

PATRÍCIA LOPES LEAL

**ATIVIDADE E DINÂMICA POPULACIONAL DE UM
CONSÓRCIO BACTERIANO DURANTE BIODEGRADAÇÃO DE
ÓLEO DIESEL NO SOLO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

PATRÍCIA LOPES LEAL

**ATIVIDADE E DINÂMICA POPULACIONAL DE UM
CONSÓRCIO BACTERIANO DURANTE BIODEGRADAÇÃO DE
ÓLEO DIESEL NO SOLO**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae***

APROVADA: 30 de setembro de 2009.

Arnaldo Chaer Borges
(Co-orientador)

Antônio Galvão Nascimento
(Co-orientador)

Célia Alencar de Moraes

**Míriam Cristina Santos
Amaral**

Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

À minha família e amigos,
por todo amor e apoio depositados.

A paz é a virtude mais bela do ser humano, e por ser a mais bela é impossível ser alcançada sem autoconhecimento.

Mahatma Gandhi (1869 – 1948)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amor e perseverança a mim concedidos para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da minha bolsa de doutorado.

Ao professor Marcos Rogério Tótola pela orientação, paciência, profissionalismo, competência e confiança depositados no meu trabalho.

Ao Prof. Arnaldo Chaer Borges, pelo aconselhamento, colaboração e incentivo ao meu trabalho.

Ao Prof. Antônio Galvão do Nascimento, pelo aconselhamento, disponibilidade e atenção a mim concedidos.

À Profa. Maria Eliana Lopes R. de Queiroz, pelo aconselhamento, incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Célia Alencar de Moraes, pela constante participação, apoio e ensinamentos fundamentais para minha formação acadêmica e científica.

À Profa. Míriam C. Amaral, pela disponibilidade, atenção e compreensão na apreciação deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos.

A todos os colegas da Microbiologia Agrícola, em especial a Janaina, Aline Leal, Aline Paiva, Aline Daniela, Adélia, Bruna, Ana Karina, Helson, Adriano, Pércles, Nívea, Fabiane e Maíke, pelos bons momentos compartilhados durante todo o curso.

À Silvana por toda dedicação e companheirismo ao longo do seu estágio.

Ao Departamento de Química, por disponibilizar o espaço e equipamentos para realização de experimentos deste trabalho.

Aos técnicos dos Departamentos de Microbiologia, por toda ajuda concedida.

Aos meus grandes amigos, Giovana, Juliana, Marcelo, Nando, Renata, Janaina e Flávia pelo total carinho e força depositados em mim, pela bela amizade e companheirismo!

Aos meus pais e minha irmã, que sempre foram e serão o alicerce de cada etapa da minha vida e com os quais sempre irei compartilhar cada conquista. Amo vocês!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo I - Avaliação da eficiência do consórcio bacteriano na biodegradação de hidrocarbonetos de óleo diesel em meio de cultivo	5
Resumo	6
Abstract	7
1 Introdução	8
2 Materiais e Métodos	10
2.1 Composição do consórcio bacteriano	10
2.2 Avaliação da atividade metabólica dos isolados bacterianos	12
2.3 Degradação de hidrocarbonetos alcanos de óleo diesel	12
3 Resultados	13
3.1 Atividade metabólica dos isolados bacterianos em culturas puras e mistas em meio de cultivo acrescido de óleo diesel	13
3.2 Degradação de hidrocarbonetos alcanos do óleo diesel em meio de cultura por membros do consórcio bacteriano	15
4 Discussão	17
4.1 Utilização do óleo diesel como fonte de carbono por culturas puras e consórcio bacterianos, em meio de cultura	17
5 Conclusões	20
6 Referências Bibliográficas	21
Capítulo II - Dinâmica populacional de um consórcio bacteriano durante a degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo em solo contaminado com óleo diesel	26

Resumo	27
Abstract	28
1 Introdução	29
2 Materiais e Métodos	32
2.1 Caracterização do solo	32
2.2 Determinação da degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo no solo sob diferentes condições de temperatura, nutricionais e umidade	33
2.3 Avaliação da dinâmica populacional dos membros do consórcio bacteriano	34
2.4 Análise estatística	34
3 Resultados	37
3.1 Efeito da temperatura, umidade e relação C:N:P na biorremediação de solo contaminado com óleo diesel	37
3.2 Degradação de HTP por consórcio bacteriano em solo contaminado com óleo diesel	46
3.3 Avaliação das populações constituintes do consórcio bacteriano durante a degradação de hidrocarbonetos em solo contaminado com óleo diesel	48
4 Discussão	50
4.1 Efeito dos fatores temperatura, umidade e relação C:N:P na biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo no solo contaminado com óleo diesel	50
4.2 Degradação de HTP e flutuação populacional do consórcio bacteriano em solo contaminado com óleo diesel	51
5 Conclusões	54
6 Bibliografia	55
Capítulo III - Dinâmica populacional de um consórcio bacteriano e seqüência de degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo em solo sob sucessivas contaminações com óleo diesel	60
Resumo	61

