

Atividade catabólica e biodegradação de hidrocarbonetos alcanos de óleo diesel por bactérias em culturas puras e em consórcio

Catabolic activity and biodegradation of diesel alkane hydrocarbons by bacteria in pure cultures and in consortia

DOI:10.34117/bjdv8n4-236

Recebimento dos originais: 21/02/2022

Aceitação para publicação: 31/03/2022

Patrícia Lopes Leal

Instituto Multidisciplinar em Saúde

Instituição: Universidade Federal da Bahia, *Campus Anísio*

Endereço: Teixeira, Rua Rio de Contas, 58 – Quadra 17, Bairro Candeias

CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

E-mail: lealpat@yahoo.com.br

Silvana Pinheiro Dadalto

Departamento de Microbiologia

Instituição: Universidade Federal de Viçosa, *Campus Viçosa*

Endereço: Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, CEP: 36570-000, Viçosa, Minas Gerais
Brasil

E-mail: totola@ufv.br

Juliana Gomes Barreto de Souza Leite

Instituto Multidisciplinar em Saúde

Instituição: Universidade Federal da Bahia, *Campus Anísio Teixeira*

Endereço: Rua Rio de Contas, 58 – Quadra 17, Bairro Candeias, CEP: 45.029-094

Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

E-mail: lealpat@yahoo.com.br

Marcos Rogério Tótola

Departamento de Microbiologia

Instituição: Universidade Federal de Viçosa, *Campus Viçosa*, Avenida Peter Henry

Endereço: Rolfs, s/n, CEP: 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

E-mail: sil_dadalto@yahoo.com

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar a atividade catabólica de linhagens bacterianas em culturas puras e em consórcio, quando cultivados em meio mineral acrescido de óleo diesel a 2% (v/v), assim como avaliar a degradação dos hidrocarbonetos nonano, decano e undecano presentes no meio de cultivo. O consórcio bacteriano estudado foi composto pelas linhagens *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 e *Bacillus subtilis* LBBMA 155. A atividade catabólica das linhagens bacterianas foi verificada por meio da técnica de respirometria e a degradação dos hidrocarbonetos foi avaliada por cromatografia gasosa. A maior produção de CO₂ foi obtida no tratamento com o consórcio e as análises cromatográficas de hidrocarbonetos residuais demonstraram que este tratamento foi o que apresentou a maior porcentagem de

degradação dos hidrocarbonetos alcanos, com valores de degradação superiores a 99%, o que comprova a existência de complementaridade metabólica entre os membros do consórcio o que o torna mais eficiente na biodegradação de tais hidrocarbonetos quando comparado às culturas puras.

Palavras-chave: biorremediação, derivados de petróleo, micro-organismos.

ABSTRACT

Catabolic activity and biodegradation of diesel oil alkanes hydrocarbons by bacteria in pure cultures and consortium. The study aimed to assess the catabolic activity of bacterial strains in pure cultures and mixed culture in mineral medium supplemented with diesel oil 2% (v / v) as well as to evaluate the degradation of hydrocarbons nonane, decane and undecane present in medium. The bacterial consortium was composed of the studied bacterial strains *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 LBBMA 155 and *Bacillus subtilis*, isolated from environments contaminated with petroleum hydrocarbons. The catabolic activity of the bacterial strains was verified through the respirometry technique. The highest CO₂ production was achieved in dealing with the consortium. GC analysis of residual hydrocarbons showed that this treatment was presented the highest degradation of hydrocarbons nonane, decane and undecane, with values higher than 99% degradation, which proves the existence of metabolic complementarity between the consortium members.

Keywords: bacteria, biodegradation, hydrocarbons, culture medium

1 INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados são uma mistura complexa de hidrocarbonetos, enxofre, nitrogênio, oxigênio e traços de metais pesados. A partir da destilação da fração média do petróleo é obtido o óleo diesel, constituído basicamente por hidrocarbonetos que na sua grande maioria são alcanos de cadeia normal e, em menor proporção, ramificados e cíclicos (Arruda, 2011). Dentre os derivados do petróleo, destaca-se o óleo diesel como o principal petroderivado comercializado no mercado brasileiro, sendo utilizado como combustível em automotivos de transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas (Petrobras, 2012). Os riscos de acidentes durante a exploração, transporte e armazenamento do petróleo e de seus derivados fazem com que os hidrocarbonetos de petróleo sejam considerados os contaminantes principais do meio ambiente (Tyagi, 2011).

