



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
CURSO DE OCEANOGRAFIA**

LARISSA BARRETO PINHEIRO

**METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO E A
CINÉTICA EM CULTURA LÍQUIDA NA PRESENÇA DE BTX: SUBSÍDIOS NA
BIOREMEDIÇÃO DE ÁREAS IMPACTADAS POR ATIVIDADES PETROLÍFERAS**

Salvador, 2016

LARISSA BARRETO PINHEIRO

METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO E A
CINÉTICA EM CULTURA LÍQUIDA NA PRESENÇA DE BTX: SUBSÍDIOS NA
BIOREMEDIAÇÃO DE ÁREAS IMPACTADAS POR ATIVIDADES PETROLÍFERAS

Trabalho final de graduação elaborado como requisito para aprovação na disciplina TFG2 – Trabalho Final de Graduação 2, para obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Joil José Celino

Salvador, 2016

TERMO DE APROVAÇÃO

LARISSA BARRETO PINHEIRO

METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO E A
CINÉTICA EM CULTURA LÍQUIDA NA PRESENÇA DE BTX: SUBSÍDIOS NA
BIOREMEDIÇÃO DE ÁREAS IMPACTADAS POR ATIVIDADES PETROLÍFERAS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joil José Celino (orientador) – IGEO/UFBA

Prof. Dr. Gúbio Soares Campos – ICS/UFBA

Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia – ICS/UFBA

Prof^a. Dr^a. Juliana Leonel – IGEO/UFBA

Salvador, 06 de abril de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe. Razão do meu viver. Motivo pelo qual hoje sou quem sou. Obrigado por tudo. Que Deus ilumine seus passos por todos os dias dessa vida. Amo você.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu tudo isso acontecer, ao longo de toda minha existência, e não somente nesses anos como universitária, mas que em todos os momentos foi o meu maior mentor espiritual.

À minha mãe, minha melhor amiga, minha heroína, que me deu apoio, amor incondicional e força para não declinar do caminho projetado. Nada disso seria possível sem você, que não mediu esforços para me ajudar a crescer em todas as etapas da vida. Mãe, sem você esse sonho não seria possível.

Ao meu pai, que apesar da distância sempre me fortaleceu, acreditou no meu potencial, teve orgulho de todas as minhas conquistas. Obrigado por tudo.

À minha irmã, que apesar dos conflitos, das brigas, dos palavrões, das tragédias gregas travadas, sempre foi quem mais esteve comigo, como amiga, ouvinte, psicóloga, companheira e esteve sempre aqui, ao meu lado, em todas as horas. Eu amo você, irmã. Obrigado por tudo.

À tia mais linda desse mundo. Tia Nil, obrigado por todo ensinamento. Pelos conselhos, pelas palavras de conforto e pela luz que me proporcionaste nessa trajetória. Sua sabedoria está bem guardada comigo. Obrigado.

Ao meu bem, José, que fez parte dessa luta. Me viu fraquejar tantas vezes, mas esteve sempre sorrindo ao meu lado, me encorajando a não vacilar. Você é parte dessa conquista e sou eternamente grata por isso.

À Ana Paula, minha amiga do coração. Companheira de vida universitária, parceira de todas as horas. Quero agradecer por todo o auxílio que me deste. Ao carinho que teve comigo, mesmo de tão longe, em todas as horas. Obrigado por fazer parte da minha vida.

À Cibele, por acreditar em mim. Me ajudar, em todas as questões, não medir esforços, e ter me ajudado tanto para a realização desse trabalho. Amo você, amiga.

À Érica, minha flor de liz nesse mundo. Obrigado por ser tão especial na minha existência. Agradeço a ti pela amizade, pelas viagens, pelos conselhos, por toda cumplicidade e compreensão. Que nossa amizade seja tão eterna quanto o próprio universo. Você é parte do meu viver. Obrigado por tudo.

À Jessyca, meu porto seguro. A amiga mais irmã, que jamais um dia eu poderia esperar ter. Você é parte integrante desse sonho. Me fez crer no melhor, acreditou em mim, até mesmo nas horas mais difíceis. Não mediu esforços para me ver feliz. Amiga, meu grande obrigado vai para você, que esteve comigo e me deu toda a força e toda a garra para continuar. Sem você eu não conseguiria.

Ao meu grande amigo Márcio, que acompanhou minha trajetória desde o início. Junto a ele, adentrei na vida acadêmica, por meio da minha primeira iniciação científica, sendo sempre muito solícito, solidário e me orientando desde o começo. Obrigado por fazer parte disso. Sou muito grata por todo apoio e confiança.

Meus agradecimentos aos amigos mais incríveis desse universo, Danilo, Fábio e Isamarck. Vocês são meus companheiros da vida, meus irmãos. Fizeram parte de minha formação e vão continuar presentes em minha vida com toda certeza do mundo.

Ao meu professor orientador Joil, pela orientação, apoio, confiança e pelo empenho na elaboração deste trabalho. Meu muitíssimo obrigado.

Aos professores Fábio, Gúbio e Juliana por integrarem minha banca examinadora, me auxiliando nessa fase da vida. Meu grande obrigado a vocês.

EPÍGRAFE

“As teorias científicas não estarão nunca aptas a fornecer uma descrição completa e definitiva da realidade. Serão sempre aproximações da verdadeira natureza das coisas. Em termos claros: os cientistas não lidam com a verdade; eles lidam com descrições da realidade limitadas e aproximadas”

(Fritjof Capra)

“A vida é infinitamente mais, que as suas ou as minhas obtusas teorias a respeito dela. Sentir o universo é um trabalho interior”

(Fritjof Capra)

“O futuro era barro, a ser moldado, dia a dia, mas o passado consistia em rocha granítica, imutável”

(Sidney Sheldon)

“Se a ciência disse uma coisa e os meus escritos outra, jogue os meus escritos fora”

(Allan Kardec)

“Quase todo lugar tem um momento, um ângulo e uma intensidade de luz em que o dia aparece com o seu melhor aspecto”

(Thomas Harris)

PINHEIRO, Larissa Barreto. **Metodologias de quantificação do crescimento bacteriano e a cinética em cultura líquida na presença de BTX: subsídios na bioremediação de áreas impactadas por atividades petrolíferas.** Salvador, Bahia, 2016. 88 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2016.

RESUMO

O sucesso de uma pesquisa científica depende da escolha de uma metodologia compatível com a finalidade do trabalho. O método de pesquisa a ser adotada é uma escolha do pesquisador, porém deve estar em sintonia com os objetivos do trabalho e de acordo com a questão que se pretende investigar.

As atividades industriais apresentam riscos ambientais inerentes, que precisam ser constantemente gerenciados. No intuito de colaborar com pesquisas voltadas para biorremediação de áreas impactadas por atividades petrolíferas, este estudo buscou avaliar duas metodologias (contagem em placas e turbidimetria) aplicadas na quantificação do crescimento bacteriano por meio de experimentos realizados em cultura líquida na presença de BTX.

Foram utilizadas bactérias provenientes de sedimentos de manguezais, que demonstraram alto potencial na degradação de derivados do petróleo, com ênfase nos hidrocarbonetos monoaromáticos BTX (benzeno, tolueno e xileno). Os testes de cinética foram realizados com seis bactérias na presença de BTX, isoladamente, no decorrer de 12 horas. O experimento foi dividido em três etapas (dias), sendo elas: preparação do inoculo (dia 1), amostragem (dia 2) e contagem das UFC (dia 3). As amostragens foram efetuadas nos tempos T₀, T₂, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₁₀ e T₁₂, onde alíquotas da suspensão bacteriana foram medidas, em triplicatas, pelos dois métodos de quantificação. Testes de consumo de oxigênio foram efetuados pela técnica de medição da respiração total da cultura após 12 horas, 24 horas e 48 horas.

Nos testes de cinética em cultura líquida as cepas apresentaram maiores velocidades na presença de xileno e tolueno, quando na presença de benzeno. Os resultados dos testes de consumo de oxigênio demonstram melhores resultados na presença de xileno, seguida do benzeno e por último o composto tolueno. Houve maior diversidade microbológica na área de transporte, seguida da área de refino, com menor variedade bacteriana existente na área de produção da cadeia petrolífera. As cepas apresentaram maior rapidez em dobrarem suas populações (tempo de geração) na presença de xileno e benzeno, quando comparado ao tolueno.

A partir da análise dos resultados concluiu-se que não houve diferença significativa entre os métodos avaliados, sendo ambas metodologias eficazes na quantificação do crescimento bacteriano em cultura líquida na presença de BTX.

Palavras-Chave: bactérias, hidrocarbonetos, BTX, sedimento, metodologias, biorremediação.

PINHEIRO, Larissa Barreto. **Methods of quantification of bacterial growth and kinetic in liquid culture in the presence of BTX: subsidies in the areas of bioremediation impacted by oil activities.** Salvador, Bahia, 2016. 88 p. Work Completion of course (Degree in Oceanography) - Institute of Earth Sciences, Federal University of Bahia, 2016.

ABSTRACT

The success of a scientific research depends the choice of methodology compatible with the purpose of the work. The research method to be adopted is a choice of the researcher, but should be in line with the objectives of the study and according to the question whether to investigate.

Industrial activities have inherent environmental risks that need to be constantly managed. In order to collaborate with research focused on bioremediation of areas impacted by oil activities, this study aimed to evaluate two methods (plate count and turbidity) applied to the quantification of bacterial growth through experiments in liquid culture in the presence of BTX.

Bacteria from sediments of mangroves were used, which demonstrated high potential in petroleum products of degradation, with emphasis on monoaromatic hydrocarbons BTX (benzene, toluene and xylene). The kinetics tests were carried out to six bacteria in the presence of BTX alone during 12 hours. The experiment was divided into three stages (days), as follows: preparation of the inoculum (day 1), sampling (day 2) and counting of UFC (day 3). The samples were taken at the times T0, T2, T4, T5, T6, T7, T8, T10 and T12, where rates of bacterial suspension were measured in triplicate by the two quantification methods. Oxygen consumption assays were performed by measurement of the total breathing technique culture after 12 hours, 24 hours and 48 hours.

Rates of bacterial suspension were measured in triplicate by the two quantification methods. In kinetic tests, in liquid culture, the strains showed higher rates in the presence of xylene and toluene, than in the presence of benzene. The results of oxygen consumption tests show better results in the presence of xylene and benzene and finally toluene compound. There was a higher microbial diversity in the transport area, followed by refining area, less existing bacterial variety in the production area of the oil chain. The strains showed faster in double their populations (generation time) in the presence of xylene and benzene, compared to toluene.

From the analysis of the results it was concluded that there was no significant difference between the methods evaluated, being both effective methodologies in quantifying bacterial growth in liquid culture in the presence of BTX.

Keywords: bacteria, hydrocarbons, BTX, sediment, methodologies, bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A) Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. B) Pontos de coleta localizados ao norte da Baía de Todos os Santos. DJ – Dom João, MD – Madre de Deus e CN – Candeias.	16
FIGURA 2 Ilustração da técnica de diluição seriada.....	20
FIGURA 3 – A) Configuração do ambiente experimental. B) Shaker orbital e incubadora....	21
FIGURA 4 - Esquema do intervalo entre as amostragens ao longo das 12hs de experimento.	23
FIGURA 5 – A) Disposição das micro gotas na placa de petri. B) Representação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da amostra 05-A em duas horas de experimento (T2).	24
FIGURA 6 - Fluxograma das etapas realizadas anteriormente para a obtenção dos dados e as realizadas neste trabalho. (1) Etapas finalizadas por FIORAVANTI (2013); (2) Etapas finalizadas por ANDRADE (2015).....	25
FIGURA 7 - Gráfico tipo box plot dos dados de densidade ótica (DO) e número de colônias (UFC/ml), respectivamente, referente ao crescimento em benzeno.	28
FIGURA 8 - Gráfico tipo blox plot dos dados de densidade ótica (DO) e número de colônias (UFC/ml), respectivamente, referente ao crescimento em tolueno.	28
FIGURA 9 - Gráfico tipo box plot dos dados de densidade ótica (DO) e número de colônias (UFC/ml) para o crescimento em xileno.	29
FIGURA 10 - Cluster comparando a similaridade entre as sequências da catecol (C120) das 10 cepas isoladas. Análise realizada utilizando o programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).	30
FIGURA 11 - Árvore filogenética das cepas bacterianas utilizadas analisadas através do programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).	31
FIGURA 12 – Resultados experimentais das taxas de crescimento específico (h^{-1}) para cada cepa na presença de BTX.	33
FIGURA 13 - Gráfico comparativo ilustrando o tempo de geração de cada bactéria, na presença dos componentes do BTX (benzeno, tolueno e xileno), entre as duas metodologias avaliadas.	35
FIGURA 14 - Estruturas químicas das moléculas dos compostos BTEX.....	61
FIGURA 15 - Porcentagem em massa dos compostos BTEX na gasolina.	62
FIGURA 16 - Curva de crescimento bacteriano mostrando as quatro fases típicas do crescimento.....	69
FIGURA 17 - Representação do método turbidimétrico.....	74

FIGURA 18 - Gráficos de crescimento microbiano (a) Relação linear entre a densidade ótica da cultura e o número de células na suspensão. (b) Exemplo de duas curvas de crescimento reais de dois organismos A e B.74

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Resultados experimentais das taxas de crescimento específico (h^{-1}) para cada cepa bacteriana na presença de benzeno, tolueno e xileno (BTX) em 12 horas.32
- TABELA 2** - Resultados do sequenciamento parcial dos genes RNA ribossomal 16S e área de coleta das cepas bacterianas.37
- TABELA 3** - Número de acidentes ambientais por produto ocorridos no Brasil em 2008.58
- TABELA 4** - Cronologia de acidentes envolvendo derramamento de petróleo e seus derivados na BTS entre o período de 1988 e 2012.60
- TABELA 5** - Propriedades físico-químicas dos compostos BTEX.62

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados da estatística univariada para os dados obtidos pela metodologia turbidimétrica (densidade ótica - DO) e contagem em placas (número de colônias – UFC/ml) para os testes de cinética em BTX.....	51
APÊNDICE B – Resultados experimentais do número de gerações e tempo de geração para as cepas bacterianas.	51
APÊNDICE C - Valores dos coeficientes de correlação linear (R^2) para cada metodologia.	51
APÊNDICE D - Gráficos do crescimento bacteriano no tempo obtidos pelas duas metodologias na presença de benzeno, tolueno e xileno.....	52

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Revisão Bibliográfica	57
ANEXO 2 - Sequenciamento parcial dos genes RNA ribossomal 16S e do gene Catecol 1,2-dioxygenase (c120). Analisados usando o programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) (ANDRADE, 2015).....	76
ANEXO 3 – Caracterização da enzima Catecol 1,2 dioxydase (C120) e identificação do 16S Rrna (ANDRADE, 2015).....	78
ANEXO 4 – Resultados experimentais das cepas bacterianas com consumo de Oxigênio em u O ₂ h ¹ g sedimento ⁻¹ realizados com sedimento de manguezal com os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTXs) em 12 horas, 24 horas e 48 horas. A) coeficiente de consumo de O ₂ em 5 mg de xileno g sedimento ⁻¹ . B) coeficiente de consumo de O ₂ em 5 mg de tolueno g sedimento ⁻¹ . C) coeficiente de consumo de O ₂ em 5 mg de benzeno g sedimento ⁻¹ (ANDRADE, 2015)	79
ANEXO 5 - Micro-organismos isolados na BTS, Belmonte, Suape, Minas Gerais, França e Egito utilizando diferentes petroderivados como fonte de carbono. B – bactérias; L – leveduras; F – fungos filamentosos (FIORAVANTI, 2013).....	79
ANEXO 6 - Cinética de crescimento das cepas em xileno benzeno e tolueno, onde o logaritmo leperiano (LN) ou logaritmo natural de um número (=LN(média)) (ANDRADE, 2015).....	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ - taxa de crescimento específico (h^{-1})
 μL - microlitro
ANP - Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis
BH - Buschnell Haas
BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio
BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Orto-Meta-Para-Xileno
BTS - Baía de Todos os Santos
BTX - Benzeno, Tolueno, Xileno
CN – Candeias
CRA – Centro de Recursos Ambientais
CV – Coeficiente de variação
DJ – Dom João
DO - Densidade Ótica
EPA - Environmental Protection Agency
FDA - Food and Drug Administration
GLP – Gás liquefeito de petróleo
HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
I – Intensidade da luz transmitida
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICS - Instituto de Ciência e Saúde
IGEO - Instituto de Geociências
IO – Intensidade da luz incidente
LEMA - Laboratório de Estudos em Meio Ambiente
LN – Logaritmo Neperiano
MD – Madre de Deus
MH - Mueller Hilton
N – Tamanho amostral
NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NEA - Núcleo de Estudos Ambientais
PETROBRÁS - Empresa de Petróleo Brasileira S/A
POSPETRO - Pós-graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente
QAV – Querosene de aviação
R1 - repetição 1
R² - Coeficiente de correlação linear
R2 - repetição 2
R3 - repetição 3
RLAM – Refinaria Lanfulfo Alves
rRNA - RNA ribossomal
TEMADRE - Terminal de Madre de Deus (Bahia)
TRANSPETRO - Petrobras Transporte S/A
TSA – Ágar triptona de soja
UCSAL – Universidade Católica de Salvador
UFBA - Universidade Federal da Bahia
UFC - Colony Forming Units (Unidades Formadora de Colônia)
Y - Equação da reta de regressão linear

SUMÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO.....	III
DEDICATÓRIA.....	I
AGRADECIMENTOS	II
EPÍGRAFE	III
RESUMO	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE APÊNDICES.....	IX
LISTA DE ANEXOS	X
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XI
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVOS GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 METODOLOGIA	15
3.1 TRABALHO DE CAMPO.....	15
3.1.1 Área de estudo.....	15
3.1.2 Coleta de sedimento	17
3.2 TRABALHO DE LABORATÓRIO	18
3.2.1 Obtenção das cepas	18
3.2.2 Reativação	18
3.2.3 Seleção e purificação.....	19
3.2.4 Identificação.....	20
3.2.5 Cinética de crescimento.....	21
3.2.6 Consumo de oxigênio.....	24
3.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS	25
3.3.1 Cálculos experimentais	26
3.3.2 Coeficiente de correlação linear	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS	29
4.2 CRESCIMENTO ESPECÍFICO (μ).....	32
4.3 CONSUMO DE OXIGÊNIO X CRESCIMENTO ESPECÍFICO	34
4.4 TEMPO DE GERAÇÃO X CRESCIMENTO ESPECÍFICO (μ).....	35
4.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS X CRESCIMENTO ESPECÍFICO X CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	35
4.6 SETORES DA CADEIA DE PETRÓLEO X DIVERSIDADE.....	36
5 CONCLUSÃO	37
6 REFERÊNCIAS	40
7 APÊNDICES	51
APÊNDICE A - Valores dos coeficientes de correlação linear (R^2) para cada metodologia. .51	

APÊNDICE B - Resultados da estatística univariada para os dados obtidos pela metodologia turbidimétrica (densidade ótica - DO) e contagem em placas (número de colônias – UFC/ml) para os testes de cinética em BTX.	51
APÊNDICE C – Resultados experimentais do número de gerações e tempo de geração para as cepas bacterianas.	51
APÊNDICE D - Gráficos do crescimento bacteriano no tempo obtidos pelas duas metodologias na presença de benzeno, tolueno e xileno	52
8 ANEXOS	57
ANEXO 1 – Revisão Bibliográfica	57
ANEXO 2 - Sequenciamento parcial dos genes RNA ribossomal 16S e do gene Catecol 1,2-dioxygenase (c120). Analisados usando o programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) (ANDRADE, 2015).....	76
ANEXO 3 – Caracterização da enzima Catecol 1,2 dioxydase (C120) e identificação do 16S Rrna (ANDRADE, 2015).....	78
ANEXO 4 – Resultados experimentais das cepas bacterianas com consumo de Oxigênio em u O ₂ h ¹ g sedimento ⁻¹ realizados com sedimento de manguezal com os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTXs) em 12 horas, 24 horas e 48 horas. A) coeficiente de consumo de O ₂ em 5 mg de xileno g sedimento ⁻¹ . B) coeficiente de consumo de O ₂ em 5 mg de tolueno g sedimento ⁻¹ . C) coeficiente de consumo de O ₂ em 5 mg de benzeno g sedimento ⁻¹ (ANDRADE, 2015)	79
ANEXO 5 - Micro-organismos isolados na BTS, Belmonte, Suape, Minas Gerais, França e Egito utilizando diferentes petroderivados como fonte de carbono. B – bactérias; L – leveduras; F – fungos filamentosos (FIORAVANTI, 2013).....	79
ANEXO 6 - Cinética de crescimento das cepas em xileno benzeno e tolueno, onde o logaritmo leperiano (LN) ou logaritmo natural de um número (=LN(média)) (ANDRADE, 2015).....	80

1 INTRODUÇÃO

Os compostos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e orto-meta-para-xileno) são encontrados em derivados do petróleo e são extremamente tóxicos, contaminando com frequência o meio ambiente e apresentando inúmeras fontes pontuais de contaminação (TRIGUEROS, 2008). Além de serem comumente encontrados nos produtos refinados do petróleo, os BTEX, são largamente utilizados nas indústrias como insumos para a produção de outros compostos (PHELPS; YOUNG, 2001; RIBEIRO, 2005; TRIGUEROS, 2008). Estas moléculas são produzidas em enormes quantidades, sendo utilizados em combustíveis, atuando como solventes de diversos produtos e como materiais primários para a produção de plásticos, fibras sintéticas, pesticidas, entre outros (ABUHAMED et. al., 2004). Organismos aquáticos da flora e da fauna são capazes de absorver ou ingerir tais compostos, armazenando-os em suas moléculas proteicas e reservas de gordura. Uma vez no tecido adiposo, esses contaminantes encontram-se inalterados, e podem ser transferidos ao longo da cadeia alimentar atingindo o homem (RESENDE, 2007). Implicações para a pesca, saúde pública e meio ambiente são provocadas devido à ingestão e acúmulo de BTEX em humanos (SILVA et. al., 2002; RESENDE, 2007).

A utilização de micro-organismos para remediação de ambientes contaminados tem sido foco de estudo de diversos pesquisadores, mundialmente, em diversos compartimentos ambientais, tais como (CERNIGLIA, 1992; CHAERUN et al., 2004; SEABRA, 2005; PEREIRA; FREITAS, 2012; NAKAZAWA, 2011; SOUZA et. al., 2009; MELO, 2012; SOUZA et al., 2006; ROSA; TRIGUIS, 2006; FIORAVANTI, 2013; BAMFORTH; SINGLETON, 2005; FIORAVANTI et al., 2012; JACQUES, 2007; PINHATI, 2014; POTIN, 2004) e em biorreatores (SOUZA, et al., 2006; GUSMÃO et. al., 2006; GUSMÃO, 2005; LOVLEY, 2001).

Com isso, o estudo da cinética microbiana pode ser utilizado na avaliação da persistência de certos compostos químicos nos ecossistemas naturais, no conhecimento das concentrações e como estes tóxicos estão sendo transportados no meio, tendo a noção de possíveis sítios, nos quais estão presentes, dentro dos compartimentos ambientais, em que o homem e outras espécies estejam expostos (JONES; ALEXANDER, 1986; ALEXANDER, 1994).

Neste contexto, este trabalho teve como finalidade reunir informações relevantes a respeito dos diferentes aspectos da utilização da técnica de bioaumento na redução de impactos ambientais oriundos de derramamentos de petróleo, ampliando os conhecimentos sobre a aplicação de bactérias nesse contexto, bem como auxiliar na avaliação entre duas

metodologias com o propósito de poupar recurso, tempo e esforço, na etapa de quantificação do crescimento bacteriano em cultura líquida (Anexo 1), pelos futuros pesquisadores que venham a se debruçar sobre questões que envolvam a utilização de bactérias em processos de biorremediação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

- Avaliar a eficiência de duas metodologias (contagem em placas e turbidimetria) utilizados na quantificação do crescimento bacteriano em cultura líquida a fim de auxiliar estudos de biorremediação em áreas costeiras contaminadas por monoaromáticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar dados de crescimento bacteriano em cultura líquida, na presença de BTX (benzeno, tolueno e xileno), como ferramenta para a análise da eficiência entre as metodologias.
- Investigar os parâmetros: taxa de crescimento específico, consumo de oxigênio, tempo de geração das cepas bacterianas e as propriedades físico-químicas do BTX a fim de estabelecer relações entre os mesmos.
- Discutir as vantagens e desvantagens de cada método.
- Avaliar a diversidade dos micro-organismos identificados encontrados em cada setor da cadeia petrolífera (produção, refino e transporte).

3 METODOLOGIA

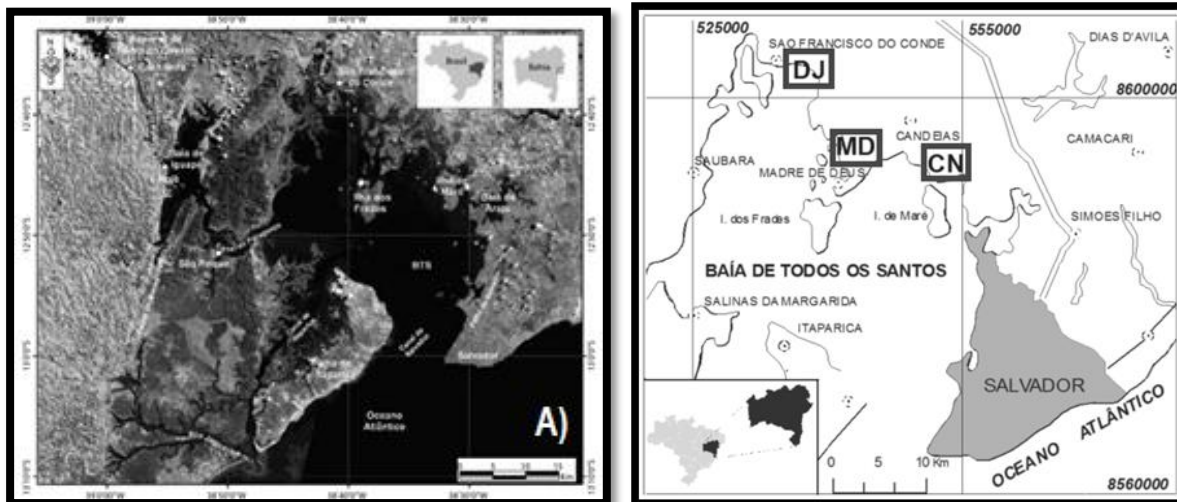
3.1 TRABALHO DE CAMPO

3.1.1 Área de estudo

Ocupando a posição de segunda maior baía costeira do Brasil, a Baía de Todos os Santos (Figura 1A) possui aproximadamente 221 km de linha de costa, possuindo 184 km

de extensão, onde podem ser encontradas mais de 30 ilhas em seu domínio (CRA, 2001; FERREIRA, 2009).

FIGURA 1 – A) Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. B) Pontos de coleta localizados ao norte da Baía de Todos os Santos (DJ – Dom João, MD – Madre de Deus e CN – Candeias).



Fonte: CIRANO; LESSA (2007); Adaptado de FIORAVANTI (2013).

É considerada a maior baía navegável do litoral brasileiro, possuindo pequenas baías (Iguape e Aratu) e enseadas (INMET, 1992). Apresenta em seus arredores, um contingente populacional que excede os três milhões de habitantes (HATJE; ANDRADE, 2009). É detentora de dez terminais portuários de grande porte, um canal único de entrada naturalmente navegável e canais internos profundos, características essas que fazem da BTS uma baía favorável estrategicamente ao desenvolvimento da região (HATJE; ANDRADE, 2009).

A BTS é incluída em uma categoria especial de estuário, formada por processos tectônicos de larga escala, sendo considerada uma baía de maré (LEÃO; DOMINGUEZ, 2000). A baixa descarga fluvial se reflete na predominância de características marinhas que podem ser vistas na quase totalidade da baía, fazendo com que a circulação dentro desta se estabeleça pela força da maré, sendo a coluna d'água bem misturada (HATJE; ANDRADE, 2009).

Circundada por 177,6 km² de manguezais e 10,6 km² de apicuns, que se encontram localizados a jusante de encostas com características diversas (HADLICH, et. al., 2008 apud QUEIROZ; CELINO, 2008), a BTS possui uma riqueza natural, com presença de extensas áreas de recifes de corais, estuários e manguezais, fazendo desta baía um polo de turismo de grande valor (HATJE; ANDRADE, 2009).

Em meados de 1950, uma mudança expressiva se deu no cenário de desenvolvimento do Recôncavo baiano, quando a Petrobras inaugurou a RLAM no

município de Mataripe, fazendo do Recôncavo o único produtor de petróleo do país ente as décadas de 50 e 80 (OLIVEIRA, 2009). A identidade da região foi intensamente transformada por conta da descoberta e exploração do petróleo promovendo um intenso desenvolvimento econômico que resultou hoje em uma extensa zona industrial que inclui o maior polo petroquímico do hemisfério Sul, o Polo Petroquímico de Camaçari (HATJE; ANDRADE, 2009).

Historicamente o local é passivo de incidentes ocasionados pela atividade petrolífera desenvolvida na região, como derramamento de óleo, explosão de poços e vazamentos no transporte de óleo e gás e possui suas águas e sedimentos contaminados principalmente por hidrocarbonetos de petróleo (CRA, 2004).

Os municípios de São Francisco do Conde, Madre de Deus e Candeias representam importantes componentes estuarinos situados ao norte da BTS. Essas localidades estão ligadas à indústria do petróleo mantendo setores de produção, transporte e refino, que são responsáveis por um dos maiores focos de poluição da região (FIORAVANTI, 2013).

3.1.2 Coleta de sedimento

A coleta de sedimento foi realizada em três regiões de manguezal, ao norte da BTS (Figura 1B), que abrigam diferentes setores da cadeia produtiva do petróleo, sendo esses: (a) *de produção*, localizado no município de Dom João (DJ) em São Francisco do Conde – caracterizado pela extração de petróleo; (b) *de refino*, situado próximo ao município de Candeias (CN) onde está localizada a RLAM – que desenvolve o processamento do petróleo em seus derivados; (c) *de transporte*, localizado em Madre de Deus (MD) – onde está inserido o Terminal Aquaviário da cidade, o TEMADRE responsável pelo transporte dos petroderivados para a capital e interior do estado (FIORAVANTI, 2013).

