



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIOVANA GRANZOTTO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS MICROBIANOS PRESENTES EM SOLO
CONTAMINADO POR PETRÓLEO**

Londrina
2009

GIOVANA GRANZOTTO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS MICROBIANOS PRESENTES EM SOLO
CONTAMINADO POR PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz
Martinez de Oliveira

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G765c Granzotto, Giovana.

Caracterização bioquímica e molecular de isolados microbianos presentes em solo contaminado por petróleo / Giovana Granzotto. – Londrina, 2009.
72 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Biorremediação – Teses. 2. Solos – Poluição por petróleo – Teses. 3. Microorganismos – Sistemas de controle biológico – Teses. Oliveira, André Luiz Martinez de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

GIOVANA GRANZOTTO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
MICROBIANOS PRESENTES EM SOLO CONTAMINADO POR
PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Carmen Luísa Barbosa Guedes
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Maria Inês Rezende
UEL – Londrina - PR

Londrina, 27 de Outubro de 2009

*Aos meus pais Helena e Arcibaldo, e meu irmão Ricardo,
melhores amigos e maiores mestres, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira, os mais sinceros agradecimentos. Sua confiança e orientação não apenas proporcionou esta dissertação de mestrado, como foi capaz de me fazer trilhar por um novo caminho profissional.

Aos professores membros da banca que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho: Profa. Dra. Carmen Luísa Barbosa Guedes e Profa. Dra. Maria Inês Rezende.

Aos professores do curso de Mestrado pelos ensinamentos transmitidos.

À minha amiga e Profa. Catia Silene Klein, pelo exemplo, pela amizade, e por despertar em mim a vontade de pesquisar e seguir a vida acadêmica.

Aos colegas de bancada e de equipe, Thaís, Malu, Rodrigo, Evandro, Humberto, Otto, Kelly, Loren e em especial ao Paulo, pela amizade e indiscutível ajuda na execução deste trabalho.

Aos meus amigos companheiros de laboratório, Elaine, Rafael, Thaís, Luciana, Leandro, Patrick, Letícia, Ismael, em especial à Siliane, pelas boas gargalhadas.

A todos meus colegas da pós-graduação, principalmente: Cristiane, Michele, João Paulo, Tati, Virgínia, Siliane, Juscélio, Leonardo e Elizete, pela amizade e agradável convivência.

À Universidade Estadual de Londrina por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Nelson Janeiro pelo apoio constante, dicas e ensinamentos.

À minha família pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos de ausência.

GRANZOTTO, Giovana. **Caracterização bioquímica e molecular de isolados microbianos presentes em solo contaminado por petróleo**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Os processos de biorremediação estão se tornando estratégias cada vez mais procuradas no que se referem à contaminação de solos por petróleo. Para tanto, uma boa alternativa é o isolamento de microrganismos autóctones da região impactada, para que se conheça a microbiota nativa, sua diversidade e seu metabolismo, e assim se utilize a melhor espécie microbiana em processos de biorremediação. O objetivo geral deste trabalho foi o isolamento de microrganismos representantes da comunidade microbiana de solo contaminado por petróleo, e a caracterização bioquímica e molecular destes microrganismos. Os isolados com capacidade de degradação do petróleo apresentaram boa atividade de lipase (0,100 U/mL, 0,211 U/mL e 0,948 U/mL), e biossíntese de biossurfactantes com índice de emulsificação de 9,935 %, 3,546 % e 26,087 %, respectivamente. Além disso, os biossurfactantes produzidos sofreram pouca variação no índice de estabilidade frente a mudanças de pH e temperatura. Para análise da diversidade molecular dos microrganismos utilizou-se a técnica de RAPD, e posterior identificação dos isolados através do seqüenciamento parcial do gene 16S RNAr. Foi observada uma grande diversidade molecular entre os isolados, sendo identificados 8 gêneros bacterianos com elevado grau de diversidade. Os isolados com maior potencial de utilização como agentes de biorremediação foram identificados pertencentes ao gênero *Bacillus subtilis*.

Palavras-chave: Petróleo. Degradação. Lipase. Biossurfactante. *Bacillus subtilis*.

GRANZOTTO, Giovana. **Biochemical and molecular characterization of microbial isolates from an oil contaminated soil.** 72 f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

The bioremediation processes are becoming increasingly sought strategies related to soil contamination by oil. To achieve this goal, one good alternative is the isolation of indigenous microorganisms from the impacted region, to study and to know the native species, their diversity and metabolism, and then use the best microbial specie as inoculum on bioremediation processes. This study aimed to obtain isolates of the microbial community from an oil contaminated soil, and identify the isolates, as well as to perform the biochemical characterization of the isolates with potential ability to use oil as a carbon source. The isolates able to degrade crude oil showed good lipase activity (0,100 U/mL, 0,211 U/mL and 0,948 U/mL), and biosurfactant biosynthesis with an emulsification index of 9.935 %, 3.546 % and 26.087 %, respectively. In addition, the biosurfactants produced suffered small variation on the stability index when assayed against pH changes and temperature variations. The molecular diversity analys was based on RAPD markers, and subsequent identification of isolates by the partial sequencing of the 16S rRNA gene. A high molecular diversity could be observed among the isolates, and 8 different bacterial genera could be identified. The isolates with higher potential of use as bioremediation agents were identified as belonging to the species *Bacillus subtilis*

Key-words: Petroleum. Degradation. Lipase. Biosurfactant. *Bacillus subtilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da produção de Petróleo bruto no Brasil (Fonte: ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). * Dados referentes a 2009 compreendem os meses de janeiro a maio	18
Figura 2 – Produção mensal de Petróleo bruto no Brasil (em metros cúbicos) (Fonte: ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Eixo y: Metros cúbicos.....	19
Figura 3 – Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol (DIAZ et al., 2006).....	27
Figura 4 – Algumas técnicas para análise da diversidade microbiana. Fonte: Dahllöf (2002).....	34
Figura 5 – Composição semi-qualitativa e quantitativa da comunidade microbiana total presente em solo contaminado por petróleo	50
Figura 6 – Perfil de gel de RAPD utilizando os primers M13, P2 e P3	51
Figura 7 – Dendograma formado a partir dos resultados de RAPD baseado no método UPGMA	52
Figura 8 – Avaliação da capacidade de consumo de petróleo por diferentes isolados obtidos a partir de solo contaminado por petróleo	55
Figura 9 – Produção de biossurfactante pela cepa 4B.....	58
Figura 10 –Índice de Estabilidade e Emulsificação dos biossurfactantes produzidos pelos microrganismos 12A, 12B e 4B, em diferentes valores de pH	60
Figura 11 –Índice de Estabilidade e Emulsificação dos biossurfactantes produzidos pelos microrganismos 12A, 12B e 4B, em diferentes temperaturas	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ARDRA	Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
C / N / P	Relação entre carbono, nitrogênio e fósforo
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
ITS	Espaçador Interno Transcrito
LUBNOR	Lubrificantes e Derivados de Petróleo do Nordeste
PAH	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
REDUC	Refinaria Duque de Caxias
REFAP	Refinaria Alberto Pasqualini
REMAN	Refinaria Isaac Sabbá
REPAR	Refinaria Presidente Getúlio Vargas
REPLAN	Refinaria do Planalto Paulista
REVAP	Refinaria Henrique Lage
RLAM	Refinaria Landulfo Alves
RPBC	Refinaria Presidente Bernardes
SSCP	Polimorfismo de Conformação de Fita Simples
TGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura
TPH	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
T-RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição Terminal
UPGMA	<i>Unweighed Pair Group Arithmetic Average</i>
VOC	Compostos Orgânicos Voláteis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	PETRÓLEO.....	16
3.2	CONTAMINAÇÃO DE SOLO POR PETRÓLEO.....	17
3.3	PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS	19
3.3.1	Landfarming.....	20
3.3.2	Compostagem	21
3.3.3	Biopilhas	21
3.3.4	Bioestimulação	22
3.3.5	Bioaumentação.....	23
3.3.6	Inoculantes Microbianos	24
3.3.7	Bioaeração In-situ.....	25
3.4	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DO SOLO	25
3.4.1	Lipases no Processo de Degradação	26
3.4.2	Microrganismos com Atividade Biosurfactante	28
3.4.2.1	Aplicações biotecnológicas dos Surfactantes.....	31
3.5	TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES	32
3.5.1	ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado)	34
3.5.2	RFLP (Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição)	35
3.5.3	RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso).....	36
3.5.4	SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples).....	37
3.5.5	Sequenciamento.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	PROCEDÊNCIA DO SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO.....	39
4.2	ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS NATIVOS	39

4.3	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	40
4.4	QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO.....	41
4.5	POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD)	42
4.6	ANÁLISE MOLECULAR DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	42
4.7	AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RNAR	43
4.8	SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO VARIÁVEL V3 DO GENE 16S RNAR.....	44
4.9	ANÁLISE TAXONÔMICA DAS SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO V3 DO GENE 16S RNAR	44
4.10	TESTES DE DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO BRUTO.....	44
4.11	CULTIVO EM MEIO SÓLIDO PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE LIPASE.....	45
4.12	CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE	46
4.13	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE	47
4.13.1	Avaliação do Índice de Estabilidade e Emulsificação do Biossurfactante em Diferentes Valores de pH e Temperaturas.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	ISOLAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NATIVOS.....	49
5.2	ANÁLISES DE TAXONOMIA E DIVERSIDADE ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES.....	50
5.3	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NA PRESENÇA DE PETRÓLEO BRUTO	54
5.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO EM MEIO SÓLIDO E DOSAGEM DA ATIVIDADE DE LIPASE	56
5.5	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE	56
5.5.1	Avaliação do Índice de Estabilidade e Emulsificação do Biossurfactante em Diferentes Valores de pH e Temperaturas.....	59
	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O petróleo permanece ainda hoje como a base energética da maioria das sociedades modernas, apresentando uma demanda crescente apesar de novas tecnologias baseadas em matrizes energéticas renováveis ganharem evidência. Grandes avanços foram obtidos nas atividades de exploração, armazenamento, transporte, refino e comercialização, pela adequação da legislação, aumento da fiscalização sobre as empresas envolvidas na cadeia produtiva, melhorias tecnológicas, entre outras. Apesar de todos estes avanços, as atividades relacionadas ao uso do petróleo envolvem riscos ambientais, econômicos, sociais e para a saúde humana, evidenciada pelo histórico de acidentes e pela estimativa de liberação acidental deste produto no meio ambiente, a cada ano. A contaminação de solos por derivados de petróleo pode causar efeitos ambientais e econômicos significativos. A extensão de tais efeitos depende em onde a descarga acontece, tipo e volume da descarga, época do ano e condições ambientais que prevalecem na hora da descarga (MICHEL; REINHRAZ, 1994).

A grande preocupação mundial, com relação à liberação de hidrocarbonetos no ambiente, é proveniente da quantidade de produtos tóxicos que o petróleo e seus derivados podem introduzir nas áreas atingidas por derramamentos. Dentre estes compostos tóxicos, aparecem substâncias carcinogênicas como o benzeno, tolueno e naftaleno (SORIANO et al., 1998), o que implica no desenvolvimento de tecnologias de descontaminação das áreas impactadas por derrames de petróleo. Uma das tecnologias disponíveis é a biorremediação, que se define como a utilização de organismos vivos, normalmente bactérias e fungos, capazes de converter contaminantes orgânicos (xenobióticos) em compostos menos tóxicos, gás carbônico e água.

Microrganismos que possam se adaptar, proliferar e degradar estes compostos tóxicos têm papel importante no tratamento biológico deste tipo de poluição. Para tanto, é de fundamental importância que se conheça a microbiota nativa das áreas impactadas, sua diversidade e seu metabolismo, para que se proceda o melhor método de remediação. A capacidade de degradação de compostos xenobióticos *in situ* por microrganismos é dependente de diversos fatores

ambientais, geralmente de difícil controle. Na maioria dos solos contaminados por hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), a população microbiana é diminuída de tal forma que não existem indivíduos suficientes para facilitar a degradação dos contaminantes.

Um número considerável de microrganismos encontrados no solo possui a capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo. Rosemberg (1993) cita que 1% da população do solo possui capacidade de degradar hidrocarbonetos, sendo que este valor é muito mais alto em solos contaminados com hidrocarbonetos. A biorremediação fundamenta-se na oxidação biológica de compostos tóxicos por microrganismos, decompondo-os em substâncias mais simples como CO_2 e H_2O , ou ainda CH_4 e CO_2 , com custos relativamente baixos.

O número de espécies e o tamanho da população de cada espécie dentro de uma comunidade microbiana são parâmetros essenciais para definir a estrutura e a diversidade da comunidade. Quantitativamente, estes dois parâmetros são limitados severamente por métodos de cultivo convencionais, pelo fato da grande quantidade e diversidade de microrganismos no ambiente, e as características seletivas intrínsecas à utilização de meios de cultura. De acordo com Theron e Cloete (2000), várias metodologias são propostas para o estudo da ecologia microbiana do solo. A diversidade biológica é geralmente usada como índice que reflete a qualidade do ecossistema, de modo que as metodologias que possibilitam o estudo da diversidade microbiana também possam indicar diferenças entre os solos, tanto com respeito a suas populações, quanto as suas funções. Em razão disso, ao analisar a biodiversidade, importantes considerações devem ser feitas, não apenas no que se refere ao número de distribuição das espécies, mas também na sua diversidade funcional.

Existem muitos microrganismos no ambiente que podem degradar bifenilas, compostos aromáticos halogenados, naftalenos e xilenos. Entretanto, a avaliação da distribuição destes microrganismos que exibem traços genéticos específicos é deficiente, pelo fato da grande maioria destes microrganismos não serem cultiváveis, e alguns genes presentes estarem latentes (LEADBETTER, 2003).

Uma idéia detalhada da composição de uma comunidade microbiana pode ser obtida extraindo-se o DNA da população em um habitat qualquer, a fim de

determinar a abundância de seqüências filogeneticamente significativas, particularmente do DNA ribossômico. A amplificação diferencial de genes alvo pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode igualmente conduzir os estudos da diversidade.

Tipicamente, 16S RNAr, 18S RNAr ou as regiões ITS são marcadores de *primers* para o estudo da diversidade, porque estes genes/fragmentos estão presentes em todos microrganismos, apresentam regiões bem definidas para a classificação taxonômica, não estão sujeitas a transferência horizontal e têm seqüências disponíveis aos pesquisadores em bancos de dados com acesso *online* (KIRK et al.,2004).

A técnica de gerar um padrão de seqüências variadas com semelhanças filogenéticas é desejável nos diferentes pontos de vista. O padrão eletroforético produz uma representação da comunidade no conjunto ou uma seção dele, definida pelos *primers* selecionados. Com a escolha da técnica correta, é possível gerar e comparar produtos ou padrões característicos dos isolados cultivados e do DNA microbiano diretamente extraído, para assim estudar a comunidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar representantes da comunidade microbiana presente em solo contaminado por petróleo, identificando potenciais agentes de biorremediação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar representantes da comunidade microbiana a partir de solo contaminado por petróleo;
- Posicionar taxonomicamente estes isolados e avaliar a diversidade microbiana através de técnicas de biologia molecular.
- Identificar e caracterizar bioquimicamente os isolados com capacidade de utilizar o petróleo como fonte de carbono.
- Verificar a produção de lipase e biossurfactante por estes isolados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PETRÓLEO

O petróleo é uma mistura complexa de ocorrência natural formada por diversos componentes orgânicos e inorgânicos. Entre os compostos orgânicos encontram-se principalmente hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos. As propriedades físicas e termodinâmicas e o comportamento de uma mistura desse tipo dependem principalmente de seus constituintes, das quantidades relativas desses constituintes, e das condições termodinâmicas nas quais ela se encontra (RAHOMA, 1989).

Com relação aos componentes do petróleo, estes variam amplamente em função de suas condições geológicas de formação, que originam diferentes tipos de óleo com características diversas. As principais características de um 'tipo' de petróleo, economicamente relevantes para o processo de refino, são a densidade do óleo, o tipo de hidrocarboneto predominante na mistura, e o teor de enxofre (MARTÍNEZ, 1999 apud ZYLBERBERG, 2006). De acordo com a origem do petróleo, sua composição química e as propriedades físicas do óleo cru podem variar demasiadamente, e é devido a esses fatores (composição complexa e variabilidade na composição) que se encontram dificuldades para o tratamento de áreas contaminadas por tal substância (MACEDO et al., 2001).