Abstract	63
1 Introdução	64
2 Materiais e Métodos	66
2.1 Determinação da degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo no solo ao longo ciclos de recontaminação/biorremediação	66
2.2 Avaliação da dinâmica populacional dos membros do consórcio bacteriano	67
3 Resultados	68
3.1 Degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) pelo consórcio bacteriano após sucessivas contaminações do solo com óleo diesel	68
3.2 Dinâmica populacional do consórcio bacteriano em solo sob sucessivas contaminações com óleo diesel	70
4 Discussão	72
4.1 Degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) pelo consórcio bacteriano após sucessivas contaminações do solo com óleo diesel	72
4.2 Dinâmica populacional do consórcio bacteriano em solo após sucessivas contaminações com óleo diesel	73
5 Conclusões	75
6 Bibliografia	76
7 Anexo	79

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Produção de CO₂ acumulado durante ensaio respirométrico para determinação da atividade metabólica de linhagens bacterianas em culturas puras e em consórcio em meio de cultivo acrescido de óleo diesel (A) e em meio mineral sem adição de óleo diesel (B). 14

Figura 2 - Curvas de crescimento das linhagens bacterianas em culturas puras e em consórcio cultivados em meio mineral acrescido de óleo diesel (A) e em meio mineral sem adição de óleo diesel (B). 15

Capítulo II

Figura 1 - Curvas de crescimento das linhagens bacterianas em culturas puras e em consórcio cultivados em meio mineral acrescido de óleo diesel (A) e em meio mineral sem adição de óleo diesel (B). 38

Figura 2 - Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da temperatura e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 30 dias de incubação 39

Figura 3 - Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da temperatura e umidade na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 30 dias de incubação. 40

Figura 4 - Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da umidade e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 30 dias de incubação 41

Figura 5 - Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da temperatura e umidade na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 45 dias de incubação 42

Figura 6 - Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da umidade e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 45 dias de incubação 43

Figura 7 - Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da interação entre temperatura e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 45 dias de incubação 44

Figura 8 - Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da temperatura e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 60 dias de incubação	45
Figura 9 - Degradação (%) de HTP em solo inoculado com um consórcio bacteriano.	46
Figura 10 - Degradação de HTP (C12 – C22) no solo, representada pelas áreas dos picos cromatográficos, após inoculação do consórcio bacteriano	47
Figura 11 - Contagem de células do consórcio bacteriano presentes em solo contaminado com óleo diesel	48
Figura 12 - Contagem de células do consórcio bacteriano presentes em solo sem adição de óleo diesel	49
Capítulo III	
Figura 1 - Degradação (%) de HTP em solo inoculado com um consórcio bacteriano, após sucessivas contaminações com óleo diesel.	68
Figura 2 - Contagem de células do consórcio bacteriano presentes em solo sem adição de óleo diesel	69
Figura 3 - Contagem de células em meio de cultura contendo antibióticos específicos para cada membro do consórcio bacteriano inoculado no solo	71

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Denominação, origem, método de isolamento e caracterização das estirpes bacterianas constituintes do consórcio para biorremediação de ambientes contaminados com petróleo 11

Tabela 2 - Degradação de hidrocarbonetos alcanos pelos isolados bacterianos em culturas puras e em consórcio cultivados em meio mineral acrescido de óleo diesel a 2% (v/v), ao longo de 30 dias de incubação a 30°C e 200rpm 16

Capítulo II

Tabela 1 - Características físicas e químicas do solo 33

Tabela 2 - Antibióticos específicos selecionados para contagem das bactérias componentes do consórcio (UFC g⁻¹ massa seca do solo). 34

Tabela 3 - Modelo do delineamento experimental DCCR utilizado para as análises dos efeitos dos fatores temperatura, teor de umidade e relação C:N:P na biodegradação dos hidrocarbonetos em solo contaminado com óleo diesel 36