Em casos de contaminações acidentais ou mesmo intermitentes com hidrocarbonetos de petróleo, ações corretivas devem ser prontamente adotadas para interromper o processo de contaminação e remover os contaminantes. Entre as técnicas

menos onerosas e ambientalmente seguras destaca-se a da biorremediação (Rahman et al., 2003; Baptista et al., 2005). Esta técnica é um processo biotecnológico que em geral envolve a utilização de micro-organismos capazes de metabolizar os hidrocarbonetos e transformá-los em substâncias inertes (CO₂ e água). Duas estratégias podem ser utilizadas na biorremediação com o intuito de se acelerar o processo de biodegradação de poluentes: a bioestimulação que consiste no controle de fatores abióticos para que ocorra o aumento da taxa de biodegradação dos poluentes por microrganismos indígenas, seja pela adição de nutrientes inorgânicos (normalmente nitrogênio e fósforo), de aceptores de elétrons (oxigênio ou outros) ou de substratos orgânicos e o bioenriquecimento que consiste em incrementar a capacidade biodegradadora das áreas contaminadas, pela inoculação de microrganismos com habilidades catalíticas desejáveis para a degradação dos poluentes (Stroud et al., 2007). Neste sentido, destaca-se o emprego de consórcios microbianos por possibilitarem maiores taxas de mineralização dos compostos poluentes quando comparadas às culturas puras. Os consórcios microbianos permitem o estabelecimento de interações entre as espécies, que tendem a atuar de forma a estimular as reações co-metabólicas. Sendo o petróleo e seus derivados compostos por moléculas de diferentes massas moleculares, incluindo alguns de estrutura macromolecular, a utilização de consórcios microbianos permite o estabelecimento de uma sucessão de populações que leva a uma sucessão de ataques aos compostos poluentes, proporcionando eficiente degradação dos mesmos (Röling et al., 2001).

Tonini et al. (2010) ressaltam ainda, que a complementaridade metabólica em consórcios microbianos é essencial para a degradação de alguns hidrocarbonetos, uma vez que estes podem apresentar toxicidade para certos microrganismos e, em contrapartida, servir de fonte de carbono para outros. Desta forma, o metabolismo de compostos poluentes tóxicos por alguns microrganismos resistentes, gera subprodutos que serão utilizados como substratos de crescimento por outras espécies (Van Hamme et al. 2003, Tiburtius et al. 2004).

Apesar de nos últimos anos, diversas pesquisas referenciam maior eficiência na degradação de poluentes do petróleo por consórcios microbianos comparados às culturas puras (Van Hamme et al. 2003, Tiburtius et al. 2004, Brito et al. 2006, Jacques et al. 2007), pouca informação existe sobre o monitoramento das populações microbianas, sejam em consórcio ou em culturas puras, ao longo de um processo de biodegradação de compostos poluentes. Para o sucesso da descontaminação de um ambiente, é importante que as culturas microbianas permaneçam viáveis por longos períodos de tempo, não

sendo afetadas pelo composto poluente ou pelos produtos gerados através das vias metabólicas de degradação. Portanto acompanhar as flutuações do número de células das populações microbianas que ocorrem durante um processo de biodegradação de compostos poluentes representa uma importante avaliação, especialmente quanto à seleção de micro-organismos para serem empregados em estratégias de bioaugmentação. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade metabólica de populações bacterianas, puras e em consórcio, em meio líquido acrescido de óleo diesel, assim como determinar a eficiência de degradação de hidrocarbonetos alcanos (nonano, decano e undecano) do óleo diesel por essas populações bacterianas, com vistas à utilização desses micro-organismos em biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos alcanos de petróleo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens bacterianas empregadas neste estudo pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, identificados como *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 e *Bacillus subtilis* LBBMA 155. Esses isolados foram obtidos de ambientes com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo (Tabela 1).

A seleção das linhagens baseou-se na presença de atributos como a capacidade de produção de biossurfactantes, capacidade de degradar diferentes hidrocarbonetos do petróleo ou presença de genes que codificam enzimas que participam no catabolismo dos compostos do petróleo, de acordo com estudos anteriores desenvolvidos neste laboratório.

