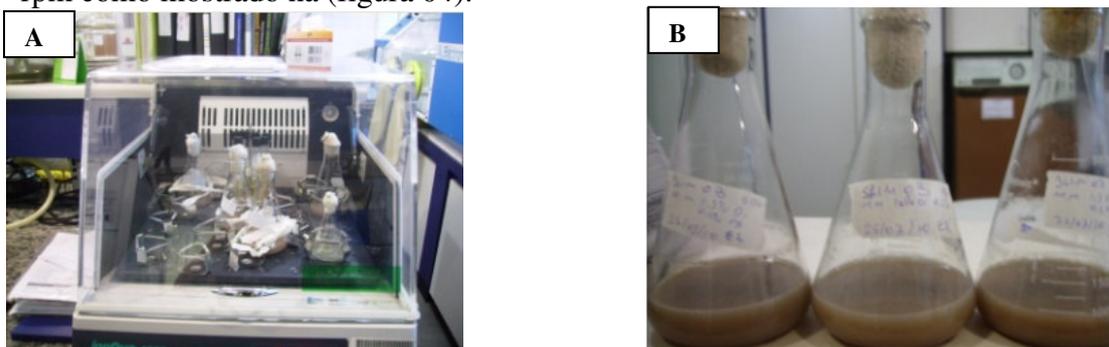


Figura 04. Meio MM contendo glicerina bruta e Óleo diesel. A) Agitador orbital a 180rpm e 30°C. B) Meio Inoculado.

3.5.4 Determinação da Concentração de Glicerina Bruta

O sistema enzimático para determinação de triglicérides por metodologia enzimática-colorimétrica (Henry, J.B, 1996) foi usado para medir a consumo de GB pela (CCMICS 109) e pelo consórcio microbiano. Após a centrifugação da cultura, 20 µL do sobrenadante e 2 mL do reagente de cor, tampão (PIPES) 45 mmol/L e pH, 7,0 foram misturados em tubos teste (5 mL). O branco consistiu em 2 mL do reagente de cor e o padrão 2 mL do reagente de cor mais 20 µL da solução padrão de glicerol (200 mg/dL). As amostras permaneceram em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente (20-30°C). Procedendo-se à leitura das absorvâncias no espectrofotômetro (Vitor) em 510-530 nm, zerando o aparelho com o branco. A cor desenvolvida permaneceu estável por 60 minutos a temperatura ambiente.

3.6 Análises Físico-químicas

3.6.1 Tensão Superficial

Para determinação experimental de tensão superficial e interfacial das amostras em estudo, foi utilizado um tensiômetro Sigma (702), com balança eletromagnética, resolução de peso (0,01mg), força de resolução em (0,01mN) e velocidade de estágio de 0,01-500mm/min. O método do anel consiste em colocar a amostra de interesse na cubeta e baixar o anel mecanicamente ate que este atravesse completamente a superfície da amostra. Foram realizados ensaios para tensão superficial da água, do controle (M.M, e O. Diesel), das amostras (CCMICS 109, M.M, G.B e O. Diesel), e (M.M, G.B e O. Diesel)

Para realização deste procedimento, as cubetas para leitura passaram por um processo de lavagem com xilol (uma lavagem), acetona (duas lavagens) e água destilada, sendo colocadas em estufa por 10 minutos para secagem.

Para limpeza do anel foi realizado flambagem do mesmo em bico de Bunsen por 5 segundos ate atingir o rubro.

As amostras foram analisadas mediante as técnicas de Huh-Mason e Zuidema-Waters, utilizadas para cálculo de correção fatorial.

3.6.2 Índice de emulsificação (E_{24})

A atividade emulsificante foi medida usando o método descrito por Cooper e colaboradores (1998), onde as amostras foram levadas a tubos de ensaio (100mm X 15mm) contendo 2mL do caldo livre de células e 2mL de óleo mineral. Em seguida, a mistura foi agitada no vórtex durante 2 minutos e deixada em repouso por 24 horas. A produção de biossurfactantes foi medida através do índice de emulsificação (E_{24}), dividindo a altura da camada emulsificada (mm) pela altura total da coluna líquida (mm) e multiplicando por 100. O controle negativo foi realizado com 2 mL de M.M não cultivado e o controle positivo com 2mL de (SDS) dodecil sulfato de sódio. As análises podem ser observadas na figura 05.



Figura 05 – Produção de Emulsificado

3.7 Análise Estatística

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizada análise de componentes principais, dendogramas e gráficos do tipo Box Plot. Estas análises reduzem o número de variáveis a poucas dimensões com um mínimo de perda de informações, permitindo a detecção dos principais padrões de similaridade e de correlação entre as variáveis. Os programas *Canoco 4.5* e *Statistica 7.0* foram utilizados para melhor interpretação dos resultados.

4 ARTIGO SUBMETIDO

Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos

Eduardo Gomes Vieira de Melo¹ Cristina Maria Assis Lopes Tavares da Mata Hermida Quintella² Antonio Fernando de Souza Queiroz³ Paulo Fernando de Almeida⁴

Uso da Glicerina Bruta na estimulação de bactérias para Biorremediação

Autor para contato: Eduardo Gomes Vieira de Melo. E-mail:

edu_vieira81@yahoo.com.br

1. Programa de Pós Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente, Universidade Federal da Bahia, Campos Ondina, Instituto de Geociências, Laboratório de Biotecnologia. CEP 40300-100 Salvador, BA – Brasil. CAPES

2. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Departamento de Química Geral e Inorgânica. Campus de Ondina 40170-290 - Salvador, BA – Brasil.

3. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, Departamento de Geoquímica. Rua Barão de Geremoabo S/N – Federação 40170-290 - Salvador, BA – Brasil.

4. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências da Biointeração. Av. Reitor Miguel Calmon, s/n Vale do Canela CEP 40300-100 - Salvador, BA - Brasil
Autor para contato. E-mail: edu_vieira81@yahoo.com.br

Resumo:

A indústria petrolífera movimenta anualmente trilhões de dólares e consolida-se como a principal fonte de energia mundial. Seus derivados têm intensa aplicação na geração de energia, bem como na indústria petroquímica. Apesar da importância econômica do segmento, a poluição ambiental causada pelos derivados de petróleo, óleos e graxas representa um problema de escala mundial que, a cada ano, aumenta consideravelmente. No Brasil, o óleo diesel é o derivado mais consumido e o país vive uma ascensão econômica inerente ao setor tendo despertado também a atenção da sociedade para impactos ambientais proporcionados pelos derramamentos de óleo. A glicerina bruta (GB) tem sido empregada experimentalmente na recuperação avançada de petróleo, mostrando-se promissora para remoção de parafinas lineares, ramificadas e com potencial para bioestimulação do metabolismo microbiano. O interesse industrial na biotecnologia e o reconhecimento de sua importância por todos os países industrializados tornam emergente a necessidade de novas tecnologias. Dessa forma, será maior o estímulo para estudo do crescimento de microrganismos na presença de hidrocarbonetos visando uma possível aplicação dos mesmos no tratamento da poluição do meio ambiente por compostos oleosos. O presente trabalho avaliou a biodegradabilidade do óleo diesel utilizando a GB na estimulação de bactérias hidrocarbonoclasticas para remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Foram utilizadas, a bactéria (CCMICS 109), e microrganismos provenientes do diesel para este estudo. Para analisar crescimento bacteriano, foi preparado meio mínimo (M.M) contendo GB como bioestimulador e óleo Diesel como fonte de carbono. Métodos cromatográficos e medidas da tensão superficial foram utilizados para avaliação experimental da atividade microbiana sobre o óleo Diesel e hidrocarbonetos utilizados. Os resultados mostraram que houve a ocorrência da utilização de compostos

como o Docosano-C22, Antraceno e Fenantreno pelo consórcio, o maior consumo observado foi para o Docosano. Após o vigésimo dia de análises, constatou-se a redução da tensão superficial. A significativa redução da mesma, atingida próxima a fase de morte celular microbiana, bem como o potencial para biodegradação principalmente de cadeias alifáticas e aromáticas do óleo diesel sugerem que o consórcio microbiano possui potencial para biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos.

Palavras-chave: Óleo diesel, biorremediação, microrganismos e consorcio microbiano.

Evaluation of Crude Glycerin in the stimulation of bacteria for Bioremediation of hydrocarbon-contaminated areas

Abstract:

The oil industry moves annually trillions of dollars and consolidates itself as the main source of world energy. Derivatives have intense application in energy generation, as well as in the petrochemical industry. Despite the economic importance of the segment, the environmental pollution caused by petroleum, oils and greases represents a worldwide problem, which every year increases considerably. . In Brazil, the Diesel oil is the major consumed derivative and the country experiences a cost-effective ancestry inherent industry having aroused the attention of the society for environmental impacts provided by oil spills. Crude glycerine (GB) has been used experimentally in advanced oil recovery, showing promise for removal of branched and linear paraffins, with potential for biostimulation devices of microbial metabolism. The industrial interest in biotechnology and the recognition of its importance by all industrialized countries make emerging the need for new technologies. Greatest stimulus to the study of the growth of microorganisms in the presence of hydrocarbons is the possible use of these organisms in the treatment of environmental pollution by oily compounds. This study assessed the biodegradability of diesel using the GB as a bio stimulator of hydrocarbonoclastic bacteria to remediation of soils contaminated with hydrocarbons. The isolated (CCMICS 109) and microorganisms proceeding from diesel had been selected for this study. To analyze bacterial growth, a minimum medium was prepared (M.M) containing GB as bio stimulator, and Diesel oil as carbon source. Chromatographic and surface tension methods were used to evaluate the microbial activity of hydrocarbons degradation present in the Diesel oil.

. The results showed that there was the occurrence of the use of compounds like Docosano-C22, Anthracene and Phenanthrene by the Consortium. The largest consumption was observed for the Docosano. After the 11th day of analysis it was evidenced the reduction of surface tension. The significant same reduction reached at the end of stationary phase of microbial cellular growth, as well as the potential for biodegradation mainly of aliphatic and aromatic chains of the oil diesel. Last results suggested the potential of this microbial process for bioremediation of ground contaminated with hydro-carbons.

KEYWORDS: Oil Diesel, Bioremediation, Micro-organisms and microbial consortium.

INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por derivados de petróleo, óleos e graxas é um problema de escala mundial e a cada ano aumenta bruscamente a quantidade de resíduos oleosos emitidos por indústrias de diversos ramos (CARVALHO et al.; 2005). O setor petrolífero movimenta anualmente trilhões de dólares e consolida-se como a principal fonte de energia mundial, gerando 40% de toda energia que alimenta o planeta. Seus derivados têm intensa aplicação na geração de energia, bem como na indústria petroquímica. No Brasil, o óleo Diesel é o derivado mais consumido, estimado a 34% do total. O país viveu um momento de crescimento econômico inerente ao setor e tem despertado atenção da sociedade com os impactos ambientais proporcionados pelos derramamentos de óleo decorrentes de atividades operacionais como extração, transporte e armazenamento (SHARLAND, 2001).