As coletas de sedimento de manguezal contaminado, por derivados de petróleo, foram realizadas em trabalho anterior (FIORAVANTI, 2013) no âmbito de um projeto de mestrado abrigado pelo Programa de Pós-Graduação em Geoquímica – Petróleo e Meio Ambiente (POSPETRO). Para as análises microbiológicas coletou-se 50 g, para cada amostra, de substrato superficial (0,0 – 5,0 cm de profundidade) de manguezal em região de intermaré (CELINO; QUEIROZ, 2006), estas foram acondicionadas em recipientes de vidro, devidamente embalados em papel escuro a fim de evitar incidência da luz sobre a amostra. Após a coleta, os recipientes foram colocados em uma caixa de isopor contendo gelo até a chegada ao laboratório para a realização dos demais procedimentos.

3.2 TRABALHO DE LABORATÓRIO

3.2.1 Obtenção das cepas

As etapas de enriquecimento, isolamento e os ensaios de seleção dos micro-organismos foram concebidos em trabalho anterior (FIORAVANTI, 2013). Tais atividades microbiológicas iniciais foram realizadas no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA), localizado na Universidade Católica de Salvador (UCSAL), Bahia. Em seu trabalho, FIORAVANTI (2013) isolou 306 micro-organismos, destes 67% foram bactérias, 24% leveduras e 4% fungos filamentosos com potencial em degradar petróleo bruto, diesel e gasolina em até 24 horas. Com base nessas informações dezesseis cepas isoladas por FIORAVANTI (2013), que obtiveram melhores resultados nos testes de oxidação na presença de petróleo, foram previamente escolhidas para os ensaios de biodegradação neste trabalho.

3.2.2 Reativação

Todo o material utilizado foi esterilizado previamente e todas as etapas dos procedimentos foram realizadas em condições de assepsia, ou seja, junto à chama do bico de Bunsen e/ou numa câmara de fluxo laminar, a fim de evitar contaminações de micro-organismos que não fossem os testados neste estudo.

O material biológico a ser reativado encontrava-se preservado em tubos criogênicos, contendo meio de cultura ágar triptona de soja (TSA), em câmara fria, sob temperatura de -85°C , localizado no LEMA.

O procedimento de reativação do material preservado foi realizado no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO), do Núcleo de Estudos Ambientais (NEA) localizado no Instituto de Geociências (IGEO) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia.

A obtenção das colônias foi realizada através de repiques das colônias preexistentes preservadas. O repique é um procedimento microbiológico que tem como finalidade a renovação, reprodução e crescimento em placas de novas colônias, promovendo a ativação do metabolismo bacteriano.

As dezesseis cepas preservadas, previamente selecionadas, foram submetidas a procedimentos microbiológicos com o intuito de reativá-las e purificá-las segundo a metodologia de SOUZA, et. al., (2006), FERREIRA et. al., (2009) e TORTORA, et. al., (2005).

Foi utilizado o método de espalhamento em placa, segundo TORTORA et. al., (2005), para purificação das culturas. Sob a forma de estrias, as cepas, retiradas dos tubos criogênicos, foram semeadas, sobre a superfície do meio mueller hilton ágar sólido (MH) em placas de petri devidamente identificadas para o restabelecimento de seus metabolismos. Trata-se de um meio muito nutritivo (MH) que apresenta como fonte de carbono a peptona. Em seguida foram levadas à estufa incubadora, do tipo demanda bioquímica de oxigênio (BOD), durante 24hs a 48hs sob temperatura de 30°C.

Após as reativações, e visualizado um crescimento significativo em biomassa das linhagens, foi preparado um cultivo em meio mineral mínimo buschenell hass sólido (BH) contendo 1% de petróleo bruto. Trata-se de um meio menos nutritivo e isento de fonte de carbono, contendo apenas componentes inorgânicos essenciais para o crescimento bacteriano. As culturas foram incubadas durante 24 h e 48 h a 35°C em estufa incubadora (BOD). Detectado o crescimento em meio BH foi possível comprovar a real degradação do petróleo pelos micro-organismos, já comprovada previamente no trabalho anterior de FIORAVANTI (2013). Dentre as dezesseis bactérias pré-selecionadas, todas cresceram, em maior ou menor grau, na presença do petróleo.

A princípio, foi observado que dentre as dezesseis cepas escolhidas, algumas não estavam puras, pois apresentavam visualmente uma ou mais características morfológicas em uma mesma placa, havendo mais de um tipo de micro-organismo. As cepas impuras foram então repicadas até a obtenção do isolado propriamente dito e posteriormente, para a manutenção destes, a cada 30 dias, com intuito de manter ativos seus metabolismos.

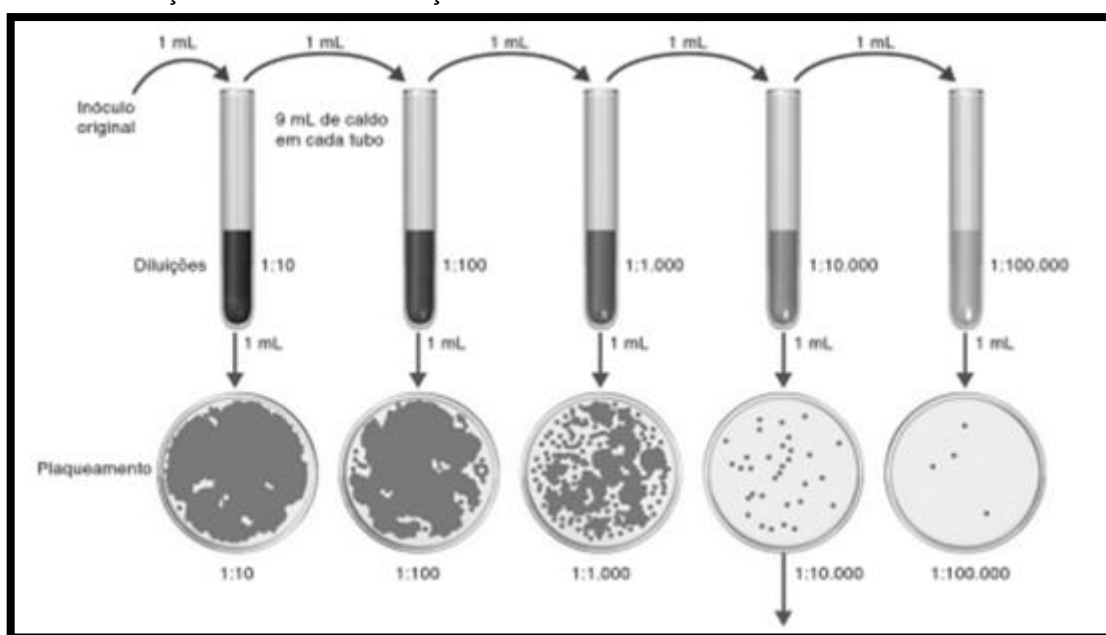
3.2.3 Seleção e purificação

Dentre os dezesseis micro-organismos cultivados, as dez cepas que obtiveram maior crescimento foram priorizadas, em detrimento das seis que não tiveram crescimento significativo observado visualmente nas placas. Em seguida foi realizada a técnica da diluição seriada (Figura 2), que consiste em sucessivas diluições da amostra permitindo tanto o isolamento como a contagem de colônias.

Nessa etapa de purificação foram utilizados quatro micro tubos, com capacidade de 1,5 ml cada, contendo 0,9 ml de solução salina (9%) estéril. Retirando-se com a alça de platina, previamente esterilizada em bico de Bunsen, uma quantidade padrão (50% do aro da alça) de colônia, da cultura de interesse, adicionou-se esse conteúdo ao micro tubo, contendo a solução salina. Uma vez levado a vortex, para homogeneizar o conteúdo e desagregar as colônias, retirou-se uma alíquota (100µl) da suspensão, adicionando ao próximo micro tubo e assim sucessivamente até que se obtivesse uma diluição de 10.000

vezes (10^{-4}). No término das diluições, retirou-se uma alíquota (100 μ l) do material em suspensão e adicionou-se em placa de petri contendo meio MH sólido, espalhando o conteúdo em placa com o auxílio da alça de drigalski. Em seguida as placas foram identificadas, embaladas e levadas à estufa incubadora (BOD) a 30°C durante quatro dias. A metodologia de espalhamento em placa, aliada à técnica de diluição seriada, foi repetida diversas vezes até que houvesse, por fim, apenas colônias puras e desagregadas umas das outras. Devidamente purificados (isolados) um total de seis cepas foram selecionada para os testes de cinética, sendo elas denominadas como amostras: LEPETRO 128-A, LEPETRO 128-B, LEPETRO 155-C, LEPETRO 155-I, LEPETRO 05-A e LEPETRO 67-F.

FIGURA 2 Ilustração da técnica de diluição seriada.



Fonte: Adaptado de TORTORA (2012).

3.2.4 Identificação

ANDRADE (2015) realizou o sequenciamento parcial do gene 16srRNA e da enzima catecol 1,2 dioxigenase (gene C120) no Centro de Biotecnologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, das dez cepas selecionadas neste estudo.

O gene C120 codifica a enzima catecol 1,2 dioxigenase, catalizadora na quebra do anel benzênico (HENDRICKX et al., 2006). O sequenciamento do gene C120 teve o propósito de identificar genótipos degradadores de monoaromáticos.

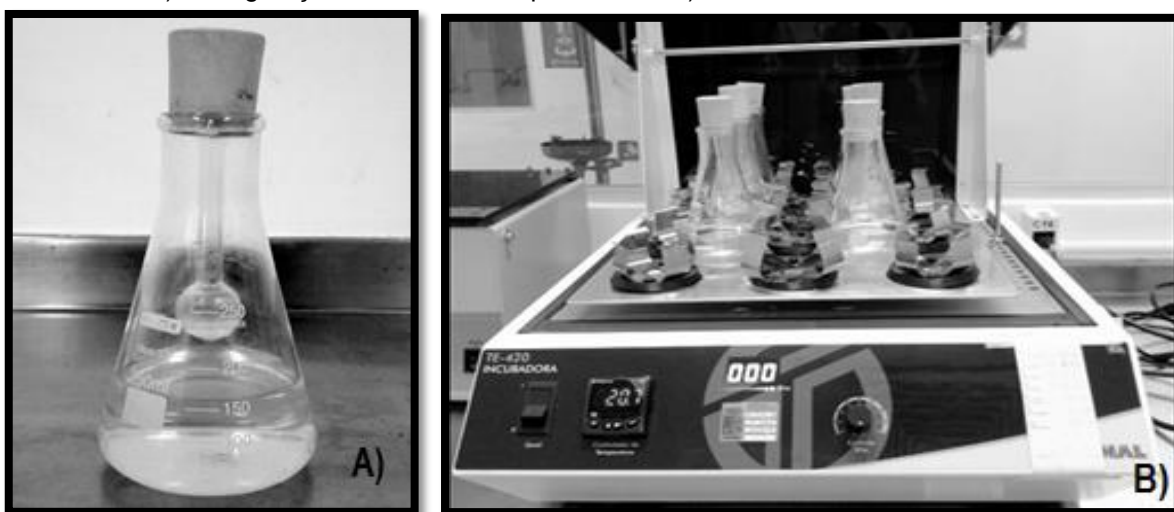
As dez cepas selecionadas para o sequenciamento genético de identificação e para a detecção do gene C120 foram escolhidas de acordo com seu potencial de degradação já estabelecido no trabalho anterior, realizado por FIORAVANTI (2013).

3.2.5 Cinética de crescimento

O experimento foi dividido em três etapas (dias), sendo elas: overnight (dia 1), medidas e plaqueamento (dia 2) e a contagem de colônias (dia 3). O experimento teve embasamento metodológico segundo trabalhos realizados por GUSMÃO et. al. (2005) e SOUZA et. al. (2009) sendo feitas triplicatas para cada amostra.

No experimento foram utilizados quatro erlenmeyers de 500 ml, para cada amostra, contendo 150 ml de meio mineral mínimo líquido (BH). Os erlenmeyers foram vedados com rolhas de borracha anti-ácidas, para que não houvesse contaminação do meio externo. Encaixados à tampa, encontravam-se inseridos, na parte inferior de cada rolha, um balão de vidro, feito sob medida, de 10 cm de altura, 0,5 cm de diâmetro e 05 mm de abertura de balão (orifício), onde por sua vez foram adicionados 02 ml de BTX, isoladamente. Uma vez no interior do tubo, o BTX pôde ser volatilizado para o meio líquido. A via de entrada do BTX sob a forma de gás teve o intuito de evitar concentrações muito altas no meio, que poderiam acarretar na morte dos micro-organismos por toxicidade durante o experimento (Figura 3A).

FIGURA 3 – A) Configuração do ambiente experimental. B) *Shaker* orbital e incubadora.



A) *Dia 1: preparo do inoculo (overnight)*

Para o preparo do inoculo, a fim de se obter biomassa significativa para dar início ao experimento, realizou-se o “overnight”. Para isso, retirou-se um *loop* (circunferência completa da alça de platina) da amostra biológica a ser inoculada e adicionou-se em um erlenmeyer contendo 150 ml de meio mineral BH líquido e 10 microlitros de benzeno (uma gota) inserida ao meio. Em uma mesa *shaker* orbital (Figura 3B), com energia de agitação

constante de 122-125 ciclos/min em temperatura controlada de 30°C, foi promovida agitação entre 12-16 horas. Para cada amostra (cepa) foram submetidos quatro erlenmeyers em agitação contendo os componentes descritos abaixo:

- ERLENMEYER 1 (OVERNIGHT): Contendo 150 ml do meio mineral líquido (BH), o inóculo (*loop*) e 10 microlitros (uma gota) dos componentes do BTX, isoladamente, imerso no meio.
- ERLENMEYER DO EXPERIMENTO - R1, R2 e R3 (TRIPLICATAS): Contendo 150 ml do meio mineral líquido (BH) e 02 ml dos componentes do BTX, isoladamente no interior do balão de fundo redondo.

Os erlenmeyers R1, R2 e R3 corresponderam às triplicatas de cada amostra e ficaram sob agitação em *shaker* orbital no dia anterior ao experimento, com o intuito de ambientá-los, permitindo a disponibilização do BTX via gás para o meio mineral dentro do período de 12-16 horas antes do início do experimento.

B) Dia 2: amostragens

Após 12-16hs, retirou-se o overnight (erlenmeyer 1) e observou certa turbidez do meio, devido ao crescimento em biomassa do inóculo adicionado no dia anterior.

O experimento foi realizado com 1% do inóculo (1,5 ml do overnight). Para isso, retirou-se 1,5 ml da suspensão overnight e inoculou-se os três erlenmeyers experimentais (R1, R2 e R3). Posteriormente foi adicionado 1 ml dos conteúdos dos erlenmeyers, já inoculados, (R1, R2 e R3), devidamente homogeneizado (manualmente), em três micro tubos previamente esterilizados. Estes foram levados a vortex, para a suspensão das colônias e realizou-se a primeira amostragem correspondente ao tempo zero hora (T0), para as medidas de densidade ótica (OD) e unidades formadoras de colônias (UFC). Ao fim da primeira medida os erlenmeyers foram recolocados na mesa *shaker* orbital para realização das amostragens posteriores.

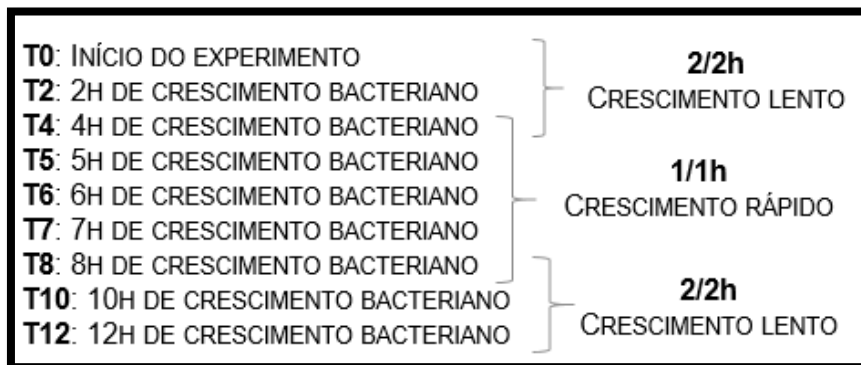
Foram efetuadas diluições sucessivas, pela técnica da diluição seriada, das alíquotas retiradas dos erlenmeyers nas amostragens, com o intuito de diluir e desagregar as colônias de bactérias e permitir a contagem das UFC posteriormente através do método de contagem em placas.

Ao longo das doze horas de experimento foram tomadas alíquotas de 0,1 ml da amostra em suspensão adicionando em micro tubos limpos e estéreis e encaminhadas para

a medição. Foram feitas nove amostragens em diferentes tempos (T0, T2, T4, T5, T6, T7, T8, T10, T12), completando assim doze horas de análise em diferentes diluições (Figura 4), onde nos tempos T0, T2, T4, a diluição foi 10^{-3} , nos tempos T5, T6, T7, T8 a diluição foi 10^{-4} e nos tempos T10 e T12, a diluição foi 10^{-2} , sendo plaqueados com uma pipeta semiautomática de 10 μ l (uma gota) em triplicatas.

O procedimento acima descrito foi repetido, da mesma maneira, nos tempos subsequentes, ao longo das doze horas de experimento, para cada amostra (cepa) em cada componente do BTX (benzeno, tolueno e xileno).

FIGURA 4 - Esquema do intervalo entre as amostragens ao longo das 12hs de experimento.

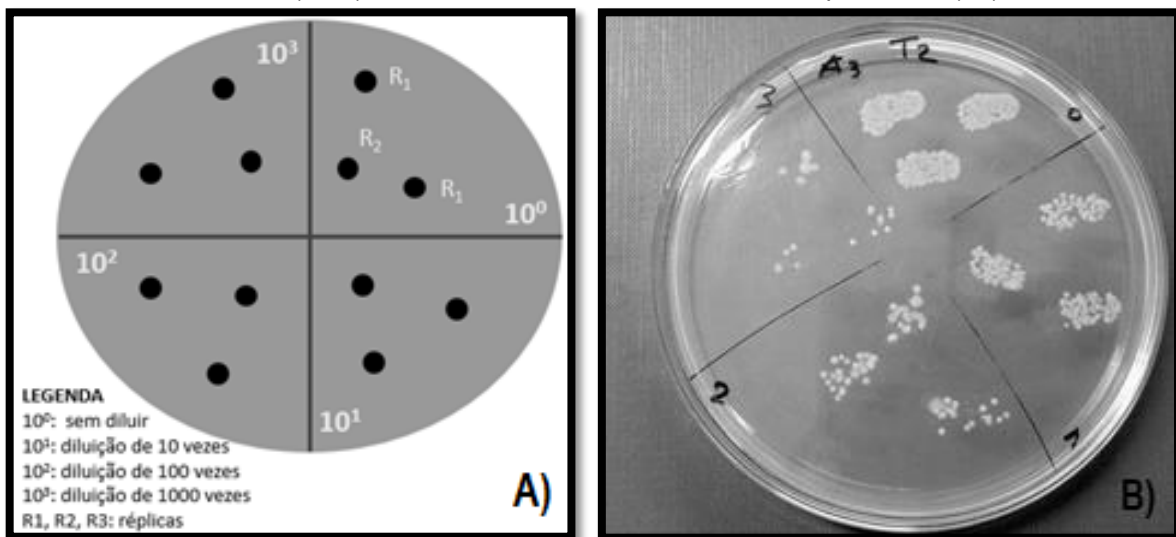


Fonte: Adaptado de TORTORA (2012).

Para estimativa das UFC foi adotado a técnica da micro gota, segundo metodologia de ROMEIRO (2007).

Para cada diluição (0, 10, 100 e 1000 vezes) foram adicionadas três gotas em placas de petri contendo meio MH sólido, previamente identificadas e divididas em quadrantes (Figura 5A). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em temperatura de 30° C e submetidas à contagem de UFC após 24 horas.

FIGURA 5 – A) Disposição das micro gotas na placa de petri. B) Representação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da amostra 05-A em duas horas de experimento (T2).



Com as alíquotas retiradas nas amostragens, realizou-se as medições da densidade ótica (DO), medindo-se a absorvância da solução bacteriana determinada por espectrofotometria de UV (*Agilent Cary 60 Agilent Technologies*) em comprimento de onda de 550 nanômetros, obtendo assim o grau de turbidez de cada amostra (medida direta do número de células totais em suspensão). O branco foi medido com o meio puro, sem o inóculo, e as medidas de DO da suspensão bacteriana foram realizadas no decorrer das 12 horas de experimento. As medidas de absorvância obtidas puderam ser correlacionadas com a concentração de biomassa nos intervalos de tempo amostrados, gerando assim medidas de densidade ótica.

C) Dia 3: contagem das UFC

Após a incubação por 24 horas em estufa incubadora (BOD), as placas foram contadas com o auxílio de um contador de colônias eletrônico. Foi possível estimar o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) presentes em cada diluição, procedendo de forma a escolher determinada diluição em que houvesse melhor visualização das colônias para contá-las de forma unitária e separadamente (Figura 5B).

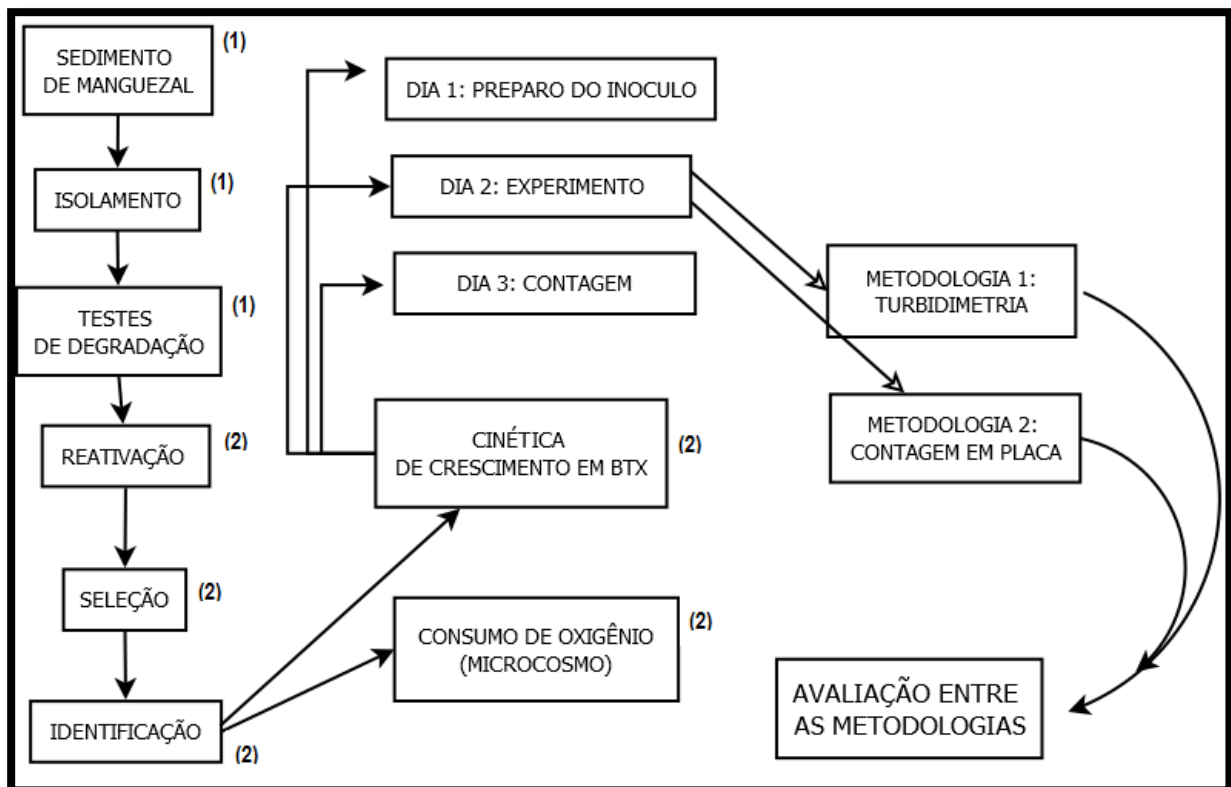
3.2.6 Consumo de oxigênio

ANDRADE (2015) realizou, em microcosmo, testes de respiração total das mesmas cepas utilizadas nos testes de cinética, em diferentes concentrações de BTX. As medidas de consumo de oxigênio foram realizadas em 12 horas, 24 horas e 48 horas. Para isso, foi

coletado sedimento de manguezal, localizado próximo ao rio São Paulo, que desagua na BTS, com a finalidade de melhor simular as condições ambientais na biodegradação.

Na Figura 6 podemos visualizar o sequenciamento metodológico do estudo. Tendo início com a coleta de sedimento de manguezal contaminado e posteriormente utilizando os micro-organismos isolados deste substrato como alvo do estudo preliminar no contexto da biorremediação. Por fim, a partir dos dados experimentais, procedeu-se de forma a avaliar as metodologias (contagem em placas e turbidimetria) utilizadas.

FIGURA 6 - Fluxograma das etapas realizadas anteriormente para a obtenção dos dados e as realizadas neste trabalho. (1) Etapas finalizadas por FIORAVANTI (2013); (2) Etapas finalizadas por ANDRADE (2015).



Fonte: FIORAVANTI (2013); ANDRADE, (2015).

3.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS

Com o auxílio do software Excel versão 2013 foi realizada a organização em tabelas dos dados coletados durante o experimento (Anexo 6). A partir dos dados tabelados foram gerados gráficos de dispersão do comportamento cinético das bactérias no tempo tanto para as medidas de DO, quanto para as medidas de UFC. As taxas de crescimento específico no tempo, que correspondem aos coeficientes lineares das retas de crescimento, para cada bactéria, foram obtidas graficamente plotando o intervalo de tempo de T2 a T6, período que

correspondeu ao crescimento exponencial das bactérias ao longo das 12 horas do experimento.

Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software PAST 3.11, onde foram gerados tabelas e gráficos. Esse software é utilizado para tratamento de dados científicos e se encontra disponível para download online. Foi efetuado o trabalho estatístico descritivo com o cálculo de parâmetros como: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação e variância das medidas (Apêndice A).

3.3.1 Cálculos experimentais

Os dados iniciais, obtidos pela contagem das colônias, para o método de contagem em placas, e as leituras da absorbância, pelo método turbidométrico, tiveram que ser transformados, através do cálculo do logaritmo neperiano (LN), a fim de torná-los compatíveis para o cálculo da reta de regressão linear. Foi utilizado para esse cálculo os dados referentes às amostragens de T2 a T6, que corresponde ao intervalo de crescimento exponencial das cepas.

Para a obtenção do valor final da densidade ótica (DO), foram somadas as três repetições (réplicas), tiradas as médias e aplicado em seguida o cálculo do LN (=LN (média)) para confecção dos gráficos de regressão. Já o cálculo realizado para as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi feito somando-se as repetições (réplicas), tiradas as médias ($X_{Média}$), multiplicando-as pelo inverso da diluição (10^n) e novamente pelo volume da micro gota ($10\mu l$). Por fim, aplicou-se o LN (=LN (X_{Final})) para obtenção do resultado final (Equação 1).

$$X_{Final} = X_{Média} \cdot 10^n \cdot 10^{-1} \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

X_{Final} – média final obtida

$X_{Média}$ – média aritmética das triplicatas

10^n – diluição realizada

10^{-1} – volume da micro gota

Na planilha do Excel, foi selecionado a coluna de tempo (que correspondeu ao T2-T6) e a coluna do LN da média final, para DO e UFC, onde foi escolhido o tipo de gráfico de dispersão (XY). Foi inserida linha de tendência exibindo a equação da reta de regressão linear ($Y = ax + b$) e o valor de R-quadrado (R^2) relacionado à dispersão dos dados. A taxa de crescimento específico, que correspondeu ao próprio coeficiente angular (a) das retas calculadas pôde, então, ser estabelecida para cada uma das seis cepas desse estudo.

A partir dos dados de cinética, pôde ser calculado o tempo de geração para cada cepa (Apêndice B). Para isso, foi utilizada a fase de crescimento exponencial (log) que correspondeu ao intervalo entre o tempo T2 até T6. Os valores obtidos para esses dois tempos foram transformados em valores logarítmicos, aplicando-se o LN, e subtraídos um do outro. A partir dessa subtração, dividiu-se esse valor pelo LN (2) = 0,301, obtendo-se assim o número de gerações, ou seja, o número de vezes que a células se dividiram dentro do intervalo de tempo (T2-T6). A partir do número de gerações (Equação 2), pode-se então calcular o tempo de geração (Equação 3).

$$\mathbf{NG} = \frac{\mathbf{LN(T6)} - \mathbf{LN(T2)}}{\mathbf{LN(2)}} \quad \text{(Equação 2)}$$

$$\mathbf{TG} = \frac{\mathbf{60 \text{ min} \times X}}{\mathbf{NG}} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

NG – número de gerações

TG – tempo de geração

LN (2) = 0,301

X = 4 horas

3.3.2 Coeficiente de correlação linear

Os coeficientes foram calculados a partir das retas de regressão linear geradas no intervalo de crescimento exponencial das cepas. O coeficiente de correlação linear (R²) é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear geral, como a regressão linear, em relação aos dados observados. Quanto maior o R², mais explicativo é o modelo, ou seja, mais ele se ajustará às amostras (Apêndice C). A quase totalidade dos coeficientes apresentaram valores muito próximos a um.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os comportamentos das cepas bacterianas no tempo estiveram em conformidade com o de um crescimento bacteriano típico, largamente expresso na literatura, podendo ser observado claramente as quatro fases do crescimento microbiano - lag, log, estacionária e

morte (Apêndice D). Ao longo das duas primeiras horas de experimento (T0 -T2) foi visualizada a fase de aclimação. A partir da segunda amostragem (T2) ocorre um crescimento abrupto com término na sexta hora (T6).

Para cada réplica de amostra (cepa), o valor médio é mostrado por uma barra cinza (Figuras 7, 8 e 9). O intervalo das barras de erro, apresentado por linhas, representa o erro padrão para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 7 - Gráfico tipo box plot dos dados de densidade ótica (DO) e número de colônias (UFC/ml), respectivamente, referente ao crescimento em *benzeno*.