As culturas-estoque da coleção foram ativadas em meio R₂A (Reasoner & Geldreich, 1985) por 18 h a 30°C, e a suspensão celular foi submetida a sucessivas lavagens em solução salina estéril. Um volume de inóculo do isolado, suficiente para se obter uma densidade óptica a 600 nm correspondente a 0,05, foi adicionado como culturas puras e em consórcio a frascos respirométricos de 500 mL (GibcoBRL, Life Technologies) contendo 100 mL de meio mineral NMP (Marsagin & Schinner, 2008) acrescido de óleo diesel a 2% (v/v). Os frascos foram acoplados a um respirômetro (Mod. TR-RM8 Respirometer Multiplexer – Sable Systems) dotado de um leitor de infravermelho (Sable Systems International, NE, USA) e a variação de temperatura durante os ensaios respirométricos foi monitorada. A liberação do CO₂ produzido pelas

células bacterianas foi avaliada ao longo de 14 dias. Como controles, foram utilizados frascos contendo meio mineral NMP sem a adição de diesel inoculado com bactérias e, também, frascos não-inoculados contendo meio mineral NMP com diesel.

Para acompanhar o crescimento dos isolados bacterianos foram realizadas curvas de crescimento das culturas puras e em consórcio, em meio mineral acrescido de óleo diesel e em meio mineral sem adição de óleo diesel (controle). Os microrganismos foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral NMP e óleo diesel a 2% (v/v). Os frascos foram mantidos sob incubação a 30°C em agitador orbital a 200rpm, por 30 dias. As leituras da densidade óptica (D.O) foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm.

As linhagens bacterianas foram inoculadas separadamente e em consórcio em erlenmeyers contendo 100 mL do meio de cultura NMP acrescido de óleo diesel a 2% (v/v). Os frascos foram mantidos sob incubação a 30°C em agitador orbital a 200rpm, por 30 dias. A degradação dos hidrocarbonetos alcanos de petróleo foi determinada utilizando-se o método de “Headspace” (Serrano & Galago, 2004), seguido de análises por cromatografia gasosa em cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS) Shimadzu®, modelo 17-A, tendo He como gás de arraste e coluna capilar Nukol® de 100m x 0,20mm x 0,25µm i.d, nas seguintes condições: temperatura inicial de 40°C (2 min), rampa de aquecimento de 8°C min⁻¹ até 240°C. A temperatura do injetor foi de 260°C e a do detector 280°C. As análises cromatográficas foram realizadas aos 7, 15 e 30 dias após o início da incubação. A taxa de degradação dos hidrocarbonetos alcanos foi calculada baseando-se na razão entre as áreas dos picos cromatográficos de cada fracção de hidrocarbonetos obtidos no momento da avaliação em relação às áreas dos picos cromatográficos obtidos no tempo zero do ensaio experimental.

3 RESULTADOS E DISCUSSAO

A utilização do óleo diesel como fonte de carbono pelos isolados bacterianos foi constatada tanto pelo ensaio respirométrico como pelas curvas de crescimento em meio mineral contendo óleo diesel como única fonte de carbono (Figuras 1 e 2). As linhagens não diferiram quanto à emissão de CO₂ em meio mineral acrescido de óleo diesel, ao longo de 400 horas de incubação (Figura 1A). Nos tratamentos inoculados com as culturas puras, a quantidade de CO₂ acumulado variou entre 900 e 1500 µmol. A evolução de CO₂ entre os isolados foi similar; contudo, no tratamento inoculado com o consórcio, a produção de CO₂ foi aproximadamente 64% maior que a obtida com *Ochrobactrum*

anthropi, espécie que apresentou a maior produção de CO₂, dentre as diferentes linhagens. O resultado é uma indicação de que a associação entre as espécies neste consórcio foi benéfica para a utilização dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel (Figura 1). Não houve produção de CO₂ ou crescimento expressivo nos tratamentos sem óleo diesel, tanto nos tratamentos com culturas puras quanto no tratamento inoculado com o consórcio (Figura 1B e 2 B). Esses dados confirmam que todos as linhagens utilizaram hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e energia e que a quantificação da evolução de CO₂ liberado pela microbiota na presença do óleo diesel foi um parâmetro indicativo de micro-organismos capazes de utilizar óleo diesel como fonte de carbono, uma vez que CO₂ e H₂O são os produtos finais da mineralização, indicando portanto a eficiência destes isolados bacterianos e, especialmente o consórcio deles, na biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo.

As linhagens componentes do consórcio pertencem a gêneros bacterianos citados na literatura científica como potencialmente capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo (Vinãs et al., 2005; Ogbonna et al., 2007; Ueno, et al., 2007; Yucheng Wu et al., 2008). Além disso, vale ressaltar que os membros do consórcio bacteriano empregados neste trabalho foram isolados de ambientes com histórico de contaminação, e que a maioria contém genes relacionados com o catabolismo de hidrocarbonetos (Tabela 1). Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos encontram-se com frequência no ambiente natural, e as liberações acidentais de hidrocarbonetos levam a um enriquecimento seletivo *in situ* desses organismos (Márquez-Rocha et al., 2001).