O interesse industrial na biotecnologia e o reconhecimento de sua importância por todos os países industrializados do mundo possibilitam modificações no tratamento de efluentes e torna emergente a necessidade de novas tecnologias. Sendo assim o maior estímulo para o estudo do crescimento de microrganismos na presença de hidrocarbonetos consiste na possível utilização destes organismos no tratamento da poluição do meio ambiente por compostos oleosos. (CARVALHO et al.; 2005).

A glicerina bruta (GB) tem sido empregada experimentalmente na recuperação avançada de petróleo mostrando-se como um método promissor para remoção de parafinas lineares e ramificadas. O uso da GB para remoção de parafinas pode viabilizar comercialmente as energias renováveis, pois o mesmo possui uma capacidade limitada de absorção em grandes quantidades pelos mercados tradicionais. Outra alternativa seria a descoberta de novas aplicações da GB a partir do metabolismo microbiano para a

produção de surfactantes, o que possibilitaria novas aplicações para o aproveitamento da GB e garantindo a sustentabilidade da operação do biodiesel.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água como os hidrocarbonetos, gorduras, óleos e graxas, usualmente produzem biosurfactantes que auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana através das emulsões formadas (CARVALHO et al.; 2005).

O Presente trabalho tem por objetivo avaliar a biodegradabilidade do óleo diesel utilizando a glicerina Bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Neste trabalho foi realizado um estudo para viabilizar análises do consorcio microbiológico entre a linhagem de *Pseudomonas Fluorescens*. (CCMICS 109) (GenBank, Access No. AF125317) cedida pelo banco de microrganismos do LABEM, isolada do solo rizosférico de *Actinocephalus* spp., no Parque Municipal de Mucugê, Município de Mucugê, Bahia, Brasil e microrganismos encontrados no óleo diesel, como bactérias e alguns tipos de fungos, que tiveram de certo modo alguma participação no processo aqui descrito. Dessa forma, seria conveniente, em outro trabalho, explorar melhor o papel desses microrganismos no processo de biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos.

. Após ser retirada do solo a linhagem bacteriana foi mantida no meio *tryptic soy broth* (TSB) com 15% de glicerol a -80°C, no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de

Microrganismos da Universidade Federal da Bahia. Para reativação, retirou-se o mesmo da geladeira a -80°C deixando por mais 30 minutos em congelador a -20°C e posteriormente mais 20 minutos na geladeira a 4°C , posteriormente transferiu-se 500 microlitros (μL) do isolado para 9,5 mililitros (mL) de (TSB) deixando a solução na estufa por 24 horas a 30°C , observando crescimento bacteriano através da turvação do meio, em seguida retirou-se um mililitro do pré-inoculo e com auxílio de alças descartáveis semeou-se em placas de petri contendo *tryptic soy agar* (TSA), novamente permanecendo em estufa a 30°C por 24 horas. Foram realizados dois repiques em TSA para manutenção e purificação da colônia.

Em seguida com auxílio da alça de platina foi retirada uma alçada dos microrganismos semeados anteriormente nas placas com TSA e transferido para erlenmeyers de 300 mililitros contendo 50 mililitros de meio TSB, garantindo uma aeração de (1/6) sendo em seguida incubados em agitador orbital a 30°C e 120 rotações por minuto (rpm) por 24 horas, Após esse procedimento, um volume de 1ml constituiu o inoculo que foi adicionado a erlenmeyers de 500 mililitros contendo 250 mililitros de meio mínimo (M.M). Durante esse ensaio foram realizados testes preliminares de espectrofotometria que visavam comprovar ou não a existência de um consórcio entre a CCMICS 109 e microrganismos provenientes do óleo diesel.

Para os ensaios de biodegradação foram estipulados valores fixos de Glicerina Bruta e Óleo Diesel guardando sempre as proporções de (1 e 3) % respectivamente para valores totais. Para o primeiro ensaio, sem adição da CCMICS 109 foram realizados testes envolvendo apenas meio mínimo e óleo diesel (Não esterilizado). Para o segundo ensaio utilizou-se meio mínimo, óleo diesel (Não esterilizado) e a bactéria CCMICS 109. O terceiro ensaio foi realizado com meio mínimo, Diesel (Não esterilizado), GB (Estéril). Todos estes ensaios foram incubados em agitador orbital a 30°C e 180 rpm durante 11

dias, de onde foram retiradas alíquotas (25mL), a intervalos regulares, para as análises cromatográficas, de tensão superficial, dosagem indireta de glicerol, densidade Ótica e Índice de Emulsificação.

O processo de degradação de alcanos foi avaliado por cromatografia gasosa capilar (Varian 3900GC) acoplada a um detector por ionização em chama (FID). O fluxo do gás do injetor, hidrogênio, foi mantido a vazão de 5,0 mL.min⁻¹, a coluna capilar usada foi CP-SIL 5 CB (CP 8741) a 100% de polidimetilsiloxano. A temperatura do injetor foi mantida a 180°C, e do detector a 250°C, a temperatura inicial do forno foi de 150°C, com uma taxa de aquecimento de 50°C/ minuto, chegando a 300°C. O tempo total de cada corrida cromatográfica foi de 6,5 minutos.

As amostras que seguiram para análise cromatográfica foram submetidas à centrifugação por 30 minutos a 4000 rpm a fim de eliminar todo o precipitado formado durante o processo, estas foram diluídas em 0,5 ml de heptano, mantendo as devidas proporções para cada amostra.

A injeção de 1 mL da amostra foi feita através de micro-seringa, sendo realizado inicialmente um controle (0,5mL de diesel + 0,5mL de heptano) para padronização do método, os testes foram realizados em triplicata.

A fim de verificar uma fonte alternativa de substrato para os microrganismos em estudo foram utilizadas amostras de glicerina bruta que tiveram origem do processo de produção de biodiesel com óleo de soja como matéria-prima, proveniente da usina PETROBRAS Biocombustível S.A. (Candeias, Bahia, Brasil). A Glicerina de soja foi utilizada como substrato paralelo ao óleo diesel, para bioestimulação microbiana, com porcentagem estipulada em 1% em meio de cultura Meio Mínimo. Para determinação da concentração da Glicerina Bruta foram realizados testes com sistemas enzimáticos. E após a centrifugação da cultura, 20 µL do sobrenadante e 2 mL do reagente de cor

tampão (PIPES) 45 mmol foram misturados em tubos teste (5 mL). O branco consistiu em 2 mL do reagente de cor e o padrão 2 mL do reagente de cor mais 20 µL da solução padrão de glicerol (200 mg/dL). As amostras permaneceram em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente (20-30°C). Procedendo-se à leitura das absorbâncias no espectrofotômetro (Vitor) em 510-530 nanômetros (nm), zerando o aparelho com o branco. A cor desenvolvida permaneceu estável por 60 minutos a temperatura ambiente. Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizada análise de componentes principais, dendogramas e gráficos Box Plot. Estas análises reduzem o número de variáveis a poucas dimensões com um mínimo de perda de informações, permitindo a detecção dos principais padrões de similaridade e de correlação entre as variáveis. Os programas *Canoco 4.5* e *Statistica 7.0* foram utilizados para melhor interpretação dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos acima citados propiciaram a realização de três ensaios sobre o processo do uso da glicerina bruta, como fonte de carbono. A suspensão, constituída por microrganismos oriundos do óleo diesel associado à CCMICS 109, foram utilizados como inóculo nesses ensaios. Os hidrocarbonetos Docosano, Antraceno e Fenantreno foram selecionados, neste estudo, como indicadores do processo de biodegradação por estarem presentes em todas as análises cromatográficas representadas neste trabalho. Ao analisar os resultados referentes ao primeiro ensaio, o nível de degradação do Antraceno e o Fenantreno, detectaram-se maiores índices nos dois primeiros dias de análise, evidenciando que o ápice do consumo é atingido durante a fase de crescimento exponencial logarítmico bacteriano, obtendo decaimento entre o sexto e o décimo primeiro dia, provavelmente ocasionado pelo esgotamento do substrato. Infere-se ainda que exista uma preferência inicial do consórcio pelo antraceno, motivada pela

conformação dos seus três anéis, rearranjados de forma linear, enquanto que seu isômero, fenantreno apresenta um dos seus anéis aromáticos não arranjados linearmente em relação aos demais, tornando o processo de degradação mais lento e oneroso pelos microrganismos, como pode ser percebido nas fig. (6 e 7). A degradação microbiana desses compostos esta inversamente relacionada com o aumento do numero de anéis e com a baixa solubilidade em água (JACQUES, 2005).



FIGURA 6. Nível de degradação do Antraceno ao longo de onze dias de análise.



FIGURA 7. Nível de degradação do Fenantreno ao longo de onze dias de análise.

O segundo ensaio envolvendo a presença do consórcio microbiano oriundos do óleo diesel associado a (CCMICS 109) degradaram rapidamente as cadeias do C22,

atingindo o ápice do consumo no sexto dia de análises como pode ser visto na figura 8. Pode-se inferir que entre o sexto e o décimo primeiro dia houve uma degradação bastante sutil do docosano, fato que poderia estar correlacionado ao próprio consumo deste hidrocarboneto, acarretando então formação de metabolitos tóxicos, limitação ou esgotamento de nutrientes ao metabolismo microbiano, ou a oxigenação superficial fornecida ao meio pela agitação dos frascos que por ventura poderia ter deixado de ser eficaz (GOLDSTEIN et al.; 1985).

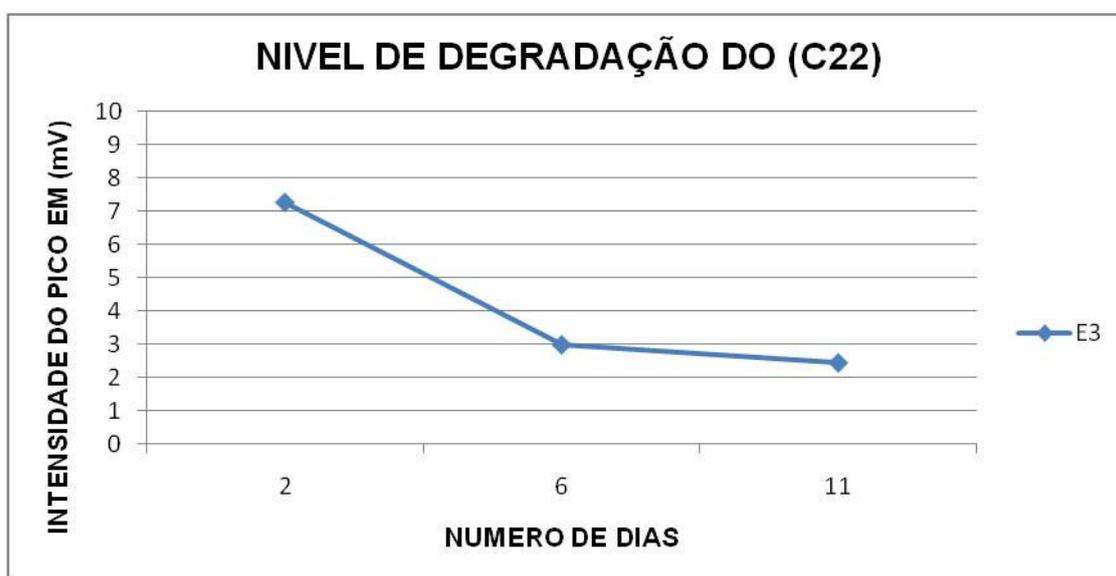


FIGURA 8. Nível de degradação do Docosano-(C22) ao longo de onze dias de análise.