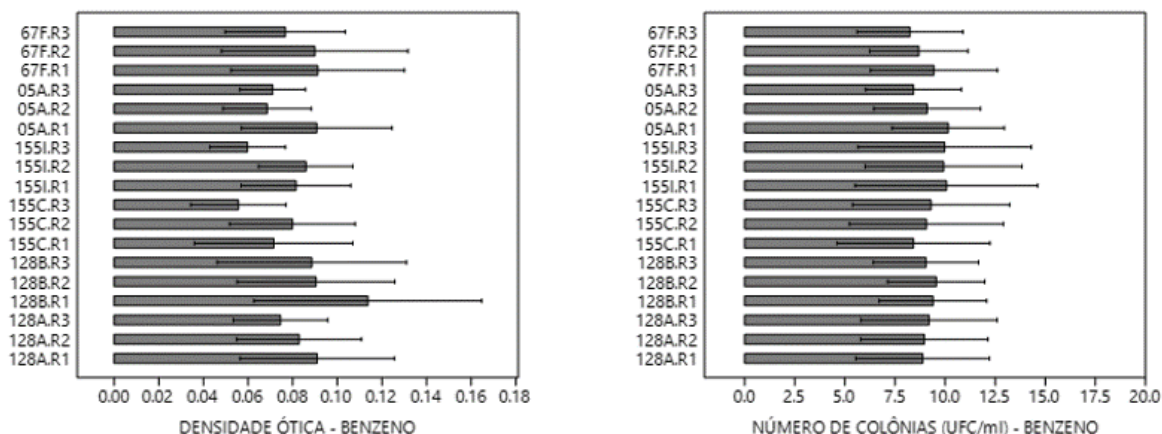


FIGURA 8- Gráfico tipo box plot dos dados de densidade ótica (DO) e número de colônias (UFC/ml), respectivamente, referente ao crescimento em *tolueno*.

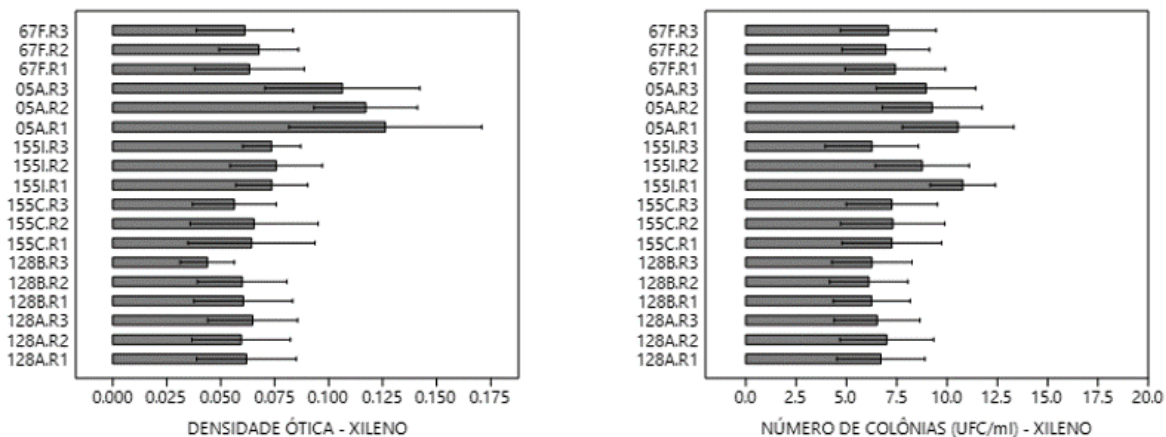
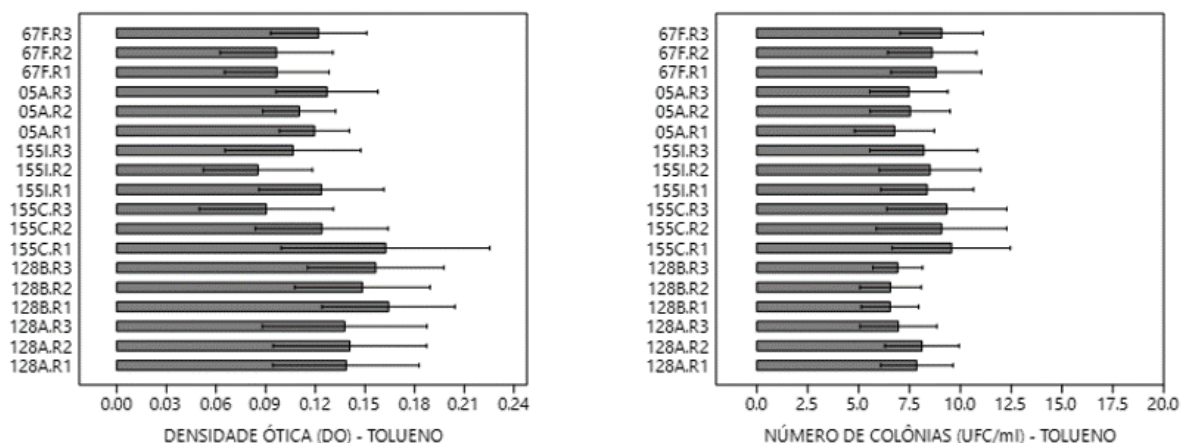


FIGURA 9 - Gráfico tipo box plot dos dados de densidade ótica (DO) e número de colônias (UFC/ml) para o crescimento em *xileno*.



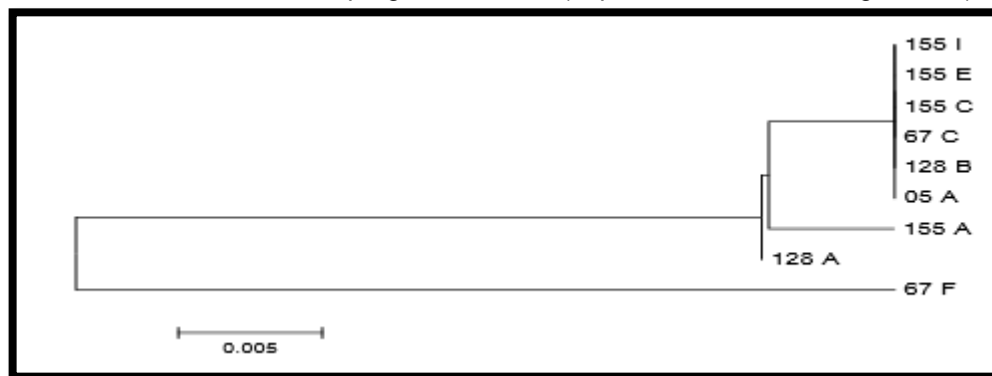
Através dos gráficos box plot gerados, podemos perceber que as réplicas dentro de uma mesma amostra variaram menos pela metodologia de contagem em placas, quando comparado às medidas de densidade ótica obtidas pelo turbidimetria.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS

As dez cepas bacterianas utilizadas nesse trabalho (Anexo 2), de acordo com as seqüências encontradas no NCBI, foram das espécies: *Pseudomonas putida* (cepa 128 A e cepa 155 C), *Pseudomonas monteilli* (cepa 05 A), *Pseudomonas sp.* (cepa 128 B e cepa 76 C) *Pseudomonas flavencens* (155 I), *Acinetobacter calcoaceticus* (cepa 102 A e cepa 67 F), *Proteus penneri* (cepa 155 A) e *Wautersiella* (cepa 155 E) (ANDRADE, 2015).

Foi construído um cluster (Figura 10) a fim de comparar as relações homologas entre as cepas e a enzima catecol 1,2 dioxigenase. Segundo ANDRADE (2015), dentre as dez cepas isoladas, um total de nove foram homologas à enzima catecol 1,2 dioxigenase (Anexo 3). O cluster gerado mostra também que dentre o total das cepas, seis (LEPETRO-128 B, LEPETRO-67 C, LEPETRO-155C, LEPETRO-155 I, LEPETRO-155 E, LEPETRO-05 A) são homólogas, apresentando uma alta similaridade entre si. Já as cepas LEPETRO-128 A e LEPETRO155 A possuem menor similaridade com as cepas anteriores, evidenciado pela distância no cluster. Por fim, a cepa LEPETRO-67 F possui uma dissimilaridade, ainda maior, entre o restante das cepas isoladas (ANDRADE, 2015).

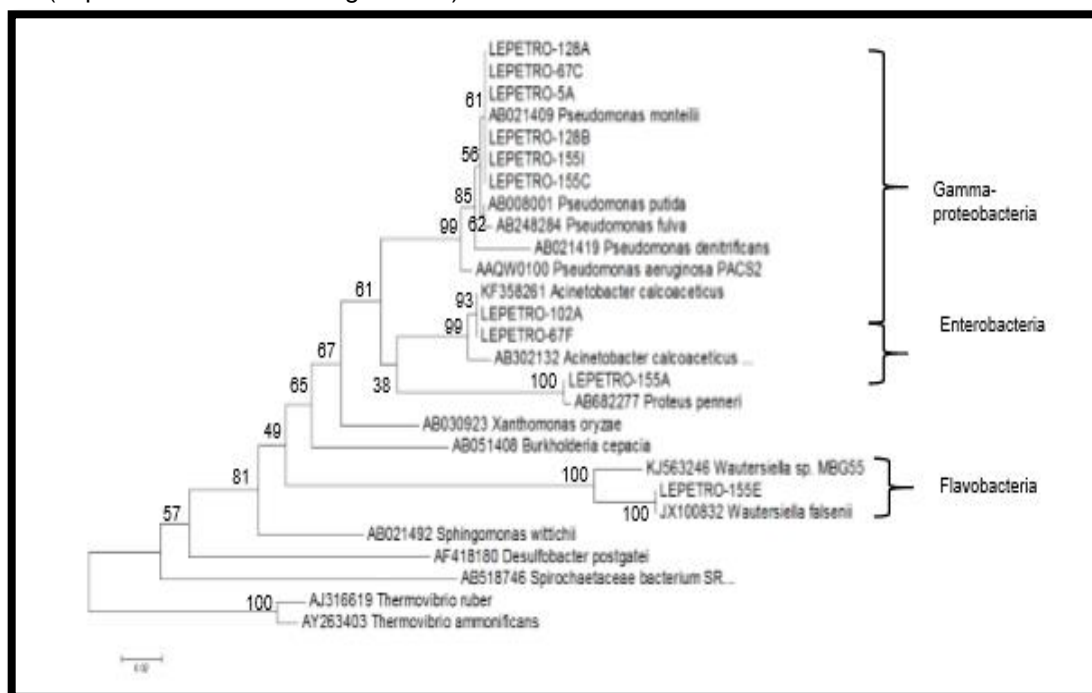
FIGURA 10 - Cluster comparando a similaridade entre as sequências da catecol (C120) das 10 cepas isoladas. Análise realizada utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).



Fonte: ANDRADE (2015).

A descrição gerada pela análise de similaridade com base na sequência parcial do gene 16S rRNA (Figura 11) indicou que as cepas LEPETRO-128A, LEPETRO-67C, LEPETRO-05A, LEPETRO-128B, LEPETRO-155I, LEPETRO-155C, foram agrupadas a classe Gama-proteobacteria, com uma probabilidade 61% de serem da mesma espécie *Pseudomonas monteilli*, 85% com a *Pseudomonas putida* e 62% com a *Pseudomonas fulva*. Já as sequências das cepas LEPETRO-102A, LEPETRO-67F e LEPETRO-155A, foram agrupadas a classe das Enterobacteria, com probabilidade de 93-99% de pertencerem a mesma espécie *Acinetobacter calcoaceticus* e com 100% de probabilidade de serem da mesma espécie da *Proteus penneri*. A cepa LEPETRO-155E foi agrupada a classe das Flavobacteria com 100% de probabilidade de serem a mesma espécie da *Wautersiella* (ANDRADE, 2015).

FIGURA 11 - Árvore filogenética das cepas bacterianas utilizadas analisadas através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).



Fonte: ANDRADE (2015).

Dentre as dez cepas selecionadas na etapa de seleção e purificação, apenas a cepa 102 A, identificada como *Acinetobacter calcoaceticus*, não amplificou, para a detecção do gene C120, responsável pela síntese da enzima catecol 1,2 dioxigenase, utilizada na quebra do anel benzênico (ANDRADE, 2015). Dentre as dez bactérias que apresentaram potencial em degradar petróleo, isoladas por FIORAVANTI (2013), nove delas apresentaram também potencial genético, confirmado com a detecção do gene C120, através do sequenciamento realizado por ANDRADE (2015) em degradar monoaromáticos. As cepas utilizadas nos testes de cinética de crescimento estão incluídas na classe Gamaproteobacteria e são do gênero *Pseudomonas*, com exceção da cepa 67 F que pertence à classe Enterobacteria classificada como sendo do gênero *Acinetobacter* (ANDRADE, 2015).

Existem diversos trabalhos acadêmicos que relatam o potencial do gênero *Pseudomonas* em degradar centenas de compostos orgânicos diferentes, como hidrocarbonetos de petróleo, inseticidas, herbicidas, plásticos e pesticidas (TRIGUEIROS, 2008). Tal habilidade é bastante conhecida na biodegradação dos compostos BTEX, tema expressamente debatido em trabalhos científicos (CAVALCA et al., 2000; REARDON et al., 2000; HAMED et al., 2003; SHIM et al., 2005; TRIGUEIROS, 2008). O gênero *Acinetobacter* também é amplamente citado na literatura como potencial assimilador de hidrocarbonetos presentes no petróleo (CHAÎNEAU, et al., 1999; GALLEG0 et al., 2001; TRIGUEIROS, 2008). A bactéria *Pseudomonas putida* é capaz de crescer em tolueno, benzeno, fenol,

etilbenzeno e outros aromáticos, utilizando-os como fontes de energia para seu desenvolvimento (REARDON et al., 2000, ABUHAMED et al. 2004; SHIM et al. 2005). SHIM e YANG (1999) demonstraram, em biorreator com leito de fibras, a biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno por co-cultura de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*.

4.2 CRESCIMENTO ESPECÍFICO (μ)

Analisando as taxas de crescimento específico (μ), que corresponde aos coeficientes lineares das retas, podemos visualizar o quanto a população bacteriana variou no tempo (h^{-1}), estimando assim as velocidades de crescimento de cada uma das cepas. Observando a Tabela 1 podemos notar que os valores encontrados para as duas metodologias são muito semelhantes.

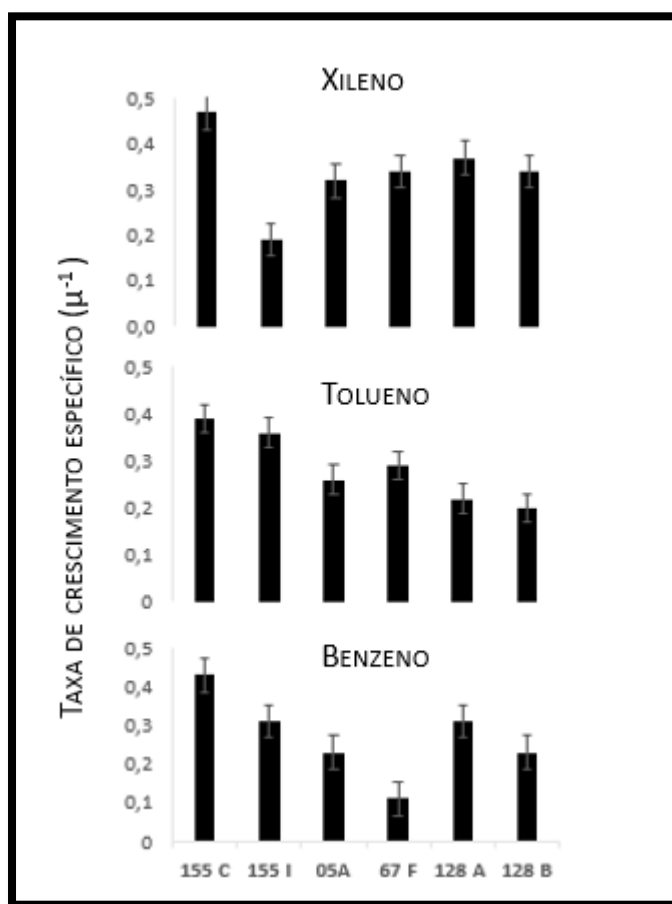
TABELA 1 - Resultados experimentais das taxas de crescimento específico (h^{-1}) para cada cepa bacteriana na presença de benzeno, tolueno e xileno (BTX) em 12 horas.

<i>Cepas</i>	<i>DO</i> <i>Benzeno</i>	<i>UFC</i> <i>Benzeno</i>	<i>DO</i> <i>Tolueno</i>	<i>UFC</i> <i>Tolueno</i>	<i>DO</i> <i>Xileno</i>	<i>UFC</i> <i>Xileno</i>
128 A	0,28	0,31	0,21	0,22	0,28	0,37
128 B	0,23	0,23	0,20	0,20	0,34	0,34
155 C	0,43	0,43	0,39	0,39	0,47	0,47
155 I	0,30	0,31	0,36	0,36	0,19	0,19
05A	0,23	0,23	0,26	0,26	0,32	0,32
67 F	0,10	0,11	0,29	0,29	0,34	0,34

* Taxas de crescimento específico (h^{-1})

Portanto, para o cálculo da velocidade de crescimento bacteriano, não foi detectada diferença significativa entre a escolha de um método a outro.

FIGURA 12 – Resultados experimentais das taxas de crescimento específico (h^{-1}) para cada cepa na presença de BTX.



Fonte: Adaptado de ANDRADE (2015).

A menor taxa de crescimento, em cultura líquida, coube à cepa 67 F ($\mu = 0,10 h^{-1}$) na presença de benzeno e a maior taxa foi detectada pela cepa 155 C ($\mu = 0,47 h^{-1}$) em xileno.

Podemos notar na Figura 12 que as maiores taxas de crescimento (μ) foram registradas na presença de xileno, seguido do composto tolueno e por fim o benzeno. Todas as seis cepas apresentaram os melhores comportamentos em xileno, exceto a cepa 155 I, que obteve melhor crescimento na presença de tolueno e benzeno.

A cepa 155 C, identificada como *Pseudomonas putida*, apresentou as maiores velocidades de crescimento na presença de todos os compostos BTX testados.

ANDRADE (2015) afirma que espécies de bactérias similares podem apresentar metabolismos diferenciados por conta de variações ecofisiológicas específicas entre as cepas, e tais variações sejam reflexo das diferenças gênicas da catecol dioxigenase. Explicando o porquê das cepas que foram identificadas como sendo da mesma espécie, ter apresentado comportamentos distintos nos experimentos de cinética de crescimento e consumo de oxigênio. Outro fator que pode explicar os diferentes comportamentos

apresentados é a existência de características metabólicas primárias e secundárias, como: capacidade de produção de biossurfactantes ou mesmo questões relacionada com o plasmídeo, das cepas, que podem ser fatores preponderantes para essas diferenciações metabólicas evidenciadas (ANDRADE, 2015).

4.3 CONSUMO DE OXIGÊNIO X CRESCIMENTO ESPECÍFICO

ANDRADE (2015) realizou experimentos em microcosmo com sedimento de manguezal, em laboratório, na presença de BTX a fim de avaliar o consumo de oxigênio utilizando a técnica de medição da respiração total da cultura inoculada para cada uma das seis cepas - 128 A, 128 B, 67 F, 155 C, 155 I e 05 A (Anexo 4).

As cepas identificadas (ANDRADE, 2015) como *Pseudomonas*, nos testes de cinética, exibiram maior potencial em biodegradar xileno, em detrimento dos outros compostos, com exceção da cepa 155 I, identificada como *Pseudomonas flavescens*, sendo a única cepa que apresentou maior potencial na presença de tolueno. Em contrapartida, para o consumo de oxigênio, a cepa demonstrou o menor consumo em tolueno, quando comparado ao xileno e benzeno. Ou seja, o comportamento da cepa 155 I em meio líquido foi melhor, quando comparado aos testes de consumo de oxigênio em sedimento contaminado. A matriz ambiental testada (sedimento) dificultou, de certa forma a capacidade da cepa em biodegradar o tolueno, tendo melhores resultados na presença de xileno e benzeno.

Os compostos, para serem biodegradados, precisam estar disponíveis, ou seja, livres no meio, de forma que possam ser transportados para o interior das células. Entre os contaminantes orgânicos é muito comum a adsorção destes em partículas do solo, tornando-os parcialmente indisponíveis para o micro-organismo (RESENDE, 2007). O processo físico de adsorção pode ter sido um dos fatores que levaram à indisponibilidade de alguns compostos para as cepas cultivadas nos testes em sedimento, podendo ser uma resposta quanto às diferenças de comportamento em meio aquoso e na matriz sedimentar.

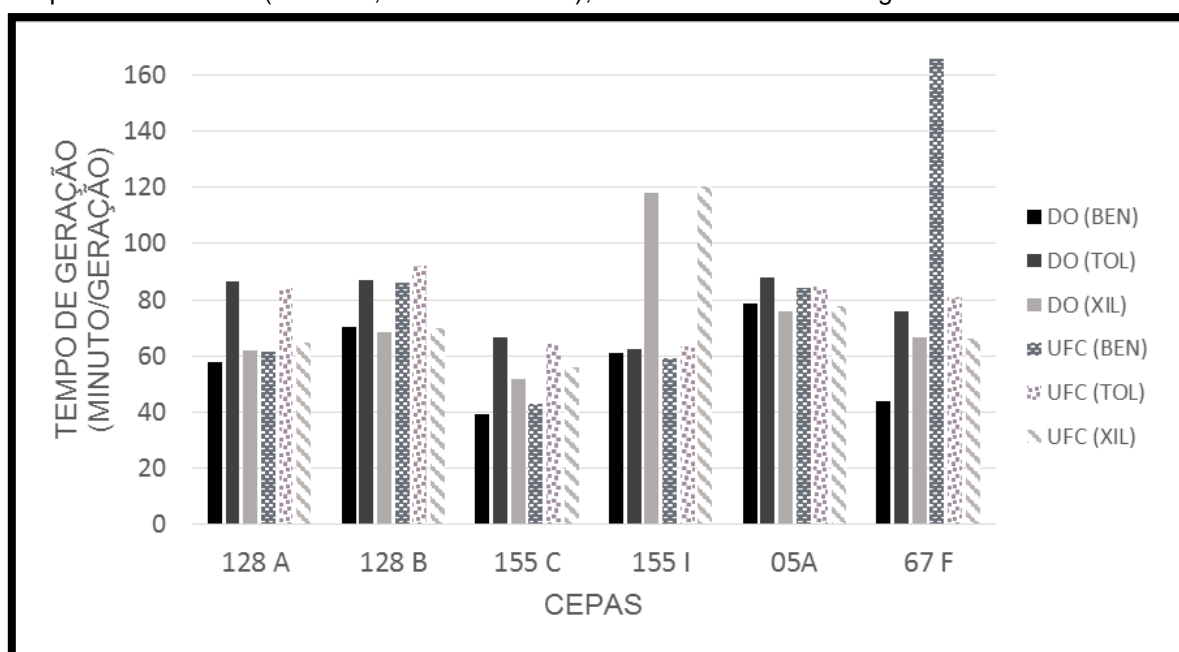
Neste trabalho, avaliando um quadro geral, as maiores taxas de crescimento foram evidenciadas em xileno, seguida de tolueno e benzeno. Com relação ao consumo de oxigênio, as cepas apresentaram melhores resultados na presença de xileno e benzeno, quando comparadas ao tolueno, diferentemente do que foi relatado no trabalho de SPILBORGHS (1997) e outros. Tais divergências podem estar relacionadas com as condições do meio, como: umidade, pH, temperatura, tipo de matriz (água/sedimento) entre outros parâmetros.

4.4 TEMPO DE GERAÇÃO X CRESCIMENTO ESPECÍFICO (μ)

A maioria das bactérias apresenta um tempo de geração de 60 a 180 minutos (1 a 3 horas), mas algumas necessitam de mais de 24 horas para cada geração (TORTORA, et al. 2005). A maior parte dos dados obtidos, neste trabalho, estiveram entre 60 e 80 minutos/geração, que reforça a ideia de um crescimento bacteriano típico.

Os valores do tempo de geração (Figura 13) calculado tiveram resultados muito próximos para os testes com os diferentes componentes do BTX (benzeno, tolueno e xileno) em ambas metodologias.

FIGURA 13 - Gráfico comparativo ilustrando o tempo de geração de cada bactéria, na presença dos componentes do BTX (benzeno, tolueno e xileno), entre as duas metodologias avaliadas.



A partir da análise, observamos que as cepas obtiveram os menores tempos de geração na presença de xileno e benzeno, enquanto que na presença de tolueno elas demoraram mais tempo para dobrarem suas populações.

4.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS X CRESCIMENTO ESPECÍFICO X CONSUMO DE OXIGÊNIO

O benzeno possui maior facilidade em passar para fase gasosa e solubilizar-se no meio de cultura, tornando-se disponível para as cepas, durante o experimento, quando comparado aos outros componentes. No entanto, foi observado que as cepas obtiveram melhores resultados em xileno. Ou seja, mesmo apresentando baixas solubilidade e pressão

de vapor, quando comparado ao benzeno, o xileno pôde ser transformado em gás e disponibilizado para o meio de cultura, sem maiores prejuízos.

Os resultados deste trabalho indicaram que as cepas bacterianas obtiveram melhores resultados na presença de xileno, composto mais pesado, do que em tolueno, confirmando que não é regra que a microbiota irá degradar frações mais leves, em detrimento das mais pesadas.

Os compostos BTEX são degradados aerobiamente por micro-organismos através de um processo oxidativo em que a primeira etapa se processa através de reações catalisadas por enzimas oxigenases que introduzem átomos de oxigênio no anel aromático ou em seus substituintes alquil (CAVALCA et al., 2000, CHAKRABORTY & COATES, 2004). Qualquer composto sofrerá biodegradação somente se houver uma enzima ou um sistema enzimático capaz de catalisá-lo (MATHEUS, 1997; TRIGUEIROS, 2008).

4.6 SETORES DA CADEIA DE PETRÓLEO X DIVERSIDADE

FIORAVANTI (2013) em seu trabalho isolou e selecionou micro-organismos de sedimentos contaminados, oriundos dos setores da cadeia produtiva de petróleo que foram utilizados na pesquisa de ANDRADE (2015), bem como neste trabalho. A partir dos isolados promoveu-se o crescimento dos micro-organismos, em laboratório, na presença de diferentes substratos (petróleo, gasolina e diesel), obtendo um maior número de micro-organismos isolados, principalmente bactérias, da região de refino (36%), transporte (30%) e produção (30%), na presença de petróleo bruto como fonte de carbono, em detrimento dos outros compostos (FIORAVANTI, 2013).

As populações bacterianas que degradam hidrocarbonetos em sedimentos marinhos contaminados por óleo são maiores do que nos sedimentos não contaminados com esses compostos (BRADDOCK et. al., 1996). Geralmente essas populações representam menos de 1% do total das comunidades em ambientes naturais, ou seja, não impactados. Entretanto, quando derivados de petróleo estão presentes, as populações degradadoras de hidrocarbonetos aumentam para um percentual de 10% da comunidade geral (ATLAS, 1995). Acidentes sucessivos, ocasionados por derrames de óleo nos diversos compartimentos ambientais aceleram o aumento da biomassa bacteriana. Dessa maneira, altas concentrações desse tipo de bactérias podem ser utilizadas como indicador de ambiente impactado por petróleo e derivados (BOOPATHY, 2000).

De acordo com resultados obtidos por FIORAVANTI (2013), um total de 206 bactérias foram isolados das regiões de produção (54 bactérias), refino (81 bactérias) e transporte (61 bactérias) localizadas ao norte na BTS. Enquanto que na região de Belmonte, localidade

isenta de atividades relacionadas ao setor petrolífero, foram isoladas apenas 27 bactérias (Anexo 5). Logo, podemos inferir que o grau de contaminação de determinada localidade está intimamente relacionado com a variedade de micro-organismos existentes no local.

Dentre as dez cepas identificadas por ANDRADE (2015), apenas duas são oriundas da área de produção, tendo o restante, compondo a grande maioria, originadas das áreas de transporte e refino (Tabela 2). Em termos de diversidade biológica, a área de produção apresentou apenas uma classe (Gamaproteobacteria) e duas espécies (*Acinetobacter calcoaceticus* e *Pseudomonas monteilli*). A área de refino apresentou duas classes (Gamaproteobacteria e Enterobacteria) e três espécies (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.* e *Acinetobacter calcoaceticus*). Já na área de transporte houve presença de duas classes (Gamaproteobacteria e Flavobacteria) e quatro espécies (*Proteus penneri*, *Pseudomonas putida*, *Wautersiella falsenii* e *Pseudomonas flavescens*).

TABELA 2 - Resultados do sequenciamento parcial dos genes RNA ribossomal 16S e área de coleta das cepas bacterianas.

Cepa	Área	Classe	Espécie
128 A	Refino - CN	Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>
128 B	Refino - CN	Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas sp.</i>
67 C	Refino - CN	Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas sp.</i>
67 E	Refino - CN	~	~
67 B	Refino - CN	~	~
67 F	Refino - CN	Enterobacteria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
155 A	Transporte - MD	Gamaproteobacteria	<i>Proteus penneri</i>
155 C	Transporte - MD	Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>
155 E	Transporte - MD	Flavobacteria	<i>Wautersiella falsenii</i>
155 I	Transporte - MD	Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas flavescens</i>
102 A	Produção - SFC/DJ	Gamaproteobacteria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
05A	Produção - SFC/DJ	Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas monteilli</i>

CN: Candeias; MD: Madre de Deus; SFC/DJ: São Francisco do Conde

Fonte: ANDRADE (2015); FIORAVANTI (2013)

A presença de uma maior variedade de frações do petróleo presentes nas regiões de transporte e refino, comparado a região de produção do setor petrolífero, pode responder a maior diversidade microbiológica encontrada nessas duas primeiras regiões.

5 CONCLUSÃO

As variações entre as réplicas das amostras (cepas) foram maiores na metodologia turbidimétrica, com relação à metodologia de contagem em placas. Nessa última os valores das réplicas variaram menos dentro de uma mesma amostra.

Os coeficientes de correlação linear calculados para ambas metodologias, em sua grande maioria, foram muito próximos a um, que significa uma alta consistência do modelo utilizado (regressão linear) para o cálculo das taxas de crescimento específico (μ^{-1}) bacteriano, a partir dos dados coletados em laboratório.

Com relação aos tempos de geração calculados não houve variação significativa entre os métodos, ou seja, para um mesmo componente do BTX avaliado, os valores do tempo de geração calculados foram muito semelhantes.

A maioria das cepas apresentaram graficamente (gráficos de dispersão) as quatro fases padrões do crescimento bacteriano típico (lag, log, estacionária e declínio) em ambas metodologias, outras, por sua vez, não apresentaram a fase final de estabilização, isso pode ser explicado pela questão do tempo não ter sido suficiente para o término da fase de declínio da cepa em questão, fazendo com que a estabilização final não pudesse ter sido visualizada.