Em relação às propriedades físicas, importantes no estudo do sítio contaminado, o petróleo pode apresentar as seguintes características, segundo Guimarães (2003):

- Densidade (influência na posição relativa do contaminante em relação à água): são produtos menos densos do que a água;
- Solubilidade em água (influenciam o transporte no lençol freático): são produtos pouco solúveis em água;

- Volatilidade (movimento com o ar ou outros gases): representa a tendência de passagem à fase vapor, sendo que quanto maior, mais volátil (VOC);
- Afinidade de um composto à presença de carbono orgânico no meio afetado;
- Viscosidade (medida de resistência interna do fluido ao fluxo): o petróleo tende a ser viscoso à temperatura ambiente.

3.2 CONTAMINAÇÃO DE SOLO POR PETRÓLEO

A contaminação de solos iniciou-se com o surgimento das primeiras sociedades humanas. Com o advento da Revolução Industrial a contaminação de solos por rejeitos aumentou consideravelmente (SEABRA, 2008).

A geração de resíduos tóxicos pelas indústrias ligadas ao setor petrolífero representa uma fonte poluidora de grande impacto ambiental nos ecossistemas. Desta forma, empresas do setor têm realizado grandes esforços para aprimorar os processos de extração, beneficiamento, refino e distribuição, visando reduzir os impactos e promover a disposição adequada dos rejeitos tóxicos (DE PAULA; SOARES; SIQUEIRA, 2006).

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2008), a produção de petróleo chegou a quase 700 milhões de barris no ano de 2008, e a produção de 2009 deve ultrapassar os 700 milhões de barris (Figura 1). Com relação às fontes internas de derivados, o país conta com 12 refinarias, sendo seis na região Sudeste (REPLAN, REDUC, REVAP, RPBC e RECAP), três na região Sul (REPAR, REFAP e IPIRANGA), duas no Nordeste (RLAM e LUBNOR) e uma na região Norte (REMAN). O país conta, ainda, com 54 terminais, principalmente na costa, e uma malha de dutos interligando refinarias e terminais de distribuição.

Diante de toda essa estrutura logística da produção e comercialização do petróleo e de seus derivados, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas, principalmente por vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos em postos de combustíveis, vêm crescendo. Segundo o órgão de controle ambiental paulista, a

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), em 2005 os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis por 73 % dos casos de áreas contaminadas no Estado de São Paulo, o que corresponde a 1596 áreas (CETESB, 2006 apud MARIANO, 2006).

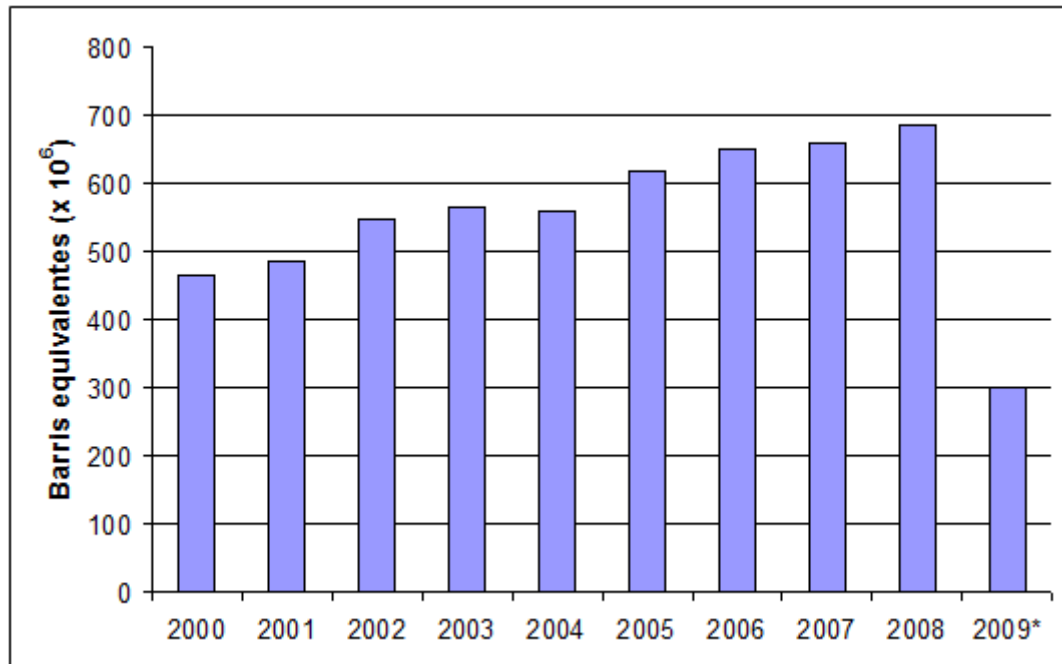


Figura 1 – Evolução da produção de Petróleo bruto no Brasil
Fonte: (ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). * Dados referentes a 2009 compreendem os meses de janeiro a maio.

No caso da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR) em Araucária - PR, o vazamento ocorrido em 16 de julho de 2000, contaminou terrenos com características geológicas bastante diversificadas, como rochas sedimentares em encostas relativamente inclinadas e secas, ou aluviões em banhados. O percurso do óleo ocorreu de diversas formas: (a) totalmente livre, (b) completamente canalizado pelo arroio Saldanha, (c) afetado por represamentos que criaram verdadeiras piscinas, e (d) extravasando o canal deste arroio e contaminando os banhados ao longo do mesmo. Neste contexto, a contaminação do solo e da água subterrânea ocorreu de diferentes formas e, conseqüentemente, diferentes técnicas de avaliação e remediação foram utilizadas, conforme os casos. O caso do vazamento da REPAR representa, portanto, uma experiência inédita no Brasil, por

suas dimensões, pela diversidade de ambientes contaminados e, mais particularmente, pela existência de banhados contaminados (MARIANO, 2006).

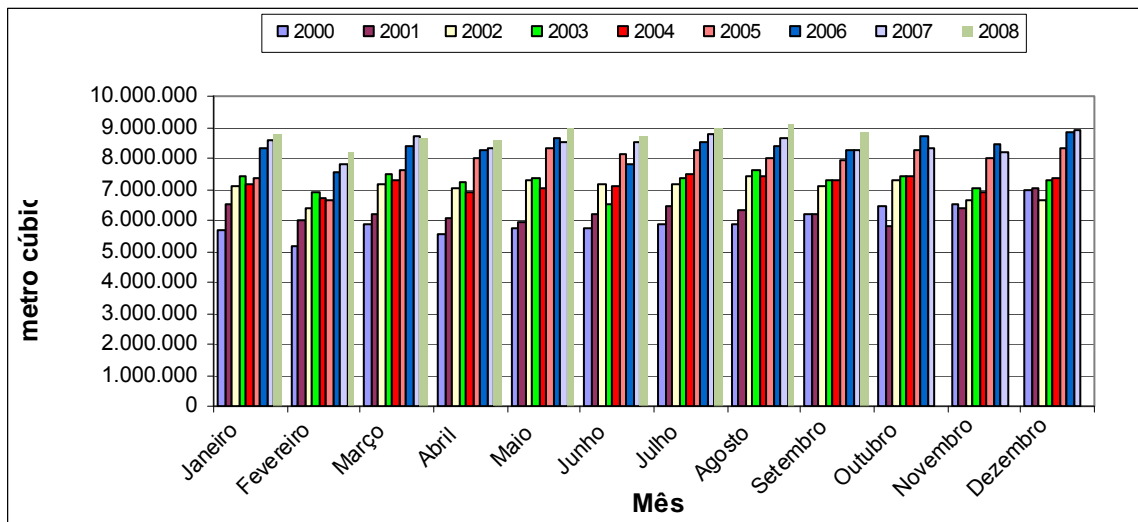


Figura 2 – Produção mensal de Petróleo bruto no Brasil (em metros cúbicos)
Fonte: (ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis)

3.3 PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS

Frequentemente, a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo atua em ambientes multifásicos e heterogêneos, onde o contaminante está presente em associação com as partículas do solo dissolvido nas fases líquidas e gasosas. Devido a essa complexidade, o sucesso da biorremediação de um solo depende de um enfoque multidisciplinar, envolvendo microbiologia, engenharia, ecologia, geologia e química (SEABRA, 2008).

Os tratamentos biológicos envolvem o uso de microrganismos ou vegetais (fitorremediação). Muitos microrganismos de ocorrência natural (fungos e bactérias) podem transformar compostos químicos perigosos em substâncias químicas mais simples que as substâncias originais (AUTRY; ELLIS, 1992). Microrganismos também têm sido usados para alterar a valência de alguns metais pesados, (ex., Cr 6⁺), fazendo com que se tornem menos pesados. Muitas espécies de plantas têm a capacidade de acumular metais pesados presentes no solo, e

algumas espécies de árvores têm a habilidade de evaporar pela transpiração, absorver e destruir vários compostos orgânicos (U.S. EPA, 2006).

Métodos *in situ*, isto é, aplicados no local da contaminação, têm sido amplamente utilizados por serem menos invasivos, e provocarem uma menor perturbação no solo. Métodos *ex situ*, no entanto, requerem o uso de escavadeiras e outros equipamentos para a remoção e transporte do solo, expondo o contaminante, e em alguns casos necessitando a substituição do solo retirado. Por esses motivos, atualmente, os métodos *ex situ* de remediação são praticamente inutilizáveis (OKOH; TREJO-HERNANDEZ, 2006).

Os microrganismos necessitam de condições ambientais favoráveis para degradação do contaminante, caso contrário, estes entrarão em latência, até que estas condições ideais sejam disponibilizadas. Os principais fatores que influenciam a biodegradação de contaminantes do solo são apresentados no Quadro 1.

Fatores químicos e físicos do contaminante	Fatores químicos e físicos do solo	Fatores biológicos
Composição química	Temperatura	Distribuição dos microrganismos no solo
Estado físico	Potencial redox	Tipo de microrganismos degradadores
Concentração	Umidade	Técnicas de inoculação
Toxicidade	pH	Técnicas de adaptação
	Teor de matéria orgânica	
	Nutrientes	

Quadro 1 – Fatores que influenciam a biodegradação de contaminantes em solo contaminado

Fonte: Seabra (2008).

3.3.1 Landfarming

O processo conhecido como *landfarming* é aplicado em larga escala nos processos de biorremediação, onde finas camadas de solo contaminado são

escavadas, e adicionam-se nutrientes orgânicos ou químicos, a fim de aumentar a carga microbiana do espaço em processo de remediação (AISLABIE; SAUL; FOGHT, 2006).

Marin, Hernandez e Garcia (2004) verificaram que, no processo de remediação conhecido como "*landfarming*" a aplicação de lodo de refinaria de petróleo para tratamento pode, inicialmente, favorecer a biomassa microbiana, respiração basal e atividade enzimática (β -glicosidase, urease e desidrogenase), porém com o tempo e uso prolongado pode haver diminuição desses indicadores, retornando a níveis próximos do solo, sem aplicação do resíduo.

3.3.2 Compostagem

No procedimento conhecido como compostagem, o material contaminado é misturado com substâncias orgânicas sólidas, geralmente materiais celulósicos, razoavelmente fáceis de serem degradados, como a palha fresca, lascas de madeira, cascas de árvores, ou até mesmo palha usada como cama para o gado. O sistema pode ser ocasionalmente suplementado com fontes de nitrogênio, fósforo, ou outros nutrientes. O processo é simples, e o material é colocado em uma única pilha, formada em longas filas, conhecidas como composteiras, ou introduzidos em grandes caixas, ou até mesmo em *containers*, equipados com alguns meios de aeração (OKOH ; TREJO-HERNANDEZ, 2006).

3.3.3 Biopilhas

Biopilhas são células ou pilhas de solo contaminado semelhantes a uma pilha de compostagem, muitas vezes construídas em um revestimento impermeável e equipadas com tubos de aeração, podem ser alteradas com nutrientes e/ou umidade para estimular a biodegradação, e podem ser misturadas mecanicamente (AISLABIE; SAUL; FOGHT, 2006).

Neste processo de biorremediação, ocorre a homogeneização e aeração, mediante revolvimento mecânico, após preparação e condicionamento dos materiais a serem tratados. A preparação desses materiais inclui: classificação, britagem, adição de substratos para melhoria de estrutura (restos de alimentos, estrume, palha, serragem, cavacos de madeira, palha de cana ou outros materiais orgânicos não tóxicos), adição de nutrientes e intensa aeração (CETESB, 2007).

Com o objetivo de remediar contaminações por petróleo no Ártico, Filler e colaboradores (2001) utilizaram biopilhas projetadas com vários pontos de acompanhamento e monitoramento de gases, temperatura interna do sistema, redes de canalização e injeções de ar para a bioestimulação dos microrganismos degradadores. As biopilhas apresentavam um sistema combinado chamado TIS, que permite o isolamento térmico das biopilhas. Segundo Aislabie, Saul e Foght (2006), biopilhas construídas *ex situ* têm sido aplicadas com sucesso na remediação do solo do Ártico, contaminado com óleo diesel, usando uma combinação de bioestimulação (aquecimento, nutrientes e aeração) e bioaugmentação.

3.3.4 Bioestimulação

De acordo com Carmichael e Pfaender (1997), o procedimento mais usado quando se fala em biorremediação é a bioestimulação dos microrganismos indígenas, pela adição de nutrientes. A introdução de grandes quantidades de carbono resultante de derrames de óleo, por exemplo, tende a resultar em um rápido esgotamento das fontes dos principais nutrientes inorgânicos, tais como nitrogênio e fósforo. Desta forma, a aplicação de nutrientes minerais nas áreas impactadas permite o crescimento maior e mais rápido das espécies com capacidade de utilização dos agentes contaminantes.

Solos contaminados com hidrocarbonetos podem ser biorremediados através da bioestimulação, com microrganismos nativos do solo, por alterações em vários parâmetros, tais como o fluxo de ar, adição de nutrientes, carbono, nitrogênio, fósforo (diferentes concentrações de C / N / P), bem como o

conteúdo de umidade, entre outros, para reforçar a biodegradação dos contaminantes (PÉREZ-ARMENDÁRIZ et al., 2004).

Na bioestimulação, a suplementação nutricional para degradação de hidrocarbonetos tem sido tradicionalmente centrada na adição de N e P, orgânica ou inorganicamente. Como o carbono é um importante constituinte do petróleo, o seu papel na biorremediação, seria como um índice para determinar a quantidade de N e P que precisam ser acrescentados para atingir a proporção ótima entre C:N:P (SARKAR et al., 2005). Em estudos mais recentes, têm sido investigadas adições de outras fontes de carbono na suplementação de sistemas de bioestimulação, como a glicose, biosólidos, e outros compostos orgânicos (NAMKOONG et al., 2002).

3.3.5 Bioaugmentação

A bioaugmentação, adição de microrganismos para reforçar uma atividade biológica específica, tem sido praticada intencionalmente, ao longo dos anos, em várias áreas, incluindo a agricultura, silvicultura e tratamento de águas residuais (JASPER, 1994).

Para Vogel (2006), a avaliação da ecologia microbiana é muito importante no sucesso do potencial da bioaugmentação e suas possíveis vantagens sobre a bioestimulação. Microrganismos são afetados pela manutenção da energia, pela produção e resistência a antibióticos e metabolitos tóxicos, morte celular, etc. A necessidade de utilização de microrganismos de "longa duração" no processo de bioaugmentação, com base na lenta reação cinética (controlada pela lentidão na dessorção dos compostos), é discutível. Compreender melhor a ecologia microbiana, a microbiologia e a genética dos microrganismos com potencial de degradação de poluentes, tem aumentado a capacidade para acompanhar o destino dos microrganismos e, eventualmente, de descobrir espécies "mais adequadas" e resistentes, ou uma estirpe com maior potencial.