Os níveis de degradação de Docosano (C22), Antraceno e Fenantreno atingidos após análises referentes ao segundo ensaio, podem ser observados através dos perfis cromatográficos visualizados na (figura 9). Constata-se a ocorrência da utilização destes compostos pelo consórcio microbiano através da análise cromatográfica entre 2 e 11 dias e subsequente diminuição da intensidade do pico.

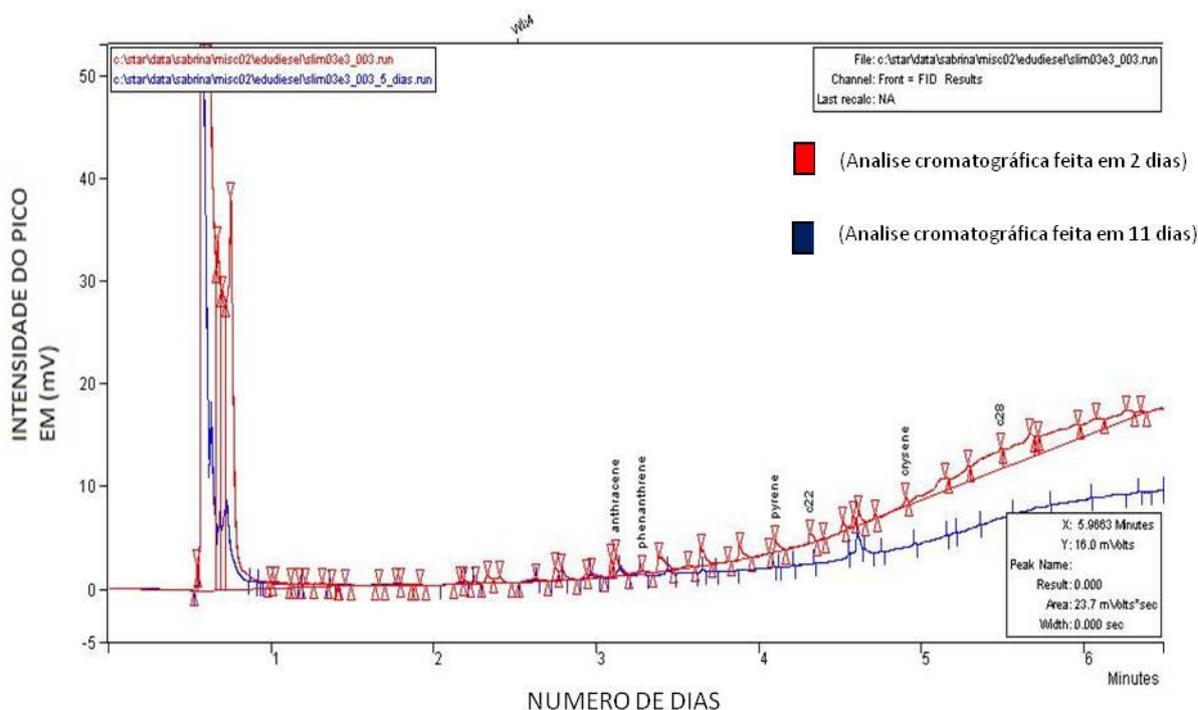


FIGURA 9. Perfil cromatográfico comparativo (Nível de degradação- Docasano (C22), Antraceno e Fenantreno em 2 e 11 dias das análises).

Ao analisar a fig. (10) referente a media da degradação dos três compostos Docosano, Antraceno e Fenantreno, foi observado maior consumo do C22, pois ele é mais susceptível a biodegradação que os de maior tamanho. Este fenômeno está relacionado com as propriedades lipossolubilizantes apresentadas por hidrocarbonetos de cadeia curta, com o aumento da cadeia carbônica, estes compostos tornam-se menos disponíveis ao ataque microbiano devido à hidrofobicidade, dificultando assim a biodegradação. É provável que estes microrganismos comecem a degradar os compostos aromáticos, a partir do momento que ocorre diminuição da disponibilidade de cadeias alifáticas (JACQUES, 2005).

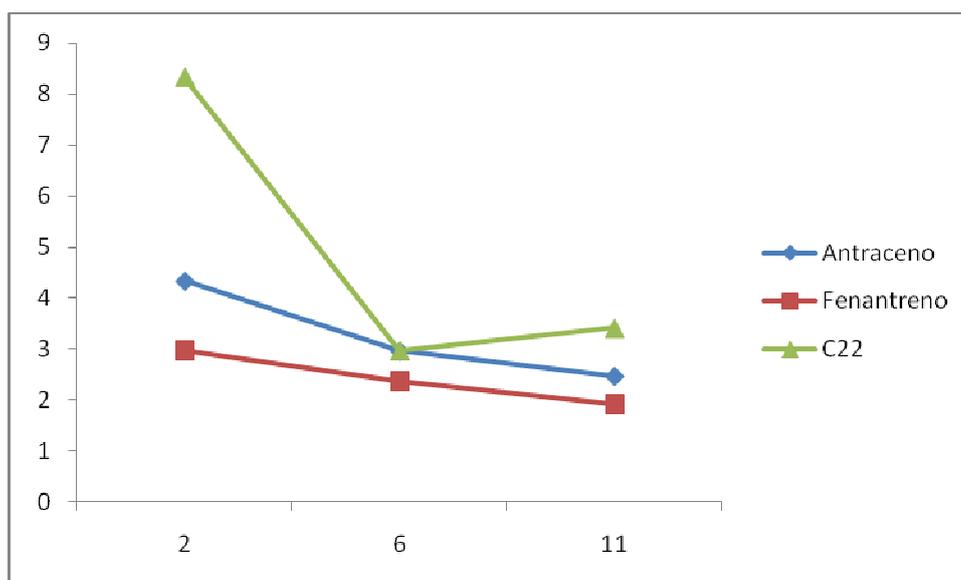


FIGURA 10. Média da degradação dos compostos (Docosano, Antraceno e Fenantreno) respectivamente, pela linhagem da (CCMICS 109) e microrganismos do diesel inoculados em Meio Mínimo.

Ao observar a fig. (11) e os resultados referentes ao terceiro ensaio, pode-se inferir que a partir do momento que se inicia a fase de crescimento celular há a necessidade do aumento no consumo da fonte de carbono secundária no caso em questão da Glicerina Bruta, o que reforça a hipótese de cometabolismo realizada por alguns tipos de fungos que muitas vezes tem maiores possibilidades de realizarem a oxidação inicial dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), isto pode ser explicado pela capacidade das suas hifas em alongar-se na direção destes compostos assim como, suas exoenzimas poderem difundir-se e buscar o substrato (JACQUES, 2005). Sendo assim, os intermediários oxidados resultantes do metabolismo fúngico dos HPAs estão mais disponíveis a comunidade microbiana do que os próprios HPAs, entretanto estes compostos resultantes do metabolismo fúngico não são suficientes para atender a

demanda nutricional de um consórcio microbiano, fazendo então necessário o consumo da Glicerina Bruta.

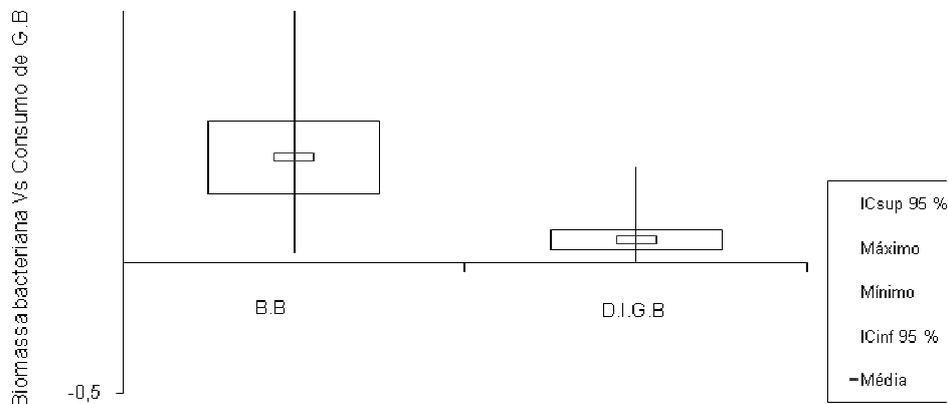


FIGURA 11. Consumo de Glicerina Bruta versus crescimento microbiano.

Análises das variáveis

A análise da (fig. 12) referente à linhagem CCMICS 109 permite verificar a formação de dois grupos principais, são eles: Índice de degradação do Fenantreno, Antraceno, Docosano, Glicerina Bruta e o segundo formado por Biomassa Bacteriana e Tensão superficial. Segundo Bueno (2008) a redução da tensão superficial e índice de emulsificação estão relacionados diretamente a produção de biossurfactantes que por outro lado esta ligada diretamente ao crescimento bacteriano.

Pode-se inferir ainda que a similaridade entre as quatro variáveis denote forte correlação, levando a hipótese que os microrganismos possam ter utilizado a segunda fonte de carbono (Glicerina Bruta) para sustentar o seu crescimento e reprodução enquanto os hidrocarbonetos do óleo diesel Docosano, Antraceno e Fenantreno eram degradados simultaneamente.