A maioria das velocidades de crescimento calculadas apresentaram valores idênticos, ou muito próximos, entre as duas metodologias, o que reforça ainda mais a ideia de que ambas são boas ferramentas de quantificação bacteriana em cultura líquida.

Através do processo de bioaugmentação, as cepas, *in situ*, obtiveram resultados satisfatórios na degradação dos compostos (benzeno, tolueno e xileno), já que no teste de cinética foi possível estimar a velocidade de crescimento em biomassa por hora, tendo os componentes do BTX como única fonte de carbono. Apesar dos diferentes comportamentos apresentados pelas bactérias, todas foram capazes, em maior ou menor grau, de crescerem na presença do BTX (ANDRADE, 2015).

Apesar das cepas 128 A e 155 C terem sido identificadas como *Pseudomonas putida*, as taxas de crescimento específico e o consumo de oxigênio destas foram muito diferentes, tendo a cepa 155 C obtido um melhor potencial tanto em crescimento em meio líquido, quanto em consumo de oxigênio em sedimento, na presença de BTX. Portanto, apesar de se apresentarem como a mesma bactéria, tratam-se de cepas diferentes, por exibirem comportamentos distintos, sob as mesmas condições laboratoriais executadas.

A maioria das cepas apresentaram as maiores taxas de consumo de oxigênio em xileno e benzeno, quando comparadas às taxas em tolueno. Já para as taxas de crescimento em meio líquido (testes de cinética), as cepas apresentaram maiores velocidades na presença de xileno, seguida pelo tolueno e por último em benzeno. Essa diferença de comportamento deve estar associada à mudança da matriz (sedimento/água) e/ou com as características abióticas do meio (pH, oxigênio, temperatura, etc).

As cepas apresentaram maior rapidez em dobrarem suas populações (tempo de geração) na presença de xileno e benzeno, quando comparado ao tolueno.

A cepa 155 C, identificada como *Pseudomonas putida*, se destacou dentre todas as outras por apresentar as melhores velocidades em meio líquido, as maiores taxas de consumo de oxigênio em sedimento e os menores tempos de geração na presença dos diferentes componentes do BTX, apresentando enorme potencial no contexto da biorremediação.

De acordo com os resultados de identificação das cepas (ANDRADE, 2015), através do sequenciamento genético, foi possível constatar uma maior diversidade microbológica nas áreas de transporte e refino, em comparação com a área de produção. Essa diferença na variedade da microbiota pode estar relacionada com o tipo de composto que é manejado na localidade, pela existência de frações mais leves (refinadas) ou de petróleo cru (bruto). Em áreas de refino e transporte existe um manejo de uma maior quantidade de frações oriundas do petróleo bruto, ou seja, há maior variedade de fontes de carbono disponível, que pode explicar a maior diversidade existente nesses setores, quando comparado ao setor de produção, onde apenas petróleo bruto é manejado.

Os parâmetros físico-químicos dos compostos (solubilidade, coeficiente de partição octanol-água, coeficiente de Henry, massa molecular e pressão de vapor) sozinhos não conseguiram responder aos diferentes comportamentos apresentados pelas cepas nos diferentes componentes do BTX.

O conhecimento do comportamento cinético, da respiração celular e do tempo de geração de culturas bacterianas na presença de compostos tóxicos, somado ao entendimento das relações existentes entre os substratos presentes no meio e das interações das culturas com as variáveis ambientais (temperatura, umidade, pH, etc.) são essenciais para a otimização e alcance de processos mais eficientes de remoção dos poluentes no contexto da biorremediação.

O método de contagem em placas possui menor celeridade, por necessitar de pelo menos 24 horas, em média, para o crescimento das colônias, além de ser mais trabalhosa nas questões procedimentais. Em contrapartida, o método turbidimétrico permite a avaliação quantitativa de forma muito célere, permitindo redução do tempo em laboratório e diminuindo etapas metodológicas.

Dessa forma, com base nos resultados deste trabalho, inferiu-se que ambas metodologias são satisfatórias e eficientes para estudos de quantificação de bactérias em cultura líquida, não apresentando diferenças significativas, com base nos parâmetros avaliados.

6 REFERÊNCIAS

- ABUHAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOĞLU, T.; MEHMETOĞLU, U. **Kinetics model for growth as Pseudomonas putida F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation**. Process Biochemistry, v.39, p.983-988, 2004.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, San Diego, California, 302 p., 1994.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Waste Management and Research, v. 17, p. 390-391., 1999.
- ALONGI, D. M. **Present state and future of the world's mangroves forests**. **Environmental Conservation**, v. 3, n. 29, p. 331-349, 2002.
- ANDRADE, D. M. **Avaliação de bactérias provenientes de um bio filtro de tratamento de vapores de gasolina**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental na área de Poluição Atmosférica, 2008.
- ANDRADE, W. B. **Bactérias endógenas degradadoras de btx na remediação do sedimento contaminado de manguezal**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia (UFBA). Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente (POSPETRO), Salvador, 2015.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2013**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=76809&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1438868792503>>. Acesso: 04/06/2015, 2013.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2014**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=76809&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1438868792503>>. Acesso: 04/07/2015, 2014.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2015**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=76809&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1438868792503>>. Acesso: 04/01/2016, 2015.
- ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2006**. Rio de Janeiro. Disponível<<http://www.anp.gov.br/?pg=76809&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1438868792503>>. Acesso em: 06/01/2015, 2006.
- ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2012**. Rio de Janeiro. Disponível<<http://www.anp.gov.br/?pg=76809&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1438868792503>>. Acesso em: 06/04/2015, 2012.
- ATLAS R. M. **Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation**. Marine Pollution Bulletin. v. 31, n 4-12, p 178-182, 1995.

ATLAS, R. M.; SEXSTONE, A.; GUSTIN, P.; MILLER, O.; LINKINS, P.; EVERETT, K. **Biodegradation of crude oil by tundra soil microorganisms**, p21-28, 1980.

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

ATLAS, R.M. **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective**. Microbiol. Rev., v.45, p.180-209, 1981.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. **Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BICALHO, K.V. **Dissolução de gasolina em presença de água e etanol**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Civil, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1997.

BOOPATHY, R. **Factors limiting bioremediation technologies**. Bioresource Technology, Chicago, v.74, n.1, p.63-67, 2000

BORDEN, R.C.; LEE, M.D.; THOMAS, J.M.; BEDIANT, P.B.; WARD, C.H. and WILSON, J.T. **Transport of dissolved hydrocarbons influenced by oxygen limited biodegradation: Field application**. Water Resource Research., v.22. p.1983- 1990, 1986.

BRADDOCK, J. F., LINDSTROM, J. E., YEAGER, T. R., RASLEY, B. T., BROWN, E. J. **Patterns of microbial activity in oiled and unoiled sediments in Prince William Sound EXXON VALDEZ**. Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium. Bethesda: Am Fish Soc, v.18, p. 94-108, 1996.

BRASIL, Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho (SSST) – **Portaria nº 14 de 20 dezembro de 1995. Reconhece a ação cancerígena do benzeno e regulamenta ações de produção, transporte e armazenamento do benzeno em empresas**. Brasília, 1995.

BRASIL. Secretaria do Meio Ambiente (CETESB). **Ambientes costeiros contaminados por óleo: procedimentos de limpeza – manual de orientação**. São Paulo, 2007.

BRITTON, L.N. **Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons**. In **Microbial Degradation of Organic Compounds**. D.T. Gibson. (Ed.), p 89-129, Marcel Dekker, ISBN 0-824-77333-0 New York, 1984.

BUCKLEY, E. N.; JONES, B.; PFAENDER, F.K. **Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: relationship of hydrocarbon utilization to ambient hydrocarbon concentrations**. Appl. Environ. Microbiol., v. 32, p. 232-237, 1976.

CAPUANO, R.N; JOHNSON, M.A. **Geochemical reactions during biodegradation/vapor-extraction remediation of petroleum contamination in the vadoze zone**. Ground water. v.34, p.31-40, 1996.

CARVALHO, A. P. **Contribuição do agregado óleo material particulado em suspensão (OSA) no desenvolvimento de bactérias hidrocarbonoclásticas**. Monografia: Graduação em Oceanografia do Departamento de Oceanografia - Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2013.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia Básica**. Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil – e-Tec Brasil. Disponível em: < http://200.17.98.44/pronatec/wp-content/uploads/2013/06/Microbiologia_Basica.pdf>. Acesso em: 09/04/2015, 2015.

CAVALCA, L.; DI GENNARO, P.; COLOMBO, M.; ANDREONI, V.; BERNASCONI, S.; RONCO, I.; BESTETTI, G. **Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil**. Res Microbiol, v.151, p.877-887, 2000.

CELINO, J. J.; QUEIROZ, A. F. S. **Fonte de grau de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) de baixa massa molecular em sedimentos da Baía de Todos os Santos, Bahia**. R. Esc. Minas, v. 59, n.3, p.265-270, 2006.

CERNIGLIA, C.E. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons**. *Biodegradation*, v. 3, p. 351-368, 1992.

CHAERUN, S. K. et al. **Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria**. Environment International, v. 30, p. 911-922, 2004.

CHAÎNEAU, C. H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. **Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil**. Sci. Total Environ., Amsterdam, v.227, n.2-3, p.237-247, 1999.

CHAKRABORTY, R. & COATES, J.D., **Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons**. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 64, p. 437-446, 2004.

CIRANO, M., LESSA, G.C. **Oceanographic characteristics of Baía de Todos os Santos, Brazil**. Revista Brasileira de Geofísica 25 (4), 363–387, 2007.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 463, de 29 de julho de 2014**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=705>>. Acesso em 19/02/2015, 2014.

CONNELL, D.W.; MILLER, G.J. **Chemistry and Ecotoxicology Pollution. USA: A Wiley-Interscience**, p.43-68 e 228-249, 1984

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, J. J. **Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol**. Water Science and Technology, v. 34, n. 7-8, p. 311-318, 1996.

CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. **Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira**. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, 4: 71-75, 1999.

CORSEUIL, H.; HUNT, C.; FERREIRA, R. S.; ALVAREZ, P. **The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation**. Water Res, v.32, n.7, p.2065-2072, 1998.

CORSEUIL, H.X., SCHNEIDER, M., ROSÁRIO, M. **Natural Attenuation Rates of Ethanol and BTEX compounds in Groundwater contaminated with gasohol**. Appropriate Environmental and Solid Waste Management and Technologies for developing countries. Volume 4. p. 2121-2128, 2002.

CRA, 2001. **Bacias hidrográficas do Recôncavo Norte**. Boletim técnico, p. 147-292.

CRA. Centro de Recursos Ambientais. **Diagnóstico do grau de contaminação da Baía de Todos os Santos por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo a partir da análise das suas concentrações nos sedimentos de fundo e na biota associada: relatório do diagnóstico da concentração de metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo nos sedimentos e biota na BTS, I, II, IV**. Salvador, 2004

DOF. Diário Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA-1-1994, 2001.

DÖRR, F. **Consórcios degradadores de BTEX: isolamento, caracterização e avaliação do potencial de degradação**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DUETZ, W. A.; MARQUES, S.; WIND, B.; RAMOS, J. L.; VAN ANDEL, J. G. **Catabolite repression of the toluene degradation pathway in Pseudomonas putida harboring pWWO under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture**. Appl Environ Microbiol, v.62, p.601-606, 1996.

FERREIRA, G; PARAISO, D; SÉRVULO, E. F. C. **Monitoramento microbiológico de solo argiloso contaminado artificialmente com gasolina**. IN: IV SIMPOSIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 4., Rio Claro. Resumo. Instituto de Biociências – UNESP, 2009.

FERREIRA, J. P. **Análise de estratégias de resposta a derramamento de óleo pesado no litoral do espírito santo utilizando modelagem computacional**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

FIORAVANTI, K. L. **Seleção de Consórcios Microbianos de Sedimentos de Manguezais com Potencial de Degradação de Hidrocarbonetos de Petróleo**. 148f. Dissertação de Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente, Universidade Federal da Bahia, 2013.

FIORAVANTI, K. L.; CELINO, J. J.; ROSSI-ALVA, J. C. **Isolamento, seleção e identificação de micro-organismos degradadores de petróleo e seus derivados em sedimentos de manguezais contaminados**. Caderno de Geociências. v. 9, n. 2, p. 130-141, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

FONSECA, S.A.R. **Análise de estratégias de contingência ao derramamento de óleo: Estudo de caso do Campo Golfinho, Espírito Santos – Brasil**. Monografia: Graduação em Oceanografia do Departamento de Oceanografia e Ecologia. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais, Vitória, 2009.

FREITAS, A. L. S. **Uso racional da água subterrânea aplicado às ciências agrárias**. Brasília, Associação Brasileira De Educação Agrícola Superior, Ed. Supercor, 75p., 1997.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. **Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation**. Biodegradation, v.12, n.5, p.325-335, 2001

GESAMP (IMO/FAO/ UNESCO/WMO/IAEA/ UNEP). Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution). **Impact of Oil and Related Chemicals and wastes on the Marine Environment**. Rep. Stud. GESAMP: 50, 180p., 1993

GOMES, E. B. **Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-PE**. Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos), UFPE. 109 p., 2004.

GOUDAR, C. T.; STREVETT, K. A. **Comparison of relative rates of BTEX biodegradation using respirometry**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 21, p. 11-18, 1998.

GUSMÃO, V. R. **Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator anaeróbio horizontal de leito fixo utilizado na remoção de BTEX**. 174p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GUSMÃO, V. R. et al. **BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition**. Process Biochem, v.41, p.1391-1400, 2006.

GUSMÃO, V. R.; CHINALIA, F. A.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. **Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period**. Journal of Hazardous Materials, v. B139, p. 301–309, 2009.

HADLICH, G.M.; UCHA, J.M.; CELINO, J.J. **Apicuns na Baía de Todos os Santos: distribuição espacial, descrição e caracterização física e química**. In: QUEIROZ, A.F. de S.; CELINO, J.J. (Org.). **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**. Salvador: UFBA, p.59-72, 2008.

HAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOĞLU, T.; MEHMETOĞLU, U. **Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene and phenol mixtures**. Process Biochemistry, v.39, p.27-35, 2003.

HATJE, V. et al. Contaminação química. In: HATJE, V.; ANDRADE, J. B. (Ed.). **Baía de Todos os Santos: aspectos oceanográficos**. Salvador: Edufba, p. 243-299, 2009.

HENDRICKX, B., JUNCA, H., VOSAHLOVA, J., LINDNER, A., RUEGG, I., BUCHELI-WITSCHER, M., FABER, F., EGLI, T., MAU, M., SCHLOMANN, M., BRENNEROVA, M., BRENNER, V., PIEPER, D.H., TOP, E.M., DEJONGHE, W., BASTIAENS, L., SPRINGAEL, C. **Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site**. Journal of Microbiological Methods 64, 250e265, 2006.

HUNT, J. R.; SITTAR, N.; and UDELL, K. S. **Non-aqueous phase liquid transport and cleanup: 1-Analysis of mechanisms**. Water Resources Research. v.24, p.1247-1258, 1998.

IBAMA. **Relatório de acidentes ambientais**. Disponível em: <www.ibama.gov.br>. Acesso em 07/04/2015, 2008.

INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). **Normas Climatológicas – 1961 a 1990**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 155 p, 1992.

IST. INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO DE LISBOA. **Página de pesquisa online.** Disponível em: <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=235&ordem=4>. Acesso: 23/10/2015, 2015.

ITOPF – Fate of marine oil spills – **Technical Information Paper n.2**, 2011.

JACQUES, R. J. S. et al. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.** *Ciência Rural*, Santa Maria. v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JOHNSON K.; ANDERSON S.; CS JACOBSON. **Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent Pseudomonas biovars.** *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3818–3825, 1996.

JOHNSON, S. J. et al. **Contribution of Anaerobic Microbial Activity to Natural Attenuation of Benzene in Groundwater.** *Engineering Geology*, v. 70, p. 343-349, 2003.

JONES, J.G.; EDINGTON, M.A. **An ecological survey of hydrocarbon-oxidizing microorganisms.** *J.Gen.Microbiol.*, v. 52, p. 381-390, 1968.

JONES, S.H. & ALEXANDER. **Kinetics of mineralization of Phenols in lake water.** *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5):891-897, 1986.

JORDAN, R.E. & PAYNE, J.R. **Fate and weathering of petroleum spilled in the marine environment: a literature review and synopsis.** Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, p.174. 1980.

KAIPPER, B. I. A. **Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel.** Tese de doutorado. Química Analítica, UFSC, 179p, 2003.

KAPLAN, I. R.; GALPERIN, Y.; LU, S. T.; LEE, R. P.. **Forensic environmental geochemistry: differentiation of fuel-types, their sources and release time.** *Organic geochemistry*, v. 27, n. 5-6, 1997.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.** *Microbiological reviews*, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LEÃO, Z. M. A. N. & DOMINGUEZ, J. M. L. **Tropical coast of Brazil. Marine Pollution Bulletin**, 41: 112-122, 2000.

LIN, C-W.; TSAI, S-L; HOU, S-N. **Effects of environmental settings on MTBE removal for a mixed culture and its monoculture isolation.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 194-201, 2007.

LITTLE, J.C.; DAISEY, J. M.; and NAZAROFF, W.W. **Transport of subsurface contaminants into buildings.** *Environmental Science and Technology*. v. 26, p.2058-2065, 1992.

LOVLEY, D. R.; BAEDECKER, M. J.; LONERGAN, D. J.; COZZARELLI, I. M.; PHILLIPS, E. J. P.; SEIGEL, D. I. **Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction.** *Nature*. vl. 339. p.297-299, 1989.

LOVLEY, D.R. **Bioremediation: anaerobes to rescue.** *Science* 293, 1444–1446, 2001.

MACKAY, D.; CHERRY, J. A. **Groundwater contamination: Pump and treat remediation.** Environmental Science & Technology, v.23, p.7-13, 1989.

MARIANO, A. P.; CRIVELARO, S. H. R.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. **Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils.** In: XXII INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING, Buenos Aires, 2006

MARTINO, Carla; LÓPEZ, Nancy I.; IUSTMAN, Laura J. Raiger. **Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading Pseudomonas sp. selected as candidates for bioremediation.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 67, p. 15-20, 2012

MARTINS, D. O. **Estudo do controle de emissões de compostos orgânicos voláteis em tanques de armazenamento de produtos químicos.** Dissertação (Mestrado em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo) – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica. Salvador, 2004.

MELO, J. A. **Metagenômica: busca de novos genes envolvidos com a biodegradação de hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Natal, 2012.

MILLERO, F.J.; SOHN, M.L. **Chemical Oceanography.** Florida USA: Boca Raton. FL: CRC Press. 531p., 1991.

MORGAN, P., AND WATKINSON, R.J. **Biodegradation of components of petroleum.** In: C. Ratledge, ed. **Biochemistry of Microbial.** Degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 1-31, 1994.

MULKINS-PHILLIPS, G. J., AND J. E. STEWART. 1974. **Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria in northwestern Atlantic waters and coastal sediments.** Can. J. Microbiol. 20:955-962, 1974.

NAKAZAWA, M. M. **Avaliação da remoção de HPAs e diversidade de micro-organismos em experimento de biorremediação de sedimento estuarino contaminado com óleo diesel.** Dissertação de mestrado (Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2011.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information.** Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 12/03/2015, 2015.

NIPPER, M.G. **Problemas de poluição em organismos bentônicos.** In: **II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. Estrutura, Função e Manejo.** Publicação ACIESP n. 71-3. Resumos, v. 03, p. 24 – 42, 1990.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL.) **Oil in the sea, inputs, fates and effects.** Washington D.C.: National Academy Press, 602p., 1985.

NRC. (NATIONAL RESEARCH COUNCIL.) **Oil in the sea III Inputs, Fates and Effects.** National Academy of Sciences, Washington. 265 p., 2003.

OLIVEIRA, C. N. **Indicadores de consumo e propostas para a racionalização do uso da água em instalações de empreiteiras: caso da Refinaria Landulpho Alves de Mataripe**. 2009. 153f. Dissertação (Mestrado em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo), Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2009.

PAST. **Paleontological Statistics Software**. Øyvind Hammer. Natural History Museum. University of Oslo. Versão 3.11. Disponível para download em: <<http://folk.uio.no/ohammer/past/>>. Acesso em: 03/11/2015, 2015.

PELCZAR, M J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 2v.,1996.

PEREIRA A.R.B.; FREITAS D. A. F. **Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados**. Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, n° 6, p 975 – 1006, 2012.

PESO-AGUIAR, M. C. & SMITH, D. H. & ASSIS, R. C. F. & SANTA- ISABEL, L. M. & PEIXINHO, S. & GOUVEIA, E. P. & ALMEIDA, T. C. A. & ANDRADE, W. S. & CARQUEIJA, C. R. G. & KELMO, F. & CARROZZO, G. & RODRIGUES, C. V. & CARVALHO, G. C. & JESUS, A. C. S. **Effects of petroleum and its derivatives in benthic communities at Baía de Todos os Santos, Bahia, Brazil**. Aquatic Ecosystem Health and Management, 3: 459-470., 2000.

PETROBRAS (S/A). Disponível em: <<http://fatosedados.blogspot.com.br/2011/04/19/campo-de-dom-joao-retoma-producao/>>. Acesso em: 06/08/2015

PETROBRAS (S/A). Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/>>. Acesso em 07/05/2015, 2015.

PHELPS, C. D.; YOUNG, L. Y. **Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review**. Adv. Agronomy, v.70, p.329-357, 2001

PINHATI, F. R. et al. **Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo**. Química Nova. v. 37, n. 8, p. 1269-1274, 2014.

POTIN, O.; CATHERINE, R.; VEIGNIE, E. **Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil**. International Biodeterioration & Biodegradation. v. 54, p. 45 – 52, 2004.

POWERS, S.E.; HUNT, C.S.; HEERMANN, S.E.; CORSEUIL, H.X.; RICE, D.; ALVAREZ, J.J. **The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol**. CRC Environmental Science and Technology, v. 31, n. 1, p. 79-123, 2001.

POWERS, S.E.; HUNT, C.S.; HEERMANN, S.E.; CORSEUIL, H.X.; RICE, D.; ALVAREZ, PUCCI, G; ACUÑA, A; LLANES, M. L; TIEDEMANN, M.C; PUCCI, O. H. **Diversidad de bacterias cultivables de la costa de Caleta Olivia, Patagônia, Argentina**. Acta biológica Colombiana, v. 14, n. 03, p. 121-134, 2009

QUEIROZ, A. F. S.; CELINO, J. J. **Impacto ambiental da indústria petrolífera em manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos (Bahia, Brasil)**. Boletim Paranaense de Geociências, n. 62-63, p. 23-34, 2008.

RAMSAY, M.A., SWANNELL, R.P.J., SHIPTON, W.A., DUKE, N.C., HILL, R.T. **Effect of bioremediation community in oiled mangrove sediments**. Marine Pollution Bulletin 41, 413–419, 2000.

RATLEDGE, C. **Biochemistry of Microbial Degradation**. London: Kluwer Academic, 509p., 1994.

REARDON, K.F., MOESTLER, D.C., BULL ROGERS, J.D.. **Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for Pseudomonas putida F1**. Biotechnol. Bioeng. 69, 385–400, 2000.

RESENDE, A. A. **Mecanismos gerais de degradação bacteriana dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX)**. Monografia (Especialização), Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. **Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da saccharomyces cerevisiae**. Química Nova, v. 23, n2 p. 27-261, 2000.

RIBEIRO, R. **Recuperação de águas contaminadas com gasolina utilizando reatores de leito fixo**. 186p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

RODRIGUES, D. F. **Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de poluentes xenobióticos na Baixada Santista**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Roteiro de aulas práticas. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 23/04/2015, 2007.

ROSA, A.P.; TRIGUIS, J.A. **Processo de Biorremediação usando o Fertilizante NPK em Eventuais Derrames de óleo - Experimentos Laboratoriais**. Revista Brasileira de Geociências, No.2,v. 36, p. 232- 242, 2006.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. **High- and low-molecular-mass microbial surfactants**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 154–162, 1999.

SALUD AMBIENTAL. **Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización**. 22 November, 2000.

SDE. Secretaria de Desenvolvimento Econômico. Governo do Estado, Bahia. **Petróleo e Gás**. Disponível em: <<http://www.sde.ba.gov.br>>. Acesso em: 04/03/2016, 2016.

SEABRA, P.N.C. **Aplicação de biopilha na biorremediação de solos contaminados com petróleo**. Tese de Doutorado (Engenharia Química) - Programa de Engenharia Química da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

SHIM, H., B. HWANG, et al. **Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of Pseudomonas putida and Pseudomonas fluorescens under hypoxic conditions**. Biodegradation, v.16, n.4, p.319-327, 2005.

SHIM, H.; YANG, S.-T. **Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of Pseudomonas putida and Pseudomonas fluorescens immobilized in a fibrous-bed bioreactor.** J Biotechnol, v.67, n.2-3, p.99-112, 1999.

SIGEE, D. C. **Bacterial Plant pathology.** Cambridge University Press. Cambridge. 325p, 1993.

SILVA, R.L.B., BARRA, C.M., MONTEIRO, T. C. N, BRILHANTE, O.M. **Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil.** Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro. v. 18, n.6, p. 1599-1607, 2002.

SINGLETON DR; POWELL SN; SANGAIAH R; GOLD A; BALL LM; AITKEN MD. **Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil.** Appl Environ Microbiol 71(3): 1202–1209, 2005.

SKINNER, B.J.; TUREKIAN, K.K. **O homem e o oceano.** São Paulo: Edgard Blucher, 1977.

SOUZA, C. S. et al. **Isolamento e seleção de micro-organismos degradadores de derivados de petróleo.** In: 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Salvador/BA. Disponível em:<http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0444_05.pdf 2005>. Acesso em: 03/04/2015, 2015.

SOUZA, D. A. et. al. **Bioremediation of gasoline-contaminated groundwater in a pilot-scale packed-bed anaerobic reactor.** International Biodeterioration & Biodegradation, nº 63, p. 747–751, 2009.

SOUZA, M. de F. V. Q. **Biorremediação de ambientes poluídos por petróleo ou seus derivados: relatório técnico.** Salvador: REDE RECUPETRO, 19p, 2006.
SPILBORGHES, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997

STANIER, R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L., PAINTER, P. R. **The Microbial World.** Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 689p, 1986.

TIBURTIUS, E.R.L., ZAMORA, P.P., LEAL, E.S. **Contaminação de águas por BTXs e Processos utilizados na remediação de sítios contaminados.** Quim. Nova. v. 27, n. 3, p. 441- 446, 2004

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 827., 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 894, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 894, 2012.

TRANSPETRO (PETROBRÁS TRANSPORTE S/A.). Disponível em: <http://www.transpetro.com.br/pt_br/home.html> Acesso em: 09/06/2015, 2015.

TRIGUEROS, D. E. G. **Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

USEPA. **National primary drinking water standards.** Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, 2001.

VEIGA, I. G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos/Ba.** 205f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Meio Ambiente), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé – RJ, 2003

VEIGA, I. G.; QUEIROZ, A. F. S.; CELINO, J.J.; TRIGUIS, J. A. **Grau de comprometimento ambiental dos sedimentos superficiais em manguezais da região norte da baía de todos os santos,** Bahia. 3º Congresso Brasileiro de P & D em Petróleo e Gás. Salvador, 2004.

VERMELHO, A. B; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, CARVALHO, IRINEIDE TEIXEIRA. T. **Práticas de microbiologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 256p, 2011.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental: Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

ZANARDI, E. **Hidrocarbonetos no Canal de São Sebastião e na plataforma interna adjacente – influência do derrame de maio de 1994.** 112p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1996.

ZIOLLI, R. L. **Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo.** Revista saúde e ambiente. vol. 3, n.2, p. 32-41, 2002.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados da estatística univariada para os dados obtidos pela metodologia turbidimétrica (densidade ótica - DO) e contagem em placas (número de colônias – UFC/ml) para os testes de cinética em BTX.

Cepa	DENSIDADE ÓTICA (DO) - BTX						NÚMERO DE COLÔNIAS (UFC/ml) - BTX					
	128 A	128 B	155 C	155 I	05A	67 F	128 A	128 B	155 C	155 I	05A	67 F
N	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81
Mínimo	0,013	0,013	0,011	0,014	0,026	0,006	2	3	3	2	3	3
Máximo	0,291	0,263	0,347	0,233	0,272	0,181	18,0	17,0	19,0	23,0	17,7	18,3
Soma	7,664	8,332	6,926	6,889	8,430	6,883	631,8	599,9	689,1	727,7	703,8	669,0
Média	0,095	0,103	0,085	0,085	0,104	0,085	7,800	7,406	8,507	8,940	8,689	8,259
Erro padrão	0,007	0,008	0,007	0,005	0,005	0,005	0,422	0,319	0,506	0,520	0,409	0,404
Variância	0,004	0,005	0,004	0,002	0,002	0,002	14,458	10,611	21,955	21,930	13,555	13,250
Desvio padrão	0,095	0,068	0,063	0,043	0,047	0,048	3,802	3,257	4,685	4,683	3,681	3,640
Mediana	0,083	0,088	0,063	0,077	0,099	0,089	7,6	7,0	6,7	9,0	8,0	7,0
CV (%)	62,87	65,58	73,24	50,40	45,05	56,83	48,75	43,98	55,07	52,13	42,37	44,07

APÊNDICE B – Resultados experimentais do número de gerações e tempo de geração para as cepas bacterianas.