Em estudo conduzido por Mancera-López e colaboradores (2008), a bioaugmentação com fungos isolados do solo a ser remediado aumentou a remoção de TPH (hidrocarbonetos totais do petróleo) em 16%, comparado com o tratamento

utilizando somente a bioestimulação com compostos orgânicos. Neste estudo, os fungos *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sydowii* e *Penicillium funiculosum* representam uma alternativa viável no tratamento a ser utilizado na biorremediação de solos poluídos.

3.3.6 Inoculantes Microbianos

Liebeg e Cutright (1999), citam que os produtos que auxiliam o tratamento de solos contaminados por petróleo apresentam em sua composição básica micronutrientes, enzimas de ação externa e surfactantes, que facilitam e estimulam a ação microbiana sobre os poluentes. Porém as técnicas de inserção de inoculantes, que empregam a adição de microrganismos exógenos, podem gerar um impacto maior ao meio ambiente, visto que empregam a adição de microrganismos não nativos ao solo de uma determinada região. Por esse motivo, as técnicas de biorremediação que utilizam a microbiota já existente no solo podem vir a produzir resultados eficazes e de menor impacto ao meio ambiente (NAMKOONG et al., 2002).

Conceição, Rizzo e Cunha (2003), ao testarem quatro inoculantes comerciais diferentes na remediação de solo contaminado com petróleo, calcularam as taxas de eficiências na biodegradação, a partir dos valores de CO₂ acumulado ao longo do período de teste. Os pesquisadores verificaram que a maior taxa de biodegradação do poluente atingida por um dos inoculantes foi de 10,2%, onde um produto que não continha em sua formulação microrganismos exógenos foi empregado. Entretanto, outro inoculante apresentou uma eficiência de biodegradação de 9,6%, muito próxima da observada no caso anterior, sendo que o produto utilizado apresenta em sua composição microrganismos provenientes de outros sítios. As outras condições apresentaram eficiências de biodegradação mais baixas, de 7,7% e 7,3%.

3.3.7 Bioaeração *In-situ*

A bioaeração *in-situ* ou *bioventing* é acompanhada da injeção contínua de pequeno volume de ar no solo impactado. O principal objetivo desse sistema é o incremento das taxas de biodegradação aeróbica dos contaminantes dissolvidos. É utilizado, em particular, em sítios contaminados por hidrocarbonetos do petróleo e certos compostos clorados. A introdução do oxigênio para promover a biodegradação aeróbica, pode ser realizada também através da adição de soluções de peróxido de hidrogênio no meio. API (1995) cita quantidades eficientes para o uso de peróxido em torno de 100 mg/L (H₂O₂ -30%).

Na bioaeração, a atividade dos microrganismos é melhorada pela introdução de um fluxo ar, ou outros gases, na zona não saturada, usando poços de injeção ou extração, e caso necessário adicionando-se macronutrientes ao meio. A principal diferença em relação à técnica de extração de vapores, quando poços de extração são utilizados, deve-se ao fato de minimizar a volatilização, diminuindo-se a necessidade de tratamento de gases (CETESB, 2007).

3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DO SOLO

Para Liebeg e Cutright (1999), a biodegradação de hidrocarbonetos é vista como uma reação de oxi-redução, onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um aceptor de elétrons é reduzido. Existem vários compostos que podem atuar como co-substrato para a enzima, e por fim como aceptores de elétrons, como o oxigênio (O₂), sulfato (SO₄²⁻), água (H₂O), dióxido de carbono (CO₂) e nitrato (NO³), gerando energia (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996).

A biodiversidade da população microbiana será determinada, em parte, pela distribuição, concentração, estrutura e disponibilidade da matéria orgânica a qual se encontra exposta. Assim, os microrganismos devem desenvolver vias metabólicas complexas com enzimas especializadas e outras características

celulares que um organismo deve possuir para degradar estes compostos (VOGEL, 2006).

A principal via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos já é conhecida. O primeiro passo para a degradação destes compostos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular. Os alcanos geralmente são convertidos a ácidos carboxílicos que posteriormente são biodegradados pelo processo de β -oxidação. Já a biodegradação de compostos aromáticos requer uma reação de dihidroxilação com a formação de dióis, seguida da clivagem do anel e a formação de catecol que posteriormente é degradado em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Os fungos formam trans-dióis, enquanto que bactérias formam cis-dióis, geralmente moléculas biologicamente inativas (ATLAS, 1995).

3.4.1 Lipases no Processo de Degradação

As lipases, triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (JAEGER et al., 1994; BEISSON et al, 2000). Estas enzimas diferem com respeito à origem (bacteriana, fúngica, vegetal, animal), propriedades cinéticas, e ainda quanto aos tipos de substrato em que atuam. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de microrganismos são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção, e abundância de microrganismos que são capazes de sintetizá-las.

Os fungos são especialmente valorizados, pois as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação, e também porque a maioria dos fungos utilizados para este fim são reconhecidos como não patogênicos ou GRAS (Generally Regarded as Safe, JAEGER et al., 1994). Fungos de diversos gêneros demonstraram serem bons produtores de lipases, e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. As lipases são enzimas hidrolíticas que "in vivo" catalisam a

hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (Figura 2), constituindo uma classe especial de carboxil-éster hidrolases (DIAZ et al., 2006).

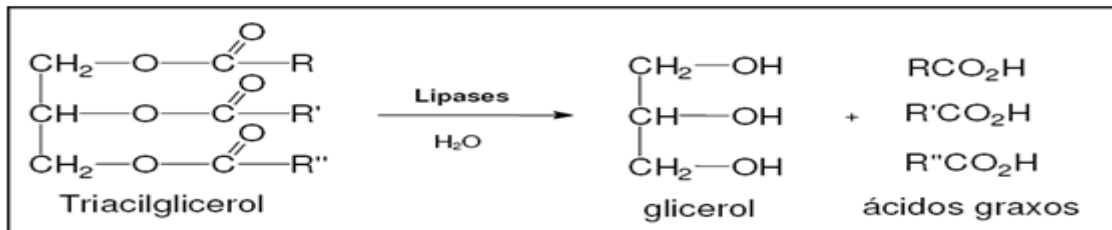


Figura 3 – Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol
Fonte: Diaz et al. (2006)

"*In vitro*", as lipases também atuam como catalisadores em diversas reações, com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas. Estas reações incluem a esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise, e ocorrem quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa, a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (FORESTI; FERREIRA, 2006).

Biopolímeros como polifenóis, polissacarídeos e poliésteres mostram um considerável grau de diversidade e complexidade. Além disso, estes compostos estão recebendo crescente atenção porque são biodegradáveis e produzidos a partir de recursos naturais renováveis. Lipases e esterases são utilizados como catalisadores para a síntese polimérica destes biopolímeros, com as principais vantagens a sua alta seletividade (estereoseletividade, regioselectividade e quimiosseletividade) (JAEGER; EGGERT, 2002).

A produção comercial de lipases pode ser realizada por fermentação submersa (FS), ou por fermentação em estado sólido (FES). O primeiro processo utiliza meio de cultura líquido, sendo este o mais utilizado e descrito na literatura; já o segundo, baseia-se na utilização de substratos sólidos com baixas porcentagens de água na sua composição (ALONSO, 2005; GUO ; XU, 2005).

Em processos de biorremediação, o papel de enzimas lipolíticas é pouco estudado, entretanto o monitoramento da atividade da enzima lipase

demonstrou correlação com a biodegradação de petróleo em solo contaminado (MARGESIN; HÄMMERLE; TSCHERKO, 2007). Além disso, a inoculação de fungos com elevada produção da enzima lipase em solo contaminado por petróleo, levou a uma maior decomposição de TPH nas áreas inoculadas (LI et al., 2002). Os produtos liberados na biodegradação de hidrocarbonetos são o substrato para hidrolases, incluindo esterases e lipases. Portanto, a medição da atividade de lipase no solo, constitui uma valiosa ferramenta para monitorar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (MARGESIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 1999).

3.4.2 Microrganismos com Atividade Biosurfactante

A biodegradação de efluentes e compostos ricos em hidrocarbonetos depende de sua estrutura química, de modo que quanto mais solúveis maior sua degradabilidade. Os surfactantes são uma ampla classe de moléculas anfipáticas (com domínio polar e apolar), que são capazes de diminuir as tensões superficial e/ou interfacial entre gases, líquidos e sólidos (PRUTHI; CAMEOTRA, 1997; DESAI; BANAT, 1997). Para Inoh e colaboradores (2001) esses compostos de superfície ativa podem ser produzidos por microrganismos com capacidade de crescerem em substrato insolúvel em água, apresentando diversas atividades biológicas.

Para produzir biosurfactante, substratos de alto custo são dispensados, podendo ser utilizados resíduos oleosos de indústrias de alimentos para o metabolismo celular, viabilizando economicamente o processo (MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

Segundo Maier (2003), as bactérias, juntamente com as arqueobactérias, são as maiores responsáveis pela produção destes compostos. Estes microrganismos têm sido isolados do solo, da água marinha, de sedimentos do mar e áreas contaminadas por óleos. Diversas evidências indicam que os biosurfactantes são produzidos, em alguns casos, em grande quantidade nestes ambientes. Uma delas é a presença de espuma e emulsões em áreas de

derramamento de óleos em oceanos, bem como seu efeito positivo no aumento da recuperação terciária de óleo.

O interesse pelos biossurfactantes aumentou durante a última década (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004), pois têm a capacidade de atuar na interface das células apresentando diferentes polaridades, em especial água/óleo (A/O), ar/água e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo.

Os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. Como os biossurfactantes aumentam a interação superficial A/O, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos. A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumentam a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

De acordo com Lang e Wagner (1993) os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos.

Os biossurfactantes apresentam diversas composições estruturais, principalmente aqueles produzidos por microrganismos na presença de hidrocarbonetos (LANG; WULLBRANDT, 1999). Em sua grande maioria, são lipídios, os quais apresentam uma estrutura típica de surfactante. A porção lipofílica dos lipídios normalmente é um hidrocarboneto com um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, ou conter estruturas cíclicas. A porção polar dos biossurfactantes pode ser simples (carbonila, hidroxila), ou uma mistura complexa de fosfatos, carboidratos, aminoácidos, dentre outros (COOPER, 1986).

Segundo Banat, Makkar e Cameotra (2000), os biossurfactantes podem ser classificados em glicolipídios, liposacarídios, lipopeptídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídeos neutros. Os glicolipídios subdividem-se em trealose, soforolipídios ou raminolipídios. Champion e colaboradores (1995) afirmam que os

biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras.

Na tentativa de remediar áreas contaminadas por petróleo no Vietnã, Huy e colaboradores (1999) isolaram quatro cepas de bactérias do solo contaminado, sendo três identificadas como *Pseudomonas* sp. e uma como *Acinetobacter* sp. A cepa de *Acinetobacter* sp., ao ser colocada em meio contendo petróleo, apresentou uma taxa de biodegradação de 95%. O biossurfactante produzido pela *Acinetobacter* sp. foi identificado como um polissacarídeo, enquanto o produzido pelas *Pseudomonas* sp., como um glicolípido.

Existem mecanismos que facilitam o consumo de substratos insolúveis em meio aquoso, como n-alcenos e outros hidrocarbonetos. Estes substratos devem ser transportados de alguma forma para atingir o contato com a célula. Segundo Goswami e Singh (1991), três formas de transporte do substrato até as células são consideradas:

- Interação das células com hidrocarbonetos dissolvidos na fase aquosa: existe somente quando os hidrocarbonetos são de cadeia curta, pois a solubilização de alcanos de cadeia longa é muito lenta e difícil, além de retardar o crescimento celular.
- Interação das células com gotas de hidrocarbonetos pseudosolubilizadas: as células interagem com partículas de hidrocarbonetos pseudosolubilizadas, bem menores que as células.
- Contato direto das células com grandes gotas de hidrocarbonetos: ocorre quando as células microbianas aderem à superfície das gotas de hidrocarbonetos maiores que as próprias células, sendo o substrato consumido por difusão. A área superficial para a adesão das células seria o fator limitante para o consumo de substrato neste caso. A emulsificação dos hidrocarbonetos através da produção de agentes biossurfactantes aumentaria a superfície entre estas duas fases.

Segundo Colla e Costa (2003), após a entrada na célula, os hidrocarbonetos são oxidados a álcoois, depois a aldeídos e posteriormente a ácidos graxos, através da oxidação terminal.

3.4.2.1 Aplicações biotecnológicas dos Surfactantes

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações na área petrolífera incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagens e a recuperação terciária do petróleo (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes aumentam a interação superficial água/óleo, e assim aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos promovendo a biorremediação de águas e solos (BANAT, 1995). A biorremediação pode ser feita utilizando os biossurfactantes diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser adicionados diretamente os microrganismos produtores ou fontes de nutrientes para promover o crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Um processo alternativo na limpeza de reservatórios de petróleo é o uso de biossurfactantes. Os resíduos tendem a sedimentar no fundo de tanques de estocagem, e não são removidos através do bombeamento convencional. Ao ser empregado, o biossurfactante promove a redução da viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do petróleo após a quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual devido à ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemáticos (BOGNOLO, 1999).

Existem outras aplicações para os biossurfactantes como produtos de higiene e cosméticos, mineração, indústrias de papel, têxtil, cerâmica, alimentos e farmacêutica (NITSCHKE; COSTA, 2007).

3.5 TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES

Segundo Kirk e colaboradores (2004) existem problemas associados com o estudo da diversidade bacteriana e de fungos no solo. Estes compreendem não somente as limitações metodológicas, mas sim pela falta de conhecimento taxonômico. É difícil estudar a diversidade de um grupo de microrganismos quando não se compreende como categorizar ou identificar as espécies.

De acordo Willians e Sayers (1994), os estudos para o isolamento, e caracterização dos primeiros plasmídeos associados na biodegradação de xenobióticos iniciaram a partir da década de 70. Estes estudos contribuíram significativamente para o entendimento da genética da biodegradação na época.

No estudo de solos ou os sedimentos, a utilização da análise molecular é muito aplicada. Pode ser usada para detectar os microrganismos fastidiosos, que são difíceis ou perigosos para cultivar *in vitro*, e para determinar o destino de microrganismos selecionados ou geneticamente projetados, e dos genes particularmente disseminados por transferência aos microrganismos nativos. Técnicas de biologia molecular podem igualmente ser usadas para estudar a diversidade bacteriana natural nestes ambientes complexos, da qual somente uma porcentagem pequena dos microrganismos nativos pode ser isolada *in vitro* (PICARD et al., 1992).

Para superar problemas associados com bactérias e fungos não cultiváveis, vários métodos foram desenvolvidos para identificar e estudar estes microrganismos, que incluem a análise de ácidos graxos e numerosos métodos baseados no estudo do DNA e RNA (KIRK et al., 2004).

Seqüências específicas de DNA de microrganismos nativos podem ser detectadas em fontes ambientais pela hibridização com sondas após a amplificação das seqüências usando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (EYERS et al., 2004). Teoricamente, o uso de seqüências conservadas de DNA em uma família do gene como *primers* universais na PCR e conseqüentemente na clonagem dos fragmentos amplificados facilitaria a detecção e o isolamento de uma maior variação de genótipos do ambiente. Weisburg e colaboradores (1991)

usaram este método para a caracterização das variações em genes do 16S rRNA de microrganismos nas comunidades naturais.

Fessehaie, De Boer e Levesque (2003) construíram um arranjo de oligonucleotídeos espécie-específicos representando os vários patógenos da batata em um suporte sólido (membranas de *nylon*) com o objetivo de avaliar a diversidade de microrganismos patogênicos em batata. O DNA genômico das culturas bacterianas foi amplificado pela utilização da PCR, usando *primers* ribossomal conservados e marcados simultaneamente com digoxigenina-dUTP. A hibridização dos amplicons no arranjo, bem como a detecção da digoxigenina marcada, demonstrou diferentes padrões de hibridização, que foram distintos para cada espécie e subespécies testadas. A tecnologia de arranjo do DNA é essencialmente uma técnica contrária ao *blot*, para a identificação de fragmentos de DNA, e foi aplicada para uma rápida identificação e detecção de bactérias patogênicas em batatas.

De acordo com Wen-Tso e colaboradores (1997), a riqueza e a regularidade de uma comunidade são estimadas quantitativa e qualitativamente, baseada no número de cópias originais e nas frequências relativas dos vários ribotipos detectados.