RESUMO

LEAL, Patrícia Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Atividade e dinâmica populacional de um consórcio bacteriano durante biodegradação de óleo diesel no solo.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

A biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo é um processo biotecnológico que em geral envolve a utilização de microrganismos capazes de metabolizar os hidrocarbonetos e transformá-los em substâncias inertes (CO₂ e água). A biorremediação tende a ocorrer naturalmente e pode ser acelerada pela otimização de fatores ambientais (bioestimulação) e ou pela introdução de microrganismos capazes de degradar os contaminantes (bioenriquecimento). Alguns fatores afetam a eficiência de biodegradação dos contaminantes como a capacidade metabólica dos microrganismos em degradar o contaminante, as condições ambientais e a biodisponibilidade do contaminante. No bioenriquecimento, a utilização de diferentes espécies ou estirpes microbianas (consórcio) permite a ocorrência de dinâmicas populacionais que levam a uma sucessão de ataques aos compostos poluentes, proporcionando eficiente degradação dos mesmos quantitativa e qualitativamente, quando comparados a culturas puras de microrganismos. Este trabalho teve como objetivo avaliar atividade metabólica dos isolados bacterianos *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 em culturas puras e consórcio na biodegradação de hidrocarbonetos alcanos, em meio de cultivo acrescido de óleo diesel; avaliar o padrão de flutuação das populações microbianas e o padrão de consumo dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), em solo contaminado com óleo diesel em reposta aos fatores temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes e avaliar o efeito de sucessivas contaminações do solo com óleo diesel na dinâmica populacional de membros de um consórcio bacteriano e na seqüência de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). O consórcio bacteriano foi mais eficiente na degradação dos hidrocarbonetos nonano, decano e undecano presentes em meio de cultivo, quando comparado às culturas puras. A degradação desses compostos pelo consórcio foi superior a 99% após 30 dias de incubação. Os fatores ambientais influenciaram a degradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, a melhor condição encontrada foi 35°C, 125:10:1 e 60% para temperatura, relação C:N:P e teor de umidade, respectivamente. Sucessivas contaminações do solo com óleo diesel promoveram alterações na estrutura populacional do consórcio bacteriano e na seqüência de

gradação de hidrocarbonetos totais de petróleo, no entanto o consórcio bacteriano se apresentou como candidato em potencial para uso em operações de biorremediação de solos contaminados com óleo diesel. Ao final de 60 dias, o consórcio bacteriano degradou aproximadamente 55% de HTP do solo, após sucessivas contaminações com óleo diesel.

ABSTRACT

LEAL, Patrícia Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2009. **Activity and population dynamics of a bacterial consortium during biodegradation of diesel oil in soil.** Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-Advisors: Antonio Galvão Nascimento, Arnaldo Chaer Borges and Maria Eliana Lopes R. Queiroz

Bioremediation of environments contaminated with petroleum hydrocarbons is a biotechnological process that usually involves the use of microorganisms capable of metabolizing hydrocarbons and convert them into inert substances (CO₂ and water). Bioremediation tends to occur naturally and can be accelerated by the optimization of environmental factors (biostimulation) and or the introduction of microorganisms capable of degrading the contaminants (bioaugmentation). Some factors affect the efficiency of biodegradation of contaminants such as the metabolic capacity of microorganisms to degrade the contaminant, environmental conditions and the bioavailability of the contaminant. In bioaugmentation, the use of different microbial species or strains (consortium) to the occurrence of population dynamics that lead to a succession of attacks on compounds, pollutants, providing efficient degradation of the same quantity and quality when compared to pure cultures of microorganisms. This study aimed to evaluate metabolic activity of bacterial strains *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11, *Bacillus subtilis* LBBMA 155 in pure cultures and consortium in the biodegradation of hydrocarbons alkanes, in culture medium with diesel oil, to analyze the pattern of fluctuations in microbial populations and the pattern of consumption of total petroleum hydrocarbons (THP), in soil contaminated with diesel oil in response to the factors temperature, humidity and nutrient availability, and to evaluate the effect of successive soil contamination with diesel oil in the population dynamics of members of a bacterial consortium and the sequence of degradation of total petroleum hydrocarbons (TPH). The bacterial consortium was more efficient in the degradation of hydrocarbons nonane, decane and undecane present in the culture medium when compared to pure cultures. The degradation of these compounds by the consortium was over 99% after 30 days of incubation. Environmental factors influencing the degradation of HTP in soil contaminated with diesel oil, the best condition found was 35°C, 125:10:1 and 60% for temperature, the C:N:P and moisture content, respectively. Successive soil contamination with diesel oil promoted changes in population structure of the bacterial

consortium and the sequence of grading total petroleum hydrocarbons. However the bacterial consortium was presented as potential candidate for use in operations bioremediation of soils contaminated with diesel oil. After 60 days, the bacterial consortium degraded approximately 55% of TPH soil after repeated contamination with diesel oil.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O petróleo é uma mistura complexa, de ocorrência natural e 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).