Cepas	Benzeno				Tolueno				Xileno			
	DO		UFC		DO		UFC		DO		UFC	
	Nº	Tempo	Nº	Tempo	Nº	Tempo	Nº	Tempo	Nº	Tempo	Nº	Tempo
128 A	4,2	57,7	3,9	61,5	2,8	86,3	2,9	84,1	3,9	62,1	3,7	64,8
128 B	3,4	70,2	2,8	85,9	2,8	87,0	2,6	91,9	3,5	68,3	3,4	69,7
155 C	6,1	39,0	5,6	42,8	3,6	66,6	3,7	64,4	4,7	51,5	4,3	55,8
155 I	3,9	60,8	4,1	59,2	3,8	62,4	3,8	63,1	2,0	117,9	2,0	120,2
05A	3,1	78,5	2,9	84,2	2,7	88,0	2,8	84,7	3,2	75,7	3,1	77,7
67 F	5,4	44,0	1,4	165,7	3,2	76,0	3,0	80,9	3,6	66,4	3,6	66,2

Nº: número de gerações

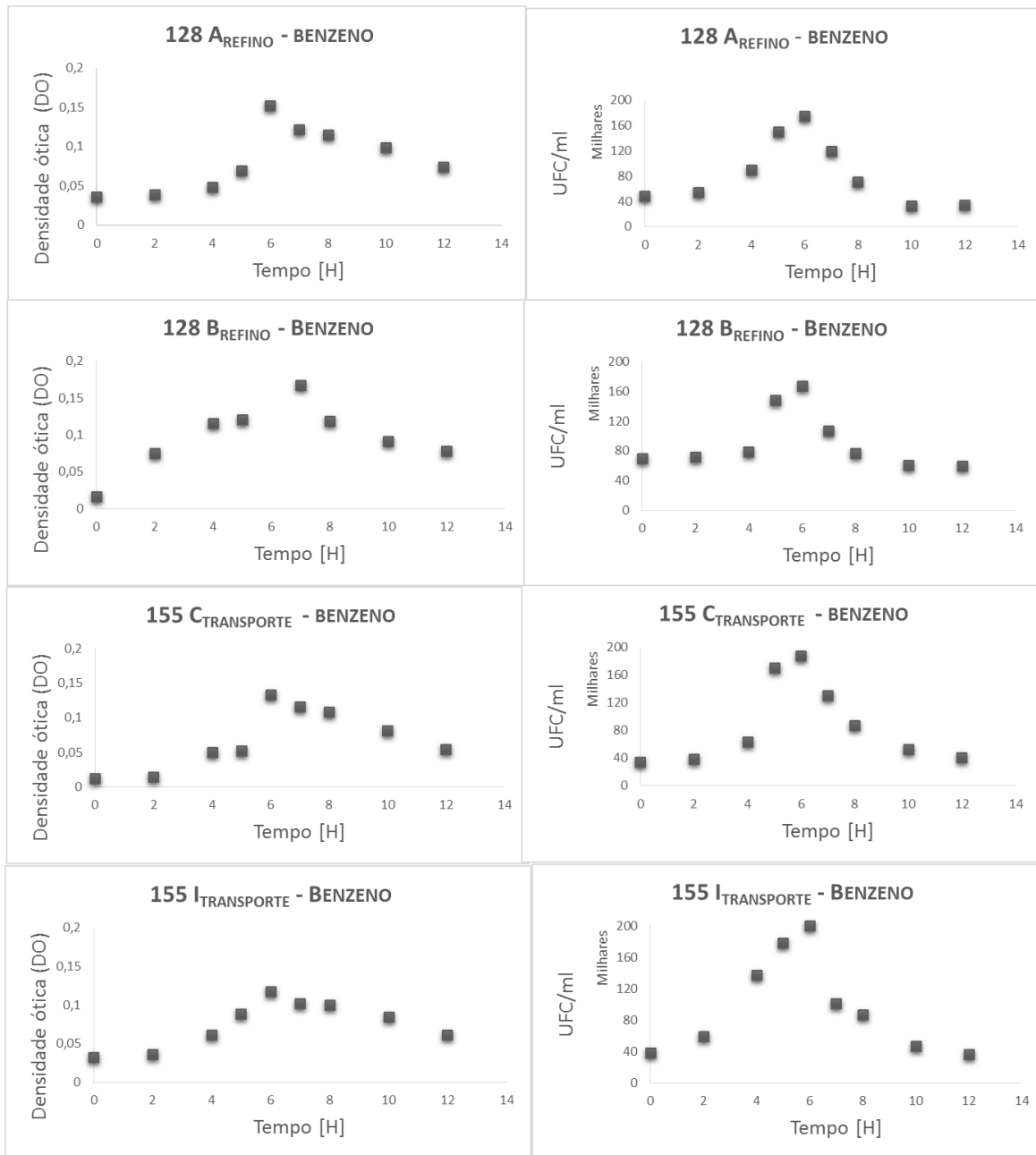
T: tempo de geração (minutos/geração)

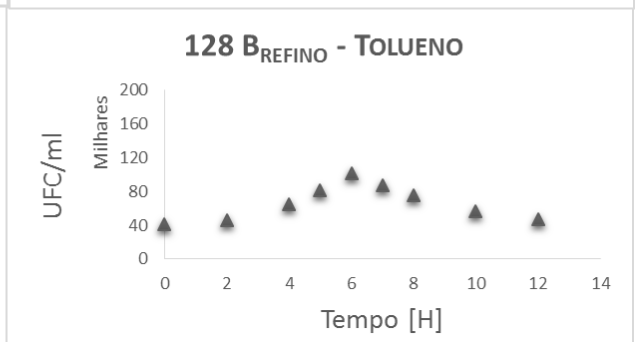
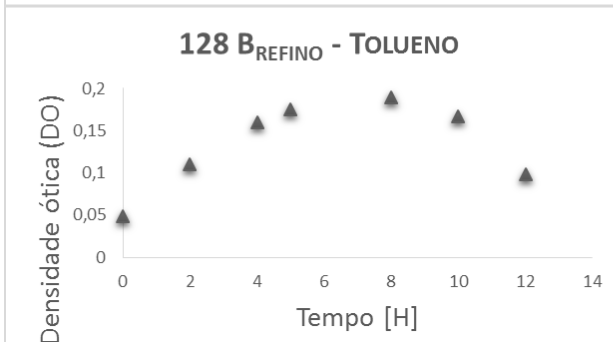
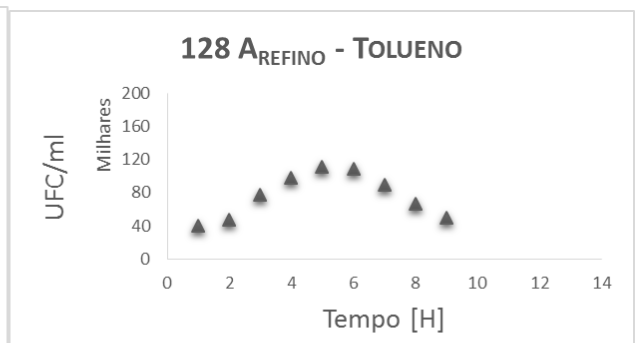
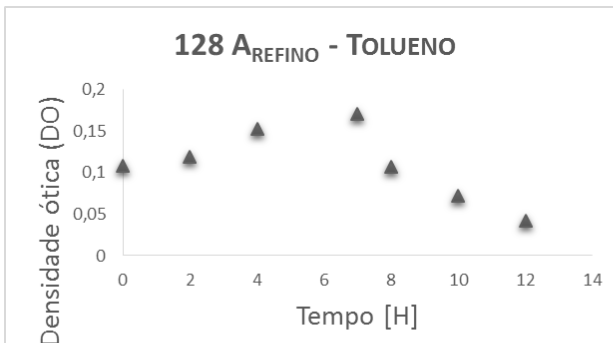
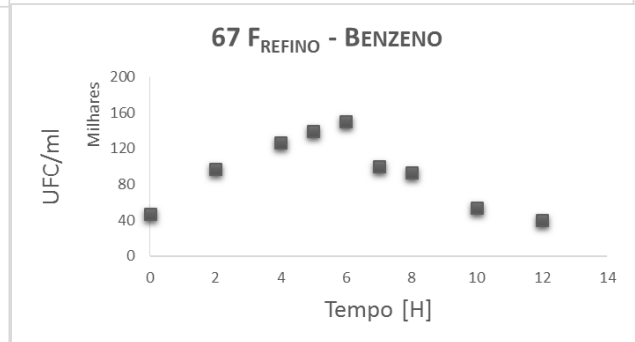
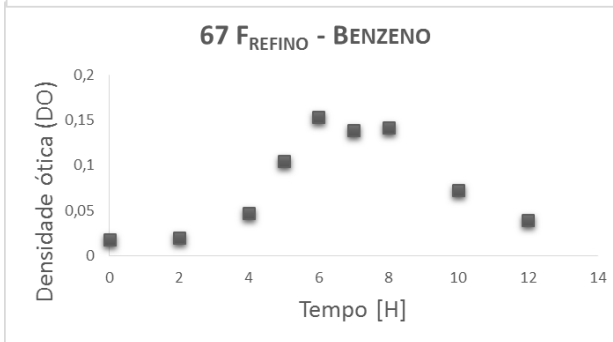
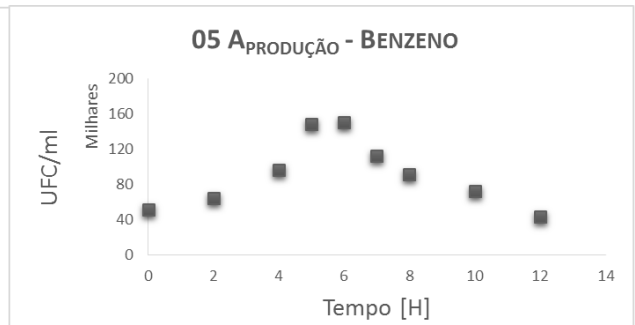
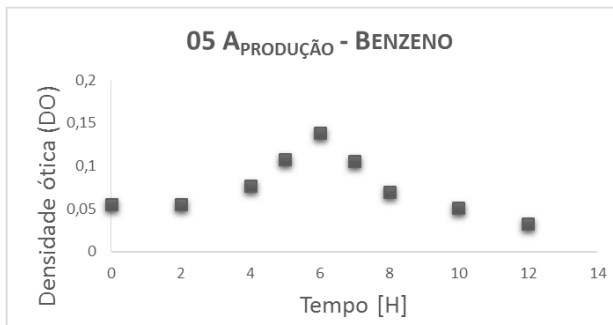
APÊNDICE C - Valores dos coeficientes de correlação linear (R^2) para cada metodologia.

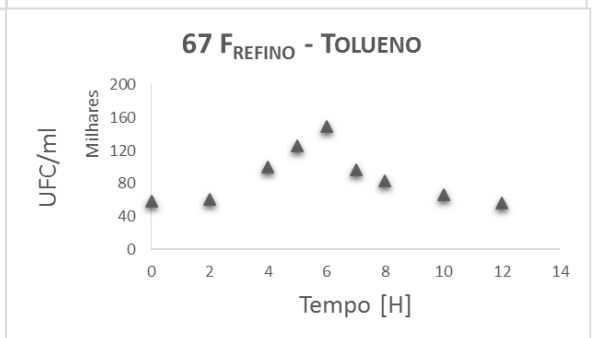
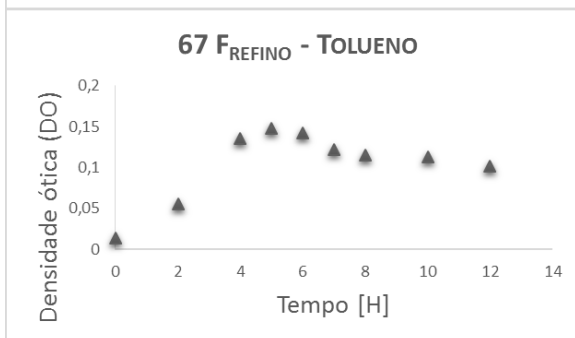
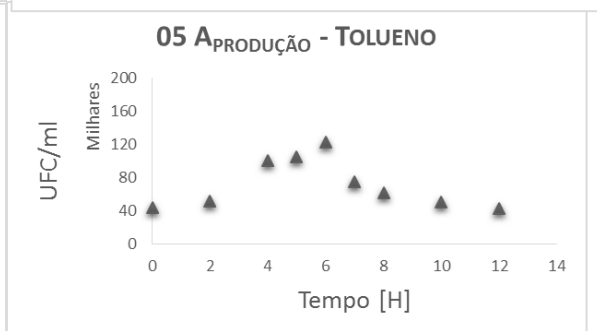
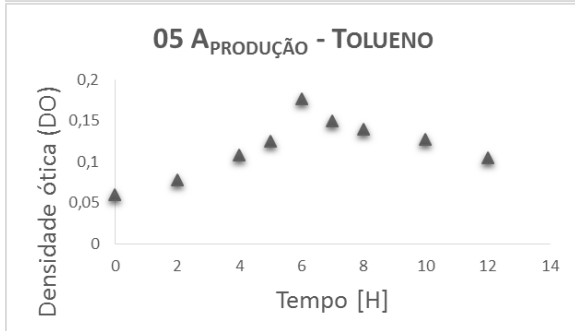
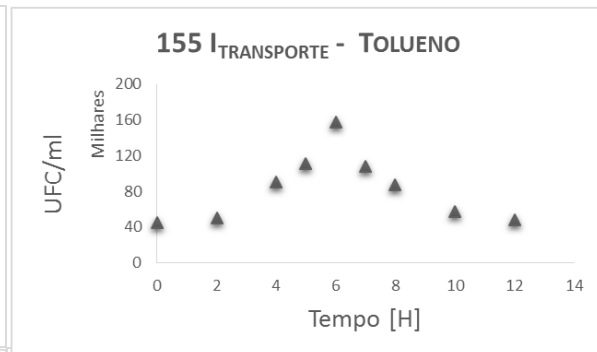
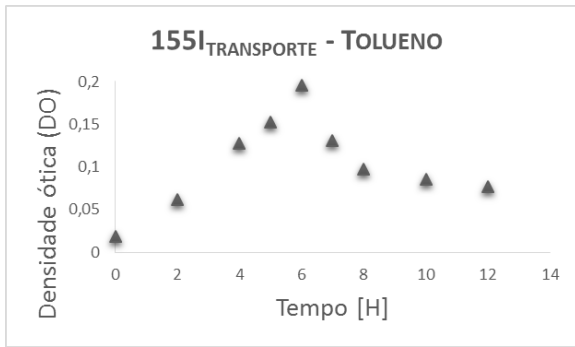
Cepas	DO _{Benzeno}	UFC _{Benzeno}	DO _{Tolueno}	UFC _{Tolueno}	DO _{Xileno}	UFC _{Xileno}
128 A	0,735	0,973	0,951	0,984	0,968	0,978
128 B	0,898	0,821	0,954	0,996	0,968	0,907
155 C	0,915	0,908	0,951	0,911	0,943	0,947
155 I	0,996	0,951	0,893	0,960	0,884	0,949
05A	0,978	0,940	0,977	0,794	0,889	0,935
67 F	0,855	0,982	0,640	0,937	0,842	0,859

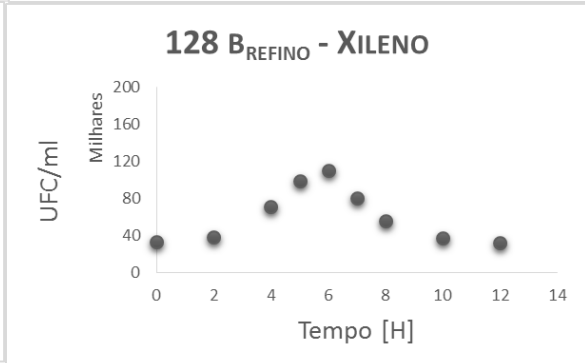
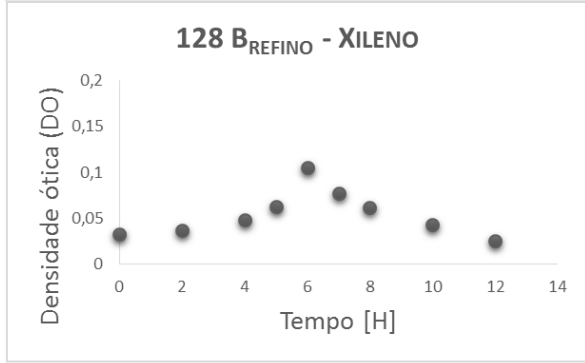
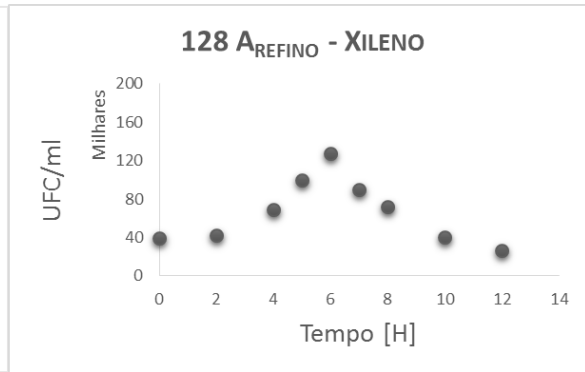
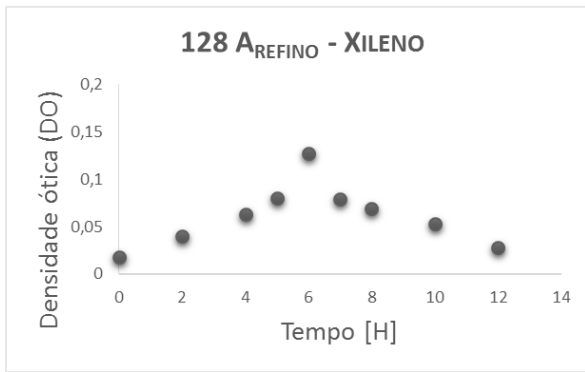
* Valores de R^2

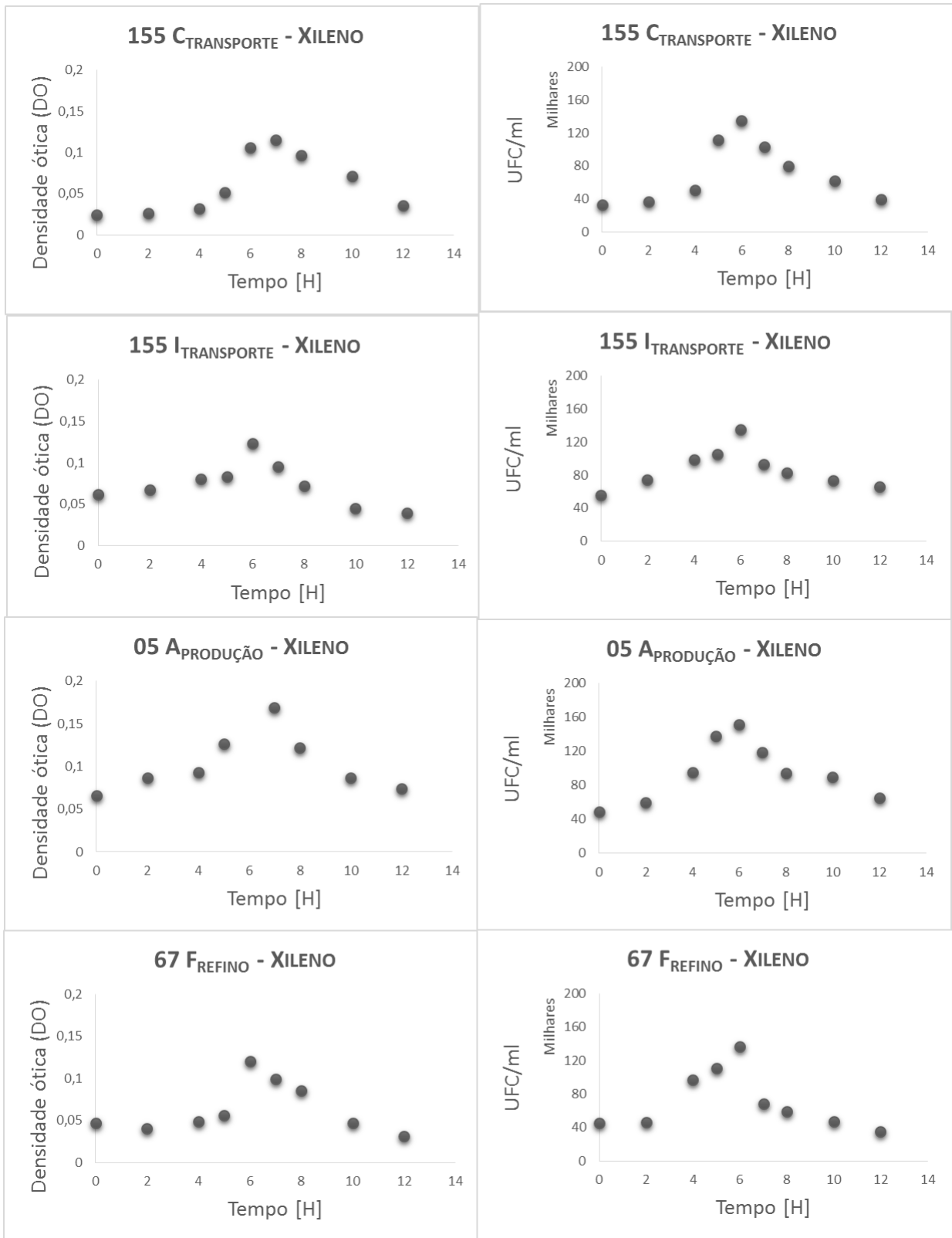
APÊNDICE D - Gráficos do crescimento bacteriano no tempo obtidos pelas duas metodologias na presença de benzeno, tolueno e xileno











8 ANEXOS

ANEXO 1 – Revisão Bibliográfica

CADEIA PRODUTIVA DO PETRÓLEO

O Brasil é o segundo país da América do Sul em reservas de petróleo, grande parte delas localizadas em áreas offshore (ANP, 2013). Segundo a ANP, em 2014, as reservas de petróleo mundial atingiram a marca de 1,7 trilhões de barris, mantendo-se em um mesmo patamar de 2013, após pequena queda de 0,1%. As reservas da América Central e do Sul registraram alta de 0,1%, somando 330,2 bilhões de barris, que corresponde a 19,4% do total mundial. Com essa alta, o Brasil detentor de 16,2 bilhões de barris ocupa a 15ª posição no ranking mundial de reservas provadas de petróleo. No que tange a produção, o Brasil se situa na 13ª posição, no volume de óleo produzido, totalizando 2,3 milhões de barris/dia que corresponde a 2,6% do total mundial (ANP, 2015).

As fases da indústria do petróleo, no Brasil, são caracterizadas em diferentes regiões, desde a exploração e produção (*upstream*) até seu transporte, refino e distribuição (*downstream*). Cada fase mantém riscos operacionais associados, a depender da maior ou menor probabilidade de ocorrência de eventos danosos, como o derramamento de óleo cru ou de seus derivados (FERREIRA, 2006).

O desenvolvimento progressivo das indústrias petrolíferas é um dos destaques no cenário econômico do Brasil. Entretanto, o mesmo crescimento é também a causa de diversos acidentes em campos de produção (LI et.al. 2000).

O primeiro poço de petróleo encontrado no Brasil ocorreu em 1938, em Salvador e já em 1941 o Governo Federal anuncia a criação do campo de exploração de petróleo, localizado na cidade de Candeias. Com isso, nasce a indústria do petróleo no Brasil, com o estado da Bahia sendo o berço nacional da extração de petróleo (SDE, 2016).

DERRAMES DE ÓLEO NO AMBIENTE COSTEIRO

Os acidentes ambientais são caracterizados como eventos inesperados e indesejados que podem causar, direta ou indiretamente, danos ao meio ambiente e à saúde (Tabela 3). Esses eventos têm se mostrado amplamente distribuídos no território brasileiro, com destaque para algumas regiões, sendo, na maioria das vezes, associados ao transporte, principalmente terrestre, de substâncias perigosas (IBAMA, 2008).

TABELA 3 - Número de acidentes ambientais por produto ocorridos no Brasil em 2008.

PRODUTO	NÚMERO DE OCORRÊNCIAS
Óleo diesel	58
Amônia	16
Petróleo	12
Óleo	11
Gaolina	6
Óleo hidráulico	6
GLP	5
Óleo combustível	5
Óleo lubrificante	55
Agrotóxico	4

Fonte: Adaptado de IBAMA (2008).

Os hidrocarbonetos podem ser classificados, a depender de sua origem, como sendo biogênicos, petrogênicos e pirolíticos (LINCH; HOBBIE, 1988; MILLERO; SOHN, 1991; RODRIGUES, 2002). As principais fontes de hidrocarbonetos para o ambiente são: erosão de rochas, vazamentos de petróleo, processos de combustão incompleta, trocas atmosféricas, drenagem urbana, combustão parcial de combustíveis (gás, madeira, carvão) utilizados nos motores de combustão interna e geração de energia (GESAMP, 1993; ZANARDI, 1996; RODRIGUES, 2002).

Incidentes com petróleo envolvido são evidenciados constantemente em diversas operações do cotidiano, como por exemplo: lavagens de tanques de óleo com água do mar nos terminais, ações de carga e descargas nos portos, ruptura de oleodutos, combustão parcial para geração de energia em veículos, queimadas, derrames de efluentes industriais, transporte atmosférico dos componentes mais voláteis do petróleo e seus refinados (gasolina, querosene, etc.) entre outros. (SKINNER; TUREKIAN, 1977; NIPPER, 1990; ZANARDI, 1996; RODRIGUES, 2002).

Acidentes envolvendo derramamentos de petróleo nos ambientes aquáticos estão inseridos no contexto de poluição marinha, constituindo uma das principais fontes de poluentes para os ecossistemas costeiros. (FONSECA, 2009).

O petróleo, advindo de incidentes de diversas naturezas, uma vez no meio marinho pode atingir diversos ecossistemas ao longo da zona costeira como manguezais, estuários, restingas, lagoas costeiras, entre outros. Tais ambientes possuem uma sensibilidade muito alta a contaminantes derivados do petróleo, depreciando os ecossistemas e prejudicando diversos nichos ecológicos presentes no meio (ZIOLLI, 2002).

O petróleo derramado nos oceanos é levado para os ecossistemas costeiros como, por exemplo, os manguezais, típicos de regiões tropicais e subtropicais. Esse ecossistema

destaca-se pela sua função de berçário, refúgio e abrigo para diversas espécies marinhas e estuarinas em busca de alimento e reprodução (ALONGI, 2002; QUEIROZ; CELINO, 2008).

Conforme a temperatura local e a velocidade do vento se configurarem, ocorrerá a maior ou menor evaporação dos componentes mais voláteis do petróleo. O óleo remanescente sofrerá influência de processos como dispersão, promovendo a quebra da mancha homogênea em gotículas menores. Estas poderão permanecer em superfície ou em suspensão na coluna d'água (FONSECA, 2009; ITOPI, 2011; CARVALHO, 2013). Dependendo da diversidade e abundância de espécies de micro-organismos, bem como da concentração de oxigênio e nutrientes disponíveis, a degradação microbiológica poderá ocorrer (JORDAN; PAYNE, 1980; RODRIGUES, 2002). Frações dissolvidas do óleo podem ser oxidadas pela luz solar e os produtos resultantes desse processo, mais solúveis, dispersam-se mais facilmente na coluna d'água (NRC, 1985).

Acidentes como os derrames e vazamentos de óleo que ocorrem no setor norte da baía vêm comprometendo a qualidade de vida da população, desde a implantação da RLAM em 1950 (Tabela 4). Essas ocorrências desastrosas têm deixado um passivo ambiental na região oriunda da contaminação das feições naturais do local, incluindo a biota comestível (QUEIROZ; CELINO, 2008; PESO-AGUIAR et. al. 2000).

A Baía de Todos os Santos (BTS) é alvo de múltiplos contaminantes, sendo na maioria das vezes difícil determinar o efeito de apenas um único fator que esteja a causar estresse ambiental sobre a biota. Somado a isso, espera-se que haja uma defasagem entre a exposição e o aparecimento de alguma resposta citotóxica significativa nos organismos alvos, o que pode dificultar a observação de correlações entre as concentrações dos compostos tóxicos e os efeitos que estes causam nos organismos. Estudos no entorno da BTS mostraram que mesmo organismos altamente resistentes, como os moluscos bivalves, tiveram alterações celulares significativas com o aumento da concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs (BAHIA, 2004).

TABELA 4 - Cronologia de acidentes envolvendo derramamento de petróleo e seus derivados na BTS entre o período de 1988 e 2012.

EVENTO	LOCAL	ANO	QUANTIDADE DERRAMADA	IMPACTOS
Vazamento de óleo	Madre de Deus	1988	700.000 litros	-
Transferência de óleo bruto entre contêineres	Madre de Deus	1992	48.000 litros	Mancha de óleo de 6km com 30,7 hectares de manguezais atingidos
Derrame de óleo	BTS	1995	-	BTS
Vazamento de Querosene	Madre de Deus	1995	-	Rio Mataripe
Rompimento de um duto	São Francisco do Conde (RLAM)	1998	Volume considerado	Praias e manguezais
Vazamento de óleo	Ilhas dos Frades	1998	Não especificado	Praias e embarcações
Ruptura de tubulação	São Francisco do Conde (RLAM)	1998	Não especificado	Incêndio em uma das unidades
Quebra do duto de um dos cargueiros da Petrobras atracado	Madre de Deus (TEMADRE)	1999	-	5km da costa atingida
Vazamento de óleo no atracamento de um navio	Madre de Deus (TEMADRE)	1999	500 litros	Praias, manguezais, embarcações e fauna marinha
Manobra técnica realizada pela RLAM	Madre de Deus	1999	1.000 litros	BTS, praias e manguezais
Despejo de efluentes ricos em amônia	São Francisco do Conde (RLAM)	2000	Volume não especificado	Morte de peixes na BTS
Vazamento de óleo	São Francisco do Conde (RLAM)	2000	-	Destruição parcial da unidade 9 da RLAM após incêndio na unidade
Rompimento de duto	São Francisco do Conde (RLAM); Polo Petroquímico de Camaçari	2000	Volume não especificado	Rio Joanes
Rompimento de ducto	RLAM; Polo Petroquímico de Camaçari	2000	Volume não especificado	Rio Joanes
Vazamento de propano seguido de três explosões	São Francisco do Conde (RLAM)	2000	Volume não especificado	Incêndio na unidade e morte de um operador
Vazamento de óleo	São Francisco do Conde (RLAM)	2000	10.000 litros	Caípe
Vazamento de nafta	São Francisco do Conde (RLAM)	2000	-	Incêndio na unidade
Rompimento de dutos	São Francisco do Conde (RLAM)	2001	10.000 litros	Manguezais
Explosão na planta de GLP	São Francisco do Conde (RLAM)	2002	-	Morte de três trabalhadores
Vazamento de óleo da RLAM	São Francisco do Conde (RLAM)	2009	-	Contaminação de praias
Vazamento de óleo em estrutura da Petrobrás desativada em 2002	São Francisco do Conde	2010	-	Manguezais
Vazamento de diluente de óleo combustível	TEMADRE e RLAM	2012	-	Praias em São Francisco do Conde

Fonte: Adaptado de VEIGA (2003); FIORAVANTI (2013).