Na figura 4, é mostrada uma abordagem comum para a análise da diversidade microbiana. Os quadros em negrito indicam as etapas preparatórias necessárias antes da detecção e da análise; os quadros com frames finos representam as técnicas de detecção. FISH e IS-PCR podem ser usadas diretamente, considerando que para as outras técnicas o DNA é extraído primeiramente. Microarranjo ou Hibridização Dot-Blot podem usar o DNA inteiro ou o fragmento amplificado. A estrutura da comunidade pode ser avaliada através de Fingerprinting do produto da PCR, por clonagem e sequenciamento, com a hibridização por sondas ou microarranjos, ou a combinação destas técnicas.

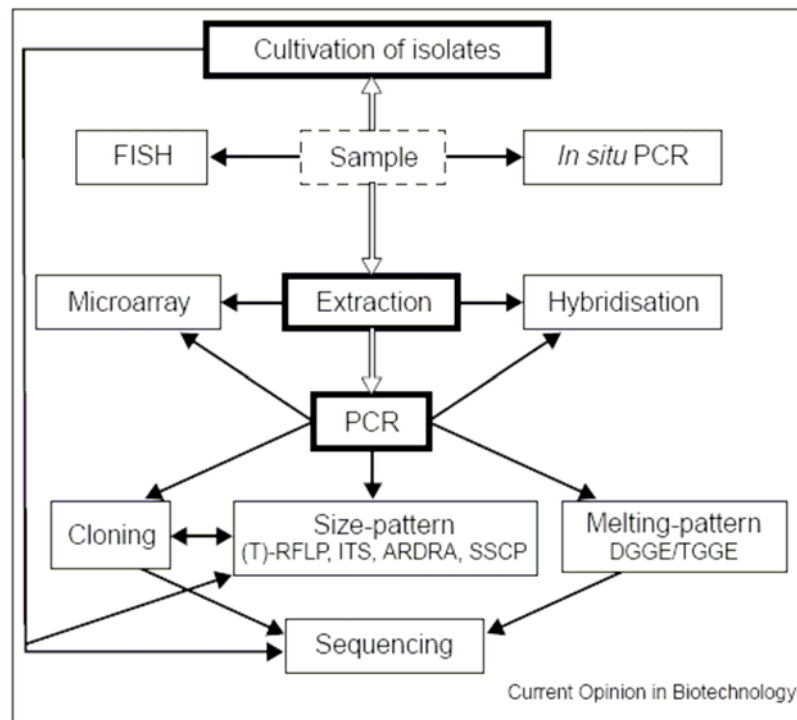


Figura 4 – Algumas técnicas para análise da diversidade microbiana
Fonte: Dahllöf (2002)

3.5.1 ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado)

A técnica conhecida como ARDRA (sigla proveniente da expressão utilizada em inglês - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) utiliza-se das características do RNA ribossômico. Essa técnica é baseada em padrões de restrição enzimática utilizando enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do RNAr que reflete padrões filogenéticos (LUDWIG ; SCHLEIFLER, 1994).

A ARDRA é bastante útil para uma rápida análise da diversidade genética. No entanto, é recomendado cuidado na escolha do fragmento de DNAr a ser amplificado e analisado por esse método. No caso da análise de microdiversidade, que apresenta grupos de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S–23S DNAr. A unidade de DNAr nuclear consiste de uma série repetitiva (tandem) de três regiões

gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS e IGS). A ARDRA possibilita a análise dessas regiões espaçadoras e estudos comparativos de seqüências de nucleotídeos de genes do DNAr (GRIFONI et al., 1995).

Fulthorpe, Rhodes e Tiedje (1998) realizaram estudo utilizando as técnicas de REP (*Repetitive Extragenic Palindrome*) e ARDRA, para relacionar a diversidade e identificar as origens geográficas de 150 isolados com capacidade de degradar componentes de petróleo. O estudo foi conduzido em diferentes regiões africanas, utilizando solo contaminado. O método de REP revela a diversidade ao nível da subespécie, enquanto o método de ARDRA avalia a diversidade em nível de gênero e a espécie. As 150 cepas demonstraram um elevado grau de diversidade genética, e um surpreendente grau de genótipos endêmicos. A maioria (91%) dos genótipos foi exclusiva para os locais de onde foram isolados. Alguns genótipos foram repetidamente encontrados em uma região, mas não nas outras regiões amostradas, o que sugere que eles são regionalmente endêmicos.

3.5.2 RFLP (Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição)

A técnica de polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) baseia-se na utilização de enzimas de restrição que cortam o DNA alvo em regiões específicas (sítios de restrição) gerando fragmentos de diversos tamanhos que podem ser detectados em gel de agarose ou poliacrilamida. A variação nos tamanhos dos fragmentos gerados por RFLP é causada por mutações que criam ou eliminam sítios de restrição da enzima. Esta técnica é apropriada para análises e clones populacionais, relações de parentesco, variações geográficas e hibridações (HOY, 1994). Em estudo sobre o solo, conduzido por Liu e colaboradores (1997), o DNAr amplificado por PCR foi digerido com uma enzima de restrição de 4 pares de base. Os diferentes comprimentos do fragmento foram detectados usando gel de poliacrilamida não desnaturante para a análise da comunidade.

3.5.3 RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)

O polimorfismo dos marcadores RAPD (do inglês, *Random Amplification of Polymorphic DNA*) é revelado pela amplificação de locos cromossômicos usando-se iniciadores (*primers*) compostos de sequências curtas e aleatórias de oligonucleotídeos. Na reação de amplificação, estes *primers*, quando submetidos a condições apropriadas de temperatura, se hibridizam com sequências genômicas que lhe são complementares. Para que haja amplificação, é necessário que existam no genoma dois sítios complementares ao *primer*, localizados em direções opostas e distantes entre si, de no máximo 3.000 pb. Como a sequência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua sequência, e por isso revelar vários locos característicos para um determinado genoma. Os fragmentos amplificados, por sua vez, são separados em um gel de poliacrilamida ou agarose, e visualizados após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídio (EtBr), sob luz ultravioleta (LOPES et al., 2002).

De acordo com Klein e colaboradores (1998) os *primers* usados nos experimentos de RAPD são compostos de 10 bases de sequências arbitrárias, com no mínimo 50% de conteúdo CG. Podem ser sintetizados no próprio laboratório, ou mais comumente, adquiridos comercialmente. Para maximizar o número de locos polimórficos amplificados por *primer*, recomenda-se inicialmente testar um grande número de iniciadores e uma pequena quantidade de amostra do conjunto total de indivíduos. Os oligonucleotídeos mais informativos são então selecionados visando proceder às análises do material genético (indivíduos, populações, acessos, isolados) reduzindo-se o tempo e custo dessas análises.

Figueiredo e colaboradores (2003) testaram as técnicas de SDS-PAGE, RAPD e ARDRA, e seqüenciamento de genes ribossomais amplificados por PCR, com o objetivo de identificar diferentes raças de *Colletotrichum graminicola*, um fungo que ataca as culturas de sorgo. Este fungo apresenta alta variabilidade e se adapta rapidamente à resistência genética do hospedeiro, produzindo novas formas de virulência. Diferente das técnicas testadas, a RAPD revelou alto grau de polimorfismo, possibilitando separar cada uma das raças de *C. graminicola* testadas, juntamente com o seqüenciamento das amostras.

Em estudo conduzido por Hanbo e colaboradores (2004), a técnica de RAPD ajudou na diferenciação genética de cepas de *Arthrobacter* isoladas de diferentes minas de captação de zinco. Segundo estes autores, esta técnica também permitiu indicar amostras relativamente sensíveis a alterações ambientais, com o objetivo de isolar microrganismos com potencial de degradação em ambientes contaminados com metais pesados.

3.5.4 SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples)

A análise de SSCP (do inglês, *Single Strand Conformation Polymorphism*) é um método simples e eficaz para a detecção de uma seqüência menor no DNA modificado amplificado por PCR. Sob circunstâncias não desnaturantes, o DNA de fita simples tem a estrutura duplicada, determinada por interações intramoleculares e por sua seqüência de nucleotídeos. A mobilidade eletroforética do DNA em um gel é dependente não somente do seu tamanho e peso molecular, mas igualmente de sua topologia (SHEFFIELD et al., 1993 apud DONG - HUN; SUNG - AE; CHI - KYUNG, 2000).

Portanto, na técnica de SSCP, a análise de fragmentos de DNA que têm tamanhos idênticos, mas diferentes seqüências, podem ser separados em diferentes bandas por eletroforese em gel poliacrilamida, devido à diferença de mobilidade das estruturas. Uma vez que na técnica não se utiliza *primers* com grampo GC, géis de gradiente, ou aparelhos específicos, a SSCP é potencialmente mais simples do que a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e análise por eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE). A técnica de PCR-SSCP pode ser considerada como um método simples e eficiente no estudo de comunidades bacterianas (SELVAKUMAR; DING; WILSON, 1997; JUNCA ; PIEPER, 2004).

No entanto, segundo Selvakumar, Ding e Wilson (1997), a análise de SSCP pode apresentar algumas desvantagens. Isso inclui o alto número de reanelamentos das fitas de DNA durante a eletroforese, após a etapa inicial de desnaturação; a presença de polimorfismos originados por uma única amostra

devido a diferenças no posicionamento da complementariedade das bases do DNA fita-simples; e a formação de DNA heteroduplex quando seqüências similares, referentes a organismos distintos, estão presentes na amostra.

3.5.5 Sequenciamento

Na reação de sequenciamento, o fragmento resultante da reação de PCR é combinado com quatro tipos de nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), quatro tipos de dideoxynucleotídeo trifosfato (ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP), os *primers* envolvidos na reação de PCR, e a DNA polimerase. Posteriormente, são feitas quatro reações diferentes, uma para cada ddNTP, onde cada reação possui um número muito grande de cópias simultâneas do fragmento. As reações são interrompidas quando uma molécula de ddNTP é incorporada na cadeia, cada uma em momentos diferentes. Sendo assim, as reações terão fragmentos de diferentes tamanhos, mas todas com início comum, variando de acordo com o ddNTP incorporado (ALBERTS et al., 1994).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDÊNCIA DO SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

Amostras de solo contaminado provenientes da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR) de Araucária – PR, foram coletadas em um dos sítios contaminados por um derramamento acidental ocorrido em 16 de julho de 2000. O material vegetal superficial foi retirado e o solo foi coletado numa profundidade de 0 a 20 cm. O solo foi caracterizado como argiloso, com 12% de areia, 39% de silte e 49% de argila, e armazenado em câmara fria. A análise química do solo encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Análise química do solo contaminado por petróleo utilizado para o isolamento de microrganismos nativos

pH			g/dm ³		cmol _c /dm ³								mg/dm ³			
pH CaCl ₂	pH SMP	pH H ₂ O	M.O	N _t	H+Al	H ⁺	Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	Na ⁺	CTC pH7,0	CTC efetiva	P	P_Rem	SO ⁻² ₄
4,04	4,72	4,82	29,93	1,50	12,87	9,43	3,44	7,11	3,26	0,17	0,04	23,46	14,02	3,71	5,93	25,52
mg/dm ³					SATURAÇÃO					RELAÇÕES						
Mn	Fe	Cu	Zn	B	K%	Ca%	Mg%	Al%	H%	V%	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K			
167,31	315,03	3,73	11,79	1,29	0,73	30,31	13,90	24,53	40,21	45,12	2,18	41,45	19,01			

Extratores: MEHLICH-I (P,K,Na,Mn,Fe,Cu,Zn); KCl 1N (Ca⁺², Mg⁺²,Al⁺³); HCl 0,5N (B); CH₃-COONH₄ (SO₄⁻²)

4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS NATIVOS

Amostras do solo contaminado (1 g) foram utilizadas para o isolamento e contagem da microbiota nativa total. Para a contagem da fração microbiana cultivável, as amostras de solo foram seriadamente diluídas 1/10 (p/v)

em solução salina a 0,9 %. As diluições (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram inoculadas (100 μL) em triplicata em placas contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), e incubadas em estufa ajustada para 28 ± 2 °C. Após a inoculação, as placas foram mantidas a 28 °C por até 12 dias e avaliadas quanto ao crescimento dos microrganismos. Representantes dos diferentes morfotipos observados foram isolados em meio BDA, e armazenados em glicerol:meio de cultivo Dygs (2 g/L de glicose, 1,5 g/L de peptona, 2 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de K_2HPO_4 , e 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 6,0) a -20 °C para posterior caracterização molecular e bioquímica. Neste estudo, somente foram caracterizados isolados bacterianos.

As inoculações, os isolamentos e toda manipulação de material estéril foram conduzidas em câmara de fluxo laminar VECO, modelo VLFS – 09.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Para análise molecular dos isolados bacterianos, foi utilizada a técnica de extração de DNA de acordo com Nomura e colaboradores (2006), com algumas modificações. Após crescimento em meio líquido Dyg's, 2 mL de cada amostra foram colocados em microtubo e centrifugadas (5000 rpm, 5 minutos, 4°C) para a sedimentação das células. As células foram coletadas e congeladas a -20 °C até o momento da extração do DNA.

Aos sedimentos congelados foram adicionados 780 μL do tampão de lise TENP 1% PVP (Tris 0,1M; EDTA 0,5M; NaCl 0,05M; PVP – polivinilpirrolidone 1%), 50 μL de Lisozima ($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 50 μL de Proteinase K ($10 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$), 100 μL de RNase A ($100 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 10 μL de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio) e 10 μL de CTAB 10% (brometo de cetiltrimetilamônio). Os microtubos foram agitados vigorosamente, e incubados em banho Maria a 37°C por 30 minutos para a ação das enzimas de lise adicionadas, seguindo uma incubação de 65°C por 30 minutos para a inativação destas enzimas. Após a etapa de lise, as amostras foram purificadas em etapas, utilizando Fenol tamponado (pH 8,0), Clorofane (fenol tamponado, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 v/v), e Clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 v/v), com a mistura por inversão dos

microtubos, e centrifugação a 14000 rpm, a 4°C por 15 minutos, em cada etapa. A fase aquosa resultante da última etapa de purificação, contendo o DNA genômico dos isolados microbianos, foi coletada e dividida em 2 microtubos, e cerca de 1,5 mL de Etanol Absoluto foi adicionado aos tubos, para precipitação do DNA, misturado por inversão, e incubados por no mínimo 3 horas a – 20 °C para a máxima precipitação dos ácidos nucleicos.

Após a etapa de precipitação, os extratos foram centrifugados a 14000 rpm, por 15 minutos a 4 °C, descartado o sobrenadante, e adicionado cerca de 0,5 mL de Etanol 70% em cada amostra, misturadas por inversão e novamente centrifugadas (14000 rpm, 15 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol 70% foi evaporado em estufa a 50°C por 5 minutos. O DNA genômico obtido foi ressuspenso em 50 µL de água deionizada, e mantido a – 20°C até a sua utilização.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Os extratos de DNA genômico dos isolados bacterianos foram diluídos 100 vezes em tampão TE (Tris 5 mM; EDTA 1 mM – pH 8), para determinação da concentração de DNA nos extratos obtidos. A pureza dos extratos foi determinada pela razão dos valores de absorbância a 260 nm e a 280 nm (A_{260}/A_{280}), sendo considerado um grau de pureza satisfatório extratos de DNA que apresentem uma razão A_{260}/A_{280} entre 1,8 a 2,0 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Sabendo-se que uma unidade de DO equivale a 50 µg de DNA, as amostras de DNA foram quantificadas através da seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{DO}_{260} \times 0,05 \times \text{fator de diluição}$$

4.5 POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD)

Para a realização do agrupamento molecular dos isolados, foi utilizada a técnica de RAPD, com 3 *primers* arbitrários. Os *primers* usados foram o M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), P2 (5'-GGTGACGCAG-3') e P3 (5'-CTGCTGGGAC-3'). As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 50µL, com a mistura da reação contendo 50 ng da amostra de DNA, 1,5 µL de *primer* (diluído a 50 pmol. µL⁻¹), 2,5 µL de MgCl₂ (1mM), 1 µL de solução de dideoxynucleotídeos (dNTP) (0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µL de enzima Taq DNA Polimerase (5 U. µL⁻¹), 5 µL de tampão para PCR (PCR Buffer 10x) e água deionizada estéril para completar o volume final de 50 µL.