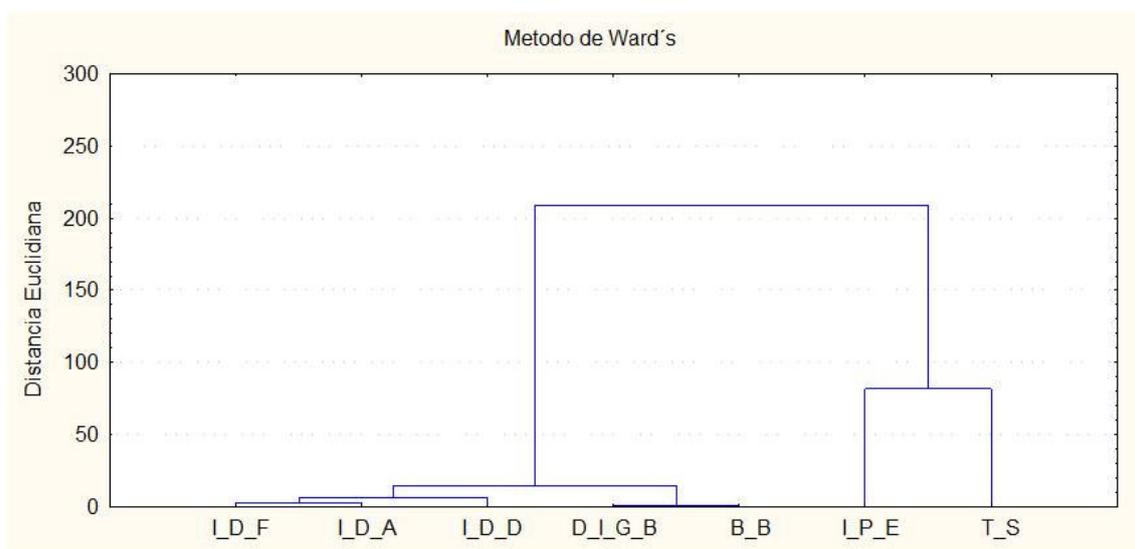


FIGURA 12. Similaridade entre as variáveis: Índice de degradação do Fenantreno, Antraceno, Docosano, Glicerina Bruta, Biomassa Bacteriana e Tensão superficial.

A (fig. 13) mostra o dendrograma referente ao consórcio de microrganismos estudados, reforçando a hipótese de similaridade entre a diminuição da tensão superficial e o índice de emulsificação de modo que podemos ter uma visão bidimensional de todo o conjunto de amostras utilizadas no estudo.

Infer-se ainda que estes microrganismos possam estar apresentando maior capacidade para degradação de hidrocarbonetos por cometabolismo, do que simplesmente pelo emprego direto dos contaminantes utilizados como fonte de carbono. Isto implica dizer que as enzimas que tem capacidade de degradar hidrocarbonetos sejam induzidas por estímulos nutricionais (Glicerina Bruta) e façam parte do metabolismo secundário podendo assim atuar independentemente da natureza e concentração do hidrocarboneto a ser degradado (LEMOS et al.; 2008).

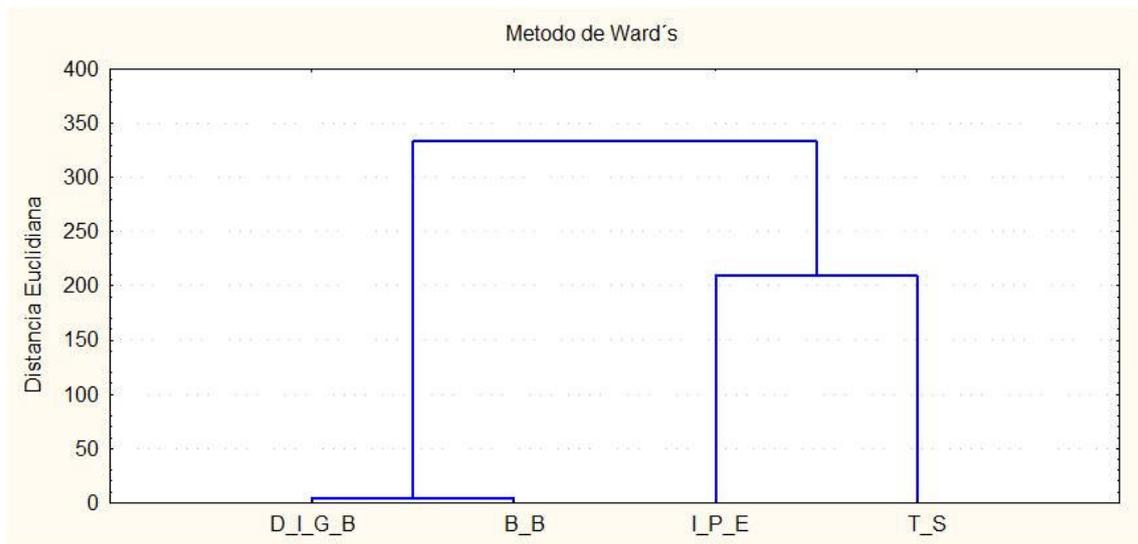


FIGURA 13. Similaridade entre as variáveis: Índice de degradação Glicerina Bruta, Biomassa Bacteriana, Produção de emulsificação e Tensão superficial.

Análise de Componentes Principais

A fig. 14 exibe a análise de componentes principais da linhagem CCMICS 109. A análise dos dados referentes à componente principal (1) versus a componente principal (2) explica 99.9% da variação total dos dados sendo que a primeira componente principal explica 99.4% de variância total dos dados. Deste modo, a análise de componentes principais em combinação com a análise de agrupamento hierárquico mostra o seguinte quadro: A amostra (1) da CCMICS 109 realizada no primeiro dia das análises evidencia maior consumo de Glicerina Bruta, Docosano, Antraceno e Fenantreno, enquanto as análises referentes ao terceiro dia denotam maior crescimento bacteriano aliado ao aumento da produção de emulsificação, seguido de perto pela diminuição da tensão superficial, como se pode observar através das análises das amostras 3, 4, 5 e 6 que pouco se assemelham a amostra 2.

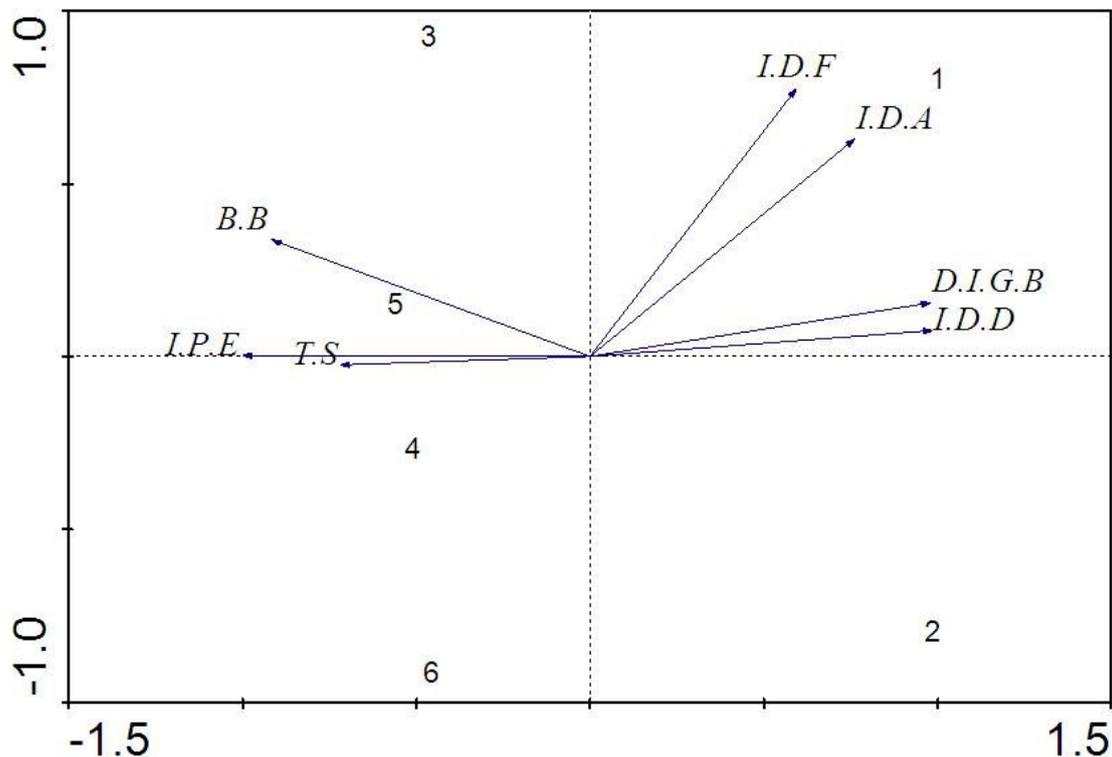


FIGURA 14. Análise de componentes principais do isolado (CCMICS 109).

A (fig. 15) mostra o gráfico da análise de componentes principais referente ao consórcio de microrganismos encontrados para estes ensaios. A análise da componente principal (1) *versus* a componente principal (2) explica 99.4% da variação total dos dados. Sendo que primeira componente principal explica 97.1% da variação total dos dados, o que reforça a idéia do consumo da glicerina bruta estar diretamente relacionado ao crescimento microbiano, com a particularidade, neste caso, de que a degradação do diesel, pode ter acontecido por cometabolismo, uma vez que não foi inoculada a bactéria CCMICS 109 em alguns dos testes realizados, ainda assim foi percebida a degradação do óleo diesel. Outra possibilidade poderia estar relacionada ao fato de que alguns fungos encontrados neste trabalho devam estar consumindo a segunda fonte de carbono adicionada (Glicerina Bruta), para garantir o seu crescimento celular, para só

então começar a degradar o óleo, isso tudo leva a crer que cada microrganismo possui uma ferramenta particular que os caracteriza e provavelmente, contribui de forma favorável para o convívio no seu habitat. Por fim, além da mineralização dos HPAs os prováveis fungos podem estar produzindo compostos altamente solúveis em água, aumentando a sua reatividade química podendo de certa forma facilitar o ataque por parte de bactérias provenientes do óleo diesel, que por sua vez irão utilizar a Glicerina Bruta como fonte de carbono, reiniciando assim, o ciclo (LEMOS et al.; 2008).