A inoculação dos microrganismos em consórcio teve um efeito significativo sobre a degradação dos hidrocarbonetos. Nesse tratamento, a quantidade de CO₂ evoluído foi cerca de 2,7 vezes maior do que nos tratamentos com as culturas puras. Este resultado indica que os diferentes isolados utilizam frações distintas de hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, ou que esteja ocorrendo a complementaridade de rotas catabólicas.

Os resultados gerados pela respirometria corroboram com os resultados obtidos pelas curvas de crescimento das linhagens bacterianas em culturas puras e mista, em meio de cultivo acrescido de óleo diesel a 2% (v/v). Nesse ensaio, constatou-se maior produção de células no tratamento com o consórcio bacteriano (Figura 2 A).

O crescimento dos isolados em culturas puras e em consórcio foi acompanhado ao longo de 20 dias. A fase exponencial teve início nas primeiras horas do experimento, provavelmente sustentada pela concentração de óleo diesel que se encontrava solúvel no meio de cultura (Figura 2 A). Assim, a quantidade de óleo diesel solúvel no meio pode

ter sido maior que a demandada pela biomassa, que ainda era pequena, fazendo com que as bactérias obtivessem altas taxas de crescimento. Verifica-se ainda um perfil de degradação caracterizado pela diauxia, onde a estirpe consome, primeiramente, os compostos de fácil assimilação e passa por um período de adaptação aos compostos menos favoráveis que, posteriormente, são consumidos (Figura 2 A). Resultados semelhantes foram relatados por Zucchi et al. (2003), que observaram alterações significativas na densidade das populações de bactérias presentes no solo contaminado com óleo diesel, dentro dos primeiros 4 dias a partir do início do ensaio experimental. A rápida adaptação das bactérias ao meio contendo óleo diesel pode ser relacionada à origem destas linhagens, uma vez que essas foram isoladas de ambientes com histórico de contaminações por hidrocarbonetos de petróleo. Isso explicaria a ausência de efeito tóxico do óleo diesel e a rápida adaptação metabólica das bactérias para o catabolismo de hidrocarbonetos. Desta forma, estes microrganismos podem ser considerados candidatos em potencial para aplicação biotecnológica ao simplificar o processo de produção de inóculo.

O crescimento mais expressivo foi o do consórcio bacteriano, promovido provavelmente pelas interações entre as espécies que atuaram de forma a estimular as reações co-metabólicas envolvendo os diferentes hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel, possibilitando um aumento das interfaces microbianas em íntimo contato e, desta forma, permitindo uma maior troca de intermediários ou produtos do metabolismo entre as espécies. Além disso, vale ressaltar a capacidade de produção de biosurfactantes por algumas linhagens que constituem o consórcio bacteriano, o que facilita o acesso dos microrganismos às frações de hidrocarbonetos de menor solubilidade. É possível ainda que interações entre as populações do consórcio tenham induzido a ocorrência de alterações de hidrofobicidade dos envoltórios celulares, o que poderia auxiliar no acesso direto de compostos hidrofóbicos pelo consórcio como um todo, conforme sugerido por Sikkema et al. (1995). Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos podem ter acesso direto aos hidrocarbonetos solúveis no meio aquoso e para os hidrocarbonetos de caráter hidrofóbico, o acesso pode se dar pela aderência direta dos microrganismos a superfícies hidrofóbicas (reduzindo a distância entre a célula e o substrato) ou pela produção de biosurfactantes ou de componentes específicos de superfície celular com propriedades emulsificantes (Ron & Rosenberg 2001). Outros autores também evidenciaram uma rápida degradação de hidrocarbonetos de petróleo com menor cadeia carbônica, tais como os alcanos avaliados em nosso estudo e atribuíram esta fase inicial

de degradação à solubilidade destes hidrocarbonetos no ambiente (Barathi & Vasudevan, 2001; Seklemova et al., 2001). Observou-se nos tratamentos-controle (sem adição de óleo diesel ao meio de cultura) o crescimento de todos os isolados nas primeiras horas após a inoculação, seguido por morte celular (Figura 2B). O crescimento inicial, na ausência de fonte externa de carbono orgânico, se deve à utilização de reservas de energia endógenas pelos isolados bacterianos.