Entre os combustíveis derivados do petróleo, destacam-se a gasolina e o óleo diesel. Segundo a Agência Nacional de Petróleo (ANP), a gasolina representou 57,8% do total de combustíveis líquidos para veículos leves consumidos no Brasil, em 2007. Naquele mesmo ano, foi registrado no país um aumento de 6,31% em relação ao ano de 2006, no mercado do diesel. A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos hidrofóbicos relativamente voláteis, na qual os hidrocarbonetos típicos são os compostos alifáticos (alcanos, cicloalcanos, alcenos), aromáticos e aditivos (FERREIRA e ZUQUETTE, 1998). O óleo diesel é composto principalmente por hidrocarbonetos de cadeias simples, não-ramificadas. Em relação à gasolina, o óleo diesel apresenta moléculas com cadeias de tamanhos maiores, o que confere a este combustível maior massa específica, menor volatilidade e menor solubilidade em água.

Contaminações de solos e de águas subterrâneas são freqüentemente causadas por acidentes durante a exploração, transporte e armazenamento do petróleo e de seus derivados. Os centros urbanos são alvos potenciais dessas contaminações, onde os maiores responsáveis pelas contaminações com hidrocarbonetos de petróleo são os postos de combustíveis. A maioria dos tanques de armazenamento de combustíveis é susceptível à corrosão nos primeiros 20 anos após sua instalação. De modo geral, cerca de 50% dos vazamentos ocorrem antes dos 15 anos e grande parte das tubulações apresenta vazamentos antes dos 10 anos (LIMA, 1998). No Brasil, essa preocupação se torna ainda maior, uma vez que um número significativo de postos foi construído na década de 1970 e ainda não se encontram sob as normas de segurança exigidas (MELO Junior & Costi, 2004). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico (CETESB), órgão responsável pelo controle e prevenção da poluição no estado de São Paulo, constatou em 2007 que, dos 8,5 mil pontos de revenda, 83,6% ainda não haviam se adequado às normas de segurança do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

Em casos de contaminações acidentais ou mesmo intermitentes, ações corretivas devem ser prontamente adotadas para interromper o processo de contaminação e remover os

contaminantes. Entre as técnicas menos onerosas e ambientalmente seguras destaca-se a da biorremediação (BAPTISTA *et al.*, 2005, RAHMAN *et al.*, 2003). A biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo é um processo biotecnológico que em geral envolve a utilização de microrganismos capazes de metabolizar os hidrocarbonetos e transformá-los em substâncias inertes (CO₂ e água). Para que os microrganismos utilizem hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia para seu crescimento, é necessário que estes possuam as enzimas que transformem as moléculas de hidrocarbonetos em intermediários das rotas catabólicas (JAQUES *et al.*, 2007). A maioria dos microrganismos presentes no solo não possui a capacidade de degradar estes compostos, principalmente os hidrocarbonetos poli-aromáticos (HPA). Esse fato frequentemente leva ao insucesso das atenuações naturais e à necessidade de se selecionar microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, visando sua utilização na biorremediação de solos contaminados com estes compostos por meio do bioenriquecimento (THOMASSIN-LACROIX *et al.*, 2002)..

A complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação do petróleo e de seus derivados é de tal ordem que, normalmente, é necessária a participação de diferentes espécies ou estirpes microbianas. Esse grupo formado por membros de diferentes gêneros e espécies microbianas, cada um especializado em degradar uma ou mais misturas complexas, recebe a denominação de consórcio. Muitos dos trabalhos sobre a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo foram conduzidos com consórcios de microrganismos e demonstraram que a capacidade biodegradativa é freqüentemente maior, quantitativa e qualitativamente, do que a obtida com culturas puras (MORALES *et al.*, 2004; JORGENSEN *et al.* 2000; PRPICH *et al.*, 2005; MISHRA *et al.*, 2001; DEPPE *et al.*, 2005; DOMDE *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a inoculação de microrganismos selecionados em laboratório em solos contaminados, o bioenriquecimento, pode resultar em baixas taxas de degradação, como conseqüência da incapacidade desses microrganismos colonizarem o ambiente-alvo e degradar os hidrocarbonetos. A complexidade química, física e biológica do solo pode determinar o declínio das populações inoculadas, seja pelas relações antagônicas impostas pelas populações autóctones, como predação e competição, ou pela ocorrência de estresses fisiológicos ocasionados pelos fatores abióticos, como pH, umidade, aeração, temperatura e disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos (JACQUES, 2007).