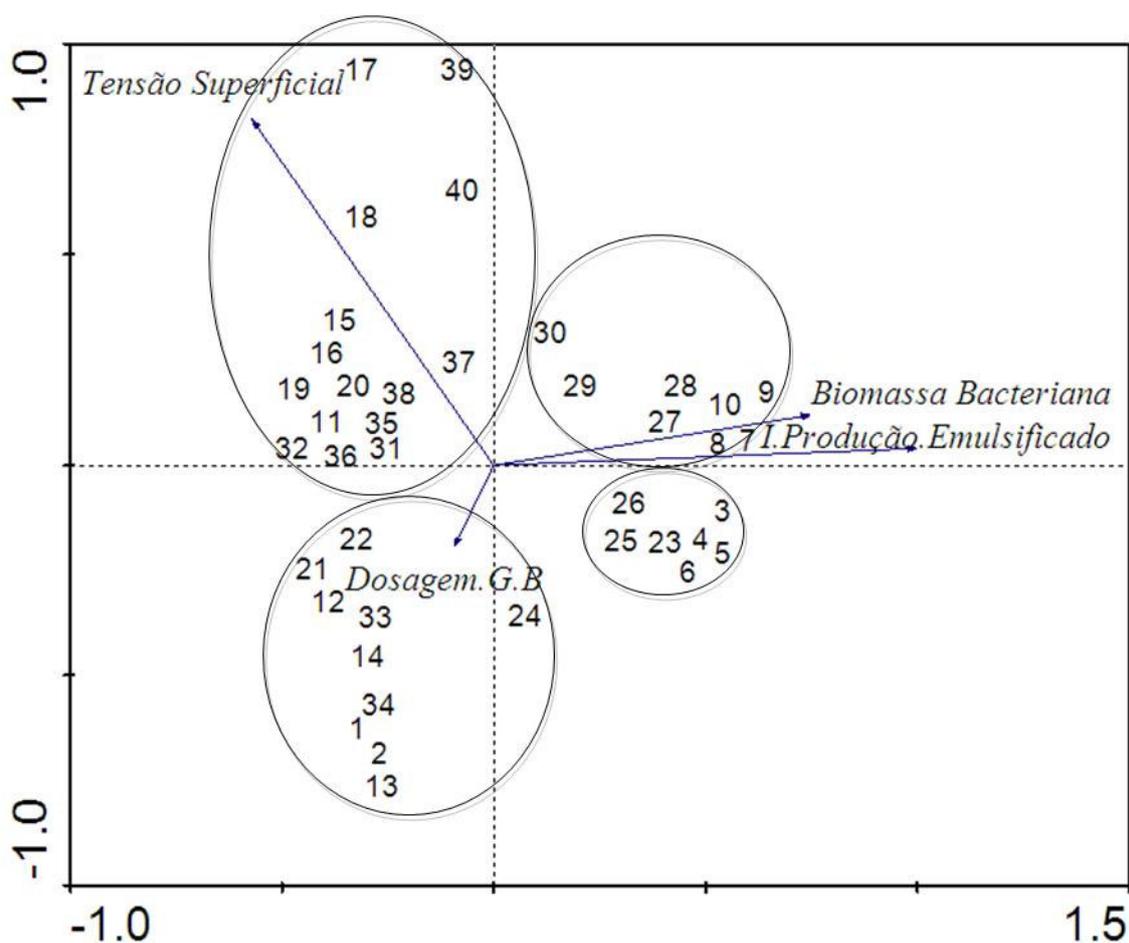


FIGURA 15. Análise de componentes principais referente ao consórcio microbiano.

Agradecimentos

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de pós graduação, a FINEP e PETROBRAS pelo financiamento do projeto.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo.** 2008. 180f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Programa de pós-graduação Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, São Paulo, 2008.

CARVALHO, D. F.; MARCHI, D. D. ; DURRANT, L. R **XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia,** Santos – SP , 2005.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti. **Biorremediação de Antraceno, Fenantreno e Pireno em um argilossolo.** 2005. 171f. Tese (Doutorado de agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LEMOS, J. B.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, S.; REICHE, A. **Fungos Filamentosos: Agentes de Degradação de Petróleo e de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.** Serie tecnológica Ambiental. 2008. 56p.

SHARLAND, E.M. R. **Estrutura, poder, influencia e interações- Estudos de casos: setor de petróleo.** 2001. 28p. Tese (Doutorado em ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

5 CONCLUSÃO

Observou-se a ocorrência da utilização de compostos como o Docosano-C22, Antraceno e Fenantreno pelo consórcio, O maior consumo observado foi para o Docosano, seguido pelo Antraceno e por fim Fenantreno, isso esta relacionado ao tamanho e conformação das cadeias carbônicas.

Segundo os resultados apresentados, a bactéria CCMICS 109 inoculada no petroderivado em questão, promoveu a degradação de Docosano, gerando metabolitos secundários que estimularam o crescimento fúngico, por sua vez estes, consumiram a segunda fonte de carbono adicionada (Glicerina Bruta), garantindo seu crescimento celular, para então degradarem moléculas mais complexas como Antraceno e Fenantreno, portanto conclui-se que estes microrganismos apresentam maior capacidade para degradação de hidrocarbonetos por cometabolismo, do que simplesmente pelo emprego direto dos contaminantes utilizados como fonte de carbono. Isto implica dizer que as enzimas que tem capacidade para degradar hidrocarbonetos sejam induzidas por estímulos nutricionais (Glicerina Bruta) fazendo parte do metabolismo secundário atuando independentemente da natureza e concentração do hidrocarboneto a ser degradado. Conclui-se ainda que os fungos estejam produzindo compostos altamente solúveis em água, aumentando a sua reatividade química, facilitando o ataque por parte da CCMICS 109 ao óleo diesel.

Apos o décimo primeiro dia de análises, constata-se a redução da tensão superficial. Tendo os microrganismos provenientes do óleo diesel somados à CCMICS 109 como principais redutores, superando resultados sem a presença da bactéria. A significativa redução da tensão superficial atingida próxima a fase de morte celular microbiana, seguido pelo o excelente índice para produção de emulsificação, bem como o potencial para biodegradação principalmente de cadeias alifáticas e aromáticas do óleo diesel sugere que o consórcio microbiano possui potencial para biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos.

6 PESPECTIVAS

Testar outras concentrações de Óleo Diesel.

Testar outras concentrações de Glicerina Bruta de soja.

Detectar quais os tipos de microrganismos encontrados no óleo Diesel.

Quantificar os níveis de degradação do Docosano, Antraceno e Fenantreno.

Avaliar o potencial para utilização de técnicas em biorremediação, caso ocorra derramamento de óleo diesel no meio ambiente, compreendendo os aspectos ambientais e socioeconômicos.

Realizar testes toxicológicos com as amostras utilizadas neste estudo, a fim de evitar possíveis danos ao meio ambiente.

7 REFERÊNCIAS

ALEXANDER. **Biorremediação de Antraceno, Fenantreno e Pireno em um Argissolo**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade federal do Rio Grande do Sul “Rodrigo Josemar Seminoti Jacques”, Campus de São José do Rio Preto, SP. 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informações e documentos: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

BALBA, M. et al. Bioremediation of oil-contaminated desert soil; the Kuwait experience. **Environmental International**, Kuwait, v. 24, n. 1-2, p. 163-173, 2001.

BANAT, I.M. et al. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Kuwait, 2002.

BIODIESELBRASIL. **Biodiesel inunda mercado no país e derruba preços**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/glicerina-biodiesel-inunda-mercado-pais-derruba-precos-02-05-07.htm>>. Acesso em: 10 Dez. 2010.

BONAVENTURA, C; JOHNSON F.M. Healthy environments for healthy people; Bioremediation today and tomorrow. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 5-20, 1997.

BOGNOLO. G, **Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons**, Elsevier Science Ltda, 1998.

BONOTTO, D. ANGELIS, D. MARIANO, A. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v.12 n.3 Jul/Set. 2007.

BRISSON, D. et al. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes. **BioEssays**, p 534-542, 2001.

BROWN, L.R. Oil-degrading microorganisms. **Chemical Engineering Progress**, p. 35-40, 2001.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Programa de pós-graduação Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, São Paulo, 2008.

CASTIOGLIONI, G. L **Modelagem e simulação da produção de biossurfactantes e lipase por fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande. Porto Alegre, 2006.

CEPETRO: banco de dados. Disponível em: <<http://www.cepetro.unicamp.br/noticias/onlinecepetro2002/out2002>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

CHAVEZ, J. D. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos.** Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

COOPER, D; Goldenberg, B. (1987) *Appl. Environmental Microbiol.* 1987. 224-229p.

CURY, J. C **Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo.** 2002. 95p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of Microbial Surfactants. **Biotechnology Advances**, p. 241-252, 2000.

FERNANDES, F.M., ALCÂNTARA, G. Z. Biorremediação de solos – estado da arte. In: REUNIÃO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO MEIO AMBIENTE, 2. **Anais...** 1998.

FIECHTERA. Biosurfactantes: moving towards industrial application. **Trends in Food Science and Technology**, p. 283-293, 1992.

FRIEDRICH, S.A. **Worldwide review of the commercial production of biodiesel.** A Technological, economic and ecological investigation based on case studies. Institute for Technology and Sustainable Product Management, Áustria, 2004.

GALLEGO, J.L.R.; MARTÍN, J.S. Biorremediación, Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido Del Prestige. In: MACIAS, F. (Ed). **Industria y Minería**, 2003. 17-22 p.

GANCEDO, C; GANCEDO, J.M; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. **Journal of Biochemistry**, v.6, n.2, p. 165-172., 2000.

GURGEL, B. S. **Avaliação de impactos ambientais por estudo geoquímico na bacia do córrego rico.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília – Instituto de Geociências - Departamento de geoquímica e recursos minerais. Paracatu, 2007. 136p

Henry, J.B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.** 19 ed., p. 216-217, 1996.

IQBAL, K. et al. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: Decrease in Alzheimer disease brain. **J Neurochem.**, v.65, 732 p., 1995.

ITO, T. et al. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.3, 260-265 p., 2005.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti. **Biorremediação de Antraceno, Fenantreno e Pireno em um argilossolo**. 2005. 171f. Tese (Doutorado de agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. **Microbial production of biosurfactants and their importance**. Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India, 1999.

LANGS, S.; WULLBRANT. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and applications potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p. 22-32, 1999.

LEMONS, J. B.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, S.; REICHE, A. **Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. 2008, 56p. (Série tecnológica Ambiental; ISSN 0103-7374).

LIMA, A. et al. **Biocologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3.

MARRAY, P. et al. **Microbiologia médica**. Espanha: Elsevier Science, 2002. 810 p.

MARCHI, D. D.; CARVALHO, D.F, DURRANT, R.L; **Production of Bacterial Biosurfactants in Vegetable and Derived of Petroleum**. Campinas: Dca/Fea-Unicamp - Campinas São Paulo, 2002.

MARTÍN, J.S.; GALLEGRO, J. L.R. Fundamentos y aspectos microbiológicos – Biorremediación. In: MACÍAS, F. (Ed). **Industria y Minería**, 2003. 12-16 p.

MELO, Itamar Soares; AZEVEDO, João Lúcio. **Microbiologia ambiental: degradação de pesticidas**. Jaguariúna: EMBRAPA. CNPMA. 2000. 440p. (Documentos, 11).

MENEGOL S.; MUCELIN C.A.; JUCHEN C.R. Avaliação das características físico-químicas do leito do Rio Alegria. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOQUÍMICA E CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 8. **Anais...** ABAS/PE, DNMPM, 2003. p. 47-64.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Central pathways of carbohydrate metabolism. In: MOAT, A.G.; FOSTER, J.W; SPECTOR, M.P. (Eds). **Microbial physiology**. New York: Wiley-Liss, 2002. 363 p.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v.60, p. 371-380, 2001.

NEVE, E. et al. **Biosurfactantes**. Florianópolis, Santa Catarina, Agosto 2004.

NITSCHKE, Marcia.; PASTORE, Maria Gláucia. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, . n. 5, p. 772-776.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2004. p. 298-299.

PIRÔLLO, Maria P. Santos. **Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Instituto de Biociências – UNESP. Rio Claro, 2006.

PRINCE, R. C. **Biodegradabilidade de óleo Diesel, por microrganismos nativos da areia da praia de Suape-PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2003.

RICHARD, J.Y; VOGEL, T.M. **Biodegradabilidade de óleo Diesel, por microrganismos nativos da areia da praia de Suape-PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2003.