A contaminação ambiental da BTS não se restringe à presença de hidrocarbonetos, tendo sido também referido elevadas concentrações de metais, a exemplo do cobre na matriz sedimentar e mercúrio na coluna d'água e biota do mesolitoral (CRA, 2004)

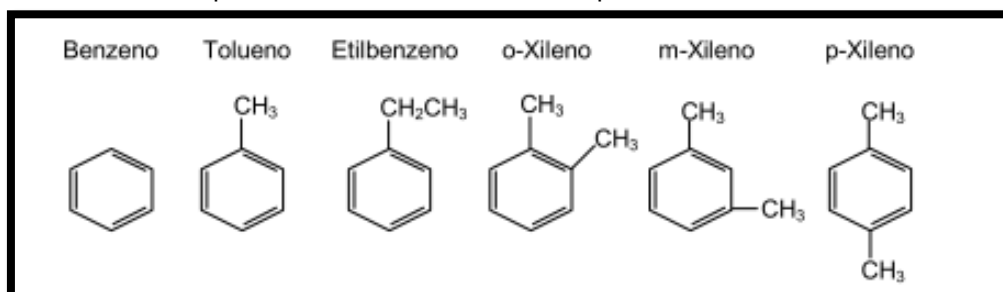
Segundo o CRA (2004) as possíveis fontes potenciais de contaminação para a região de Madre de Deus são: (i) a RLAM da Petrobras, contribuindo na contaminação por hidrocarbonetos e metais, através de efluentes líquidos, drenagem contaminada, sistema de refrigeração em circuito aberto e poluição atmosférica; (ii) a Fábrica de Asfalto e o TEMADRE da Petrobras, que contribui com a contaminação por hidrocarbonetos; (iii) as atividades de exploração de petróleo em mar e em terra, que contribuem com a contaminação por hidrocarbonetos e metais; (iv) os rios São Paulo e Mataripe, contribuindo com metais e hidrocarbonetos, devido principalmente às atividades industriais e de exploração de petróleo em suas bacias.

BTEX

Os hidrocarbonetos monoaromáticos possuem apenas um anel benzênico e são os componentes mais voláteis encontrados no petróleo, comumente chamados de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e orto-meta-para-xileno) estão presentes em abundância nos óleos leves (NRC, 2003; HATJE; ANDRADE, 2009).

O grupo BTEX (Figura 14) engloba os hidrocarbonetos mais abundantes da gasolina (Figura 15), podendo representar uma parcela de 18% a 25% em massa desta (ANP, 2006). No Brasil, a gasolina comercializada nos postos é bastante distinta quando comparada a outros países, devido à presença de 20-26% de etanol (anidro) em sua composição (MARTINS, 2004).

FIGURA 14 - Estruturas químicas das moléculas dos compostos BTEX.

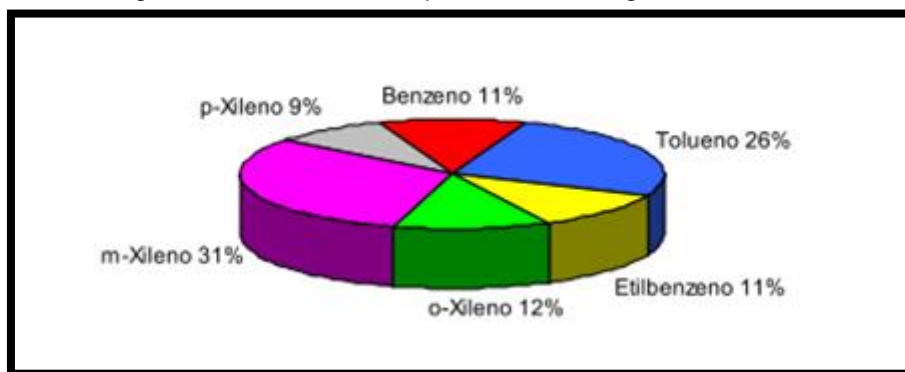


Fonte: TRIGUEIROS (2008).

A formulação diferenciada que a gasolina nacional apresenta gera um efeito negativo no que diz respeito à contaminação de aquíferos, relacionado diretamente aos compostos

BTEX. De acordo com CORSEUIL et al. (2002) o etanol é um agente depletivo dos receptores de elétrons, provocando uma inibição ou retardando a degradação dos compostos mono e poliaromáticos. Essa inibição pode ocorrer devido aos compostos BTEX serem degradados por enzimas que seriam reprimidas na presença de substratos como o etanol em altas concentrações (DUETZ et al., 1996; MARTINS, 2004).

FIGURA 15 - Porcentagem em massa dos compostos BTEX na gasolina.



Fonte: ANP (2006).

Outro fator importante é o fato do etanol ser energeticamente mais favorável a ser biodegradado, como demonstrou CORSEUIL et al., (1998) em experimentos de microcosmos comparando a degradação preferencial do etanol frente ao benzeno. Somado a isso, há um aumento em massa dos compostos BTEX em fase aquosa, promovendo uma contaminação mais complexa, quando há presença do etanol, comparado à contaminação produzida somente pela gasolina isenta desse combustível (MARTINS, 2004). Em síntese, o etanol pode interferir diretamente na solubilização dos compostos tóxicos e também nas taxas de degradação microbiológica (CORSEUIL et al., 1998; MARTINS, 2004).

TABELA 5 - Propriedades físico-químicas dos compostos BTEX.

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Densidade (g cm ⁻³)	Solubilidade em água (25° C) (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (atm) (25° C)	Constante de Henry K _h (10 ³) (atm m ³ mol ⁻¹)	Coefficiente de partição octanol/água Log K _{ow} (25° C)
Benzeno	C ₆ H ₆	78,10	0,880	1780	0,1250	5,5	2,13
Tolueno	C ₇ H ₈	92,10	0,867	515	0,0370	6,6	2,69
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,867	152	0,0125	8,7	3,13
p - Xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,860	198	0,00895	5,0	3,15
m - Xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,864	187	0,00803	5,0	3,20
o - Xileno	C ₈ H ₁₀	106,20	0,880	175	0,00697	4,0	3,12

Fonte: KAIPPER (2003).

As propriedades físico-químicas como: solubilidade, pressão de vapor, densidade, massa molar e o coeficiente de partição octanol-água (Tabela 5) dos compostos do BTEX são importantes no contexto da biorremediação (TRIGUEIROS, 2008). Tais propriedades determinarão a maior ou menor disponibilidade do substrato à biota. O aumento na massa molecular do composto infere em uma maior resistência à biodegradação (SILVA, 2002). Segundo CERNIGLIA (1992) a recalcitrância dos HPAs para os micro-organismos aumenta de forma proporcional com o aumento do peso molecular e com o coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$). Os compostos benzeno, tolueno e xileno possuem uma tendência em evaporar rapidamente, uma vez em contato com a atmosfera. Essas substâncias ocupam uma faixa intermediária de coeficiente de partição (GOMES, 2004). O coeficiente de partição é calculado como a razão da concentração de um composto orgânico, neste caso os compostos BTEX, dissolvido entre o octanol e a água, ambos em equilíbrio, descrevendo a tendência da partição desse composto entre a fase orgânica e a fase aquosa. Quanto maior esta razão, maior será a hidrofobicidade do composto (TRIGUEIROS, 2008). Os compostos benzeno e tolueno se dissolvem preferencialmente na água subterrânea, quando comparados ao etilbenzeno e os isômeros do xileno, pois esses últimos possuem menor solubilidade e são mais recalcitrantes à biodegradação (KAPLAN et al., 1997; MARIANO, 2006). A pressão de vapor é uma medida da volatilidade de uma substância. É definida como sendo a pressão exercida pelos vapores do composto quando estes estão em equilíbrio dinâmico com o líquido. Representa a força exercida pelas moléculas do produto contra a superfície atmosférica para passar para o estado de vapor. Quanto maior for a pressão de vapor de uma substância, mais facilmente ela deixará o estado líquido e passará para o estado gasoso. A constante de Henry expressa essa relação entre a solubilidade de um gás e a pressão, onde a solubilidade de gases em líquidos aumenta com o aumento da pressão. A proporção com que ocorre essa variação na solubilidade com a pressão é específica de cada gás e constante a uma dada temperatura. (MC MURRY, 2008).

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse na investigação de derramamentos, isso porque o aumento do número de vazamentos de tanques subterrâneos, que armazenam combustíveis em postos de gasolina, é alarmante e são os principais responsáveis pela contaminação de aquíferos por BTEX (BORDEN et al., 1986; HUNT et al., 1988; MACKAY; CHERRY, 1989; LITTLE et al., 1992; CAPUANO; JOHNSON et. al., 1996; FREITAS, 1997; CORSEUIL; ALVAREZ, 1996; BICALHO, 1997; GUSMÃO, 2005).

Uma das principais preocupações, ao se falar em derrames e/ou vazamentos de combustíveis, é, principalmente, a contaminação de aquíferos que são largamente utilizados como fonte de água para o consumo humano. Os maiores problemas de contaminação são

relatados por conta da presença dos HPAs, isso porque estes são as frações mais solúveis e móveis da gasolina. A mobilidade desses constituintes é explicada pelo baixo coeficiente de partição entre octanol-água que compete aos mesmos uma lenta adsorção no solo e um transporte preferencial pela água. Essa mobilidade é ainda aumentada pela adição de álcool na gasolina que é comercializada no Brasil, devido ao efeito de co-solvente que o álcool promove. (SILVA et. al., 2002, TIBURTIUS et al., 2004; RESENDE, 2007). Devido à presença de poluentes em águas subterrâneas, o nível de potabilidade destas está ficando cada vez menor (GUSMÃO, 2005).

Nos EUA, os níveis máximos para a água potável dos componentes individuais de BTEX são de 0,005, 1,0, 0,7, e 10 mgL⁻¹, respectivamente (USEPA 2001). No México, os regulamentos de saúde ambiental estipulam níveis máximos de 0,01, 0,3, 0,7, e 0,5 mgL⁻¹, respectivamente (DOF, 2000). No Brasil, segundo o CONAMA (2012), de acordo com a Resolução nº 357 de 2005, os valores máximos permitidos para o grupo de compostos BTEX em águas destinadas ao consumo humano (águas doces) são: 0,005 mgL⁻¹ para o benzeno, 2 µgL⁻¹ para o tolueno, 90 µgL⁻¹ para o etilbenzeno, 300 µgL⁻¹ para o xileno.

Devido à alta toxicidade, com enfoque, principalmente, no potencial carcinogênico e mutagênico do grupo BTEX, existe uma grande preocupação no contexto ambiental geral, mas, sobretudo, na contaminação de mananciais de abastecimento urbano (SILVA et. al., 2002; RESENDE, 2007). Tais compostos podem causar distúrbios neurológicos, alterações nas funções do sistema endócrino e lesões em órgãos como os rins e o fígado (RESENDE, 2007).

Segundo a Portaria da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho nº 14 de dezembro de 1995, o benzeno é considerado um agente cancerígeno (RESENDE, 2007; BRASIL, SECRETARIA DE SEGURANÇA E SAÚDE NO TRABALHO, 1995). Atua no sistema reprodutor podendo causar deformações no feto (efeito teratogênico), disfunção sexual, como infertilidade e aborto, podendo ainda agir nos sistemas neurológico e imunológico (GUSMÃO, 2005).

Os componentes do BTEX são poderosos depressores do sistema nervoso central (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996) sendo o benzeno mais tóxico dentre eles (DÖRR, 2008). Se apresenta como o componente mais simples, dentre os hidrocarbonetos aromáticos, sendo dele derivado um grande número de substâncias relativamente solúveis em água (CETESB, 2007). Dentre os componentes do petróleo, o benzeno é o que se apresenta em menor quantidade, geralmente correspondendo apenas 2% do petróleo cru. No entanto, mesmo em baixas concentrações não deixa de ser perigoso. Se considerarmos sua alta estabilidade, tem-se uma maior toxicidade e persistência quando comparado aos outros componentes (JOHNSON et. al., 2003; ANDRADE, 2008).

Exposições a tolueno estão relacionadas com disfunções hepáticas e gastrointestinais, sendo, também teratogênico. O etilbenzeno provoca danos ao sistema respiratório e provoca irritação nos olhos e desmaios. Exposição aos vapores de xileno estão relacionados com fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, fraqueza, perda de memória, sonolência, distúrbios de humor e equilíbrio, zumbido, náuseas e perda de apetite. Em altas concentrações pode levar a inconsciência e morte (RIBEIRO, 2005; GUSMÃO, 2005).

BIORREMEDIAÇÃO

Inúmeros fatores irão influenciar no processo de oxidação do óleo inserido no ambiente marinho, tais como: composição química do óleo, dispersão na água, temperatura, concentração de nutrientes inorgânicos, salinidade e diversidade microbiológica (CONNELL; MILLER, 1984). Baixas temperaturas, por exemplo, aumentam a viscosidade do óleo diminuindo a capacidade da mistura do óleo na água do mar (GESAMP, 1993).

Uma vez no ambiente marinho, o óleo sofre intemperismo decorrente de processos físicos, químicos e biológicos que poderá contribuir para sua remoção ou persistência no meio. A composição química e a quantidade do óleo derramado irão determinar sobremaneira o comportamento da mancha de óleo no ambiente marinho. Quando o derramamento se processa, ações naturais agem sobre a mancha de óleo. Inicialmente, o espalhamento provoca alterações de coloração e espessura, podendo ser também fragmentada (FONSECA, 2009; ITOPI, 2011; CARVALHO, 2013).

Em ambientes marinhos, a quantidade de bactérias com capacidade de degradar hidrocarbonetos pode variar de 0,003% (HOLLAWAY, 1980; RODRIGUES, 2002) a 100% (MULKINS-PHILLIPS; STEWART, 1974; RODRIGUES, 2002). Estudos utilizando culturas purificadas demonstraram que, em geral, estas podem metabolizar somente alguns tipos de hidrocarbonetos (BRITTON, 1984). Muitas investigações têm sido feitas com micro-organismos que apresentam capacidade de degradar HPAs a fim de remediar locais que foram alvo de contaminações (POTIN, et. al., 2004).

Compostos monoaromáticos de baixo peso molecular tais como benzeno, tolueno e xileno, que estão entre os compostos tóxicos encontrados no petróleo, são também muito facilmente degradados por diversos micro-organismos marinhos (ATLAS, 1995; MELO, 2012).

Segundo ALEXANDER (1999) a maior parte dos micro-organismos presentes no solo não detém a capacidade de degradar HPAs, devido ao grande número de enzimas que estão envolvidas na degradação destes compostos. Ao passo que, justifica-se então, a necessidade de se isolar e selecionar micro-organismos que degradem tais compostos, a

fim de remediar áreas contaminadas através de processos da biorremediação (ALEXANDER, 1999; JACQUES et. al., 2007).

A biodegradação por bactérias e fungos, segundo LEAHY e COLWELL (1990) de hidrocarbonetos alifáticos, cicloalifáticos e aromáticos é realizada, em um primeiro momento, por enzimas chamadas oxigenases. Sabe-se que o oxigênio molecular tem duas funções principais, agir como: i)ceptor final de elétrons, para a liberação destes durante as reações metabólicas, no intuito de que essas ocorram ii) e oxidante direto do anel aromático, realizando as oxidações microbianas. Um enorme desafio pode ser visualizado na degradação aeróbica pelos micro-organismos, tendo em vista que alguns compostos, mesmo os de baixo peso molecular, podem apresentar alta toxicidade devido a seus efeitos solventes nas membranas celulares (MORGAN; WATKINSON, 1994). Há um decaimento expressivo na solubilidade desses compostos com o aumento do peso molecular, dificultando significativamente a utilização destes como substrato pelos micro-organismos (RODRIGUES, 2002).

O processo de biodegradação dos compostos de carbono envolve diversos genes e enzimas específicas para os diferentes constituintes que os compõe. Existem variações na capacidade de degradar e nas vias de degradação de certos compostos, como os hidrocarbonetos, para os micro-organismos. Somado a isso, as enzimas responsáveis pela degradação são altamente específicas, e isso vale tanto para as reações catalisadas, quando na seleção do substrato utilizado. Portanto, para cada tipo de micro-organismo existirá um conjunto de enzimas envolvidas na degradação (RODRIGUES, 2002).

As condições do meio são determinantes em limitar ou favorecer a sobrevivência dos micro-organismos e os processos de biodegradação. A umidade, por exemplo, é considerada, segundo muitos autores, como o fator mais importante na biodegradação, pois as atividades metabólicas só irão ocorrer se houver uma adequada disponibilidade de água, visto que, o teor de água está relacionado com a quantidade de oxigênio disponível no meio, fator extremamente importante para a atividade de micro-organismos aeróbicos. A temperatura também afeta, sobremaneira, a biodegradação, sendo a faixa ideal estabelecida entre 25° e 35°. O pH do meio também interfere nos processos metabólicos microbianos, através dos efeitos que os íons H⁺ promovem na permeabilidade celular e na atividade enzimática, alterando também, porventura, a disponibilidade de macro e micronutrientes, bem como na solubilidade de metais pesados que poder ser tóxicos à microbiota. Todos esses fatores, em conjunto, irão determinar uma maior ou menor abundância da população de micro-organismos e, conseqüentemente, na eliminação dos hidrocarbonetos indesejáveis (JACQUES ET AL., 2007).

Somado a isso, as enzimas responsáveis pela degradação são altamente específicas, e isso vale tanto para as reações catalisadas, quando na seleção do substrato utilizado (RODRIGUES, 2002).

Diversas culturas bacterianas puras têm sido utilizadas em estudos de biorremediação por crescerem aerobiamente em compostos BTEX, como: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Ralstonia*, dentre outras (TRIGUEIROS, 2008).

De acordo com LOVLEY et. al. (1989), bactérias isoladas de aquíferos são capazes de degradar uma variedade de hidrocarbonetos combustíveis, incluindo os monoaromáticos do grupo BTEX, em condições aeróbicas. As bactérias aeróbicas mais comuns isoladas de aquíferos contaminados com gasolina incluem *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia* (ROSENBERGE et. al., 1999).

A atual necessidade de remediar ambientes contaminados por estes poluentes diz respeito à elevada toxicidade inerente aos mesmos e devido ao fato desses compostos possuírem alta solubilidade em água (DÖRR, 2008; GOUDAR; STREVETT, 1998), permitindo uma maior mobilidade destes no meio. Nesse âmbito, a biorremediação pode ser entendida com uma estratégia, na qual se utiliza micro-organismos degradadores de compostos orgânicos, que tem como intuito transformar moléculas orgânicas complexas em moléculas mais simples como gás carbônico, metano e água (RESENDE, 2007). A biorremediação de substâncias químicas orgânicas tornou-se uma alternativa aos métodos físicos e químicos tradicionais, que podem ser caros e produzir produtos perigosos (ABUHAMED et. al., 2004; SINGLETON, 2005).

Diversos micro-organismos apresentam capacidade em degradar hidrocarbonetos do petróleo, principalmente fungos e bactérias, que apresentam ubiquidade nos ambientes terrestres (ATLAS et. al., 1980; JONES; EDINGTON, 1968) e aquáticos (BUCKLEY et. al., 1976; MULKINS-PHILLIPS; STEWART, 1974; WARD & BROCK, 1976). As bactérias são seres capazes de se adaptarem rapidamente as alterações dos componentes bióticos e abióticos do meio. A variabilidade metabólica desse grupo de organismos, sua rápida capacidade de multiplicação e variabilidade genética, são algumas das características que as tornam conhecidas pelo seu potencial de degradação (RAMSAY et. al., 2000; GOMES, 2004; PUCCI et. al., 2009).

Diversos autores relatam estudos com ênfase nesses compostos tais como RESENDE (2007), que avaliou os mecanismos gerais de degradação do BTEX por micro-organismos. Outros autores como (GOUDAR; STREVETT, 1998; JOHNSON, et. al., 2003;

TIGUEROS, 2008; DÖRR, 2008) realizaram pesquisas voltadas à avaliação da cinética de biodegradação do BTEX, como apresentado neste trabalho.

MARTINO et. al., (2012) relatou em sua pesquisa que um dos isolados de *Pseudomonas* provou ser capaz de degradar BTX, bem como tolerar suas altas concentrações, provando que essa bactéria pode ser utilizada para propósitos de biorremediação em ambientes contaminados. LIN et. al., (2007) avaliaram a capacidade de degradação de misturas contendo BTX por isolados de *Pseudomonas aeruginosa* através de modelos cinéticos, mostrando em sua pesquisa uma estratégia promissora para remediar aquíferos poluídos pela mistura desses compostos.

Estudar a cinética de um dado fenômeno denota acompanhar a evolução no tempo deste processo, por meio da quantificação de determinadas grandezas (parâmetros) que definem de forma adequada essa evolução. Estudos sobre a cinética de degradação de compostos químicos tóxicos são extremamente importantes, à medida que possibilitam estimar a persistência dos contaminantes no ambiente, quantificar suas concentrações com o decorrer do tempo, de forma a determinar a possibilidade ou não da degradação destes, antes que os mesmos atinjam sítios de exposição à biota e aos humanos (MARTINS, 2004).

Conhecer a cinética microbiana, em estudos de biorremediação, é ferramenta básica e essencial para a avaliação da evolução, em termos de concentrações, bem como na mobilidade dessas substâncias nocivas dentro dos diversos compartimentos ambientais.

CINÉTICA

A eficácia que sistemas biológicos apresentam dentro do contexto da biorremediação é diretamente dependente das propriedades cinéticas do crescimento populacional microbiano e das taxas de degradação dos substratos (MARTINS, 2004).

Curva de crescimento bacteriano

O aumento do número de micro-organismos com o passar do tempo é denominado de crescimento bacteriano. Este crescimento é estudado em termos de aumento populacional no tempo e não no aumento em dimensão das células individuais de cada bactéria, isto é explicado por conta das reduzidas dimensões celulares e devido às suas características particulares de divisão (STANIER et. al., 1986; SIGEE, 1993; ROMEIRO, 2007; TORTORA, et. al. 2005).

As bactérias se reproduzem por fissão binária, isto é, uma vez atingido um determinado tamanho, a célula divide-se em duas e posteriormente estas dividir-se-ão em novas células e assim por diante. Ao término de n divisões, o número formado de células é

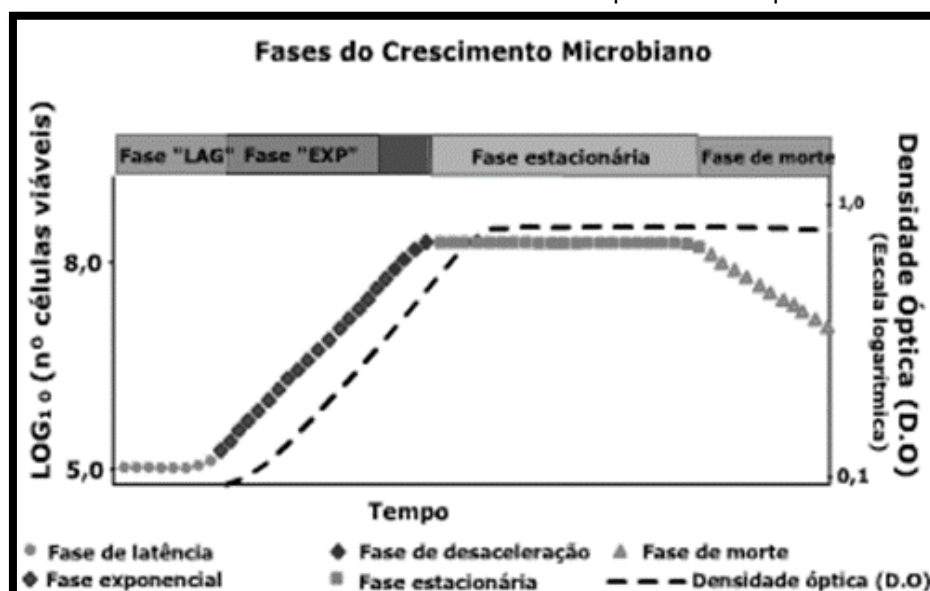
2n. Essa reprodução é expressa em progressão geométrica (2^n), por isso a expressão é apresentada em logaritmo (log) do número dos micro-organismos pelo tempo gasto na multiplicação, ou seja, o crescimento exponencial é promovido à medida que uma célula origina duas outras, que por sua vez originam quatro, e assim, sucessivamente (CARVALHO, 2010; TORTORA, et. al., 2000; TORTORA, et. al. 2005).

O tempo necessário para uma célula formar duas outras células prontas para se dividirem é chamado tempo de geração, que varia de acordo com os micro-organismos e condições ambientais. Em geral, estima-se que o tempo de geração dura entre 1 e 3 horas (60 e 180 minutos), porém pode ocorrer em 24 horas ou 20 minutos, dependendo do micro-organismo em questão (TORTORA, et. al., 2000; TORTORA, et. al., 2005). Representar graficamente populações muito grandes, como é o caso de populações bacterianas, utilizando escalas aritméticas é bastante difícil. Por isso, normalmente se utilizam numerações logarítmicas para representar graficamente o crescimento microbiano (TORTORA, et. al., 2005)

Fases do crescimento bacteriano

O crescimento dos micro-organismos descreve uma curva caracterizada por quatro fases: latência (lag), exponencial (log), estacionária e morte ou destruição (TORTORA et al., 2012; TORTORA et. al., 2000; VERMELHO, et. al., 2011; IST, 2015; CARVALHO, 2000). (Figura 16).

FIGURA 16 - Curva de crescimento bacteriano mostrando as quatro fases típicas do crescimento.



Fonte: IST (2015).

A Fase "LAG", também conhecida como fase de latência, corresponde a uma fase em que se processa uma adaptação fisiológica por parte das células ao novo meio de cultura a que foram introduzidas. O metabolismo microbiano está ativo, sintetizando enzimas e coenzimas, com o intuito de criar condições que favoreçam a divisão celular. Nesta fase as células ainda não se encontram em processo de divisão, mantendo a concentração de células constante no meio (TORTORA, 2000). Essa fase inicial do crescimento é influenciada pela idade da cultura, quantidade de inoculo microbiano, tipo de micro-organismo, características do substrato e condições do meio como: pH, oxigênio, composição do meio, substâncias inibidoras, entre outras (CARVALHO, 2010). Entende-se que nessa fase o micro-organismo está rearranjando seu arcabouço enzimático, com o intuito de iniciar a metabolização do substrato presente. Quanto mais aclimatado estiver o micro-organismo, dentro das condições de cultivo que se pretende, menor tempo durará esta fase (PELCZAR et. al., 1996; TORTORA et. al., 2000).

Na fase de aceleração, inicia-se o crescimento microbiano e conseqüentemente, o consumo de substrato. A velocidade aumenta com o tempo nesta fase (TORTORA et. al., 2000).

Quando os micro-organismos encontram as condições ideais à sua multiplicação, finaliza-se a fase de latência e inicia-se a fase logarítmica - fase LOG (CARVALHO, 2000). Nesta fase o número de células aumenta exponencialmente com o tempo, também conhecida como fase exponencial de crescimento. Esta fase é representada por um intenso metabolismo celular, pois para crescer de modo exponencial a célula necessita de grande quantidade de energia, ou seja, há uma necessidade de produção de grandes quantias de ATP à custa de um enorme consumo da fonte de carbono disponível. Essa produção de ATP a partir de uma fonte de carbono é denominado catabolismo, que é um processo exotérmico, que junto com outros processos (catabólicos e anabólicos) que se processam dentro das células, liberam calor. Em síntese, a célula libera calor quando está metabolicamente ativa (TORTORA et. al., 2000). Por conta do aumento populacional, pode ocorrer esgotamento dos nutrientes e/ou alta concentração de metabólitos tóxicos às células, limitando a multiplicação celular, pondo fim à fase exponencial (CARVALHO, 2010). As células se dividem numa taxa logarítmica constante, em decorrência do excesso de substrato no meio. Nesta fase há uma maior sensibilidade às mudanças nas condições ambientais (TORTORA et. al., 2000)

A Fase de desaceleração ocorre à medida que o substrato começa a ficar escasso ou mesmo podendo haver acúmulo maior de produtos que interfiram negativamente no crescimento. Devido a esses fatores a velocidade de crescimento passa a diminuir (TORTORA et. al., 2000).

Após o crescimento abrupto da fase exponencial, segue-se a fase estacionária, onde o número de células viáveis se mantém constante, ou seja, há um equilíbrio entre o número de células que nascem e morrem. Na fase estacionária o esgotamento dos substratos ou mesmo o acúmulo de substâncias tóxicas em níveis insuportáveis aos micro-organismos, faz com que a velocidade de crescimento volte a ser nula (TORTORA, et. al., 2000). A população microbiana permanece constante neste período como resultado da parada de divisões binárias ou através do equilíbrio entre taxas de reprodução e mortalidade (PELCZAR et. al., 1996). Esta fase caracteriza-se pela presença de células velhas, porém resistentes a condições adversas, podendo, em alguns casos se esporular (CARVALHO, 2010).

Na fase de morte, há um decaimento expressivo no número de células (velocidade de crescimento negativa), isso porque as condições do meio vão se tornando cada vez mais impróprias à sobrevivência das células com o tempo, aumentando as taxas de mortalidade (MC CORNICK, 1995; RETTORI; VOLPE, 2000). O metabolismo de uma determinada célula é resultado do seu catabolismo e anabolismo e dependerá do meio de cultura utilizado e das fases do crescimento microbiano (lag, exponencial, estacionária e morte) na qual a célula se encontra. Os processos metabólicos em geral, requerem energia (ATP), que é sintetizado à custa da oxidação de uma fonte de carbono (RETORI; VOLPE, 2000). A redução da concentração de células pode decorrer em virtude do consumo das reservas alimentares intracelulares, ou mesmo pela lise celular, promovendo a diminuição no número de células presentes. Dentre os fatores que podem contribuir para a mortalidade de bactérias estão: a falta de nutrientes essenciais e acúmulo de substâncias inibidoras, como os ácidos (VON SPERLING, 1996, TORTORA et al., 2000). A medida que as condições adversas do meio aumentam, as células morrem em ritmo acelerado, dando fim ao ciclo microbiano (VERMELHO, 2011).

MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA

O crescimento populacional microbiano pode ser medido de diversas formas. Existem variados métodos para a contagem de micro-organismos, que podem ser divididos em dois grupos, os que quantificam o número de células e aqueles que quantificam a massa celular, ou massa total da população, que geralmente é proporcional ao número de células. Somado a isso, têm-se que alguns métodos são capazes de determinar as células viáveis (somente as vivas), enquanto que outros conseguem determinar as células totais - células vivas e mortas (VERMELHO, et. al., 2011; TORORA, et. al., 2012). Segundo TORTORA et. al. (2012) os métodos de quantificação de micro-organismos podem ser classificados em

diretos e indiretos. Dentre os métodos diretos encontram-se: (i) contagem em placas; (ii) filtração; (iii) número mais provável e (iv) contagem microscópica direta. Enquanto que os métodos indiretos englobam: (v) a turbidimetria; (vi) atividade metabólica e (vii) peso seco.