As reações foram amplificadas em termociclador Gene Amp PCR Sistem 9700, estabelecendo o programa de 5 minutos a 94 °C para desnaturação do DNA, 30 segundos a 54 °C para o anelamento dos *primers* e 60 segundos a 68 °C para extensão da fita de DNA, sendo esse ciclo repetido 35 vezes.

Os produtos da reação de RAPD foram separados em gel de agarose a 1,5%. A corrida de eletroforese foi realizada a 90V, por 3 horas, em tampão TAE 1x (0,04 M de Tris acetato + 1 mM de EDTA). Foram aplicados 10 µL da reação de amplificação com 3 µL de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol + 60 % de sacarose) por canaleta do gel. O marcador 1 Kb DNA *Ladder* (µg. µL⁻¹) foi usado como padrão para o cálculo do peso molecular das bandas.

Após a corrida de eletroforese, o gel foi corado em solução contendo brometo de etídio, visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (UV), para posterior análise.

4.6 ANÁLISE MOLECULAR DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

A análise molecular dos resultados foi baseada no registro de presença ou ausência de bandas no gel de agarose a 1,5 %, pela reação de RAPD. A partir da coleta desses resultados, foi montada uma matriz binária usando o

software GelQuest[®] versão 2.1.2, através da detecção de picos ou sinais de bandas ausentes ou presentes. O coeficiente para o cálculo de similaridade genética utilizada para a análise dos indivíduos foi o de Jaccard (ROHLF, 2000), Com os dados de similaridade foi realizada a análise de agrupamento (módulo SAHN), utilizando o método da média das distâncias genéticas (UPGMA – do inglês, *Unweighed Pair Group Arithmetic Average*), utilizando o *software* ClusterVis[®]. Os dois softwares utilizados nas análises moleculares foram adquiridos gratuitamente pela internet.

4.7 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RNAR

A amplificação do gene 16S RNAr dos isolados bacterianos foi feita com os *primers* 63f (5' CAGGCCTAACACATGCAAGTC 3') e 1378r (5' GGGCGGWGTGTACAAGGC 3') (MARCHESI et al., 1998). A mistura de reação foi realizada com 5 ng de DNA dos isolados, 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTPs, 3,0 mM de MgCl₂, 1,0 U de Taq DNA polimerase em 20mM de Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl, em um volume de reação de 50 µL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), com 35 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento (60 °C, 30 segundos) e extensão (72 °C, 1 minutos), e uma extensão final (72°C) por 5 minutos. Após amplificação, 5 µl de cada reação de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose (1% p/v) em tampão TEB 1X e corado com brometo de etídio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) para visualização sob luz ultravioleta. As amostras que apresentarem banda no tamanho esperado (1300 pb) foram tratadas para reação de sequenciamento.

4.8 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO VARIÁVEL V3 DO GENE 16S RNAR

Os fragmentos da subunidade 16S amplificados pela reação de PCR foram purificados com o *kit PureLink PCR Purification Kit* (Invitrogens, Carlsbad) seguindo instruções do fabricante. Os fragmentos purificados foram utilizados em reações de sequenciamento utilizando o *kit comercial DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) em um sequenciador automático MegaBace 1000, utilizando os *primers* V3f (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3') e V3r (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3') (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993), produzindo um fragmento de tamanho médio de 500 bases.

4.9 ANÁLISE TAXONÔMICA DAS SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO V3 DO GENE 16S RNAR

O coeficiente de similaridade do *Ribosomal Database Project* (RDP, MAIDAK et al. 1997), e o algoritmo BLASTN 2.0.6 (ALTSCHUL et al., 1997) foram utilizados para o posicionamento e identificação das seqüências do gene ribossomal 16S RNAr.

4.10 TESTES DE DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO BRUTO

Para verificar o potencial de degradação de petróleo pelos isolados bacterianos, estes foram cultivados em meio Bushnell-Haas (BUSHNELL; HAAS, 1941), composto de 1 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/L de NH_4NO_3 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L de FeCl_3 , 0,02 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, para 1 litro de H_2O destilada. Os microrganismos provenientes do estoque, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio mínimo constituído de 7 g/L de K_2HPO_4 , 3 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L de

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,2 % de glicose 40% para 1 litro de H_2O destilada), e incubados a 28 ± 2 °C por 24 a 48 horas. Para os testes de degradação, os microrganismos foram retirados do meio mínimo (1 mL), inoculados em Erlenmeyers contendo 25 mL de meio Bushnell-Hass e cerca de 1 mL de petróleo bruto, do tipo árabe leve. Os frascos foram incubados em câmara incubadora com agitação orbital, por 5 a 8 dias, a 180 rpm e 28 ± 2 °C.

Para quantificar a capacidade de uso do petróleo como fonte de carbono pelos isolados do solo contaminado com petróleo, foi feita a extração do petróleo não consumido nos Erlenmeyers após 8 dias de cultivo, utilizando clorofórmio como solvente. A recuperação do petróleo nos Erlenmeyers foi feita através de extração líquido - líquido, sendo 15 mL de solvente para 50 mL de meio de cultivo. O petróleo com solvente foi separado em funil de separação, com papel filtro de gramatura 80, e após a evaporação total do solvente no papel filtro, foi feita a análise gravimétrica do petróleo recuperado. O peso médio de petróleo adicionado nos cultivos foi de 0,2488 g.

4.11 CULTIVO EM MEIO SÓLIDO PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE LIPASE

Para verificar a produção de lipase pelas cepas isoladas, foram realizados cultivos em meio sólido, em placas de Petri contendo o meio descrito por Kouker e Jaeger (1987), com algumas modificações: 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de carne, 4 g/L de NaCl e 10 g/L de ágar, para 1 litro de H_2O destilada. O meio foi ajustado para o pH 7,0 e autoclavado. Antes de solidificar, 10 mL de óleo de soja e 10 mL de solução de Rodamina B (0,001 %) foram adicionados ao Erlenmeyer e distribuído em placas de Petri estéreis. A produção de lipase foi confirmada pela presença de halos alaranjados ao redor das colônias, que apresentam coloração alaranjada fluorescente ao UV, após 48 h de incubação em estufa ajustada em 28 ± 2 °C.

4.12 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE

As cepas caracterizadas como produtoras de lipase foram cultivadas em meio mínimo de Vogel (1956) e submetidas ao ensaio espectrofotométrico baseado na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) utilizado como substrato, para determinação da atividade enzimática (WINKLER; STUCKMANN, 1979). Os isolados foram cultivados em frascos de Erlenmeyer, com 25 mL de meio de Vogel, em temperatura controlada de 28 ± 2 °C, por 5 dias a 180 rpm em câmara incubadora com agitação orbital. O cultivo foi centrifugado por 5 minutos a 9000 rpm, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade lipolítica.

O ensaio foi conduzido em banho Maria 50°C, por 15 minutos, e a liberação do *p*NPP foi determinada a 410 nm.

O volume final do ensaio enzimático foi de 1 mL (Tabela 2), e os reagentes utilizados na determinação da atividade da lipase foram previamente preparados. A Solução A continha 3 mg de *p*NPP para 1 mL de álcool isopropílico, e a Solução B continha 2g de Triton e 450 mL de tampão fosfato pH 8,0 a 0,05M.

Tabela 2 – Ensaio para determinação da atividade enzimática da lipase

	Solução A	Solução B	Água Destilada	Amostra	Volume final
Branco	90 µL	810 µL	100 µL	---	1000 µL
Amostra	90 µL	810 µL	---	100 µL	1000 µL

O coeficiente de extinção molar do *p*NPP ($\xi = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi usado para relacionar a concentração do produto com a absorvância líquida obtida na leitura. A unidade da atividade enzimática foi definida como liberação de 1µmol de *p*NPP/minuto/mL, de acordo com a equação abaixo:

$$U/\text{mL} = \text{Abs} / \xi \cdot \text{FD}/t, \text{ onde:}$$

Abs = Absorvância média da leitura da amostras

ξ = Coeficiente de extinção molar do pNPP ($\xi = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

t = Tempo de incubação (em minutos)

FD = Fator de diluição

4.13 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Os testes de produção de biossurfactante foram realizados segundo metodologia descrita por Chen e colaboradores (2007), com algumas modificações. O meio utilizado foi chamado meio Mínimo M9, e sua composição foi a seguinte: Na₂EDTA, 140 mM; ZnSO₄. 7 H₂O, 7.6 mM; MnSO₄. 4 H₂O, 25 mM; CuSO₄. 5 H₂O, 3.2 mM; (NH₄)₆Mo₇O₂₄. 4 H₂O, 0,9 mM; CoCl₂. 6 H₂O, 6.7 mM. A glicose, única fonte de carbono do meio foi esterilizada por filtração em filtro Millipore (0.22 μm), e adicionada ao meio M9 estéril a uma concentração de 0,2 % (v/v). O meio M9 foi distribuído (10 mL) em tubos de ensaio, e inoculado com 1 colônia dos isolados, provenientes do meio Mínimo sólido. Os tubos foram incubados a 28 ± 2 °C, 180 rpm por 48 horas. Após a incubação, o meio foi centrifugado por 30 minutos a 14000 rpm, e o sedimento descartado. O sobrenadante foi utilizado para determinar qualitativamente a produção de biossurfactante, que foi realizada adicionando-se 5 mL de sobrenadante com 5 mL de n-dodecano, em tubos de 25 mL com tampa de rosca, seguido de agitação em vórtex por 2 minutos.

A produção de biossurfactante foi determinada pela presença de uma emulsão nos tubos de ensaio 2 horas do após o tratamento de agitação descrito, com reavaliação das amostras 48 horas (após o tratamento de agitação). O índice de emulsificação foi calculado através da equação:

$$\text{Índice de emulsificação (\%)} = \text{He} / \text{Ht} \times 100, \text{ onde:}$$

He = altura da emulsão

Ht = altura total do líquido.

4.13.1 Avaliação do Índice de Estabilidade e Emulsificação do Biossurfactante em Diferentes Valores de pH e Temperaturas

Os ensaios de produção de biossurfactante foram submetidos a uma avaliação do índice de estabilidade e emulsificação, frente à variações de pH e temperatura. Após a emulsificação do meio de cultura M9, e avaliação da camada de emulsificação (em centímetros), cada tubo foi incubado em banho Maria por 5 minutos em diferentes temperaturas (35°C, 40°C, 45°C e 50°C), e o pH modificado para 5, 6, 8 e 9, com solução 1 M de NaOH e solução 0,5 M de HCl. A mudança do pH foi avaliada com fita indicadora, e após a incubação e modificação do pH a camada de emulsificação foi avaliada novamente, para a determinação do índice de estabilidade da emulsão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NATIVOS

A capacidade de utilização de petróleo como substrato é exibida por uma grande variedade de microrganismos. Chaillan e colaboradores (2004) isolaram 61 cepas, sendo 31 bactérias, 14 fungos filamentosos totais, 12 fungos filamentosos hidrocarbonoclásticos (microrganismos capazes de degradar óleo cru) e 4 actinomicetos de solos poluídos por petróleo na Indonésia, utilizando diferentes meios de cultivo com óleo cru (BAL 150) como fonte de carbono. A partir do solo contaminado das proximidades da Refinaria Getúlio Vargas, contaminado há 8 anos, foram isolados 45 microrganismos do solo contaminado com petróleo, a partir das placas de BDA, sendo que deste total, 20 (44,4%) foram classificadas como bactérias gram-positivas, 5 (11,1%) como bactérias gram-negativas, 6 (13,3%) actinomicetos e 14 (31,1%) dos isolados foram classificados como fungos filamentosos (Figura 5).

Embora a maioria dos estudos revelem que os sítios contaminados por petróleo são dominados por bactérias Gram-negativas (Roling et al., 2004), nosso experimento revelou um maior número de bactérias Gram positivas. Quatrini e colaboradores (2008) também encontraram em seu experimento uma fração dominante de microrganismos cultiváveis composta de bactérias Gram-positivas e actinomicetos do gênero *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Gordonia*.

Pela coloração de Gram, foi possível descrever a morfologia dos microrganismos, pois os que apresentaram a cor violeta (Gram positivos) foram classificados como sendo do tipo cocos, diplococos, tetracocos, estafilococos (cocos agrupados irregularmente) e estreptococos (cocos em cadeia). Os isolados que apresentaram a coloração rósea (Gram negativos), foram classificados morfologicamente como bacilos, pois têm forma de bastonetes, podendo ainda apresentar extremidades retas ou arredondadas.

Margesin, Hammerle e Tschërko (2007) isolaram duas bactérias e duas leveduras de solos contaminados com derivados de petróleo na Austrália,

utilizando meio mineral contendo óleo Diesel ou hexadecano como fonte de carbono, através da técnica de contagem de células viáveis. Ao isolar e identificar os representantes da população bacteriana autóctone de efluente petroquímico bruto e tratado, Barbosa, Caminha e Paz (2007) encontraram bacilos Gram-positivos, identificados como pertencentes ao gênero *Corynebacterium sp.*, cocos Gram-positivos identificados como *Staphylococcus sp.* e bactérias isoladas do efluente final identificadas como do gênero *Bacillus sp.*

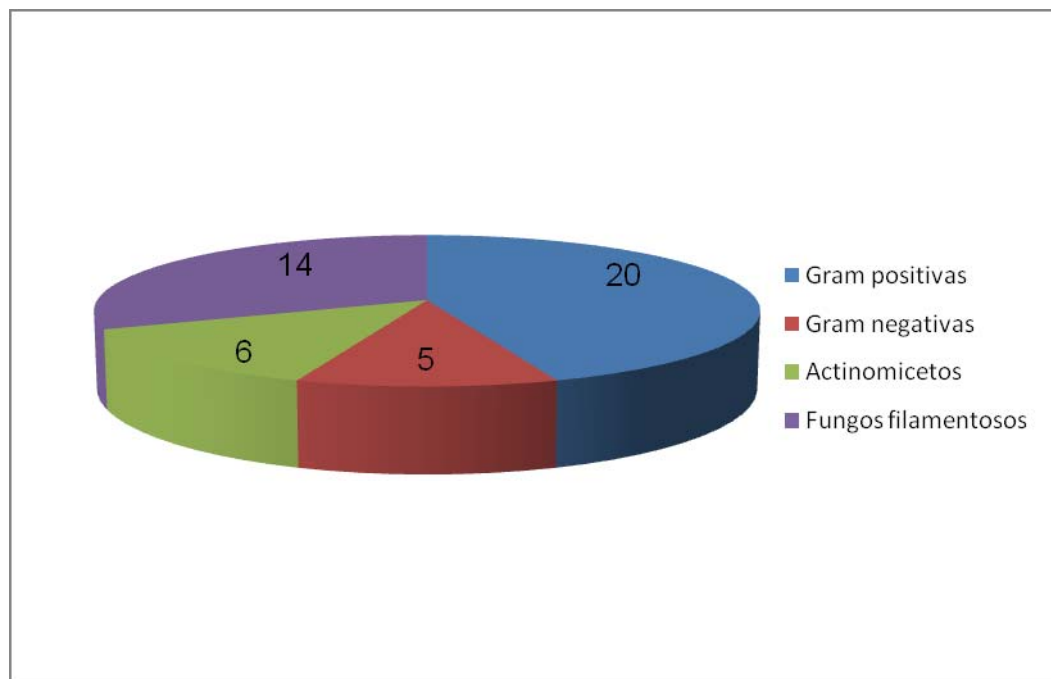


Figura 5 – Composição semi-quantitativa e quantitativa da comunidade microbiana total presente em solo contaminado por petróleo

5.2 ANÁLISES DE TAXONOMIA E DIVERSIDADE ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

Um total de 45 amostras foram testadas e avaliadas, e os tamanhos dos fragmentos variaram entre 250 a 5000 pares de base (Figura 6). Das 45 amostras de DNA testadas, 55,6% não foram amplificadas pelo *primer* M13, 57,8% pelo *primer* P2, e 62,3% não foram amplificadas pelo *primer* P3. Esse fato deve-se certamente a qualidade do DNA submetido a análise de RAPD, ou a quantidade

utilizada na técnica, pois as amostras que não foram amplificadas são as mesmas para os três *primers*. O estudo foi conduzido com apenas 25 isolados bacterianos, dos 45 que foram isolados, visto que a extração de DNA de fungos e actinomicetos não se mostrou eficiente.