RODRIGUES, Débora Frigi. **Caracterização Polifásica da Biodiversidade de Isolados Degradadores de Poluentes Xenobióticos na Baixada Santista**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ROLING, W. F.M.; HEAD, Y. M.; LATER, S. R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, p. 321-328, 2003.

SANTOS, Antônio Silveira. **Bioprospecção: considerações gerais**. v. 4, n. 44, São Paulo, 2000.

SHARLAND, E.M. R. **Estrutura, poder, influencia e interações - estudos de casos: setor de petróleo**. 2001. 28p. Tese (Doutorado em ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical Sciences. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. .3, p. 142-146, 2004.

SOARES, M.C.C. et al. **Análise geoquímica dos sedimentos de fundo do Arroio Salso**. Porto Alegre, 2004, p. 39-50.

THOMPSON, J.C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering and Agriculture**, v. 22, p. 261-265, 2006.

TURKOVSKAYA, O.V.; DMITRIEVA, T.V.; MURATOVA, A.Y. A Biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* **Strain Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 71-75, 1999.

WIDDEL, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 259-276, 2001.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinions on Biotechnology**, v. 18, p. 213, 2007.

YONG, K.C. et al. Refining of crude glycerin recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. **Journal of Oil Palm Research**, v. 13, p. 39-44, 2001.

9 APÊNDICE

Análise de Tensão Superficial

Segundo Bueno (2008) a diminuição da tensão superficial e índice de emulsificação estão relacionados diretamente a produção de biossurfactantes, que por sua vez é diretamente proporcional ao crescimento bacteriano. Os dados para tensão superficial foram coletados inicialmente nos três primeiros dias de incubação em agitador orbital e posteriormente de cinco em cinco dias.

Nota-se que após onze dias de análises houve redução da tensão superficial, como pode ser observado nas (tabelas 2 e 3). Ressalta-se que neste período as bactérias já estavam atingindo a fase de morte celular, ainda assim os resultados referentes à redução da tensão superficial são bastante significativos. Os testes realizados sugerem que a linhagem CCMICS 109 foi capaz de reduzir a tensão superficial, que inicialmente apresentavam valores de controle iguais a de (65,73 mN/m e 65,35 mN/m) chegando a resultados de (26,21 mN/m e 26,44 mN/m) técnicas de Huh-Mason e Zuidema-Waters respectivamente.

TABELA 2- Método para calculo de correção fatorial (Huh-Mason).

Isolados Triplicatas	Dias	Tensão superficial do meio (M.M)	Tensão superficial água
(Controle)	Primeiro Dia	65,73 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Primeiro Dia	28,07 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Segundo Dia	27,75 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Terceiro Dia	26,21 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Oitavo Dia	28,69 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Décimo Primeiro Dia	29,47 mN/m	71,60 mN/m

TABELA 3 - Método para calculo de correção fatorial (Zuidema-Waters).

Isolados Triplicatas	Dias	Tensão superficial do meio (M.M)	Tensão superficial água
(Controle)	Primeiro Dia	65,35 mN/m	69,81 mN/m
CCMICS 109	Primeiro Dia	28,26 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Segundo Dia	27,96 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Terceiro Dia	26,44 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Oitavo Dia	28,87 mN/m	71,60 mN/m
CCMICS 109	Décimo Primeiro Dia	29,63 mN/m	71,60 mN/m

Segundo os resultados, parece existir, um tipo específico de fungo ainda não identificado neste trabalho, que apresenta efeito antagônico a CCMICS 109, sendo por isso realizado uma batelada de testes sem a presença da linhagem CCMICS 109 em alguns meios, a fim de avaliar a capacidade do consórcio microbiano em reduzir ou não a tensão superficial. Os resultados permitiram inferir que os microrganismos oriundos do óleo diesel foram capazes de reduzir a tensão superficial, que inicialmente apresentavam valores de controle iguais a de (65,73 mN/m e 65,35 mN/m) chegando a resultados de (32,92 mN/m e 33,67 mN/m) técnicas de Huh-Mason e Zuidema-Waters respectivamente.

De acordo com os dados apresentados e conforme mostra as tabelas (4 e 5), a hipótese mais provável é que este fungo deva estar consumindo a segunda fonte de carbono adicionada (Glicerina Bruta), estimulando a produção de compostos solúveis em água, que acarretaria aumento de reatividade química facilitando de certa forma o crescimento por parte de bactérias provenientes do óleo diesel que por sua vez levaria a redução da tensão superficial.

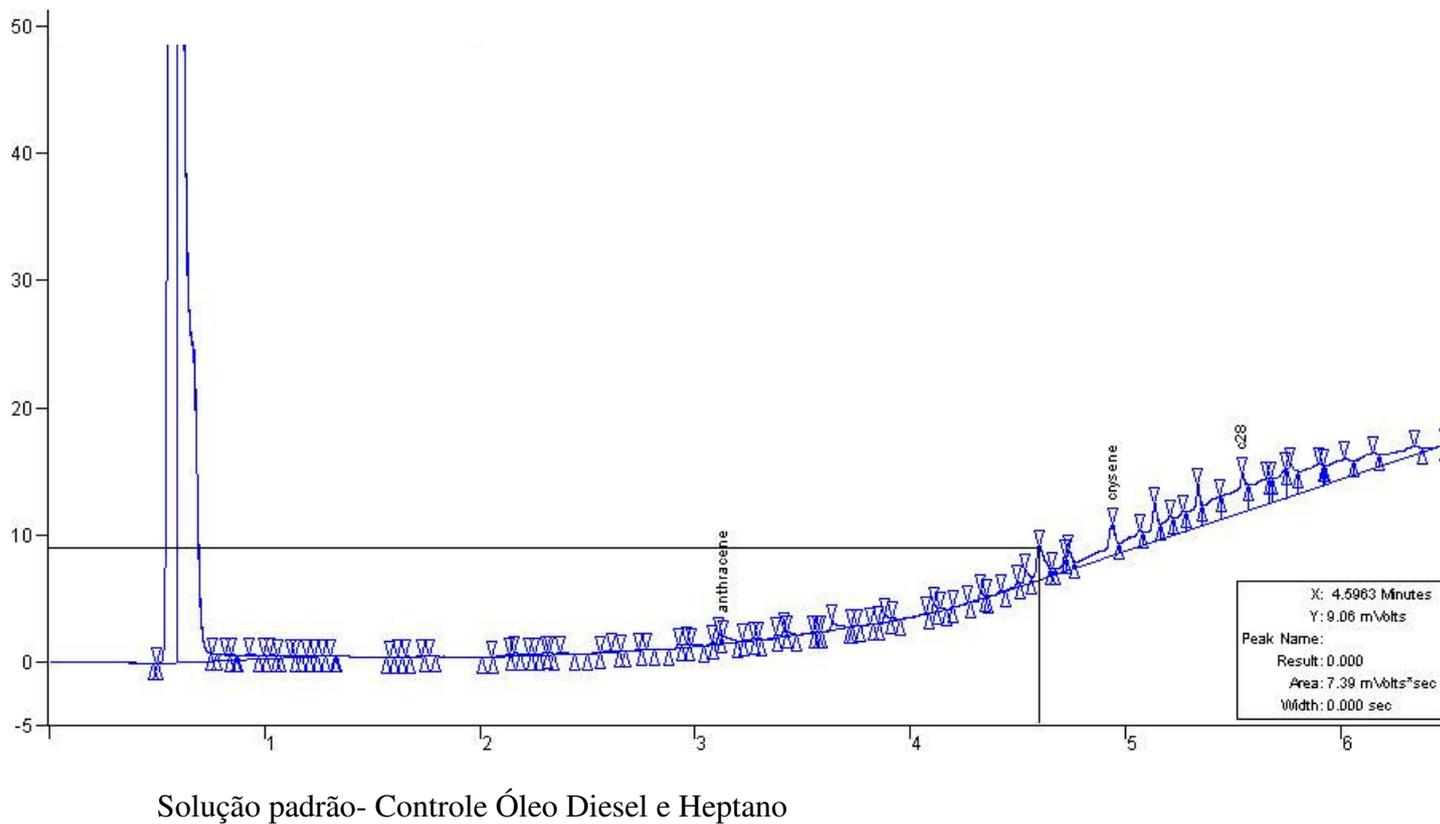
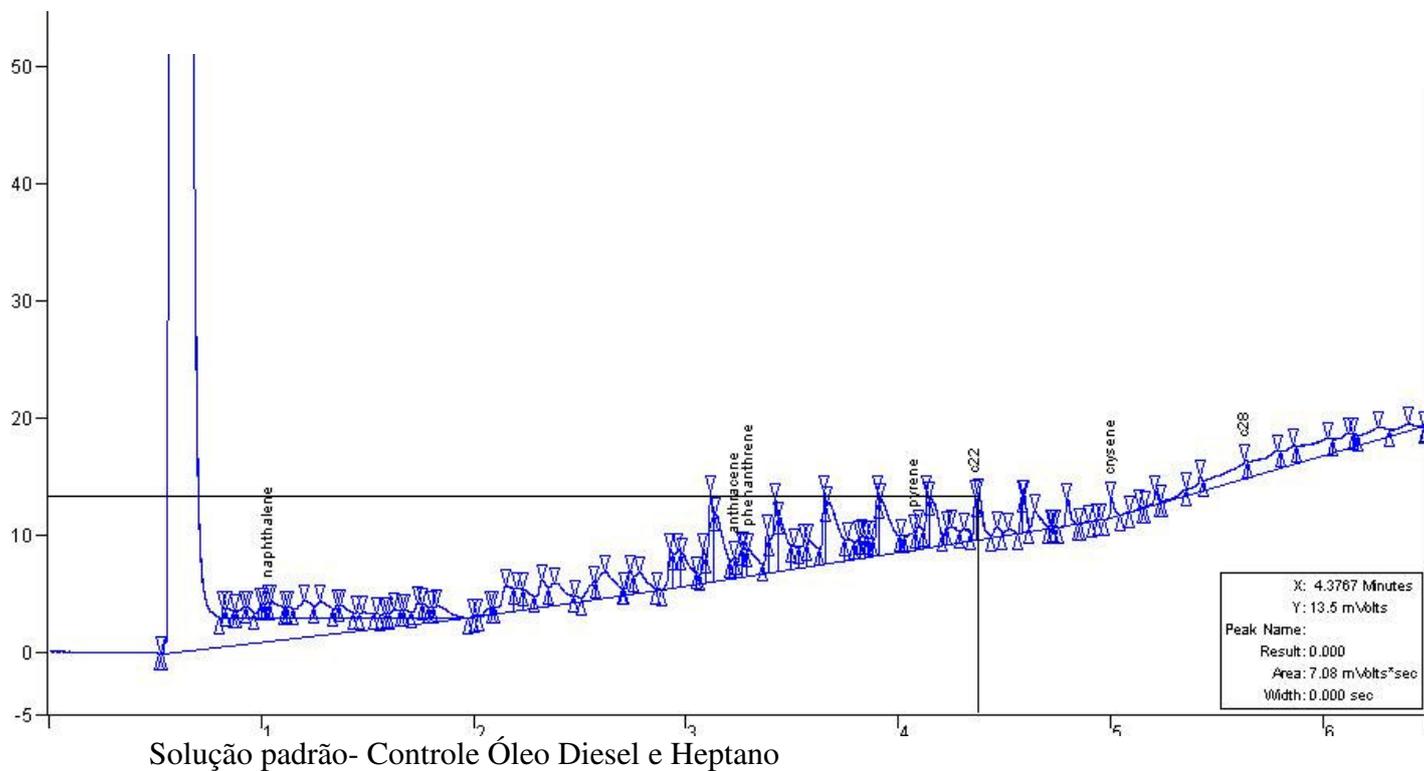
TABELA 4- Método para calculo de correção fatorial (Huh-Mason).