O uso de biorreatores se torna uma alternativa atrativa para biorremediação, no que se refere principalmente ao controle de algumas condições ambientais que afetam a atividade microbiana. Diferentemente da biorremediação de solos contaminados “*in situ*”, na qual o

solo é tratado no próprio lugar onde ocorreu a contaminação, na biorremediação “*ex situ*” o resíduo ou o solo contaminado são removidos de seu local original e transportados para serem tratados em locais específicos, como biorreatores e biopilhas (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Os biorreatores permitem o monitoramento efetivo do processo, maior controle das variáveis (valor de pH, temperatura, umidade, etc.) e facilitam a aclimação e desenvolvimento da microbiota e também a incorporação de aditivos. Além disso, os biorreatores são sistemas que permitem o controle de emissões e possibilita, na maioria dos casos, a redução do tempo de tratamento (RAIMUNDO e RIZZO, 2002). O emprego de biorreatores mostra-se como uma tecnologia viável para o tratamento de solo contaminado com compostos orgânicos (URURAY, 1998). BAPTISTA e colaboradores (2006) utilizaram reatores de leito fixo para tratamento de solo argiloso contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e verificaram uma remoção de cerca de 45% de hidrocarbonetos totais de petróleo após 45 dias de ensaio de biodegradação.

As características físico-químicas do contaminante também influenciam diretamente a eficiência da biorremediação. Altas taxas de degradação são conseguidas quando o contaminante possui baixa massa molecular (SKLADANY e METTING, 2006). A concentração é também determinante na degradação de um composto, sendo que concentrações elevadas podem ser tóxicas e concentrações baixas podem estar abaixo do limiar crítico, a partir do qual a degradação ocorre principalmente na presença de substratos alternativos (WILBERG, 2006).

Embora existam significantes registros na literatura sobre estruturas de comunidades bacterianas e cinética de degradação associados com biorremediação de ambientes contaminados, poucos deles focam uma descrição detalhada sobre a dinâmica da comunidade microbiana ao longo do processo de biorremediação (RONCEVIC, *et al.* 2005; KIM, *et al.* 1997; ATAGANA, *et al.* 2006, BRAKSTAD, 2008). Alguns estudos demonstraram que bactérias específicas estão associadas com diferentes fases da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo no solo. Esses estudos indicam ainda a existência de interações complexas entre espécies bacterianas e condições ambientais, que influenciam a capacidade de biodegradação desses compostos por comunidades microbianas (VIÑAS *et al.* 2005). KAPLAN *et al.* (2004), ao investigarem a dinâmica da comunidade bacteriana em uma unidade de tratamento de solo contaminado com petróleo, verificaram a predominância de filotipos de *Flavobacterium* e *Pseudomonas* na fase rápida de degradação de hidrocarbonetos totais, seguida pela dominância de outros quatro filotipos quando a taxa de degradação de hidrocarbonetos diminuiu.

A hipótese estabelecida neste estudo é que exista, ao longo da biodegradação do solo contaminado com óleo diesel, relação entre o padrão de flutuação de populações microbianas do consórcio e o padrão de consumo de hidrocarbonetos de óleo diesel presentes no solo. Portanto, este trabalho buscou primeiramente avaliar a eficiência de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em meio de cultivo por isolados bacterianos, em culturas puras e em consórcio e, posteriormente, avaliar a dinâmica populacional do consórcio bacteriano e o perfil de degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo, em resposta aos fatores temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes, durante a biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo em solo contaminado com óleo diesel. A flutuação populacional do consórcio bacteriano em solo contaminado com óleo diesel foi também avaliada ao longo de ciclos de biorremediação/recontaminação.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO CONSÓRCIO BACTERIANO NA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE ÓLEO DIESEL EM MEIO DE CULTIVO