Alguns métodos determinam o número de células, como é o caso da metodologia de contagem em placas, enquanto que em outros a análise é feita pela massa total da população microbiana, que é diretamente proporcional ao número de células, como o método turbidimétrico (TORTORA, et. al., 2005)

Método de contagem em placas

O método de contagem em placas é o mais utilizado para medir populações bacterianas. Uma grande vantagem deste é a medição de células viáveis. Em contrapartida, possui como desvantagem o tempo, já que são necessárias 24hs de incubação para que as colônias, macroscopicamente visíveis, possam ser formadas. O fator tempo pode ser um problema sério, dependendo da finalidade do método. A contagem em placas pressupõe que cada bactéria viva cresce e tem potencial de se dividir para produzir uma única colônia, o que não é sempre verdade pois as bactérias geralmente crescem juntas em agregados celulares ou cadeias. Com isso, uma colônia, certas vezes pode ser originada não de uma única bactéria, mas de determinado fragmento de uma cadeia ou agregado microbiano (TORTORA et. al., 2012). Por conta disso, as contagens realizadas em placas são denominadas de unidades formadoras de colônias (UFC).

Este método pode ser utilizado para amostras com alta concentração celular, neste caso conciliando com a técnica de diluição seriada, a fim de diluir o conteúdo amostral, bem como ser utilizado para amostras com pouca concentração microbiana, ao passo que o método paralelo de filtração é o mais apropriado (VERMELHO et. al., 2011).

Ao realizarmos contagens em placas é importante estabelecer um limite de colônias que irão se desenvolver. Na presença de uma quantidade muito grande de colônias, algumas células podem ser reprimidas e não se desenvolver, afetando negativamente na contagem destas, causando imprecisões nos resultados. Segundo Food and Drug Administration (FDA), órgão norte americano que controla alimentos e medicamentos, é recomendado que as placas possuam entre 25 a 250 colônias, mas muitos microbiologistas apontam entre 30 e 300 colônias. Para obter tal faixa de valores, sujeita-se o inóculo inicial a um processo chamado de diluição seriada. Segundo ROMEIRO (2007) o número de diluições para cada suspensão celular deve ser escolhido de modo que o número de colônias isoladas em cada placa esteja entre 5 a 100 colônias por micro gota.

O número de células viáveis em uma suspensão tem sido comumente denominado UFC (Unidades Formadoras de Colônias), sigla esta derivada do equivalente em inglês CFU

(Colony Forming Units). Em uma suspensão bacteriana existem células viáveis e células mortas, sendo a soma dessas o resultado do número de células totais presente em solução. As células viáveis são capazes de multiplicar-se e dar origem a duas células filha. A sigla UFC é utilizada quase como sinônimo de célula viável.

Estimar o número de UFC numa determinada suspensão bacteriana pode ser realizada segundo diferentes metodologias. Atualmente, a técnica comumente empregada para essa estimativa é denominada técnica da micro gota e tem sido extensivamente usada tanto por permitir certa economia de tempo e materiais utilizados, quanto por possibilitar um grande número de repetições (ROMEIRO, 2007).

Para a estimativa das UFC deve-se escolher uma técnica que torne a contagem unitária possível de ser realizada. ROMEIRO (2007) adverte que células microbianas devem ficar distanciadas umas das outras, de modo que, após várias divisões celulares, se originem colônias visíveis à vista desarmada e bem isoladas entre si.

Método turbidimétrico

Trata-se de um método indireto em que são contadas as células totais (células mortas e vivas) por meio da turvação que o meio líquido, onde se dá crescimento microbiano, apresenta. A turbidez é obtida através do espectrofotômetro, instrumento que mede a intensidade da radiação, para um determinado comprimento de onda estabelecido, desviada (transmitância) e/ou absorvida (absorbância) (VERMELHO et. al., 2011).

No interior do espectrofotômetro, um feixe de luz incide sobre a amostra (suspensão bacteriana) até um detector fotossensível. Com o aumento no número de bactérias em suspensão, menos luz atingirá o detector. Essa alteração é registrada pela escala do próprio instrumento em termos de porcentagem de transmissão. Há também o registro da expressão logarítmica chamada de absorbância (também conhecida como densidade ótica, ou DO, que é calculada como $Abs. = 2 - \log$ de % da transmissão. A absorbância, ou densidade ótica, é a unidade de medida da turvação do meio. De posse dos valores de absorbância no tempo, é possível representar graficamente o crescimento microbiano (TORTORA et. al., 2012; VERMELHO et. al., 2011).

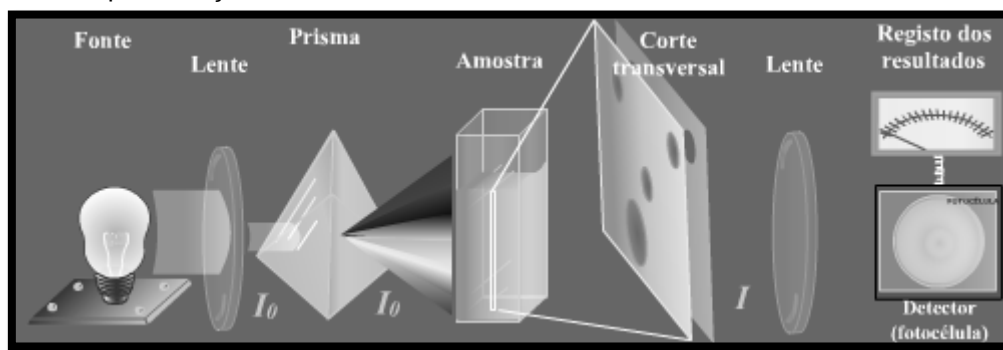
A quantia da luz que atravessa a suspensão celular irá depender da concentração de células na suspensão e tamanho destas, do comprimento de onda, da intensidade da luz incidente (IO) e do diâmetro do tubo que contém a suspensão celular (Figura 17). Em síntese, a densidade ótica da cultura corresponderá à absorbância, que é determinada com base na expressão $D.O = \log (I_0/I)$, onde IO é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células (IST, 2015).

Existem comprimento de ondas que são frequentemente utilizados para medições de densidade ótica de suspensões de células de bactérias ou leveduras que variam de 540, 550, 600 ou 640 nm (IST, 2015).

Dentro de certos limites, existe uma relação linear entre a absorbância, ou densidade ótica, da cultura e o número total de células por mililitro de suspensão, ou seja, a concentração celular (Figura 18). No entanto, para suspensões celulares muito densas é geralmente necessário fazer diluições das culturas de modo que todos os valores de DO mensurados estejam incluídos na região linear da curva de DO versus concentração celular (IST, 2015).

Para que os primeiros sinais de turbidez possam ser medidos pelo equipamento deve estar presente de 10 milhões a 100 milhões, dependendo da sensibilidade do instrumento, de células por mililitro. Com isso, a turbidimetria não é o método viável para amostras com pequeno número de bactérias (TORTORA et. al., 2012).

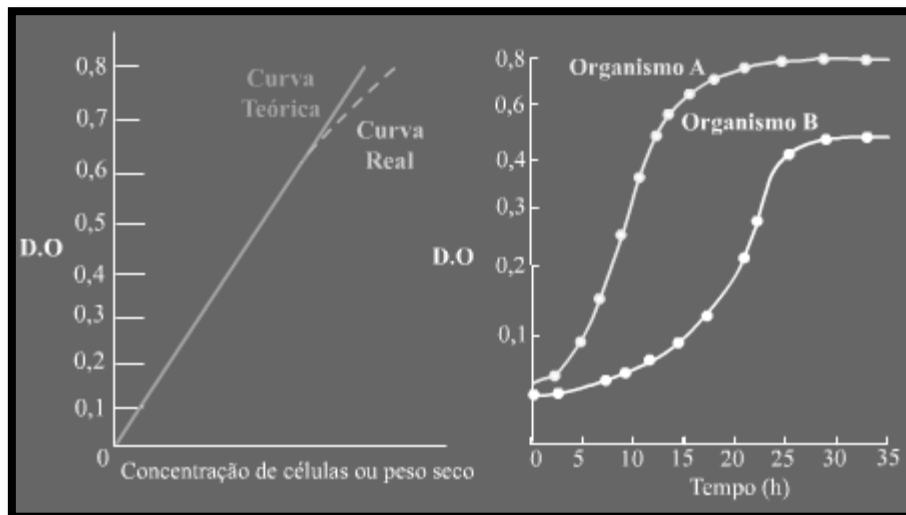
FIGURA 17 - Representação do método turbidimétrico.



Fonte: IST (2015).

Na Figura 17 podemos observar a representação do método turbidimétrico para a medida do crescimento bacteriano. Os raios de luz que incidem sobre a suspensão bacteriana são dispersos, enquanto outros, não dispersos, são detectados por uma célula fotoelétrica e registrados em termos de luz transmitida (IST, 2015).

FIGURA 18 - Gráficos de crescimento microbiano (a) Relação linear entre a densidade ótica da cultura e o número de células na suspensão. (b) Exemplo de duas curvas de crescimento reais de dois organismos A e B.



Fonte: IST (2015).

Existe uma relação linear entre a densidade ótica (DO) da cultura e o número de células na suspensão celular. Trata-se, portanto, de variáveis diretamente proporcionais, cabendo inferir uma, baseada em dados reais da outra. No entanto, para suspensões celulares muito concentradas essa relação deixa de existir (IST, 2015).

O método de contagem em placas, para análise de amostras muito concentradas, deve ser aliado com a técnica da diluição seriada, o que o torna mais trabalhoso e demandando mais tempo, quando comparado ao método turbidimétrico, sendo este último mais célere e obtendo resultados instantâneos, a partir das análises em espectrofotômetro.

ANEXO 2 - Sequenciamento parcial dos genes RNA ribossomal 16S e do gene Catecol 1,2-dioxygenase (c120). Analisados usando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (ANDRADE, 2015)

Sequencia mento das cepas microbiana s (F)	16S ribossomal RNA gene, partial sequence	Catechol 1,2- dioxygenase (c120) gene, complete	Espécie
128 A	<p> GMYTTKKGSSGMRGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCT TGCTCCTTGAT TCAGCGCGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGA CAAGTTTTCSA AAGGAACGCTAATACCGCATACGCTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG GCCTTGCCT ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAA GGCGACGATC CGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGAGACACGGTCCA GACTCCTACGG GAGGCGCAGTGGGGAATTGGCAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG CCGCGTGT GAAGAAGGCTTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAAGGCGAGTAA GTTAATACCTT GCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAG CCGCGTAATA CAGAGGCTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGGTAGGTG GTTCGTTAAG TTGATGTGAAAAGCCCGGGCTCAACTGGGAACGATCCAAAAGTGGCGA GCTAGAGTAC GGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA AGGAACCA GTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT GGGGAGCAAC AGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG GAATCCTTGAG ATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGGGC GCAAGGTTAAA CTCAAAWKRGAAATGRCRSMGGA </p>	<p> GGGRGGTCTTATTCTACTTCGATT CGACTCAG TCCGAATACAACCTGCGCCGCCGA TCATCACCG ATGCCGAGGGCCGCTACCGTCCG GCTCCATCG TGCCGTCGGGTACGGCTGCGACC CGCAGGGCC CGACCCAGGAATGCTGGACCTGCT CGGCCGCC ACGGCCAGCGCCCGGCGCACGTGC ACTTCTTCAT CTCGGCACCTGGGTTCCGCCACCTG ACCACGA GATCAACTTTGAAGGCGA </p>	<i>Pseudomona s putida</i>
128 B	<p> GMYKKGSSGMRGGACTACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTG CTCCTTGATC AGCGCGGACCGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACA ACGTTTTCSAA GGAACGCTAATACCGCATACGCTCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTTCGGG CCTTGCCTAT CAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAAG CGACGATCCG TAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGA CTCCTACGGGA GCGAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC GCGTGTGTA AGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAAGGCGAGTAAAGT AATACCTTGCT GTTTTACGCTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCG CGTAATACAG AGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGTT CGTTAAGTTG GATGTGAAAAGCCCGGGCTCAACTGGGAACGATCCAAAAGTGGCGAGCT AGAGTACGGT AGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAG AACACAGT GCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGG GAGCAACAG GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAT CCTGAGATTT AGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCA GGTTAAACTC AAAAAKRAATKACGRGGA </p>	<p> AAAGGGTAAATWATTCTACTTCGAT TCGACTCA GTCCGAATACAACCTGCGCCGCCG ATCATCAC GATGCCGAGGGCCGCTACCGTCCG CGCTCCATC GTGCCGTCGGGTACGGCTGCGAC CCGCAGGGC CCGACCCAGGAATGCTGGACCTGC TCGGCCG CACGGCCAGCGCCCGGCGCACGTG CACTTCTTC ATCTCCGACCTGGGTTCCGCCACC TGACCAAGC AGATCAACTTTGAAGGSGA </p>	<i>Pseudomona s sp.</i>
67 C	<p> GSKWKKGSSGMRGGCTAMACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTT GCTCCTTGAT CAGCGCGGACCGGTGAGYAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAC AACGTTTTCSAA AGGAACGCTAATACCGCATACGCTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGG CCTTGCCTAT TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAAG CGCAGATCC GTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCGCAGTGGGGAATTGGCAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG CCGCGTGT GAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAAGGCGAGTAA GTTAATACCTT GCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAG CCGCGTAATA CAGAGGTCGCAAGCCTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGGTAGGTG GTTCGTTAAG TTGATGTGAAAAGCCCGGGCTCAACTGGGAACGATCCAAAAGTGGCG AGCTAGAGTA CGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG AAGGAACCA GTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT GGGGAGCAACA GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGA TCCTGAGATT TTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGSCTGGGGAGTACGGSCCSA GGTTAAACTM AAATGRATKGRGAGGA </p>	<p> AARRGGTAGTTATTCTACTTCGAT TCGACTCAG TCCGAATACAACCTGCGCCGCCGCA TCATCACCG ATGCCGAGGGCCGCTACCGTCCG GCTCCATCG TGCCGTCGGGTACGGCTGCGACC CGCAGGGCC CGACCCAGGAATGCTGGACCTGCT CGGCCGCC ACGGCCAGCGCCCGGCGCACGTGC ACTTCTTCAT CTCGGCACCTGGGTTCCGCCACCTG ACCACGA GATCAACTTTGAAGGCGA </p>	<i>Pseudomona s sp.</i>
67 F	<p> GSYWKGKGCSSMRGGCTTAMCATGCAAGTCGAGCGGAGAGGATGCTTGC TACTGATCTTA GCGCGGACCGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAAC ATTTCCGAAAG GAATCTTAATACCGCATACGCTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACTTCGGACC TTGCGCTAATA GATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCGCTACCAAGGCG ACGATCTGTA GCGGGTCTGAGAGGATACCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTGGGGAATAATTGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC CGCGTGTGTA AGAAGGCTTATGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTT AATACCTAGG ATAGTGGAGCTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCC GCGTAATACA GAGGTCGCAAGCCTAATCGGATTAAGTGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGG </p>	<p> AMAAGTGGGAGGGGGGCTAGYTG GCGATCTTG ATCGACTCATCGAATCACCTGCGC CGCCGCATC ATCACCGATGCCRACGGTCCGMTACC GTGCGCG TCCATCTGCTCGGGTACGGCT GCGACCG CARGGCCAGCCASGAATGCTGG ACCTGCTC GGCCGCCAGGGCAGCGCCGGCG CACGTGCAC TTCTTCATCTCGGCACCTGGGTTCCG CCACCTGA CCACRCAGATCAACTTTGAAGGCGA </p>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

	<p>CTAATTAAGTC AAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAATGCACTCGATCTGTTAGCT AGAGTGTGGGA GAGGATGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA ATACCCGATGG CGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGG AGCAAAACAGGA TTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCT TTGAGCGTTT AGTGGCCAGCTAACCGGATAGTACCGCTGGGAGTMCCTCGCAARACTAA ACTCAAARTG AATKTGACGGGA</p>		
155 A	<p>GSKPKSSGSRGGCTAMCATGCAAGTCGRGCGTAACAGGAGAAAGCTTGC TTCTTGTCTGA CGAGGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGA TAACACTGGA AACGGTGGCTAATACCGCATGACGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGG ACCTTGGCGT ATCGGATGAACCCATATGGGATAGCTAGTAGTGGGGTAAAGGCTCACCTA GGCGACGATCT CTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGCGCAAGCCGTATGACGCCAT GCCCGTGAT GAAGAAGGCCCTTAGGGTTGAAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGTGTTAAG ATTAATCTCT TAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGAAGCACCGGTAACCTCGTGCCAGCAG CCGCGTAAT ACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGCGAGG CGTCAATTA GTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACCTGGGAATGCACTGAAACTGGTTG GCTAGAGTCT TGTAGAGGGGTGAGTAATCCACGTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG AGCAATACCG GTGGCGAAAGCGGCCCTGGACAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGT GGGAGCAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTAGAGTT GTGGTCTTGA CCGTGCTTCTGGAGTAAACCGTTAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCG CAAGGTTAAA ACTCAAAWAKRAATTGRCGGGGAA</p>	<p>ACCTTCTTGGGGGAAGGTMITATT CGTCTCGAT TCGACTCAGTCCGAATACAACTGC GCCGCCGA TCATCACCGATGCCGAGGGCCGCTA CCGTGCGC GCTCCATCGTCCGCTCGGGGTACGG CTGCGACC CGCAGGGCCGACCCAGGAATGCCT GGACTGC TCGGCCGCAACGGCCAGCGCCCGG CGCACGTGC ACTTCTTATCTCGGCACCTGGGTT CGCCACT GACCCAGCAGATCAACTTTGAAGGC GA</p>	<i>Proteus penneri</i>
155 C	<p>GSRRRKKSSGSMRGGCTACAMATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTT GCTCCTTGA CAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGAC AACCTTTCGAA AGGAACGCTAATACCCGATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGG CCTTGGCGTA TCAGATGAGCCTAGGTGGGATAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAG GGCAGATCC GTAACGTGCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAAGTACGACACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGCGCAAGCCGTATCCAGCCATG CCGCGTGT GAAGAAGGCTTTCGGATTGTAAGCACTTAAGTTGGGAGGAAGGCAGTAA GTTAATACCTT GCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGTAACCTGTGCCAGCAG CCGCGTAATA CAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGTAGGTG GTTGTTAAG TTGCAATGAAAGCCCCGGGCTCAACTGGGAAGTGCATCCAAACTGGCGA GCTAGATAC GGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA AGGAACCA GTGGCGAAGCGGACCACTGGACTGATGACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT GGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGGTAACGATGTRRACTAGCCGTTG GAATCCTGAG ATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGTTAAA CTCAAAWKRAATTGRCGGGGAA</p>	<p>CASGGGTAATTATTGCTACTCGATT CGACTCAGT CCGAATACAACTGCGCCGCCGAT CATCACCGA TGCCGAGGGCGCTACCGTCCGCG CTCCATCGT GCCGTGGGGTACGGCTGCGACCC GCAGGGCC GACCCAGGAATGCCTGGACTGCTC GGCCGCA CGGCCAGCGCCGCGCACGTCGA CTTCTTATC TCGGCACTGGTTCGCCACTGGA CCAGCGAGA TCAACTTTGAAGGCGA</p>	<i>Pseudomonas putida</i>
155 I	<p>ASRYKKGSGGMRGGCTAAMAMATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTT GCTCCTTGA CAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGAC AACGTTTCGAA AGGAACGCTAATACCCGATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGG CCTTGGCGTA TCAGATGAGCCTAGGTGGGATAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAG GGCAGATCC GTAACGTGCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAAGTACGACACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGCGCAAGCCGTATCCAGCCATG CCGCGTGT GAAGAAGGCTTTCGGATTGTAAGCACTTAAGTTGGGAGGAAGGCAGTAA GTTAATACCTT GCTTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGTAACCTGTGCCAGCAG CCCGGTAATA CAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGTAGGTG GTTGTTAAG TTGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACTGGGAAGTGCATCCAAACTGGCGA GCTAGATAC GGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA AGGAACCA GTGGCGAAGCGGACCACTGGACTGATGACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT GGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGGTAACGATGTRRACTAGCCGTTG GAATCCTGAG ATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCC GCAAGGTTAAA CTCAAAWKRAATTGRCGGGGAA</p>	<p>ARGGGGACTTATTGCTACTCGAT TCGACTCAG TCCGAATACAACTGCGCCGCCGCA TCACTACCG ATGCCGAGGGCGCTACCGTCCGCG GCTCCATCG TGCCGTGGGGTACGGCTGCGACC CGCAGGGCC CGACCCAGGAATGCTGGACCTGCT CGGCCGCG ACGGCCAGCGCCCGCGCACGTCG ACTTCTTAT CTCGCCACTGGGTTCCGCCACTG ACCAACGA GATCAACTTTGAAGGSGA</p>	<i>Pseudomonas flavescens</i>
155 E	<p>GMMRWSSGGRGSSITAMMATGCAAGCCGAGGGGTATAGTTCTTTCGGGAA CTAGAGACCG GCGCACGGGTGCGTAACGCGATGCAACTTCCCTACTGAAAAGGATAGCCC TTCGAAAGGA GGATTAATACTTTATAACAGATTTAATGCGATCATTAGATTTTGAAGATTTATC GCACTAGGAT AGGCATGCGTAAGATTAGTTAGTTGGTGGTAAACGGCTACCAAGACGATG ATCTTTAGGGG GCCTGAGAGGGTGAACCCACACTGGTACTGAGACACGGACGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGAAGGAAATTTGGCAATGGGTGGAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTG TAGGATGAGC GCCTATGGGTTGTAACACTTTTTATCTGGGATAAACCTACTTACGTGTAAG TAGCTGAAG TACCAGAAAGATAAGCACGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG GAGGTGCAA GCGTTATCCGATTTATGGGTTAAAGGGTCCGTAGCGGATTAATCAGTCA GTGGTGAAT CTCATAGCTTAACATGAAACTGCCATTGACTGTAGTCTTGGTGGTGGTGGT AAGTTGCTGG AATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATTACGAGAAACCAATTGGC AAGCAGGTG ACTAAACATTAACGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT</p>	<p>CGKTYGWTMCTTAKWCGTACTTGA TTGACTCA GTCCGAATRCRACCTGCGCCGCCG ATCATACC GATGCCGAGGGCCGCTACCGTCCG CGCTCCAT GTGCCGTGGGGTACGGCTGCGAC CCGAGGGG CCGACCCAGGAATGCCTGGACTGC TCGGCCG CACGGCCAGCGCCCGCGCACGTCG CACTCTTC ATCTGGCACCTGGGTTCCGCCACC TGACCACG AGATCAACTTTGAAGGCGA</p>	<i>Wautersiella falseni</i>

	AGATACCCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACTTGCTGTTGGGCTTTCCGRCTCAGTGG CTAAGCGAAAG TTATAAGTATCCACCTGGGAGTACGTTTCGCAGAATGAAACTCAAAGKRAAT TGACSSGA			
102 A	ARKKGCSSGSMRGGCTAAMCATGCAAGTCGAGCGGAGAGAGGTAGCTTGTCT ACTGATCTTAG CGGGCGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACA TTTCGAAAGGA ATGCTAATACCCGATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTT GCGCTAATAGA TGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCTACCAAGGCGAC GATCTGTAGC GGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACAGGCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCG GTGTGTAAG AAGGCCTTATGGTTGTAAGCACCTTAAAGCAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAA TACCTAGAGAT AGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCG GGTAATACAGA GGGTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTA ATTAAGTCAA TGTGAAATCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGCACTGTTAGCTAGA GTGTTGGAGA GGATGGTGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCTAGAGATCTGGAGGAAT ACCGATGGCG AAGCGACCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAG CAAACAGGATT AGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACAGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTT TGAGCTTTAG TGGCGCAGCTACCGGATAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTA AACTCAAAGK GAAATTGRCSMGRGRGA	Não amplificou	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
05 A	GSYYGKKKSSGSMGGCTWAAMCATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCT TGCTCCTTGAT TCAGCGCGGACGGGTGAGTWWTGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGG ACAACGTTTTCG AAAGGAACGCTAATACCCGATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTG GGCCTTGCGC TATCAGATGACCTAGGTGCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGGCTCACCA AGGCGACGATC CGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCA GACTCCTACGG GAGGCACGACTGGGGAATATTGGCAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG CCGCTGTGT GAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACCTTAAAGTTGGGAGGAAGGCGAGTAA GTTAATACCTT GCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAG CCGCGTAATA CAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTTG GTTGTTAAG TTGGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAACTGGCGA GCTAGAGTAC GGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA AGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT GGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACCGCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGG AATCCTTGAGA TTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCGCG AAGGTTAAACT CAAATGAAATTKACRG	AARRRGGGTAATWATTCGACTCTG ATTCGACTC AGTCCGAATACAACCTGCGCCGCGG CATCATCAC CGATGCCGAGGGCCGCTACCGTGC GCGCTCCAT CGTGCCCTCGGGTACGGCTGCGA CCCCAGGG CCCCAGCCAGGAATGCTGGACCTG CTCGCCG CCACGGCCAGCGCCCGGCGCAGT GCACCTTCT CATCTGGCACCTGGGTTCCGCCAC CTGACCAGC CAGATCAACTTTGAAGGSSGA		<i>Pseudomonas monteilii</i>

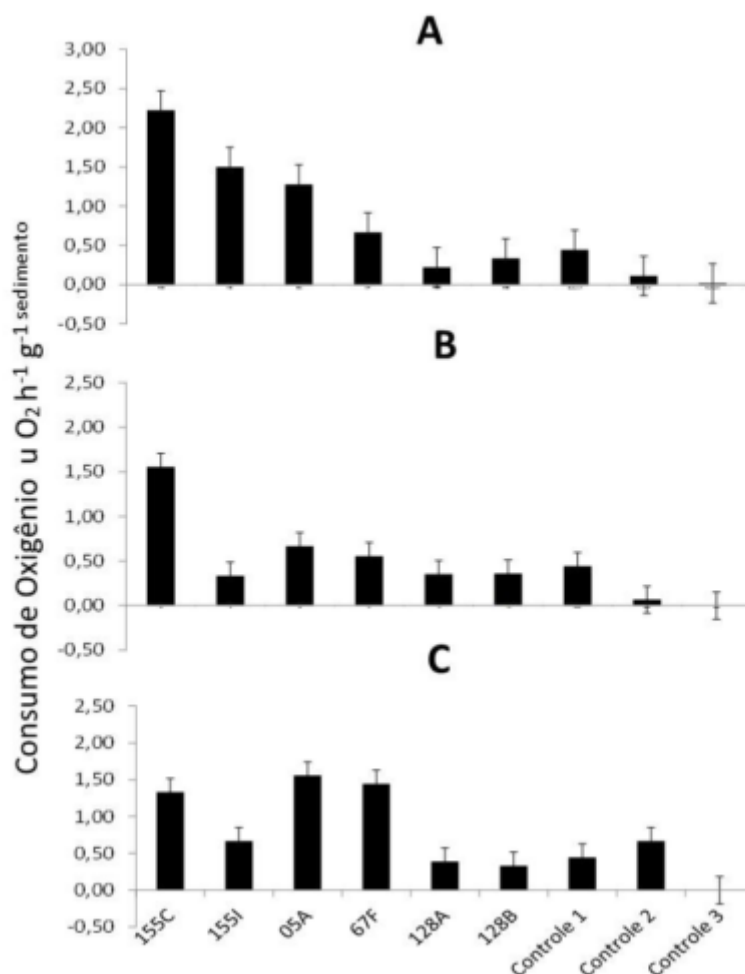
ANEXO 3 – Caracterização da enzima Catecol 1,2 dioxydase (C120) e identificação do 16S Rrna (ANDRADE, 2015).

Nº cepas	Cepas microbianas**	Primer 16S rRNA	Primer C120
1	LEPETRO-128 A	128 A	128 A
2	LEPETRO-128 B	128 B	128 B
3	LEPETRO-67 C	67 C	67 C
4	LEPETRO-67 F	67 F	67 F
5	LEPETRO-155 A	155 A	155 A
6	LEPETRO-155 C	155 C	155 C
7	LEPETRO-155 I	155 I	155 I
8	LEPETRO-155 E	155 E	155 E
9	LEPETRO-102 A	102 A	*
10	LEPETRO-05 A	05 A	05 A

*Cepa que não amplificou para o primer de degradação C120 Catecol 1,2 dioxydase

**Cepas microbianas utilizadas na caracterização enzimática

ANEXO 4 – Resultados experimentais das cepas bacterianas com consumo de Oxigênio em $\mu\text{O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ sedimento⁻¹ realizados com sedimento de manguezal com os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTXs) em 12 horas, 24 horas e 48 horas. A) coeficiente de consumo de O_2 em 5 mg de xileno g^{-1} sedimento⁻¹. B) coeficiente de consumo de O_2 em 5 mg de tolueno g^{-1} sedimento⁻¹. C) coeficiente de consumo de O_2 em 5 mg de benzeno g^{-1} sedimento⁻¹ (ANDRADE, 2015)



ANEXO 5 - Micro-organismos isolados na BTS, Belmonte, Suape, Minas Gerais, França e Egito utilizando diferentes petroderivados como fonte de carbono. B – bactérias; L – leveduras; F – fungos filamentosos (FIORAVANTI, 2013).

Locais	B	L	F	Fonte de C	Referências
BTS	206	89	1	Petróleo, diesel e gasolina*	FIORAVANTI, 2013
Belmonte	27	18	2	Petróleo, diesel e gasolina*	FIORAVANTI, 2013
BTS	297	nd	45	Petróleo e quitosana	SOUZA, 2006
Suape	40	23	23	Diesel, gasolina, bunker, querosene	SOUZA et al., 2005
Minas Gerais	185	4	4	Petróleo e Gasolina	BATISTA et al., 2006
França	110	nd	nd	Diesel	CHAINÉAU et al., 1999
Egito	nd	nd	28	Diesel	EL-MORSY, 2005
Total	884	134	103		

ANEXO 6 - Cinética de crescimento das cepas em xileno benzeno e tolueno, onde o logaritmo leperiano (LN) ou logaritmo natural de um número (=LN(média)) (ANDRADE, 2015).