Quanto a degradação de hidrocarbonetos alcanos do óleo diesel em meio de cultura por membros do consórcio bacteriano, todas as linhagens foram competentes em utilizar esses compostos como fonte de carbono (Tabela 2). Altas porcentagens de degradação foram obtidas, tanto pelos isolados em culturas puras quanto pelo consórcio, ao final de 30 dias. Contudo, o consórcio apresentou a maior eficiência de degradação já na primeira semana de incubação, atingindo mais de 90% de degradação dos hidrocarbonetos nonano, decano e undecano, resultado similar que os tratamentos inoculados com isolados em culturas puras apresentaram aos 15 dias após incubação. Ao final do experimento, culturas bacterianas puras e em consórcio apresentaram altos valores de degradação para os três hidrocarbonetos analisados, no entanto o consórcio foi o tratamento que proporcionou degradação com valores maiores que 99% para todos os hidrocarbonetos presentes no meio (Tabela 2). Esses resultados corroboram com a com o registro de Herbes (1981), citado por Wilberg (2006), de que solos e microrganismos previamente expostos a contaminantes não possuem ou possuem menor período de aclimação do que aqueles sem prévia exposição.

4 CONCLUSÕES

A associação entre linhagens bacterianas em consórcio favoreceu a utilização de hidrocarbonetos nonano, decano e undecano do óleo diesel tanto como fonte de carbono para a multiplicação celular quanto para a obtenção de energia.

As linhagens bacterianas demonstraram que não necessitam ou que necessitam de curto período de aclimação para crescerem em meio de cultivo contendo óleo diesel como única fonte de carbono.

A contagem do número de células viáveis e a quantificação do CO₂ liberado pelas bactérias em cultura pura ou consórcio, apresentaram-se como métodos simples e eficientes para avaliar a atividade catabólica dos micro-organismos na biodegradação de hidrocarbonetos alcanos do óleo diesel.

O consórcio foi mais eficiente na degradação dos hidrocarbonetos nonano, decano e undecano presentes em meio de cultivo, quando comparado às culturas puras. A degradação desses compostos pelo consórcio foi superior a 99%, após 30 dias apenas de incubação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Agência Federal de Apoio e Avaliação da Pós-Graduação (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto e bolsas.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, Flávia Virgínia Ferreira de. *Degradação de óleo diesel por Aspergillus terreus, Cunninghamella echinulata e Penicillium commune*. MS thesis. Universidade Federal de Pernambuco, 2011.
- Baptista, Sandro José, Magali Christe Cammarota, and Denize Dias de Carvalho Freire. "Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil." *Brazilian archives of biology and technology* 48 (2005): 249-255.
- Brito, Elcia Margareth S., et al. "Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil." *Research in microbiology* 157.8 (2006): 752-762.
- Herbes, Stephen E. "Rates of microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments in the vicinity of a coal-coking wastewater discharge." *Applied and Environmental Microbiology* 41.1 (1981): 20-28.
- Jacques, RJ S, Bento, F M, Antonioli Z I & Camargo, FAO (2007) Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, 37:1192-1201.
- Barathi, S., and N. Vasudevan. "Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil." *Environment international* 26.5-6 (2001): 413-416.
- Márquez-Rocha, FJ, Hernández-rodríguez, V & Lamela, MT (2001) Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution*, 128:313-320.
- Marsagin & Schinner. *Applied Microbiology Biotechnol.*, v.47, p. 462-468, 2008.
- Ogbonna, DN. et al. Effect of bioremediation on the growth of Okro (*Abelmoshus esculetus*) in the Niger Delta soils. **Environmentalist**, v. 27, p. 303-309, 2007. <http://www.springerlink.com/content/w0jg77873176g447/>
- Petrobras. Óleo diesel, 2012. Disponível em: < <https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/produtos/automotivos/oleo-diesel/>> . Acesso em 16 de Fev. de 2022.
- Rahman, Kaja SM, et al. "Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients." *Bioresource technology* 90.2 (2003): 159-168.
- REASONER, D. J. E GELDREICH, E. E., A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49 (1), p.1-7, 1985. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC238333/>
- RÖLING, W. F.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; LEE, K., DANIEL, F.;
- RON, E. Z.; ROSEMBERG, E. Natural role of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359508>
- Seklemova, E., A. Pavlova, and K. Kovacheva. "Biostimulation-based bioremediation of

diesel fuel: field demonstration." *Biodegradation* 12.5 (2001): 311-316.

Serrano, A., and M. Gallego. "Direct screening and confirmation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water." *Journal of Chromatography A* 1045.1-2 (2004): 181-188.

Sikkema, Jan, Jan A. de Bont e Bert Poolman. "Mecanismos de toxicidade de membrana de hidrocarbonetos." *Revisões microbiológicas* 59.2 (1995): 201-222.