A extração do DNA e a amplificação do RNA ribossomal são as principais limitações metodológicas para estudos genéticos de microrganismos, que permita o uso com sucesso dos produtos da amplificação em reações de sequenciamento e em métodos moleculares comparativos. No caso de fungos crescidos em meios de cultura, a maioria das espécies possui uma grande quantidade de polissacarídeos, que podem ser co-extraídos, gerando impurezas na molécula e interferências na reação de amplificação. O processo de extração também não é tão simples quanto o de bactérias, pois alguns fungos formam estruturas rígidas de resistência e esporos difíceis de serem lisados durante a extração, o que gera, na maioria das vezes, a fragmentação ou a degradação do DNA e perda da qualidade da molécula (OLIVEIRA et al., 2005). Por esse motivo, a extração foi otimizada e padronizada para as condições do laboratório, com boa reprodutibilidade.

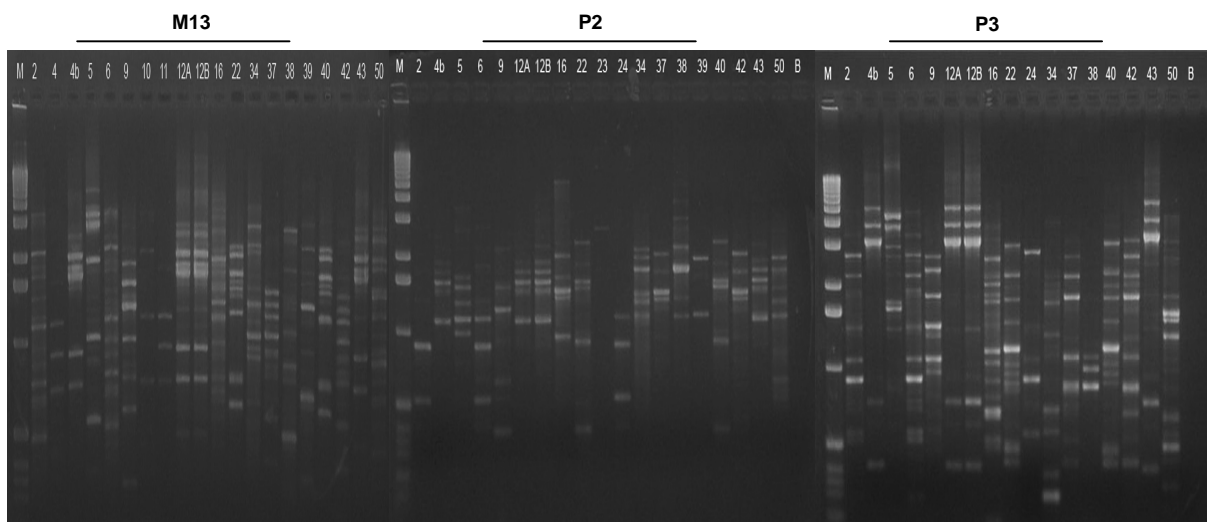


Figura 6 – Perfil de gel de RAPD utilizando os primers M13, P2 e P3

Segundo Hadrys, Balick e Schierwater (1992), as tecnologias mais comuns para análise de DNA se diferem pela complexidade dos processos tecnológicos, quantidade necessária de DNA, seqüência de informações necessárias de acordo com o que está sendo analisado, tempo de execução e amplitude das aplicações. Neste contexto, os marcadores de RAPD parecem susceptíveis de ter grande potencial para aplicações em engenharia molecular e ecologia, e exigem menos em tecnologia, trabalho e despesas.

A análise dos resultados de RAPD resultou em um dendograma UPGMA, como demonstrado na Figura 7. No dendograma é possível visualizar 3 grupos distintos, sendo que o grupo 1 possui 4 amostras, o grupo 2 possui 7 amostras, e o grupo 3 possui 10 amostras. Para a interpretação do dendograma, deve-se levar em consideração que quanto maior a proximidade entre as medidas relativas às amostras, maior a similaridade entre elas.

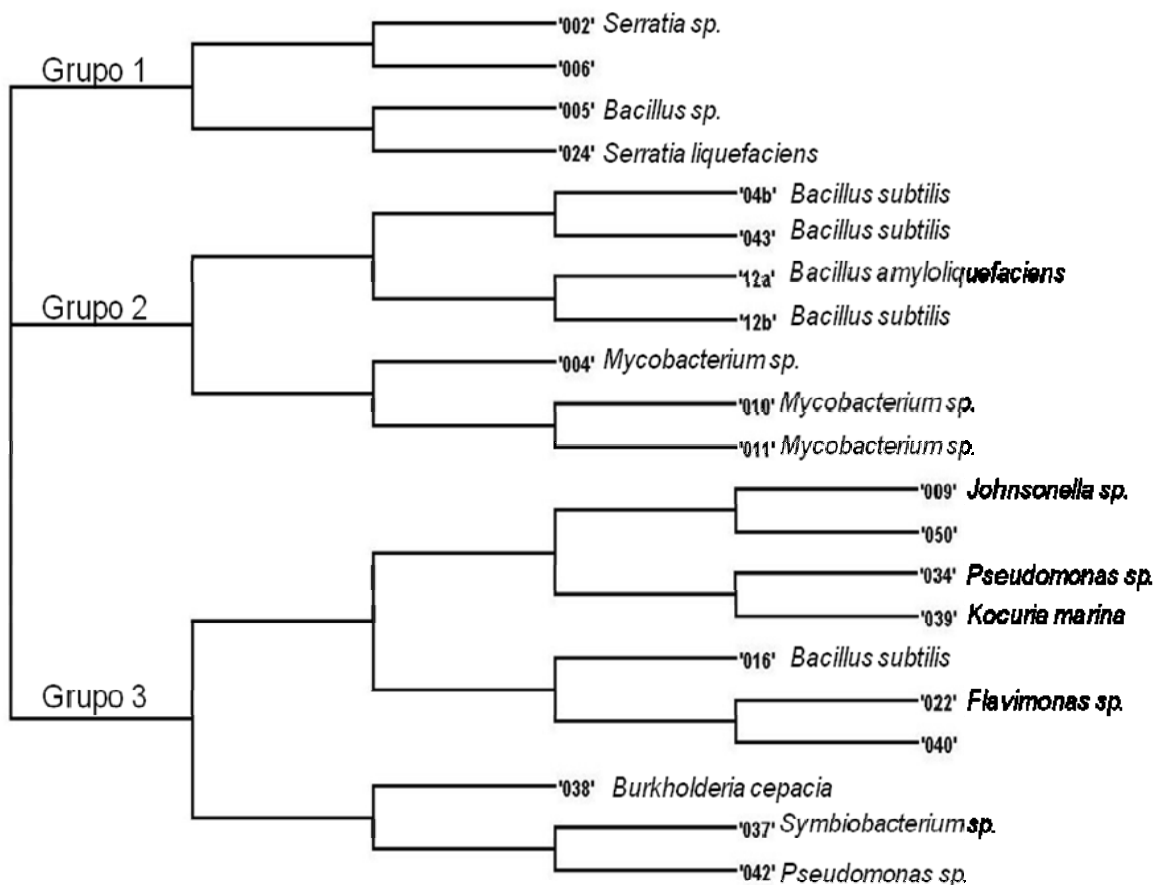


Figura 7 – Dendograma formado a partir dos resultados de RAPD baseado no método UPGMA

Foram utilizados para análise da identidade dos fragmentos seqüenciados, arquivos do banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Vinte e dois isolados bacterianos foram seqüenciados, e suas sequências alinhadas com sequências já depositadas nesse banco de dados, através do programa Blastn, onde foi possível identificar o gênero e a espécie a que pertenciam.

Os isolados 12A, 12B, e 4B, que possuem capacidade de consumir o petróleo e com atividade biossurfactante foram classificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* (Figura 7). Essas bactérias são tidas como degradadoras dos metabólitos secundários produzidos por microrganismos que iniciam o processo de biotransformação dos hidrocarbonetos (DuTEAU et al., 1998). A produção de biossurfactante relacionada ao gênero *Bacillus* deve-se ao fato que, através da síntese de surfactantes, tais bactérias conseguem emulsificar o petróleo, tornando-o mais acessível ao consumo (BARATHI; VASUDEVAN, 2001). Deste modo, outros microrganismos iniciam o processo de degradação, enquanto os *Bacillus* sobrevivem dos produtos metabólicos formados por estes microrganismos.

Vasconcellos (2006), ao isolar e caracterizar microrganismos através do 16S rDNA de águas de formação de petróleo, constatou que, dos 28 isolados, 19 pertenciam ao gênero *Bacillus*. Huertas e colaboradores (2000) relataram que quando uma grande dose de tolueno (10% m/v) foi adicionada ao solo, para avaliação da tolerância microbiana a choques repentinos de solventes derivados de petróleo, apenas 1% das bactérias indígenas do solo sobreviveram e, posteriormente, re-colonizaram o solo em altas densidades. Vários dos isolados que sobreviveram foram posteriormente identificados através de seqüenciamento do fragmento de 16S rDNA como sendo pertencentes ao gênero *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas sp.*, e representantes de outros gêneros (*Rhodococcus* e *Ralstonia*) foram isolados em bioreator de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, por Stapleton e Sayler, (2000), e identificados através da análise das sequências do fragmento do gene 16S rDNA.

5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NA PRESENÇA DE PETRÓLEO BRUTO

Muitos estudos apontam a taxa de consumo de petróleo por microrganismos através de análises cromatográficas. Porém a análise gravimétrica nos forneceu bons parâmetros de comparação, relatando quantitativamente o petróleo consumido pelos isolados, mesmo sendo uma análise questionável, pela sutileza nas diferenças de pesagens. Dott e colaboradores (1989), ao utilizar um consórcio bacteriano comercial para a degradação de petróleo em meio líquido, analisaram por cromatografia o consumo de 24 a 64 % do petróleo adicionado ao inóculo. Em estudo similar, conduzido por Walker e Colwell (1974), o fungo *Cladosporium resinae*, isolado na Baía de Chesapeake, um estuário americano, foi responsável por consumir 40 % do petróleo do inóculo, em temperatura de incubação de 10 °C. Dos 45 microrganismos isolados do solo contaminado, três apresentaram elevada capacidade de utilizar o petróleo como fonte de carbono contido no frasco de Erlenmeyer, apresentando 77,3%, 62,9% e 66,1% de utilização de petróleo (MO 12A, MO 12B e MO 4B, respectivamente). Outros três isolados apresentaram moderada capacidade de utilizar o petróleo, consumindo 55,9%, 28% e 36,3% (MO 1, MO 8B e MO 10 respectivamente, Figura 8). Os 39 microrganismos restantes não apresentaram nenhum efeito sobre o petróleo adicionado ao meio de cultivo.

Considerando-se que para ocorrer a degradação a massa de petróleo recuperada deve ser igual ou inferior a 0,1687g (massa média de petróleo recuperado dos controles), os microrganismos que apresentaram massa média de recuperação acima deste valor foram eliminados das etapas seguintes. A recuperação de menos de 40% do óleo adicionado foi interpretada como um elevado potencial de utilização do óleo; a recuperação de maiores quantidades de óleo foi considerada como moderado a baixo potencial de utilização do óleo pelos isolados testados.

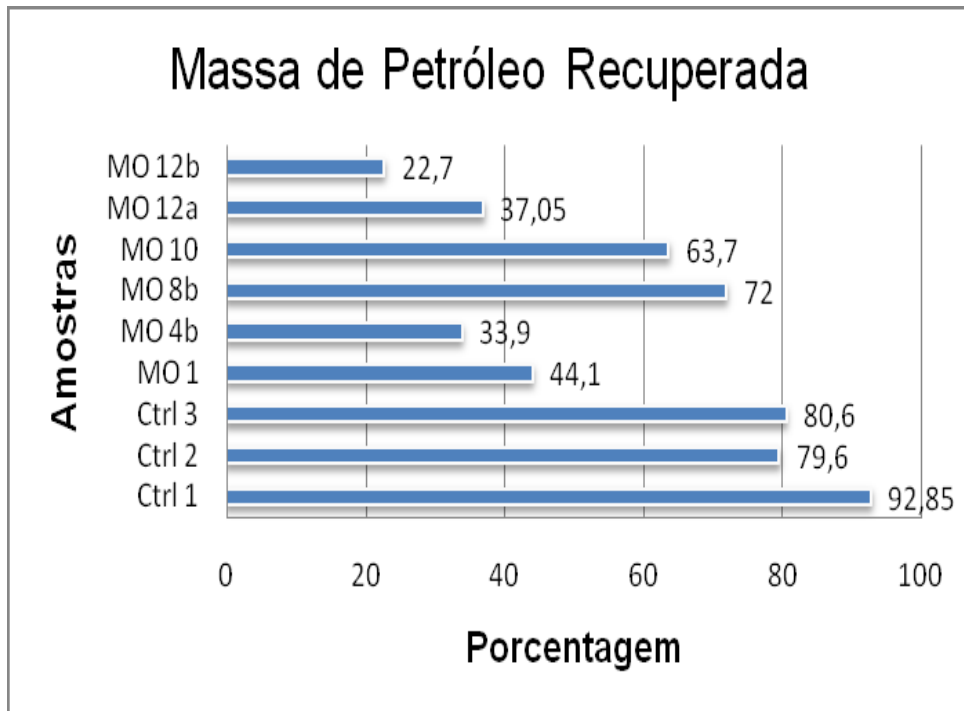


Figura 8 – Avaliação da capacidade de consumo de petróleo por diferentes isolados obtidos a partir de solo contaminado por petróleo

Em pesquisa realizada por Venkateswaram e Harayama (1995), através do cultivo e enriquecimento do solo, foi isolada uma população bacteriana capaz de degradar petróleo, sendo que 28-51% do composto foi consumido por uma cultura mista. Porém, quando as culturas foram estudadas puras, nenhuma delas apresentou melhor degradação do que quando estavam em consórcio. As espécies isoladas foram *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Moraxella sp.*, *Sphingobacterium sp.* e *Ochrobactrum sp.* Em nossos experimentos, determinou-se que os isolados 12A, 12B e 4B, consumiram quantidades relativamente consideráveis de petróleo, sendo que o isolado 12B consumiu aproximadamente 77,3 % do petróleo do cultivo.

Grishchenkov e colaboradores (2000) utilizaram cepas de *Pseudomonas sp.* e *Brevibacillus sp.*, isoladas de solo contaminado por petróleo, com capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo em condições aeróbias e anaeróbias. Em condições aeróbias (10 dias de experimento em meio líquido) as cepas degradaram 20-25% do total de materiais extraíveis (TEM), incluindo até 90-95% de todos os alcanos analisados por cromatografia gasosa (n-C₁₀-C₃₅). Sob

condições anaeróbicas (50 dias de experimento), estes organismos degradaram 15-18% do TEM, e 20-25% de alguns alcanos.

5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO EM MEIO SÓLIDO E DOSAGEM DA ATIVIDADE DE LIPASE

Os testes para produção de lipase foram realizados com os microrganismos que apresentaram capacidade de degradação do petróleo, e somente os isolados 4B, 12A e 12B apresentaram halo fluorescente envolvendo a colônia, quando visualizada em câmara ultravioleta.

Para determinação da atividade de lipase, somente os microrganismos que demonstraram ser produtores de lipase foram submetidos aos testes de atividade.

A rotação do cultivo em agitador orbital foi pré-estabelecida para 180 rpm, pois acredita-se que a aerações lentas promovem uma melhor atividade enzimática. Segundo Alonso e colaboradores (2005), em estudo para padronização da atividade ótima da lipase em diferentes níveis de oxigênio e velocidades de incubação, a atividade da enzima e o crescimento celular foram reduzidos quando o cultivo foi realizado em 400 rpm e 300 rpm (0,830U/mL e 2,39 U/mL, respectivamente), em razão do stress mecânico e oxidativo causado pela alta rotação. No mesmo estudo, a lipase obteve atividade ótima e maior crescimento celular quando o cultivo foi incubado a 200 rpm, com 6,25 U/mL e 8,7g de biomassa seca/L. Nos nossos estudos, o isolado 12A teve uma atividade de 0,211 U/mL, o isolado 12B teve 0,100 U/m L e o isolado 4B, 0,948 U/mL de atividade.