D.O. CEPA 128 A XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,025	0,015	0,013	0,053	0,0177	0	T0	0,0177	-4,03608	
1	T2	0,029	0,047	0,044	0,12	0,0400	1	T2	0,0400	-3,21888	
2	T4	0,062	0,064	0,065	0,191	0,0637	2	T4	0,0637	-2,75409	
3	T5	0,097	0,072	0,071	0,24	0,0800	3	T5	0,0800	-2,52573	
4	T6	0,131	0,135	0,118	0,384	0,1280	4	T6	0,1280	-2,05573	
5	T7	0,075	0,069	0,093	0,237	0,0790	5	T7	0,0790	-2,53831	
6	T8	0,061	0,065	0,083	0,209	0,0697	6	T8	0,0697	-2,66403	
7	T10	0,049	0,047	0,062	0,158	0,0527	7	T10	0,0527	-2,94377	
8	T12	0,028	0,021	0,034	0,083	0,0277	8	T12	0,0277	-3,58753	

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO(UFC) CEPA 128 A XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	4	4	3,7	11,7	3,9	0	T0	39000	10,57132	
1	T2	4	4,7	4	12,7	4,2	1	T2	42000	10,64542	
2	T4	7,7	7	6	20,7	6,9	2	T4	69000	11,14186	
3	T5	9	11	10	30	10,0	3	T5	100000	11,51293	
4	T6	12,7	13,3	12,3	38,3	12,8	4	T6	128000	11,75979	
5	T7	9	9	9	27	9,0	5	T7	90000	11,40756	
6	T8	7,7	7,3	6,7	21,7	7,2	6	T8	72000	11,18442	
7	T10	4	4	4	12	4,0	7	T10	40000	10,59663	
8	T12	2,3	2,7	3	8	2,7	8	T12	27000	10,20359	

D.O. CEPA 128 A XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,045	0,027	0,025	0,097	0,032333	0	T0	0,0323	-3,43166	
1	T2	0,038	0,043	0,029	0,11	0,036667	1	T2	0,0367	-3,30589	
2	T4	0,052	0,055	0,037	0,144	0,048	2	T4	0,0480	-3,03655	
3	T5	0,062	0,065	0,061	0,188	0,062667	3	T5	0,0627	-2,76993	
4	T6	0,143	0,133	0,041	0,317	0,105667	4	T6	0,1057	-2,24747	
5	T7	0,077	0,074	0,081	0,232	0,077333	5	T7	0,0773	-2,55963	
6	T8	0,063	0,066	0,055	0,184	0,061333	6	T8	0,0613	-2,79143	
7	T10	0,042	0,043	0,044	0,129	0,043	7	T10	0,0430	-3,14656	
8	T12	0,022	0,033	0,021	0,076	0,025333	8	T12	0,0253	-3,67563	

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO(UFC) CEPA 128 B XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	3	3	4	10	3,3	0	T0	33000	10,40426	
1	T2	4,7	3,7	3,3	11,7	3,9	1	T2	39000	10,57132	
2	T4	7	7,3	7	21,3	7,1	2	T4	71000	11,17044	
3	T5	9,3	9,7	10,7	29,7	9,9	3	T5	99000	11,50288	
4	T6	11,3	11	10,7	33	11,0	4	T6	110000	11,60824	
5	T7	8,3	8	8	24,3	8,1	5	T7	81000	11,3022	
6	T8	5,7	5	6	16,7	5,6	6	T8	56000	10,93311	
7	T10	3,7	4	3,7	11,4	3,8	7	T10	38000	10,54534	
8	T12	3,3	3,3	3	9,6	3,2	8	T12	32000	10,37349	

D.O. CEPA 67 F XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,011	0,079	0,051	0,141	0,047	0	T0	0,047	-3,05761
1	T2	0,082	0,029	0,011	0,122	0,041	1	T2	0,041	-3,20235
2	T4	0,041	0,058	0,047	0,146	0,049	2	T4	0,049	-3,02276
3	T5	0,051	0,063	0,054	0,168	0,056	3	T5	0,056	-2,8824
4	T6	0,13	0,114	0,118	0,362	0,121	4	T6	0,121	-2,11472
5	T7	0,105	0,091	0,101	0,297	0,099	5	T7	0,099	-2,31264
6	T8	0,081	0,088	0,089	0,258	0,086	6	T8	0,086	-2,45341
7	T10	0,041	0,056	0,043	0,14	0,047	7	T10	0,047	-3,06473
8	T12	0,027	0,031	0,036	0,094	0,031	8	T12	0,031	-3,46307

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO(UFC) CEPA 67 F XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	3,7	5	4,7	13,4	4,5	0	T0	45000	10,71442
1	T2	4	4,7	5	13,7	4,6	1	T2	46000	10,7364
2	T4	9,7	9,3	10	29	9,7	2	T4	97000	11,48247
3	T5	10,7	11,3	11,3	33,3	11,1	3	T5	111000	11,61729
4	T6	14,7	12,7	13,7	41,1	13,7	4	T6	137000	11,82774
5	T7	9	6,3	5	20,3	6,8	5	T7	68000	11,12726
6	T8	6	5,7	6	17,7	5,9	6	T8	59000	10,98529
7	T10	5	4,3	4,7	14	4,7	7	T10	47000	10,7579
8	T12	4	3,3	3,3	10,6	3,5	8	T12	35000	10,4631

D.O. CEPA 155 C XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,014	0,029	0,03	0,073	0,024333	0	T0	0,0243	-3,71591
1	T2	0,026	0,029	0,023	0,078	0,026	1	T2	0,0260	-3,64966
2	T4	0,041	0,029	0,026	0,096	0,032	2	T4	0,0320	-3,44202
3	T5	0,051	0,048	0,055	0,154	0,051333	3	T5	0,0513	-2,96941
4	T6	0,154	0,056	0,107	0,317	0,105667	4	T6	0,1057	-2,24747
5	T7	0,107	0,153	0,085	0,345	0,115	5	T7	0,1150	-2,16282
6	T8	0,089	0,12	0,081	0,29	0,096667	6	T8	0,0967	-2,33649
7	T10	0,063	0,089	0,061	0,213	0,071	7	T10	0,0710	-2,64508
8	T12	0,033	0,036	0,039	0,108	0,036	8	T12	0,0360	-3,32424

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO (UFC) CEPA 155 C XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	3,7	3	3,3	10	3,3	0	T0	33000	10,40426
1	T2	4	3,7	3,3	11	3,7	1	T2	37000	10,51867
2	T4	5,3	5	5	15,3	5,1	2	T4	51000	10,83958
3	T5	10,7	12	11	33,7	11,2	3	T5	112000	11,62625
4	T6	14,3	13,3	13	40,6	13,5	4	T6	135000	11,81303
5	T7	10	11	10	31	10,3	5	T7	103000	11,54248
6	T8	8	8,3	7,7	24	8,0	6	T8	80000	11,28978
7	T10	6	5,7	7	18,7	6,2	7	T10	62000	11,03489
8	T12	3,3	3,7	5	12	4,0	8	T12	40000	10,59663

D.O. CEPA 155 I XILENO										
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln
0	T0	0,066	0,054	0,065	0,185	0,0617	0	T0	0,0617	-2,78601
1	T2	0,069	0,069	0,063	0,201	0,0670	1	T2	0,0670	-2,70306
2	T4	0,074	0,089	0,079	0,242	0,0807	2	T4	0,0807	-2,51743
3	T5	0,076	0,091	0,084	0,251	0,0837	3	T5	0,0837	-2,48091
4	T6	0,127	0,136	0,108	0,371	0,1237	4	T6	0,1237	-2,09017
5	T7	0,096	0,097	0,094	0,287	0,0957	5	T7	0,0957	-2,34689
6	T8	0,065	0,077	0,073	0,215	0,0717	6	T8	0,0717	-2,63573
7	T10	0,043	0,037	0,055	0,135	0,0450	7	T10	0,0450	-3,10109
8	T12	0,047	0,031	0,041	0,119	0,0397	8	T12	0,0397	-3,22724

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO (UFC)CEPA 155 I XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	6,7	6	4	16,7	5,6		0	T0	56000	10,93311
1	T2	8,7	8,7	4,7	22,1	7,4		1	T2	74000	11,21182
2	T4	12,6	12	2	26,6	8,9		2	T4	99000	11,50288
3	T5	12	13,3	6,3	31,6	10,5		3	T5	105000	11,56172
4	T6	15	11,6	14	40,6	13,5		4	T6	135000	11,81303
5	T7	12	12,3	3,7	28	9,3		5	T7	93000	11,44035
6	T8	11	5	9	25	8,3		6	T8	83000	11,3266
7	T10	10	5	7	22	7,3		7	T10	73000	11,19821
8	T12	9	5	5,7	19,7	6,6		8	T12	66000	11,09741

D.O. CEPA 155 I XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	0,057	0,077	0,063	0,197	0,066		0	T0	0,066	-2,72316
1	T2	0,105	0,078	0,077	0,26	0,087		1	T2	0,087	-2,44569
2	T4	0,106	0,089	0,085	0,28	0,093		2	T4	0,093	-2,37158
3	T5	0,124	0,132	0,124	0,38	0,127		3	T5	0,127	-2,0662
4	T6	0,272	0,175	0,228	0,675	0,225		4	T6	0,225	-1,49165
5	T7	0,202	0,16	0,145	0,507	0,169		5	T7	0,169	-1,77786
6	T8	0,111	0,143	0,113	0,367	0,122		6	T8	0,122	-2,10101
7	T10	0,082	0,108	0,069	0,259	0,086		7	T10	0,086	-2,44954
8	T12	0,077	0,092	0,053	0,222	0,074		8	T12	0,074	-2,60369

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO (UFC) CEPA 155 I XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0	5	6,3	3,3	14,6	4,9		0	T0	49000	10,79958
1	T2	6	8	4	18	6,0		1	T2	60000	11,0021
2	T4	10,3	9	9,3	28,6	9,5		2	T4	95000	11,46163
3	T5	14,7	13,7	13	41,4	13,8		3	T5	138000	11,83501
4	T6	15,3	16	14,3	45,6	15,2		4	T6	152000	11,93164
5	T7	12,7	11	12	35,7	11,9		5	T7	119000	11,68688
6	T8	15,3	4	9	28,3	9,4		6	T8	94000	11,45105
7	T10	10	9	8	27	9,0		7	T10	90000	11,40756
8	T12	5,6	6,3	7,7	19,6	6,5		8	T12	65000	11,08214

D.O. CEPA 128 A benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	LN	
0	T0	0,025	0,024	0,031	0,08	0,026667		1	T0	0,036	-3,62434
1	T2	0,031	0,052	0,047	0,13	0,043333		2	T2	0,039	-3,13883
2	T4	0,036	0,044	0,066	0,146	0,048667		3	T4	0,049	-3,02276
3	T5	0,085	0,064	0,05	0,199	0,066333		4	T5	0,069	-2,71306
4	T6	0,185	0,147	0,123	0,455	0,151667		5	T6	0,152	-1,88607
5	T7	0,125	0,128	0,112	0,365	0,121667		6	T7	0,122	-2,10647
6	T8	0,121	0,123	0,101	0,345	0,115		7	T8	0,115	-2,16282
7	T10	0,109	0,099	0,087	0,295	0,098333		8	T10	0,098	-2,31939
8	T12	0,102	0,065	0,054	0,221	0,073667		9	T12	0,074	-2,6082

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 128 A benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	ln	
0	T0		5	5,3	4,3	14,6	4,866667	1	T0	48000	10,77896
1	T2		7,3	9	10	26,3	8,766667	2	T2	54000	10,89674
2	T4		9,3	9,6	8,3	27,2	9,066667	3	T4	90000	11,40756
3	T5		15,3	14,8	15	45,1	15,03333	4	T5	150000	11,91839
4	T6		18	16,6	18	52,6	17,53333	5	T6	175000	12,07254
5	T7		11	12,3	12,6	35,9	11,96667	6	T7	119000	11,68688
6	T8		7	6,7	7,6	21,3	7,1	7	T8	71000	11,17044
7	T10		4	3,1	3	10,1	3,366667	8	T10	33000	10,40426
8	T12		3	3,3	4	10,3	3,433333	9	T12	34000	10,43412

D.O. CEPA 128 B benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0		0,013	0,017	0,019	0,049	0,016	0	T0	0,016	-4,11455
1	T2		0,027	0,035	0,014	0,076	0,025	1	T2	0,075	-2,58583
2	T4		0,071	0,056	0,023	0,15	0,050	2	T4	0,116	-2,15417
3	T5		0,169	0,095	0,099	0,363	0,121	3	T5	0,121	-2,11196
4	T6		0,263	0,172	0,197	0,632	0,211	4	T6	0,211	-1,55748
5	T7		0,166	0,169	0,167	0,502	0,167	5	T7	0,167	-1,78777
6	T8		0,128	0,111	0,116	0,355	0,118	6	T8	0,118	-2,13425
7	T10		0,097	0,088	0,088	0,273	0,091	7	T10	0,091	-2,3969
8	T12		0,089	0,071	0,074	0,234	0,078	8	T12	0,078	-2,55105

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 128 B benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	ln	
0	T0		8	7	6	21,0	7,0	0	T0	70000	11,15625
1	T2		7,2	7,3	7,1	21,6	7,2	1	T2	72000	11,18442
2	T4		8,7	8	7	23,7	7,9	2	T4	79000	11,2772
3	T5		15,3	14,7	14,3	44,3	14,8	3	T5	148000	11,90497
4	T6		17	16	17	50,0	16,7	4	T6	167000	12,02575
5	T7		10	12	10	32,0	10,7	5	T7	107000	11,58058
6	T8		7	8	8	23,0	7,7	6	T8	77000	11,25156
7	T10		6,3	6	6	18,3	6,1	7	T10	61000	11,01863
8	T12		5	7	6	18,0	6,0	8	T12	60000	11,0021

D.O. CEPA 67 F BENZENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0		0,019	0,021	0,023	0,063	0,0210	0	T0	0,017667	-3,86323
1	T2		0,041	0,036	0,037	0,114	0,0380	1	T2	0,019667	-3,27017
2	T4		0,075	0,072	0,086	0,233	0,0777	2	T4	0,047667	-2,55533
3	T5		0,134	0,143	0,109	0,386	0,1287	3	T5	0,105	-2,05053
4	T6		0,141	0,151	0,117	0,409	0,1363	4	T6	0,153	-1,99265
5	T7		0,159	0,133	0,125	0,417	0,1390	5	T7	0,139	-1,97328
6	T8		0,134	0,181	0,111	0,426	0,1420	6	T8	0,142	-1,95193
7	T10		0,086	0,064	0,067	0,217	0,0723	7	T10	0,072333	-2,62647
8	T12		0,032	0,043	0,045	0,12	0,0400	8	T12	0,04	-3,21888

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 67 F benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	ln	
0	T0		3	4	4	11	3,7	0	T0	37000	10,51867
1	T2		4	4,3	4,3	12,6	4,2	1	T2	42000	10,64542
2	T4		13	12	13	38	12,7	2	T4	127000	11,75194
3	T5		14,7	14,7	15,3	44,7	14,9	3	T5	149000	11,9117
4	T6		17	17	17	51	17,0	4	T6	170000	12,04355
5	T7		10	11	9	30	10,0	5	T7	100000	11,51293
6	T8		9,3	10	8,7	28	9,3	6	T8	93000	11,44035
7	T10		5	6,6	4,6	16,2	5,4	7	T10	54000	10,89674
8	T12		4	3	5	12	4,0	8	T12	40000	10,59663

D.O. CEPA 155 C											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0	0,011	0,019	0,012	0,042	0,014		1	T0	0,012667	-4,2687
1	T2	0,018	0,032	0,015	0,065	0,021667		2	T2	0,014333	-3,83198
2	T4	0,024	0,051	0,044	0,119	0,039667		3	T4	0,049667	-3,22724
3	T5	0,043	0,068	0,047	0,158	0,052667		4	T5	0,052667	-2,94377
4	T6	0,16	0,135	0,106	0,401	0,133667		5	T6	0,133667	-2,01241
5	T7	0,128	0,127	0,094	0,349	0,116333		6	T7	0,116333	-2,1513
6	T8	0,121	0,125	0,078	0,324	0,108		7	T8	0,108	-2,22562
7	T10	0,083	0,098	0,063	0,244	0,081333		8	T10	0,081333	-2,5092
8	T12	0,057	0,064	0,042	0,163	0,054333		9	T12	0,054333	-2,91262

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 155 C benzeno												
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA	LN		TEMPO	UFC	In	
0	T0	3	3,3	4	10,3	3,4	1,233532		1	T0	34000	10,43412
1	T2	4	4	3,3	11,3	3,8	1,32619		2	T2	38000	10,54534
2	T4	6	6,3	6,7	19	6,3	1,845827		3	T4	63000	11,05089
3	T5	16	17,3	17,7	51	17,0	2,833213		4	T5	170000	12,04355
4	T6	18,5	18,7	19	56,2	18,7	2,930304		5	T6	187000	12,13886
5	T7	12	13	14	39	13,0	2,564949		6	T7	130000	11,77529
6	T8	9	9	8	26	8,7	2,159484		7	T8	87000	11,37366
7	T10	4	6	6	16	5,3	1,673976		8	T10	53000	10,87805
8	T12	3,3	4	5	12,3	4,1	1,410987		9	T12	41000	10,62133

D.O. CEPA 155 I											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0	0,015	0,029	0,051	0,095	0,031667		1	T0	0,031667	-3,45249
1	T2	0,031	0,062	0,014	0,107	0,035667		2	T2	0,035667	-3,33354
2	T4	0,071	0,074	0,038	0,183	0,061		3	T4	0,061	-2,79688
3	T5	0,095	0,085	0,084	0,264	0,088		4	T5	0,088	-2,43042
4	T6	0,127	0,135	0,089	0,351	0,117		5	T6	0,117	-2,14558
5	T7	0,108	0,111	0,088	0,307	0,102333		6	T7	0,102333	-2,27952
6	T8	0,112	0,113	0,074	0,299	0,099667		7	T8	0,099667	-2,30592
7	T10	0,098	0,099	0,057	0,254	0,084667		8	T10	0,084667	-2,46903
8	T12	0,076	0,065	0,043	0,184	0,061333		9	T12	0,061333	-2,79143

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 155I benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	In	
0	T0	4	3,3	4	11,3	3,8		0	T0	38000	10,54534
1	T2	5	6,6	6	17,6	5,9		1	T2	59000	10,98529
2	T4	14	13	14	41	13,7		2	T4	137000	11,82774
3	T5	18,3	16,8	18,3	53,4	17,8		3	T5	178000	12,08954
4	T6	23	20,6	21,6	65,2	21,7		4	T6	200000	12,20607
5	T7	10	11	9,3	30,3	10,1		5	T7	101000	11,52288
6	T8	8	9	9	26	8,7		6	T8	87000	11,37366
7	T10	5	5	4	14	4,7		7	T10	47000	10,7579
8	T12	3,3	4	3,6	10,9	3,6		8	T12	36000	10,49127

D.O. CEPA 05 A											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0	0,063	0,051	0,05	0,164	0,055		1	T0	0,055	-2,9065
1	T2	0,052	0,055	0,058	0,165	0,055		2	T2	0,055	-2,90042
2	T4	0,084	0,072	0,075	0,231	0,077		3	T4	0,077	-2,56395
3	T5	0,123	0,114	0,085	0,322	0,107		4	T5	0,107	-2,23182
4	T6	0,187	0,115	0,112	0,414	0,138		5	T6	0,138	-1,9805
5	T7	0,151	0,079	0,087	0,317	0,106		6	T7	0,106	-2,24747
6	T8	0,069	0,062	0,077	0,208	0,069		7	T8	0,069	-2,66883
7	T10	0,055	0,043	0,055	0,153	0,051		8	T10	0,051	-2,97593
8	T12	0,033	0,026	0,04	0,099	0,033		9	T12	0,033	-3,41125

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 05 A benzeno											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	UFC	In	
0	T0		6	5	4,3	15,3	5,1	1	T0	51000	10,83958
1	T2		7,3	6,7	5,3	19,3	6,4	2	T2	64000	11,06664
2	T4		10,7	9	9	28,7	9,6	3	T4	96000	11,4721
3	T5		17,7	13,6	13,3	44,6	14,9	4	T5	149000	11,9117
4	T6		15,7	15,3	14,3	45,3	15,1	5	T6	151000	11,92504
5	T7		12	12	10	34	11,3	6	T7	113000	11,63514
6	T8		9	10,3	8	27,3	9,1	7	T8	91000	11,41861
7	T10		7,3	7	7,3	21,6	7,2	8	T10	72000	11,18442
8	T12		5,7	3	4,3	13	4,3	9	T12	43000	10,66896

D.O. CEPA 128 A TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0		0,107	0,121	0,098	0,326	0,109	0	T0	0,109	-2,21947
1	T2		0,114	0,117	0,125	0,356	0,119	1	T2	0,119	-2,13144
2	T4		0,141	0,151	0,165	0,457	0,152	2	T4	0,152	-1,88168
3	T5		0,193	0,224	0,199	0,616	0,205	3	T5	0,205	-1,58312
4	T6		0,277	0,254	0,291	0,822	0,274	4	T6	0,274	-1,29463
5	T7		0,173	0,185	0,155	0,513	0,171	5	T7	0,171	-1,76609
6	T8		0,108	0,111	0,102	0,321	0,107	6	T8	0,107	-2,23493
7	T10		0,083	0,071	0,063	0,217	0,072	7	T10	0,072	-2,62647
8	T12		0,051	0,033	0,041	0,125	0,042	8	T12	0,042	-3,17805

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 128 A TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0		4	4	4	12	4,0	0	T0	40000	10,59663
1	T2		4,7	5	4,3	14	4,7	1	T2	47000	10,7579
2	T4		8	7,7	7,7	23,4	7,8	2	T4	78000	11,26446
3	T5		9,3	10	10	29,3	9,8	3	T5	98000	11,49272
4	T6		10,7	11,3	11,3	33,3	11,1	4	T6	111000	11,61729
5	T7		11	11,7	10	32,7	10,9	5	T7	109000	11,5991
6	T8		10,3	10	6,3	26,6	8,9	6	T8	89000	11,39639
7	T10		7,7	7,3	5	20	6,7	7	T10	67000	11,11245
8	T12		5	6	4	15	5,0	8	T12	50000	10,81978

D.O. CEPA 128 B TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0		0,061	0,041	0,043	0,145	0,048	0	T0	0,048	-3,02963
1	T2		0,107	0,119	0,106	0,332	0,111	1	T2	0,111	-2,20123
2	T4		0,171	0,148	0,162	0,481	0,160	2	T4	0,160	-1,8305
3	T5		0,191	0,155	0,181	0,527	0,176	3	T5	0,176	-1,73917
4	T6		0,255	0,256	0,251	0,762	0,254	4	T6	0,254	-1,37042
5	T7		0,207	0,208	0,198	0,613	0,204	5	T7	0,204	-1,588
6	T8		0,201	0,173	0,193	0,567	0,189	6	T8	0,189	-1,66601
7	T10		0,181	0,143	0,175	0,499	0,166	7	T10	0,166	-1,79376
8	T12		0,103	0,093	0,099	0,295	0,098	8	T12	0,098	-2,31939

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 128 B TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA		
0	T0		4	4	4,3	12,3	4,1	0	T0	41000	10,62133
1	T2		4,3	4,3	5,3	13,9	4,6	1	T2	46000	10,7364
2	T4		6,7	6,7	6	19,4	6,5	2	T4	65000	11,08214
3	T5		8,3	8,3	8	24,6	8,2	3	T5	82000	11,31447
4	T6		10	10,3	10	30,3	10,1	4	T6	101000	11,52288
5	T7		8	9	9	26	8,7	5	T7	87000	11,37366
6	T8		8	7	7,7	22,7	7,6	6	T8	76000	11,23849
7	T10		5,3	5,5	6,3	17,1	5,7	7	T10	57000	10,95081
8	T12		4,3	4	5,7	14	4,7	8	T12	47000	10,7579

D.O. CEPA 67 F TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0		0,014	0,015	0,012	0,041	0,014	0	T0	0,014	-4,2928
1	T2		0,015	0,006	0,144	0,165	0,055	1	T2	0,055	-2,90042
2	T4		0,115	0,141	0,15	0,406	0,135	2	T4	0,135	-2,00001
3	T5		0,135	0,155	0,153	0,443	0,148	3	T5	0,148	-1,9128
4	T6		0,142	0,131	0,154	0,427	0,142	4	T6	0,142	-1,94958
5	T7		0,123	0,107	0,135	0,365	0,122	5	T7	0,122	-2,10647
6	T8		0,114	0,109	0,123	0,346	0,115	6	T8	0,115	-2,15993
7	T10		0,113	0,104	0,121	0,338	0,113	7	T10	0,113	-2,18332
8	T12		0,099	0,1	0,105	0,304	0,101	8	T12	0,101	-2,28934

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 67 F TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0		5,7	5,7	6	17,4	5,8	0	T0	58000	10,9682
1	T2		6	6	6,3	18,3	6,1	1	T2	61000	11,01863
2	T4		10	10	10	30	10,0	2	T4	100000	11,51293
3	T5		12,3	12,7	12,7	37,7	12,6	3	T5	126000	11,74404
4	T6		15,3	14,7	14,7	44,7	14,9	4	T6	149000	11,9117
5	T7		10	9	10	29	9,7	5	T7	97000	11,48247
6	T8		8,3	7,7	9	25	8,3	6	T8	83000	11,3266
7	T10		6	6,7	7	19,7	6,6	7	T10	66000	11,09741
8	T12		5,7	5	6	16,7	5,6	8	T12	56000	10,93311

D.O. CEPA 155 C TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0		0,101	0,059	0,058	0,218	0,073	0	T0	0,073	-2,62187
1	T2		0,134	0,063	0,058	0,255	0,085	1	T2	0,085	-2,4651
2	T4		0,127	0,149	0,0234	0,2994	0,100	2	T4	0,100	-2,30459
3	T5		0,174	0,198	0,197	0,569	0,190	3	T5	0,190	-1,66249
4	T6		0,347	0,214	0,193	0,754	0,251	4	T6	0,251	-1,38098
5	T7		0,269	0,141	0,089	0,499	0,166	5	T7	0,166	-1,79376
6	T8		0,187	0,151	0,077	0,415	0,138	6	T8	0,138	-1,97809
7	T10		0,091	0,093	0,061	0,245	0,082	7	T10	0,082	-2,50511
8	T12		0,031	0,047	0,057	0,135	0,045	8	T12	0,045	-3,10109

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 155 C TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	ln	
0	T0		5,7	4,7	5	15,4	5,1	0	T0	51000	10,83958
1	T2		6,3	5,3	5	16,6	5,5	1	T2	55000	10,91509
2	T4		10	10	9,3	29,3	9,8	2	T4	98000	11,49272
3	T5		15,7	15,7	16,3	47,7	15,9	3	T5	159000	11,97666
4	T6		16,7	17,3	16,7	50,7	16,9	4	T6	169000	12,03765
5	T7		11,3	11,7	11	34	11,3	5	T7	113000	11,63514
6	T8		10	7	8	25	8,3	6	T8	83000	11,3266
7	T10		6	6	6,7	18,7	6,2	7	T10	62000	11,03489
8	T12		4,3	4	6	14,3	4,8	8	T12	48000	10,77896

D.O. CEPA 155 I TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0	0,026	0,016	0,014	0,056	0,019	0	T0	0,019	-3,98102	
1	T2	0,041	0,069	0,074	0,184	0,061	1	T2	0,061	-2,79143	
2	T4	0,123	0,117	0,144	0,384	0,128	2	T4	0,128	-2,05573	
3	T5	0,155	0,147	0,154	0,456	0,152	3	T5	0,152	-1,88387	
4	T6	0,192	0,161	0,233	0,586	0,195	4	T6	0,195	-1,63305	
5	T7	0,181	0,111	0,101	0,393	0,131	5	T7	0,131	-2,03256	
6	T8	0,157	0,053	0,083	0,293	0,098	6	T8	0,098	-2,32619	
7	T10	0,127	0,051	0,079	0,257	0,086	7	T10	0,086	-2,45729	
8	T12	0,111	0,043	0,076	0,23	0,077	8	T12	0,077	-2,56829	

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 155 I XILENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0	4,3	5,3	4	13,6	4,5	0	T0	45000	10,71442	
1	T2	5	5	5	15	5,0	1	T2	50000	10,81978	
2	T4	9	9	9	27	9,0	2	T4	90000	11,40756	
3	T5	11,3	11,3	10,7	33,3	11,1	3	T5	111000	11,61729	
4	T6	15	15,7	16,3	47	15,7	4	T6	157000	11,964	
5	T7	10	11,3	11	32,3	10,8	5	T7	108000	11,58989	
6	T8	9	9	8	26	8,7	6	T8	87000	11,37366	
7	T10	6	5,7	5,5	17,2	5,7	7	T10	57000	10,95081	
8	T12	5,7	4,3	4,3	14,3	4,8	8	T12	48000	10,77896	

D.O. CEPA 05 A TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0	0,062	0,053	0,066	0,181	0,060	0	T0	0,060	-2,80787	
1	T2	0,081	0,071	0,082	0,234	0,078	1	T2	0,078	-2,55105	
2	T4	0,123	0,089	0,113	0,325	0,108	2	T4	0,108	-2,22254	
3	T5	0,142	0,111	0,121	0,374	0,125	3	T5	0,125	-2,08211	
4	T6	0,153	0,152	0,227	0,532	0,177	4	T6	0,177	-1,72972	
5	T7	0,147	0,149	0,153	0,449	0,150	5	T7	0,150	-1,89934	
6	T8	0,146	0,132	0,141	0,419	0,140	6	T8	0,140	-1,96885	
7	T10	0,122	0,121	0,139	0,382	0,127	7	T10	0,127	-2,06095	
8	T12	0,099	0,114	0,101	0,314	0,105	8	T12	0,105	-2,25697	

Nº DE COLONIAS POR DILUIÇÃO CEPA 05 A TOLUENO											
	TEMPO	R1	R2	R3	TOTAL	MÉDIA		TEMPO	MÉDIA	In	
0	T0	4	4,3	5	13,3	4,4	0	T0	44000	10,69194	
1	T2	5	5,3	5,3	15,6	5,2	1	T2	52000	10,859	
2	T4	9,3	10,3	10,3	29,9	10,0	2	T4	100000	11,51293	
3	T5	10,3	11	10,3	31,6	10,5	3	T5	105000	11,56172	
4	T6	12	12,3	12,3	36,6	12,2	4	T6	122000	11,71178	
5	T7	6,3	8,3	8	22,6	7,5	5	T7	75000	11,22524	
6	T8	5,3	6	7	18,3	6,1	6	T8	61000	11,01863	
7	T10	4,7	5,3	5	15	5,0	7	T10	50000	10,81978	
8	T12	4	5	4	13	4,3	8	T12	43000	10,66896	