STROUD J. L., PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1239-1253, 2007. <http://eprints.lancs.ac.uk/18531/>

Tiburtius, Elaine Regina Lopes, Patricio Peralta-Zamora, and Elenise Sauer Leal. "Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites." *Química nova* 27.3 (2004): 441-446.

Tonini, Rita Maria Costa Wetler, Carlos Eduardo de Rezende, and Adriana Daudt Grativol. "Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão." *Oecologia Australis* 14.4 (2010): 1025-1035.

Tyagi, Meenu, M. Manuela R. da Fonseca, and Carla CCR de Carvalho. "Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes." *Biodegradation* 22.2 (2011): 231-241.

UENO, A., ITO, Y., YUMOTO, I., OKUYAMA, H. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p.1739-1745, 2007. <http://www.springerlink.com/content/a41w745312615j24/>

Van Hamme, Jonathan D., Ajay Singh, and Owen P. Ward. "Recent advances in petroleum microbiology." *Microbiology and molecular biology reviews* 67.4 (2003): 503-549.

VIÑAS, M., SABATE, J., ESPUNY, M. J., SOLANAS, A. M. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. **Appl. and Environ. Microb.**, p. 7008-7018, 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269736>

WILBERG, D. Q. **A espécie *Trifolium repens* L. como bioindicadora de estado de Biorremediação do solo contaminado com óleo diesel.** 2006. 172p., Tese (Mestrado em Ciências Agrárias) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná.

Yucheng Wu, et ai. "Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos contaminados solo com *Monilinia* sp.: degradação e análise da comunidade microbiana." *Biodegradação* 19.2 (2008): 247-257.

Zucchi, M., et al. "Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil." *Journal of Applied Microbiology* 94.2 (2003): 248-257.

ANEXO

Figura 1 - CO₂ acumulado durante ensaio respirométrico para determinação da atividade catabólica de linhagens bacterianas em culturas puras e em consórcio em meio de cultivo acrescido de óleo diesel (A) e em meio mineral sem adição de óleo diesel (B). Os microrganismos foram inoculados em frascos de 500 mL contendo 100 mL de meio mineral NMP e óleo diesel a 2% (v/v). Os frascos foram acoplados a um respirômetro dotado de um leitor de CO₂ a infravermelho e mantidos em condição estática e temperatura ambiente (20 a 25°C) por 400 horas.