5.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Sabe-se que bactérias capazes de consumir hidrocarbonetos do petróleo por vezes podem produzir biossurfactantes, que melhoram a solubilidade dos compostos hidrofóbicos e assim, sua biodegradabilidade. Os isolados

selecionados foram examinados quanto a capacidade de produzir biossurfactantes, e apenas 3 dos 6 microrganismos que utilizaram o petróleo como fonte de carbono produziram uma emulsão estável, sendo que a cepa 4B atingiu maior índice de produção (Figura 9).

Após 48 horas calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada (He) e altura total (Ht). O teste do Índice de Emulsificação foi conduzido em triplicatas e os resultados estão na Tabela 3. De acordo com estudos obtidos por Soares e colaboradores (2003), a produção de biossurfactante por uma cepa de *Acinetobacter iwoffii* atingiu resultados satisfatórios quando cultivada em meio contendo glicerol como substrato. No mesmo estudo, quando os cultivos com etanol foram avaliados, o resultado foi razoável, e os cultivos em querosene foram insatisfatório, ou seja, não apresentaram atividade surfactante.

Tabela 3 – Índice de Estabilidade e Emulsificação do biossurfactante produzido pelas isolados MO12A, MO12B e MO4B

Isolado	Tempo 1 – 2 horas (He/Ht)	Tempo 2 – 48 horas (He/Ht)
MO 12A	9,93 %	0,73 %
MO 12B	3,54 %	2,85 %
MO 4B	26,08 %	24,19 %

Segundo Sampaio (1995) existe uma grande quantidade de microrganismos com a capacidade de degradar e/ou assimilar hidrocarbonetos. Desse número de microrganismos, alguns também são capazes de emulsificar esses hidrocarbonetos durante o processo da degradação do substrato. Microrganismos que assimilam petróleo ou derivados são comumente encontrados em locais onde ocorreu alguma contaminação, ou em áreas que historicamente têm sido expostas a algum tipo de hidrocarboneto. Broderick e Cooney (1982) relataram que 96% das bactérias isoladas de lagos de água doce que utilizam hidrocarbonetos foram capazes de emulsionar querosene, e observaram também que culturas mistas

de organismos marinhos e do solo, que eficazmente degradam óleo cru, também exibem forte atividade emulsificante.

Em estudo conduzido por Martins, Kalil e Costa (2008), sobre a utilização de microrganismos fermentados em estado sólido para degradação de óleos vegetais e hidrocarbonetos, quando a produção de biossurfactante foi relacionada com a produção de lipase, foi verificado que os valores encontrados não demonstraram uma tendência de aumento ou decréscimo das atividades emulsificantes. As atividades lipolíticas encontradas no suporte inerte apresentaram resultados muito inferiores aos encontrados para o suporte complexo, porém foram encontradas atividades emulsificantes água/óleo e óleo/água em ambos suportes. Em nossos resultados a amostra 4B produziu biossurfactante em quantidades superiores aos outros isolados, e também demonstrou ser produtora de lipase.

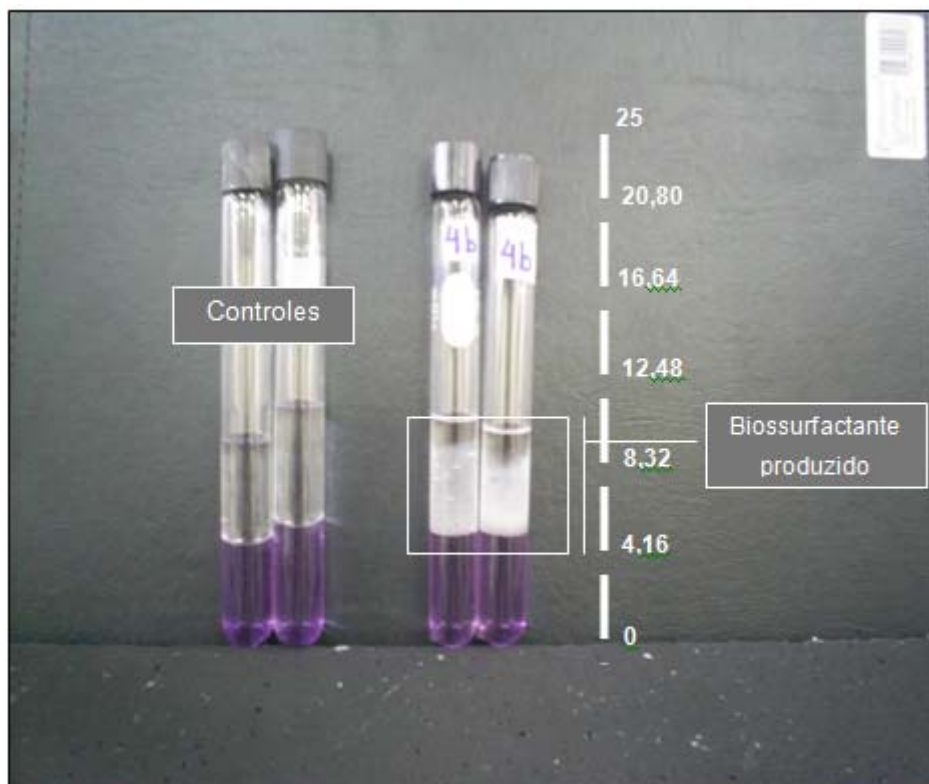


Figura 9 – Produção de biossurfactante pela cepa 4B. Linha tracejada corresponde a escala aproximada (cm).

Joo e colaboradores (2008) isolaram sete microrganismos de solo contaminado, que foram cultivados em meio contendo óleo diesel. Quatro amostras apresentaram significativamente maior eficiência de degradação de hidrocarbonetos de cadeia longa. O índice de remoção n-hexadecano, o componente mais abundante do petróleo, foi em média de 60% em 4 culturas, e mais de 40% em 2 culturas. A amostra que degradou menos mostrou uma remoção máxima de 45%. Esta amostra apresentou uma alta de atividade emulsificante, porém esta atividade não se traduz em uma alta remoção do petróleo. Foi observado também que quanto menor a cadeia de hidrocarbonetos de petróleo, mais eficaz a degradação. Barathi e Vasudevan (2001) utilizaram uma cepa de *Pseudomonas fluorescens* isolada de um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e observaram a produção de biossurfactante durante a degradação de n-alcanos, principalmente o hexadecano, seguido do hexano, decano, querosene e óleo cru.

5.5.1 Avaliação do Índice de Estabilidade e Emulsificação do Biossurfactante em Diferentes Valores de pH e Temperaturas

Vários biossurfactantes e sua atividade de superfície não são afetados por condições ambientais como temperatura e pH. McInerney e colaboradores (1990) relataram que o bioemulsificante produzido por uma cepa de *Bacillus licheniformis* não foi afetado pelo aumento da temperatura (para até 50 °C), variações de pH (4,5 a 9,0). Uma cepa psicotrófica isolada da Antártida, de *Arthrobacter protophormiae* produziu um biossurfactante termoestável na faixa de 30 °C a 100 °C, e estável a valores de pH de 2 a 12 (PRUTHI; CAMEOTRA, 1997).

O pH do emulsificante produzido, antes dos testes foi de 7,0. Os testes relataram a queda do índice de estabilidade e emulsificação em pH 5,0 e 6,0, e uma sensível diminuição em pH 8,0 e 9,0, para todas as amostras, sendo que o isolado 4B obteve uma queda maior do índice, de 45 % para 35%. Os índices de emulsificação foram calculados após 2 horas da adição do n-dodecano e agitação em vórtex por 2 minutos (Figura 10). Em função da total desestabilização do emulsificante em pH ácido, os dados não foram demonstrados na figura.

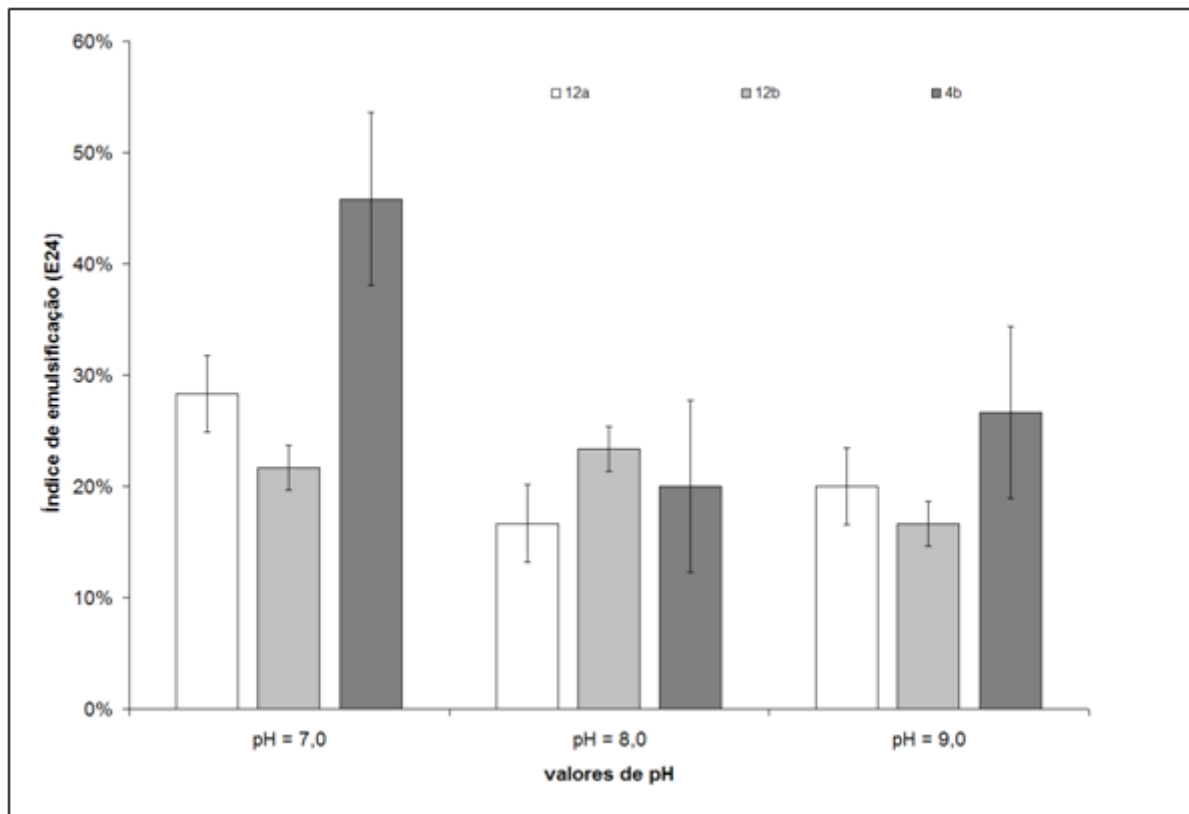


Figura 10 – Índice de Estabilidade e Emulsificação dos biossurfactantes produzidos pelos microrganismos 12A, 12B e 4B, em diferentes valores de pH

Quando submetidos à diferentes temperaturas, os biossurfactantes apresentaram pouca variação no índice de estabilidade e emulsificação. As emulsões produzidas pelas cepas 12A, 12B se mantiveram relativamente estáveis, e o isolado 4B sofreu uma queda no índice de 30% para 16,6, % (Figura 11). Para Nitschke e Pastore (2002), uma emulsão produzida pela cepa de *B. licheniformis* JF-2 permaneceu estável a temperaturas em torno de 75 °C por até 140 h e pH entre 6 e 11.

É importante ressaltar que o valor máximo da atividade emulsificante foi determinado com relação à presença do biossurfactante no sobrenadante do cultivo, isto é, a substância biossurfactante não foi ainda isolada e purificada, portanto tais índices tendem a aumentar após estas etapas.

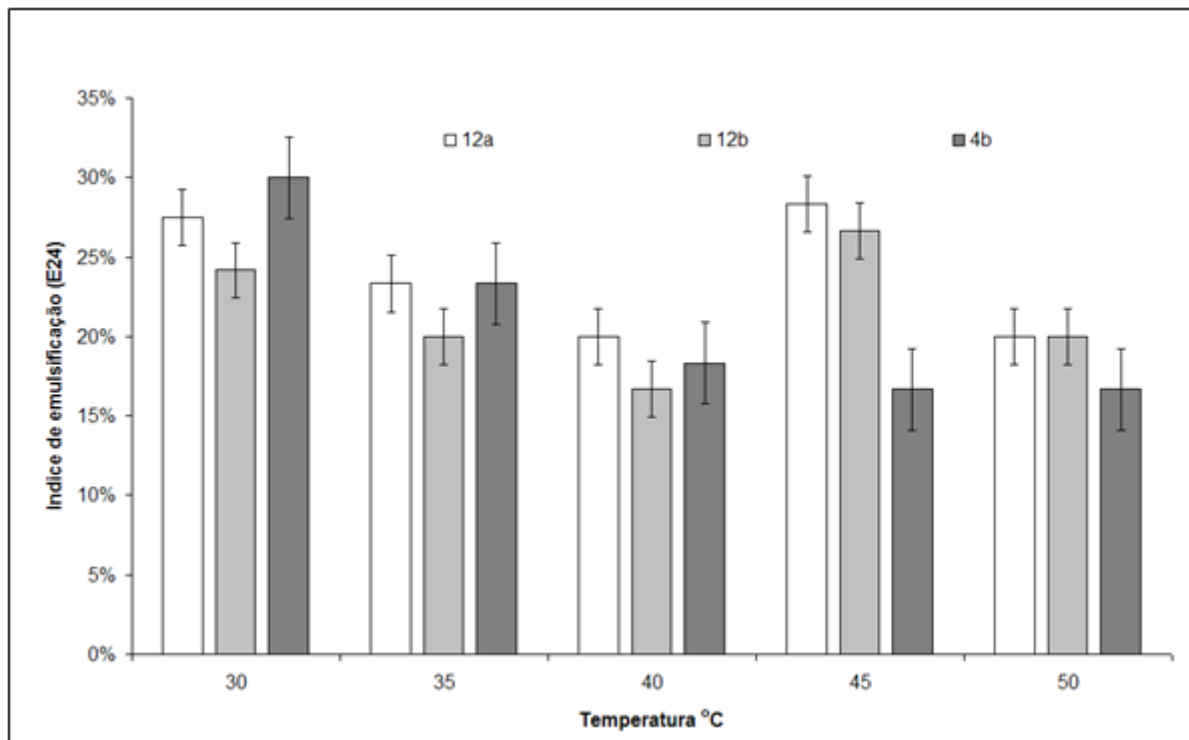


Figura 11 – Índice de Estabilidade e Emulsificação dos biossurfactantes produzidos pelos microrganismos 12A, 12B e 4B, em diferentes temperaturas

Para a remoção de óleo derramado pelo navio “Exxon Valdez”, no Alaska, foi utilizado biossurfactante produzido a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados demonstraram que o bioemulsificante se tornou mais efetivo na remoção do óleo na temperatura de 50 °C. Além da melhoria quantitativa na remoção, o biossurfactante não apresentou toxicidade e promoveu uma maior biodegradabilidade ao ser aquecido (HARVEY et al., 1990).

Os processos industriais frequentemente envolvem a exposição dos surfactantes a temperaturas extremas, pressão, pH e força iônica, portanto, há uma contínua necessidade de isolar microrganismos que produzam emulsões capazes de funcionar sob estas condições (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Segundo Nitschke e Costa (2007), a produção de surfactantes a partir de microrganismos extremófilos ganhou a atenção dos pesquisadores nos últimos anos, uma vez que as propriedades únicas destes compostos são consideradas de interesse comercial.