RESUMO

LEAL, Patrícia Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Avaliação da eficiência do consórcio bacteriano na biodegradação de hidrocarbonetos de óleo diesel em meio de cultivo.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade metabólica de isolados bacterianos em culturas puras e mista, quando cultivados em meio mineral acrescido de óleo diesel a 2% (v/v), assim como avaliar a degradação dos hidrocarbonetos nonano, decano e undecano presentes no meio de cultivo. O consórcio bacteriano estudado foi composto pelos isolados *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 e *Bacillus subtilis* LBBMA 155, isolados de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. A atividade catabólica dos isolados bacterianos foi verificada por meio de respirometria. A maior produção de CO₂ foi obtida no tratamento com o consórcio. As análises cromatográficas de hidrocarbonetos residuais demonstraram que este tratamento foi o que apresentou a maior porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos nonano, decano e undecano, com valores de degradação superiores a 99%, o que comprova a existência de complementaridade metabólica entre os membros do consórcio.

ABSTRACT

LEAL, Patrícia Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, september 2009.
Evaluation of the efficiency of bacterial consortium in the biodegradation of diesel oil in culture medium. Advisor: Marcos Rogério Tótola. Committee Members: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

This study aimed to evaluate the metabolic activity of pure and mixed (consortium) bacterial cultures, on mineral containing diesel oil (2% v/v) as sole carbon source, as well as to evaluate the degradation of the hydrocarbons nonane, decane and undecane present in the medium. The bacterial consortium was composed of the strains *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* ES11 LBBMA, and *Bacillus subtilis* LBBMA 155, isolated from environments contaminated with petroleum hydrocarbons. The catabolic activity was measured by respirometry.. The highest production of CO₂ was obtained in treatment with the consortium. The analysis of residual hydrocarbons chromatography showed that this treatment showed the largest percentage of degradation of hydrocarbons nonane, decane and undecane, with values of degradation over 99%, which proves the existence of metabolic complementarity between the consortium members.

1 INTRODUÇÃO

A biorremediação é um processo biotecnológico que tem sido amplamente utilizado em ambientes contaminados com petróleo e seus derivados, com uso de diferentes grupos microbianos, que mineralizam ou transformam os contaminantes em formas menos tóxicas (VIDALI, 2001). O processo de biorremediação pode ser iniciado naturalmente pelos microrganismos autóctones do ambiente contaminado. Entretanto, a fração residual desse processo de degradação é recalcitrante e pode representar de 10% a 40% dos contaminantes inicialmente presentes (MARIANO, 2007).

Dois procedimentos podem ser utilizados com o intuito de se acelerar o processo de biodegradação de poluentes: a bioestimulação e o bioenriquecimento, também chamado de bioaugmentação (JACQUES *et al.*, 2007). Ambos têm como objetivo criar condições favoráveis para que ocorra aumento da comunidade microbiana, com conseqüente acréscimo das atividades metabólicas envolvidas na biodegradação dos poluentes. A bioestimulação consiste no controle de fatores abióticos para que ocorra o aumento da taxa de biodegradação dos poluentes por microrganismos indígenas, seja pela adição de nutrientes inorgânicos (normalmente nitrogênio e fósforo), de aceptores de elétrons (oxigênio ou outros) ou de substratos orgânicos. O bioenriquecimento consiste em incrementar a capacidade biodegradadora das áreas contaminadas, pela inoculação de microrganismos com habilidades catalíticas desejáveis para a degradação dos poluentes (STROUD *et al.*, 2007).

Uma condição ideal para a biorremediação poderia a princípio resultar em completa mineralização dos poluentes. Porém, em um ambiente tão complexo como o solo, nem sempre isso ocorre em razão da possibilidade de acúmulo de intermediários das rotas metabólicas (KAZUNGA e AITKEN, 2000). Uma alternativa para se aumentar a mineralização de moléculas complexas como hidrocarbonetos de petróleo no solo é a utilização de consórcios microbianos, constituídos de populações que apresentem complementaridade metabólica.

Os consórcios microbianos permitem o estabelecimento de interações entre as espécies, que tendem a atuar de forma a estimular as reações co-metabólicas. Sendo o petróleo e seus derivados compostos por moléculas de diferentes massas moleculares, incluindo alguns de estrutura macromolecular, a utilização de culturas mistas permite o estabelecimento de uma sucessão de populações que leva a uma sucessão de ataques aos compostos poluentes, proporcionando eficiente degradação dos mesmos (RÖLING *et al.*, 2002).