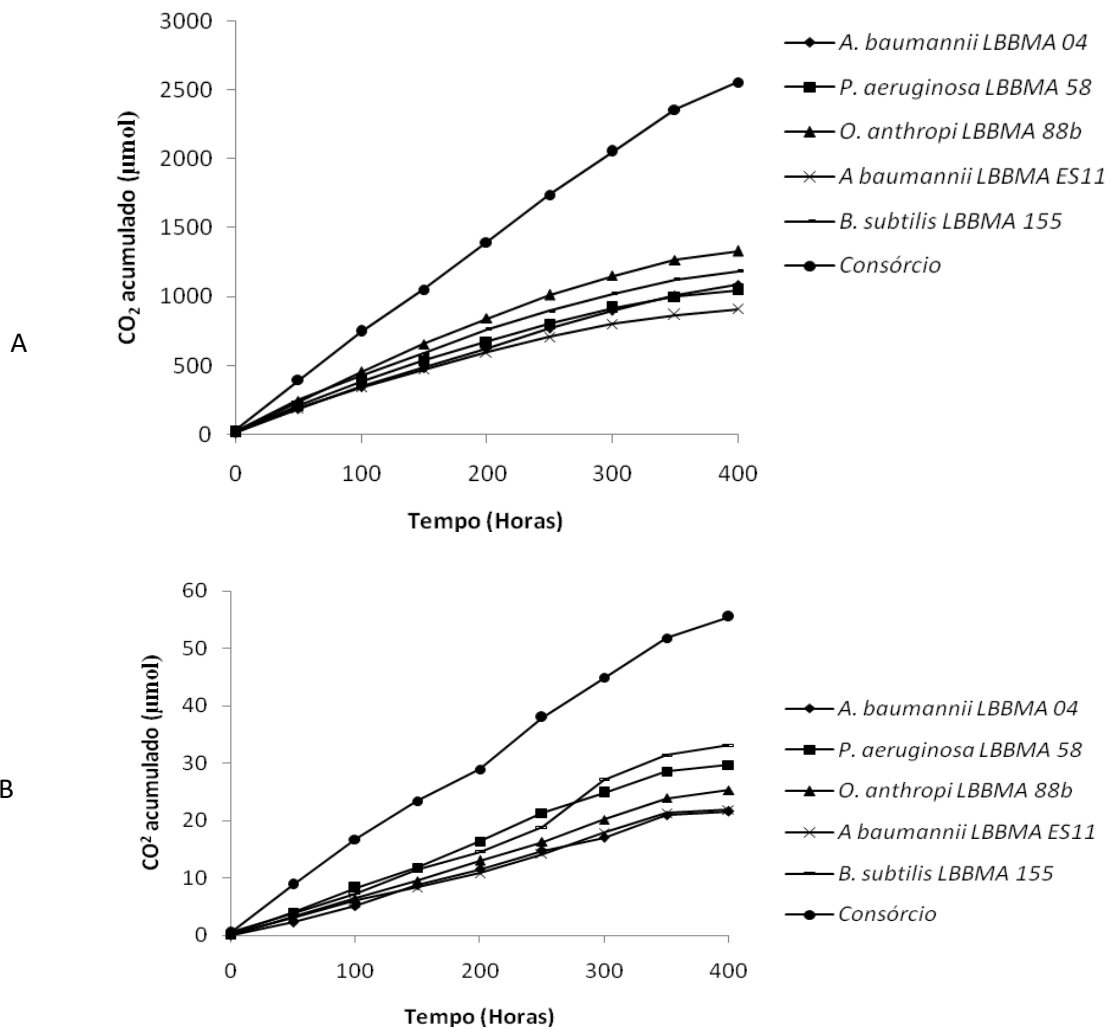


Figura 2 – Curvas de crescimento das linhagens bacterianas em culturas puras e em consórcio, em meio mineral acrescido de óleo diesel (A) e em meio mineral sem adição de óleo diesel (B). Os microrganismos foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral NMP e óleo diesel a 2% (v/v). Os frascos foram mantidos sob incubação a 30°C em agitador orbital a 200rpm, por 30 dias. As leituras da densidade óptica (D.O) foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm.