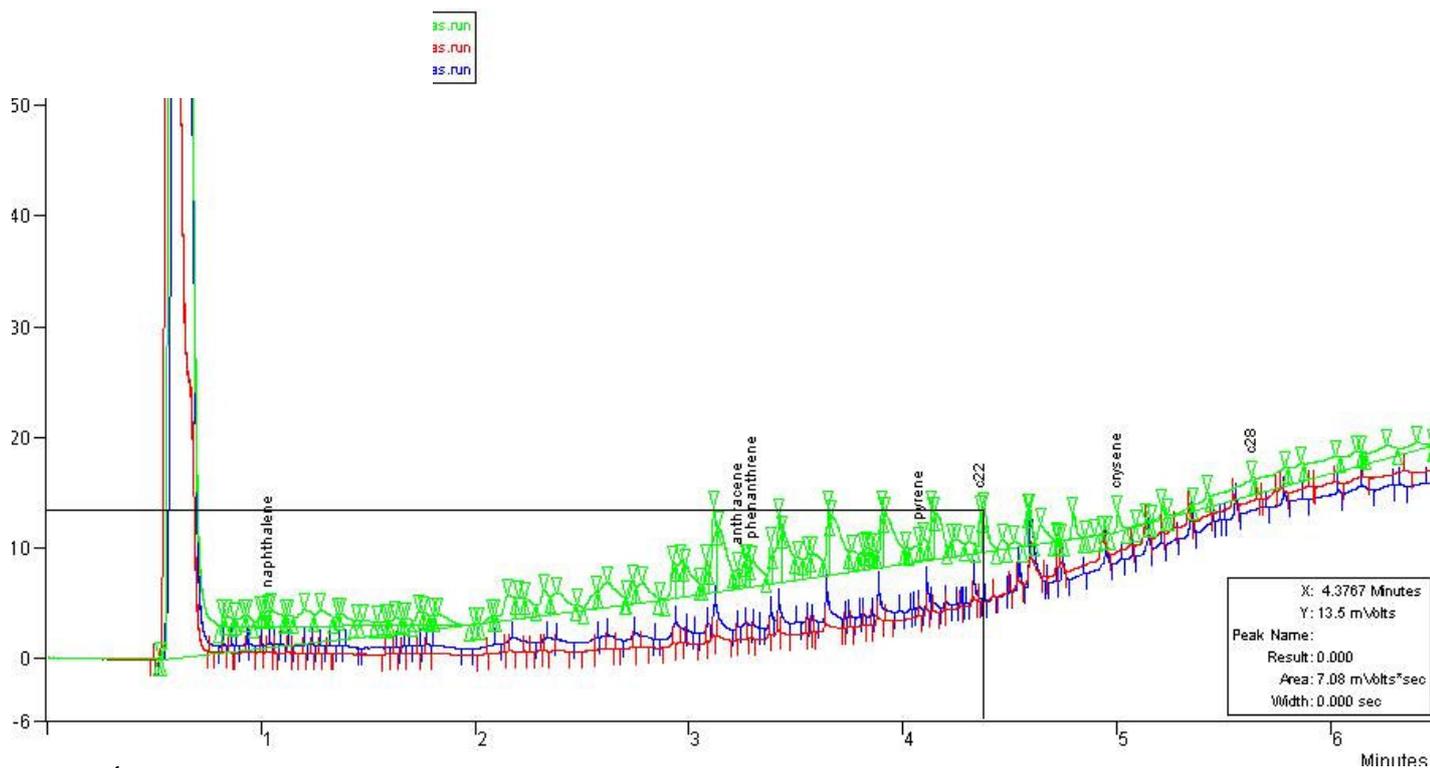
Isolados Triplicatas	Dias	Tensão superficial do meio (M.M)	Tensão superficial água
(Controle)	Primeiro Dia	65,73 mN/m	71,60 mN/m
M.M+DIESEL+GB	Primeiro Dia	39,05 mN/m	71,60 mN/m
M.M+DIESEL+ GB	Segundo Dia	32,92 mN/m	71,60 mN/m
M.M+DIESEL+ GB	Terceiro Dia	39,64 mN/m	71,60 mN/m
M.M+DIESEL+ GB	Décimo Primeiro Dia	39,04 mN/m	71,60 mN/m

TABELA 5- Método para calculo de correção fatorial (Zuidema-Waters).

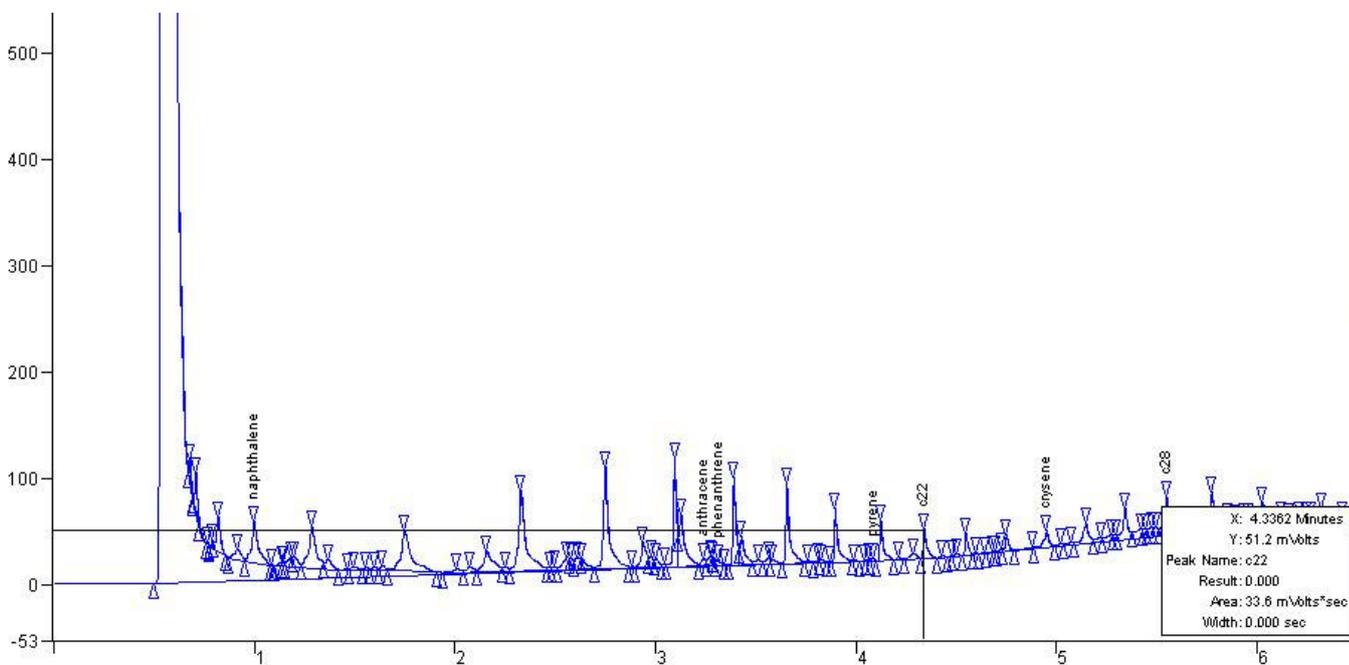
Isolados Triplicatas	Dias	Tensão superficial do meio (M.M)	Tensão superficial água
(Controle)	Primeiro Dia	65,35 mN/m	71,60 mN/m
M.M+DIESEL+GB	Primeiro Dia	41,07 mN/m	71,60 mN/m
M.M+DIESEL+ GB	Segundo Dia	33,67 mN/m	71,60 mN/m
M.M+DIESEL+ GB	Terceiro Dia	39,58 mN/m	71,60 mN/m
M.M+DIESEL+ GB	Décimo Primeiro Dia	39, mN/m	71,60 mN/m