A técnica de bioenriquecimento é normalmente recomendada em solos recém-contaminados, quando o contaminante é de difícil degradação e se exige uma rápida descontaminação, ou ainda quando a concentração do contaminante é baixa (BEWLEY, 1992). A sobrevivência e atividade dos microrganismos introduzidos no ambiente dependem da sua adaptação a fatores bióticos e abióticos presentes (FANTROUSSI e AGATHOS, 2005). Os fatores bióticos mais relevantes para o bioenriquecimento são a predação dos microrganismos alóctones adicionados ao ambiente, bem como a competição desses com os microrganismos autóctones (VAN VEEN et al., 1997). Os fatores abióticos compreendem a disponibilidade de nutrientes, o suprimento de oxigênio, condições de temperatura, pH e umidade, entre outros (VAN VEEN et al., 1997). Portanto, a aplicação da estratégia de bioenriquecimento requer uma série de avaliações em laboratório, que visam caracterizar as populações degradadoras dos contaminantes e conhecer as demandas dessas populações no que se refere às condições ambientais apropriadas para o sucesso da biorremediação.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade metabólica de populações bacterianas, puras e mistas, em meio de cultura acrescido de óleo diesel, assim como determinar a eficiência de degradação de hidrocarbonetos alcanos do óleo diesel por essas populações, com vistas à sua utilização em biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Composição do consórcio bacteriano

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

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

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

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

REGAP¹ – Refinaria Gabriel Passos, Betim, MG

REDUC² – Refinaria de Duque de Caxias, RJ.

2.2 Avaliação da atividade catabólica dos isolados bacterianos

As culturas-estoque da coleção utilizadas para compor o consórcio foram ativadas em meio R₂A (REASONER & GELDREICH, 1985) por 18 h a 30°C, e a suspensão celular foi submetida a sucessivas lavagens em solução salina estéril. Um volume de inóculo do isolado, suficiente para se obter uma densidade óptica a 600 nm correspondente a 0,05, foi adicionado a frascos respirométricos de 500 mL (GibcoBRL, Life Technologies) contendo 100 mL de meio mineral NMP (MARSAGIN & SCHINNER, 1998) acrescido de óleo diesel a 2% (v/v). Os frascos foram acoplados a um respirômetro (Mod. TR-RM8 Respirometer Multiplexer – Sable Systems) dotado de um leitor de infravermelho (Sable Systems International, NE, USA) e a variação de temperatura durante os ensaios respirométricos foi monitorada. A liberação do CO₂ produzido pelas células bacterianas foi avaliada ao longo de 14 dias. Como controles, foram utilizados frascos contendo meio mineral NMP sem a adição de diesel inoculado com bactérias e, também, frascos não-inoculados contendo meio mineral NMP com diesel.

2.3 Degradação de hidrocarbonetos alcanos de óleo diesel

As linhagens bacterianas foram inoculadas separadamente e em consórcio em frascos de “Headspace” contendo 15 mL do meio de cultura NMP (MARSAGIN & SCHINNER, 1998) acrescido de óleo diesel a 2% (v/v). Os frascos foram mantidos sob incubação a 30°C em agitador orbital a 200rpm, por 30 dias. A degradação dos hidrocarbonetos alcanos de petróleo foi determinada utilizando-se o método de “Headspace” (SERRANO E GALAGO, 2004), seguido de análises por cromatografia gasosa em cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS) Shimadzu®, modelo 17-A, tendo He como gás de arraste e coluna capilar Nukol® de 100m x 0,20mm x 0,25µm i.d, nas seguintes condições: temperatura inicial de 40°C (2 min), rampa de aquecimento de 8°C min⁻¹ até 240°C. A temperatura do injetor foi de 260°C e a do detector 280°C. As análises cromatográficas foram realizadas aos 7, 15 e 30 dias após o início da incubação.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade catabólica das linhagens bacterianas em culturas puras e mistas em meio de cultivo acrescido de óleo diesel

As linhagens não diferiram quanto à emissão de CO₂ em meio mineral acrescido de óleo diesel, ao longo de 400 horas de incubação (Figura 1A). Nos tratamentos inoculados com as culturas puras, a quantidade de CO₂ acumulado variou entre 900 e 1500 µmol. A inoculação dos microrganismos em consórcio teve um efeito significativo sobre a degradação dos hidrocarbonetos. Nesse tratamento, a quantidade de CO₂ evoluído foi cerca de 2,7 vezes maior do que nos tratamentos com as culturas puras. Este resultado indica que os diferentes isolados utilizam frações distintas de hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, ou que esteja ocorrendo a complementaridade de rotas catabólicas.