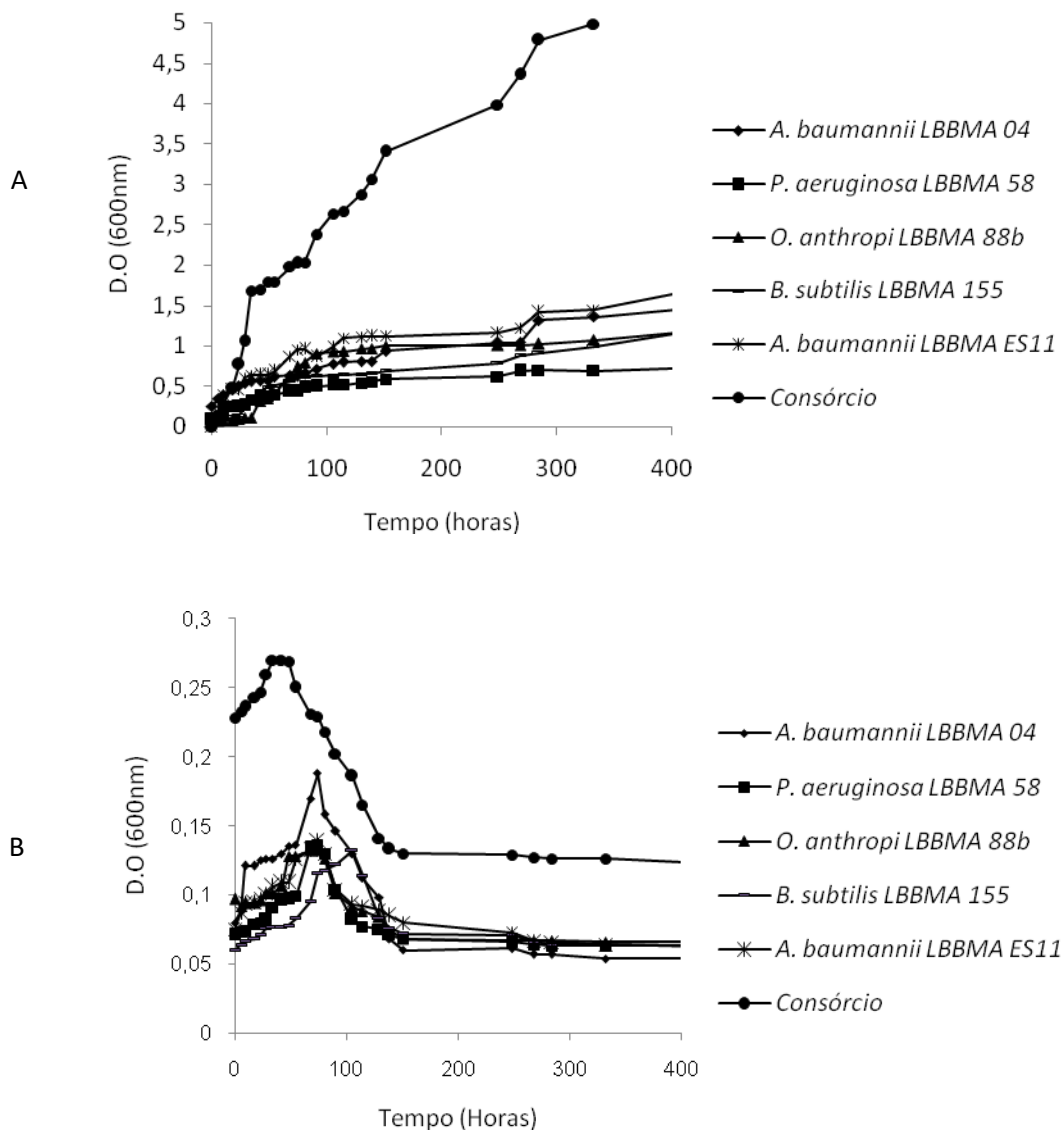


Tabela 2 - Degradação de hidrocarbonetos alcanos pelos isolados bacterianos em culturas puras e em consórcio cultivados em meio mineral acrescido de óleo diesel a 2% (v/v), ao longo de 30 dias de incubação a 30°C e 200rpm

Linhagens bacterianas	Degradação dos hidrocarbonetos (%)			Dias
	Nonano	Decano	Undecano	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (Isolado 04)	78,1	75,3	79,3	7
	90,2	89,5	91,1	15
	98,7	93,8	94,7	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Isolado 58)	77,9	89,2	90,1	7
	88,6	92,5	96,9	15
	99,2	93,7	97,2	30
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (Isolado 88b)	80,9	82,4	85,4	7
	93,6	87,6	94,8	15
	95,8	93,8	97,8	30
<i>Acinetobacter baumannii</i> (Isolado ES11)	79,3	80,9	77,2	7
	86,9	92,4	88,3	15
	98,6	97,4	94,6	30
<i>Bacillus subtilis</i> (Isolado 155)	89,9	78,6	83,4	7
	96,5	92,7	94,4	15
	98,6	95,8	96,9	30
Consórcio	90,7	95,3	93,9	7
	97,1	97,6	96,4	15
	99,3	99,9	99,5	30

Tabela 1. Denominação, origem, método de isolamento e caracterização das estirpes bacterianas constituintes do consórcio para biorremediação de ambientes contaminados com petróleo

Estirpe	Origem	Método de Isolamento	Caracterização
LBBMA 04 <i>Acinetobacter baumannii</i>	Landfarming REGAP ¹	Plaqueamento direto em R ₂ A	Gram negativa; temperatura ideal para crescimento na faixa de 30 a 35°C; não produz biossurfactantes; possui os genes para as enzimas tolueno dioxigenase, PAH dioxigenase inicial e naftaleno dioxigenase
LBBMA 58 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Landfarming REGAP ¹	Cultura de enriquecimento em petróleo	Gram negativa; temperatura ideal para crescimento na faixa de 30 a 35°C; produz biossurfactante; possui os genes para as enzimas alcano hidroxilase e tolueno dioxigenase
LBBMA 88 <i>Ochrobactrum anthropi</i>	Landfarming REGAP ¹	Cultura de enriquecimento em petróleo	Gram negativa; temperatura ideal para crescimento na faixa de 30 a 35°C; não produz biossurfactantes; possui os genes para as enzimas alcano hidroxilase e tolueno dioxigenase
LBMMA ES11 <i>Acinetobacter baumannii</i>	Landfarming REGAP ¹	Cultura de enriquecimento em petróleo	Gram negativa; temperatura ideal para crescimento na faixa de 30 a 35°C; produz biossurfactante; não há informações específicas sobre genes catabólicos para esta estirpe
LBMMA 155 <i>Bacillus subtilis</i>	Solo de mangue REDUC ²	Cultura de enriquecimento em petróleo e plaqueamento direto em R ₂ A	Gram positiva; temperatura ideal para crescimento na faixa de 30 a 35°C; não produz biossurfactantes; possui o gene para a enzima PAH dioxigenase inicial

REGAP¹ – Refinaria Gabriel Passos, Betim, MG

REDUC² – Refinaria de Duque de Caxias, RJ.