CONCLUSÕES

- Através das análises moleculares, pode-se sugerir uma alta diversidade intergenérica no solo contaminado, com baixo número de espécies;
- Concluir que os isolados com maior capacidade de utilização de petróleo como fonte de carbono são pertencentes ao gênero *Bacillus sp.*, confirmando as análises morfológicas e bioquímicas;
- A extração de DNA deve ser otimizada para todos os grupos microbianos encontrados, pois a reação de PCR não foi abrangente a todos os isolados;
- Os isolados 12A, 12B e 4B, que utilizaram o petróleo como fonte de carbono produziram boas quantidades de biossurfactante, com índices de emulsificação de 9,935 %, 3,546 % e 26,087 %, e lipase, com 0,211 U/mL, 0,100U/mL e 0,948 U/mL de atividade, respectivamente; verifica-se a viabilidade da aplicação biotecnológica destes isolados bacterianos em estudos de biorremediação, visto que mostraram-se com elevado potencial de degradação de petróleo;
- Mesmo com a produção de biossurfactante e lipase entre os isolados 12A, 12B e 4B, verificou-se a ausência de correlação entre a capacidade de utilização de petróleo nos ensaios *in vitro*, indicando que não são parâmetros eficientes para a seleção de microrganismos com potencial de degradação de petróleo.

REFERÊNCIAS

- AISLABIE, J.; SAUL, D.J.; FOGHT, J.M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soil. **Extremophiles**, v. 10, p. 171-179, 2006.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 3.ed. New York: Garland Publishing, 1994. p. 1294 – 1301.
- ALONSO, F.O.M.; OLIVEIRA, E.B.L.; DELLAMORA-ORTIZ, G.M.; PEREIRA-MEIRELLES, F.V. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 9-18, 2005.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v.25, p. 3389-3402, 1997.
- AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE - API. Publication N° 4627. **Health and Environmental Sciences Department**, 139p, 1995.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Anuário estatístico 2008**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/petro/dados_estatisticos.asp>. Acesso em: 17 nov. 2008.
- ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiology Reviews**, v.45, p.180–209, 1981.
- ATLAS, R.M. Bioremediation. **Chemical Engineering News**, v. 73, p. 32-42, 1995.
- AUTRY, A.R.; ELLIS, G.M., Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Environmental Progress**, v. 11, p. 318-323, 1992.
- BANAT, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal – state of art. **Acta Biotechnol.**, v. 15, p. 251-267, 1995.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495 – 508, 2000.
- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, v. 26, p. 413-416, 2001.
- BARBOSA, S.P.P.; CAMINHA, M.C.C.; PAZ, M.C.F. Identificação da microbiota bacteriana autóctone de efluentes petroquímicos no município de Fortaleza. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2., João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: [s.l.], 2007.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 34, p. 133-153, 2000.

BENTO, F.M.; OLIVEIRA, F.A.C.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER Jr., W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiology Resource**, v.160, p. 249–255. 2005.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BRODERICK, L. S.; COONEY, J. J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. **Developments in Industrial Microbiology**, v.23, p. 425-434, 1982.

BUSHNELL, L.D., HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, p. 653 – 673, 1941.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520 - 529, 1998.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262–266, 2004.

CARMICHAEL, L.M.; PFAENDER, F.K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. **Biodegradation**, v.8, p. 1–13, 1997.

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

CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAYONG, Y.; GRIMONT, P.; SAILOT, A.; OUDOT, J. Identification and Biodegradation Potential of tropical Hydrocarbon- Degrading Microorganisms. **Research Microbiology**, v.155, p. 587 – 595, 2004.

CHEN, C.; BAKER, S.C.; DARTON, R.C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **Journal of Microbiological Methods**, v.70, p. 503-510, 2007.

COLLA, L.; COSTA, J. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **VETOR: Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v.13, p.85-103, 2007.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Investigação para Remediação - Capítulo X**, Projeto CETESB – GTZ. São Paulo: CETESB, 2007.

CONCAWE. Sludge Farming: a technique for the disposal of oily refinery wastes. **Concawe Report**, 3: 80, The Hague: 95p., 1980.

CONCEIÇÃO, D. E.; RIZZO, A. C. L.; CUNHA, C. D. da. Avaliação do uso de produtos comerciais no processo de Biodegradação de petróleo em solo. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2003.

COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**. v. 3, p. 145-149, 1986.

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

DAHLLÖF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.213–217, 2002.

DE PAULA, A.M.; SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.448–455, 2006.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology: Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHAM.; CARRIÉRE, F.; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

DONG-HUN, L.; SUNG-AE, N.; CHI-KYUNG, K. Development of molecular biological methods to analyze bacterial species diversity in freshwater and soil ecosystems. **The Journal of Microbiology**, v. 38, p.11-17, 2000.

DOTT, W.; FEIDIEKER, D.; KÄMPFER, P.; SCHLEIBINGER, H.; STRECHEL, S. Comparison of autochthonous bacteria and commercially available cultures with respect to their effectiveness in fuel oil degradation. **Journal of Industrial Microbiology**, v.4, p. 365 – 373, 1989.

DuTEAU, N.M.; ROGERS, J.D.; BARTHOLOMAY, C.T.; REARDON, K.F. Species-specific oligonucleotides for enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia sp.* strain JS150, and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 in biodegradation experiments. **Applied Environ Microbiology**, v.12, p. 4994–4999, 1998.

EVANS, K.A.; DUBEY, S.T.; KRAVETZ, L., EVETTS, S.W.; DZIDIC, I.; DOOYEMA, C.C. Quantitation of alcohol ethoxylate surfactants in environmental samples by electrospray mass spectrometry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, 1997.

EYERS, L.; GEORGE, I.; SCHULER, L.; STENUIT, B.; AGATHOS, S. N.; EL FANTROUSSI, S. Environmental genomics: exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 123-130, 2004.

FESSEHAIE, A.; DE BOER, S.H.; LEVESQUE, C.A. An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. **Phytopathology**, v.93, p.262-269, 2003.

FIGUEIREDO, J.E.F.; DE-PAOLI, H.C.; QUINTÃO, P. L.; COELHO, V.T.S.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; BRESSAN, W.; GUIMARÃES, C.T. ; GOMES, E.A. Caracterização molecular de microrganismos do ecossistema agrícola do cerrado: *Colletotrichum graminicola*. **Comunicado Técnico - Embrapa CNPMS**, v. 68, p. 1-10, 2003.

FILLER, D. M.; LINDSTROM, J. E.; BRADDOCK, J. F.; JOHNSON, R. A.; NICKALASKI, R. Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic. **Cold Regions Science and Technology** , v. 32, p.143-156, 2001.

FORESTI M.L.; FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification. **Enzyme Microbiol. Technol.**, 2006.

FULTHORPE, R. R.; RHODES, A. N.; TIEDJE, J. M. High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1620–1627, 1998.

GOSWAMI, P. e SINGH, H. D. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 1-11, 1991.

GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M.; DI SERI, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Identification of Azospirillum strains by restriction fragment length polymorphisms 16S DNAr and of the histidine operon. **FEMS Microbiological Letters**, v. 127, p.85 – 91, 1995.

GRISHCHENKOV, V.G.; TOWNSEND, R.T.; McDONALD, T.J.; R.L. AUTENRIETH, R.L.; BONNER, J.S.; BORONIN, A.M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. **Process Biochemistry** , v.35, p. 889–896, 2000.

GUIMARÃES, C. H. D. Avaliação de Risco Ambiental de Sítios Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro: UFRJ, 2003.

GUO, Z; XU, X. New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.3, p. 2615–2619, 2005.

HADRYIS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, v.1, p. 55-63, 1992.

HANBO, Z.; CHANGQUN, D.; QIYONG, S.; WEIMIN, R.; TAO, S.; LIZHONG, C.; ZHIWEI, Z.; BIN, H. Genetic and physiological diversity of phylogenetically and

geographically distinct groups of *Arthrobacter* isolated from lead-zinc mine tailings. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 333-341, 2004.

HARVEY, S.; ELASHVILLI, I.; VALDES, J. J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by microbial surfactant. **Biotechnology**, v. 8, p. 228-230, 1990.

HOY, M.A. **California: insect molecular genetics**. San Diego: Academic Press, p.203-240,1994.

HUERTAS, M.J.; DUQUE, E.; MOLINA, L.; ROSELLO-MORA, R., MOSQUEDA, G.; GODOY, P.; CHRISTENSEN, B.; MOLIN, S., RAMOS, J.L. Tolerance to sudden organic solvent shocks by soil bacteria and characterization of *Pseudomonas putida* strains isolated from toluene polluted sites. **Environmental Science Technology**. v.34, p. 3395 – 3400, 2000.

HUY, N. Q.; JIN, S.; AMADA, K.; HARUKI, M., HUU, N.; HANG, D. T.; HÁ, D. T. C.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88, p. 100-102, 1999.

INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactants of MEL – A increase gene transfection mediated by cationic liposomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 57-61, 2001.

JAEGER, K.E.; RANASK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **EMS Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 390–397, 2002.

JASPER, D.A. Bioremediation of agricultural and forestry soils with symbiotic microorganisms. **Australian Journal of Soil Research**, v.32, p. 1301 – 1319, 1994.

JOO, H. S.; NDEGWA, P. M.; SHODA, M.; PHAE, C.G. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. **Environmental Pollution**, v.156, p.891–896, 2008.

JUNCA, H.; PIEPER, D. H. Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. **Environmental Microbiology**, v.6, p. 95-110, 2004.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, n. 58, p.169– 188, 2004.

KLEIN.G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.2, p.103-125, 1998.

KOUKER G.; JAEGER, K. E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 211-213, 1987.

LANG, S.; WAGNER, F. **Biosurfactants**: production, properties, applications. 2. ed. New York: Marcel Decker, 1993.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipds – biosynthesis, microbial production and application potencial. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LEADBETTER, J.R. Cultivation of recalcitrant microbes: Cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st. century laboratory. **Current Opin. Microbiol.** v.6, p.274-281, 2003.

LIEBEG, E. W.; CUTRIGHT, T. J. The investigation of enhanced bioremediation thought the addition of macro and micro nutrients in PAH contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.44, p. 55-64, 1999.

LI, J.; SUN, T.; STAGNITTI, F.; ZHANG, C.; ZHANG, H.; XIONG, X.; ALLISON, G.; MA, X.; ALLISON, M. Field-scale bioremediation of soil contaminated with crude oil. **Environmental Engeneering Science**, v. 19, n. 5, p. 277-289, 2002.

LIU, W.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.4516-4522, 1997.

LOPES,R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.D.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência**, v. 29, p. 56-60, 2002.

LUDWIG, W.; SCHLEIFLER, K.W. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiological Review**, v. 15, p. 155-173, 1994.

MACEDO, R.C.; BERBERT, V.H.C.; LEMOS, J.L.S.; TRINDADE, P.V.O.; RIZZO, A.C.L. **Biorremediação de Solos Impactados por Óleo Cru Utilizando Fungos Filamentosos.** Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_X_jic_2002/Victor.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2009.

MAIDAK, B. L.; OLSEN, G.J.; LARSEN, N.; OVERBEEK, R.; McCAUGHEY, M. J.; WOESE, C.R. The RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 109-111, 1997.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. **Advances Applied Microbiology**, USA: Academic Press. v. 52, p. 101-121, 2003.

MANCERA-LOPEZ, M. E.; ESPAZA-GARCIA, F.; CHAVEZ-GOMEZ, B.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; BARRERA-CORTES, J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of

biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 61, p. 151-160, 2008.

MARCHESI, J. R.; TAKUICHI, S.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S.J.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied And Environmental Microbiology**, v.64, p.2333-2338, 1998.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Soil lipase activity - a useful indicator of oil biodegradation. **Biotechnology Techniques**, v.13, p. 859–863, 1999.

MARGESIN, R.; HÄMMERLE, M.; TSCHERKO, D. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 259-269, 2007.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista: UNESP, 2006.

MARIN, J. A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Biorremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. **Environmental Research**, v.98, n.2, p.185-195, 2004.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, n. 8, p. 1942-1947, 2008.

MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Advances in Environmental Research**, v.7, n.4, p.881-887, 2003.

MICHEL, J.; REINHARZ, E. Preassessment phase guidance document. National oceanic e atmospheric administration. **Office of General Counsel Damage Assessment Regulations Team**. 1994.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C. UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

NAMKOONG, W.; HWANG, E.; PARK, J.; CHOI, J. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. **Environmental Pollution**, v.119, p. 23-31, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n.5, 2002.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science eTechnology**, v.18, p. 252 – 259, 2007.

NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p. 396 – 405, 2006.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; GOMES, E. A.; LANNA, U. G. P.; SA, N. M. H.; MARRIEL, I. E. **Otimização da metodologia de extração e amplificação do DNA de fungos do solo**. Memória Técnica (Embrapa Milho e Sorgo), 2005.

OKOH, A. I.; TREJO-HERNANDEZ, M. R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: Exploiting the bioremediation strategies. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2520-2525, 2006.

PEREZ-ARMENDARIZ, B.; LOERA-CORRAL, O.; FERNANDEZ-LINARES, L.; ESPARZA-GARCIA, F.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R. Biostimulation of microorganisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 373-377, 2004.

PICARD, C.; PONSONNET, C.; PAGET, E.; NESME, X.; SIMONET, P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2717-2722, 1992.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v.11, p.671 – 674, 1997.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Production, properties of a biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae* e an Antarctic strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.137 – 139, 1997.

QUATRINI, P.; G. SCAGLIONE, G.; DE PASQUALE, C.; RIELA, S.; PUGLIA, A.M. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 251–259, 2008.

RAHOMA, S. M. **A fração pesada de petróleo e gás natural: propriedades e implicações**. Dissertação (Tese de Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**, version 2.1. New York: Exeter Software, 2000.

ROLING, W.F.; MILNER, M.G.; JONES, D.M.; FRATEPIETRO, F.; SWANNEL, R.P.; DANIEL, F. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a fieldscale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 2603–2613, 2004.

ROSENBERG, E.; LEGMANN, R.; KUSHMARO, A.; TAUBE, R.; ADLER, E.; RON, E.Z. Petroleum bioremediation - a multiphase problem. **Biodegradation**, v. 3, p. 337, 1992.

ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbons – new markets. **Trends in Biotechnology**, v.11, p.419-424, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SAMPAIO, R. M. **Estudo da produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por fermentação em óleo-diesel comercial**. Campinas - Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1995.

SARKAR, D.; FERGUSON M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136, p. 187-195, 2005.

STAPLETON, R.D.; SAYLER, G.S. Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. **Microbial Ecology**. v. 39, p. 211-221, 2000.

SEABRA, P. N. C. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: MELO, Itamar Soares de; AZEVEDO, João Lúcio de. **Microbiologia ambiental**. 2.ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 547-570.

SELVAKUMAR, N.; DING, B.C.; WILSON, S.M. Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. **Bio Techniques**, v.22, p.604-606, 1997.

SORIANO, F. R.; FERNÁNDEZ-ROBLAS, R.; CALVO, R.; GARCÍA-CALVO, G. *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultative non-spore-forming Gram-positive bacilli to HMR 3647 (RU 66647) and 14 other antimicrobial. **Antimicrobials. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1028-1033, 1998.

THERON, J.; CLOETE, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**. v.26, p.37– 57, 2000.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U.S. EPA. **In Situ Treatment Technologies for Contaminated Soil**. Engineering Forum Issue Paper. 35 p. 2006. Disponível em: <www.epa.gov/tio/tsp>. Acesso em: 15 nov. 2008.

VASCONCELLOS, S. P. de. **Atividades enzimáticas e biodegradação de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)**. Dissertação (Tese de Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 767-775, 1995.

VOGEL, T.M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 311-316, 2006.

WALKER, J. D.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of model petroleum at low temperatures. **Microbial Ecology**, v.1, p. 63- 95, 1974.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLELIER, D.A.; LONE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 697-703, 1991.

WEN-TSO, L.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4516–4522, 1997.

WILLIAMS, P.A.; SAYERS, J.R. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. **Biodegradation**, v.5. p. 195-217, 1994.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M., Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.138, p. 663 - 670, 1979.

ZYLBERBERG, R.S. **Impactos econômicos e sociais da nova refinaria no Brasil: uma análise comparativa**. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro: UFRJ, 2006.