CROMATOGRAFIA

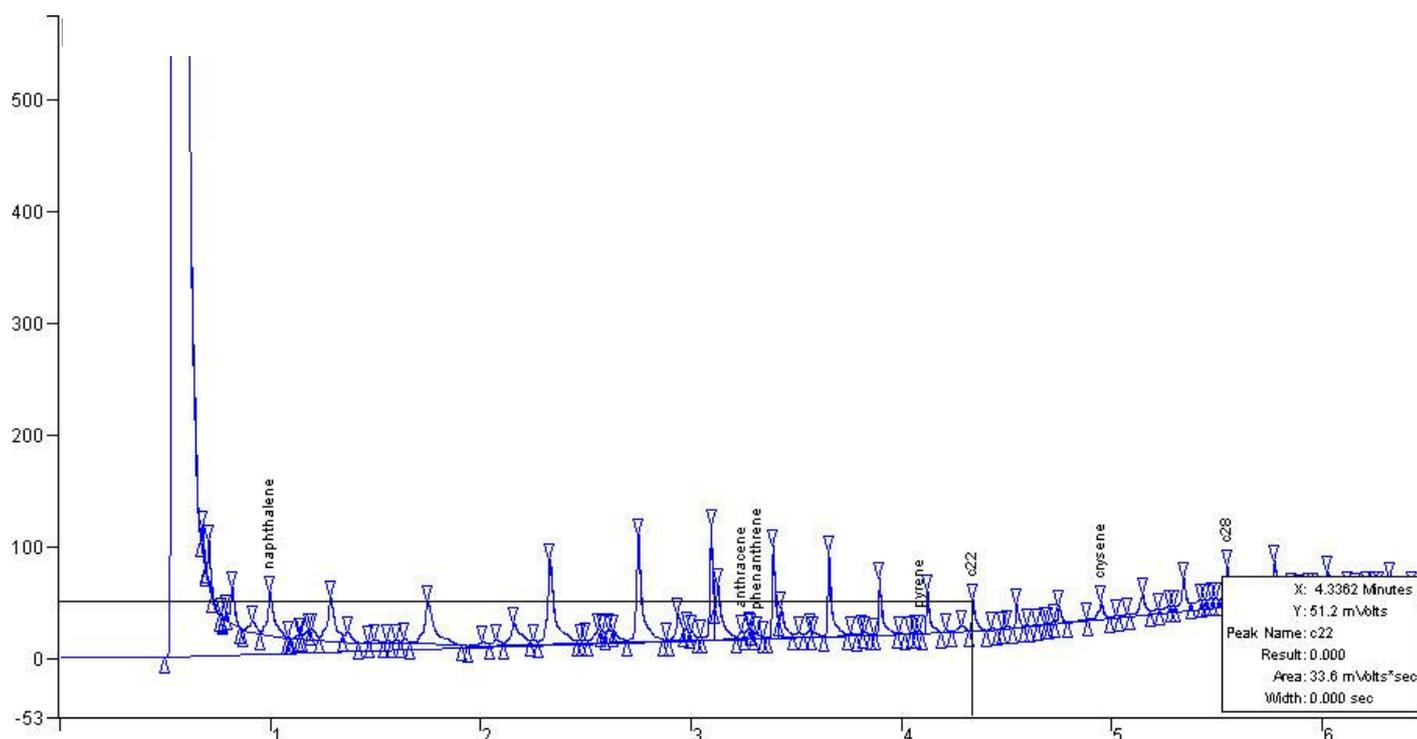




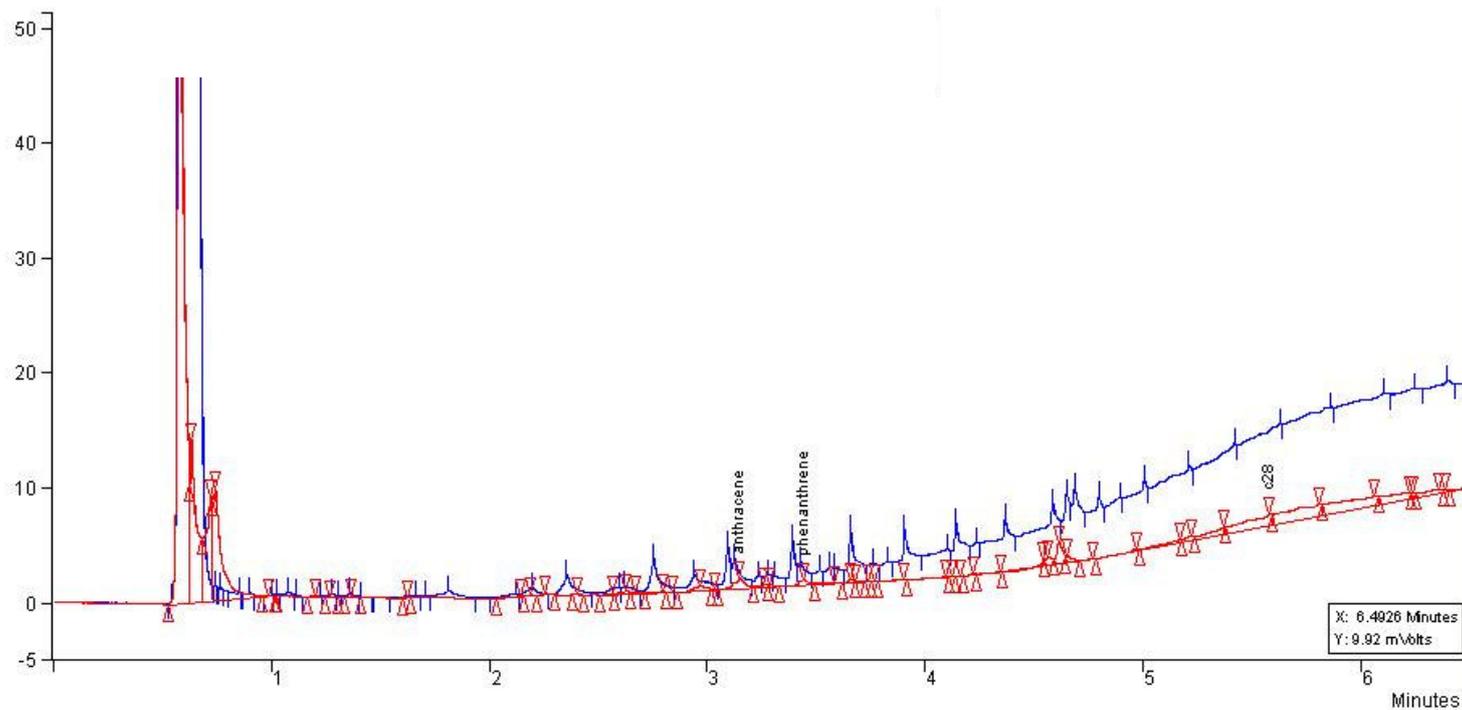
Índice de degradação do C22, Antraceno e Fenantreno após três dias de incubação em agitador orbital



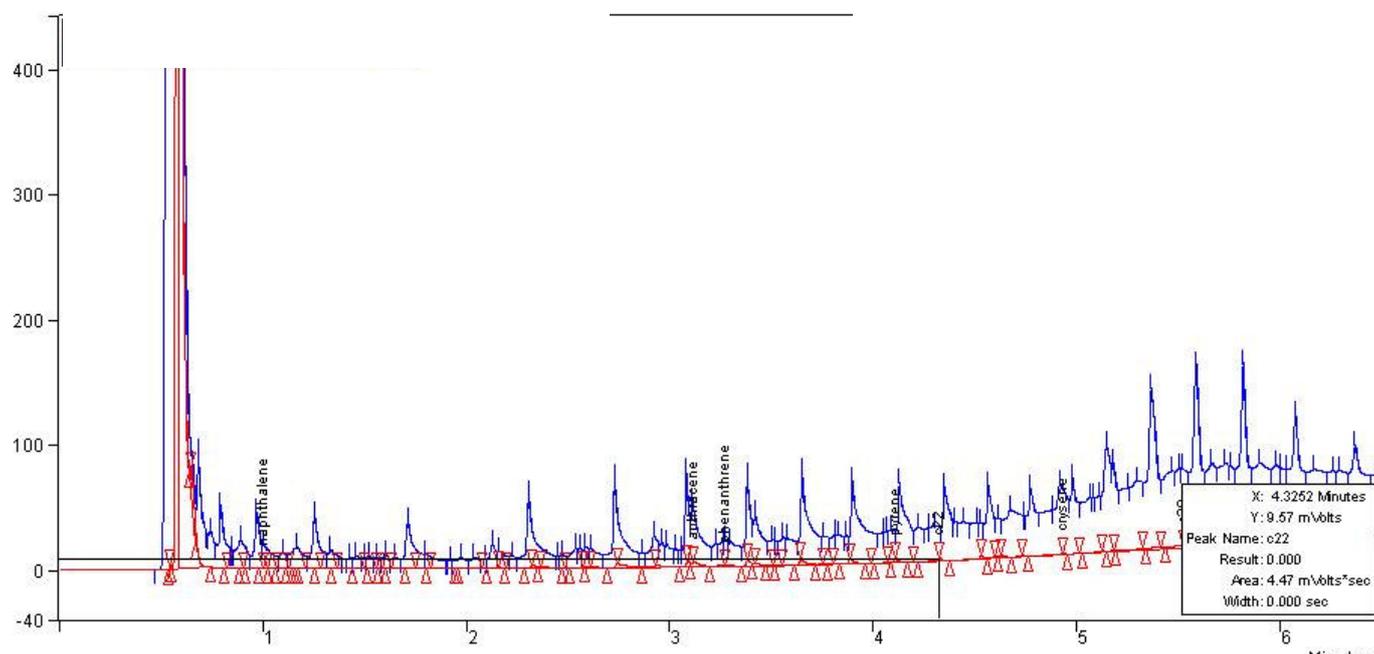
Análise cromatográfica dos picos de C22, Antraceno e Fenantreno após quatro dias de incubação em agitador orbital.



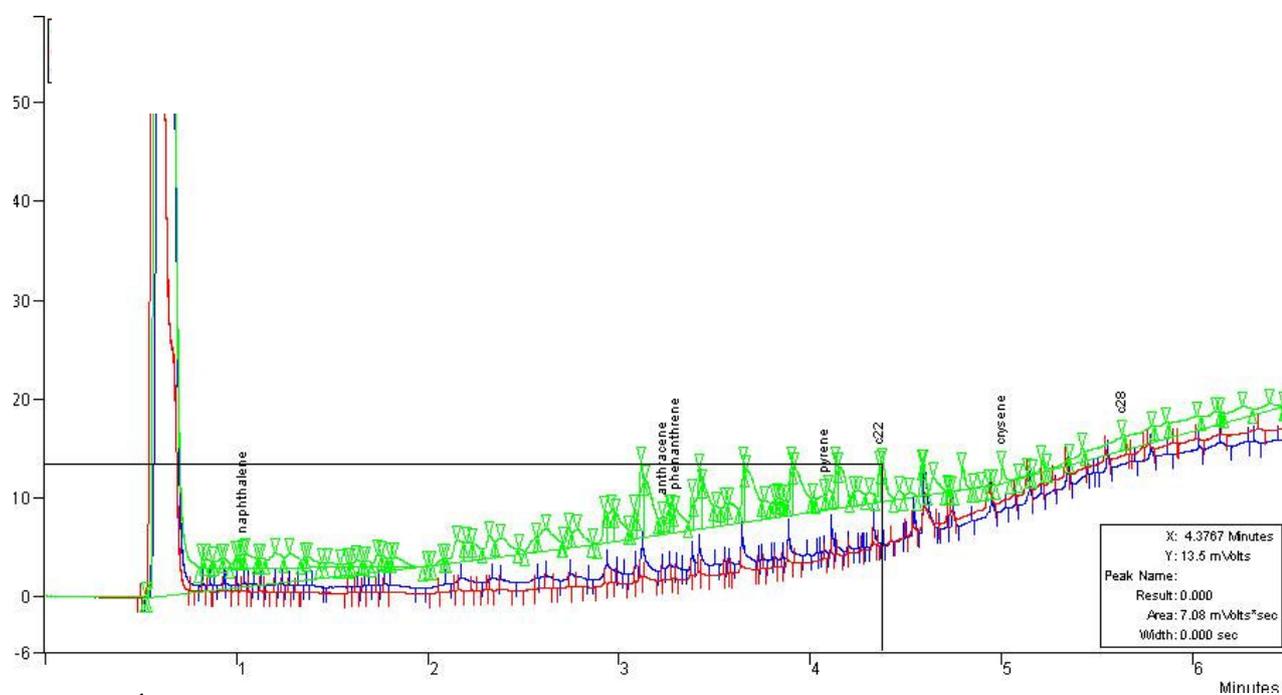
Análise cromatográfica dos picos de C22, Antraceno e Fenantreno após quatro dias de incubação em agitador orbital.



Índice de degradação do Antraceno e Fenantreno após três dias de incubação em agitador orbital.



Índice de degradação do C22, Antraceno e Fenantreno após quatro dias de incubação em agitador orbital.



Índice de degradação do C22, Antraceno e Fenantreno após quatro dias de incubação em agitador orbital.