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

Não houve produção de CO₂ ou crescimento expressivo nos tratamentos sem óleo diesel, tanto nos tratamentos com culturas puras quanto no tratamento inoculado com o consórcio (Figura 1B e 2 B). Esses dados confirmam que todos as linhagens utilizam hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e energia.

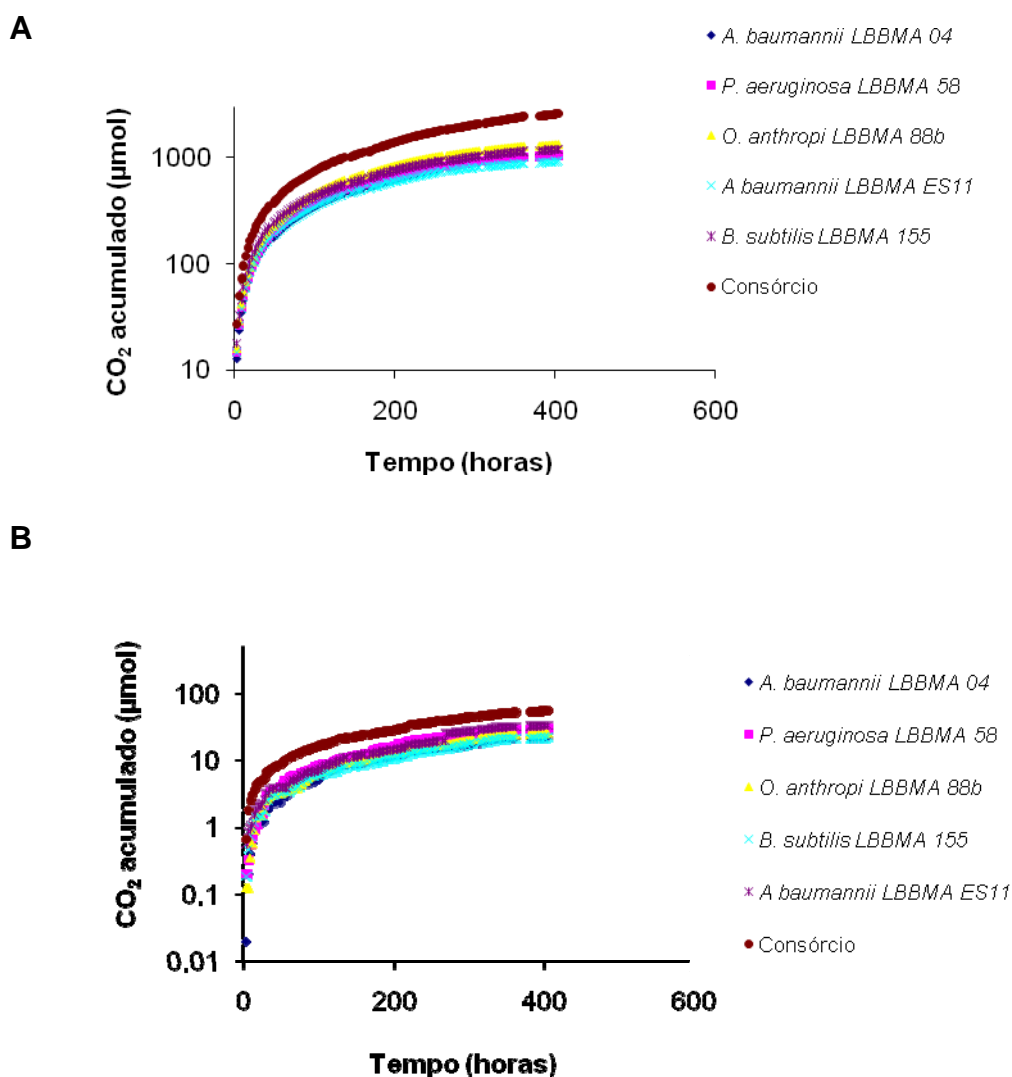


Figura 1 - CO₂ acumulado durante ensaio respirométrico para determinação da atividade catabólica de linhagens bacterianas em culturas puras e em consórcio em meio de cultivo acrescido de óleo diesel (A) e em meio mineral sem adição de óleo diesel (B). Os microrganismos foram inoculados em frascos de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

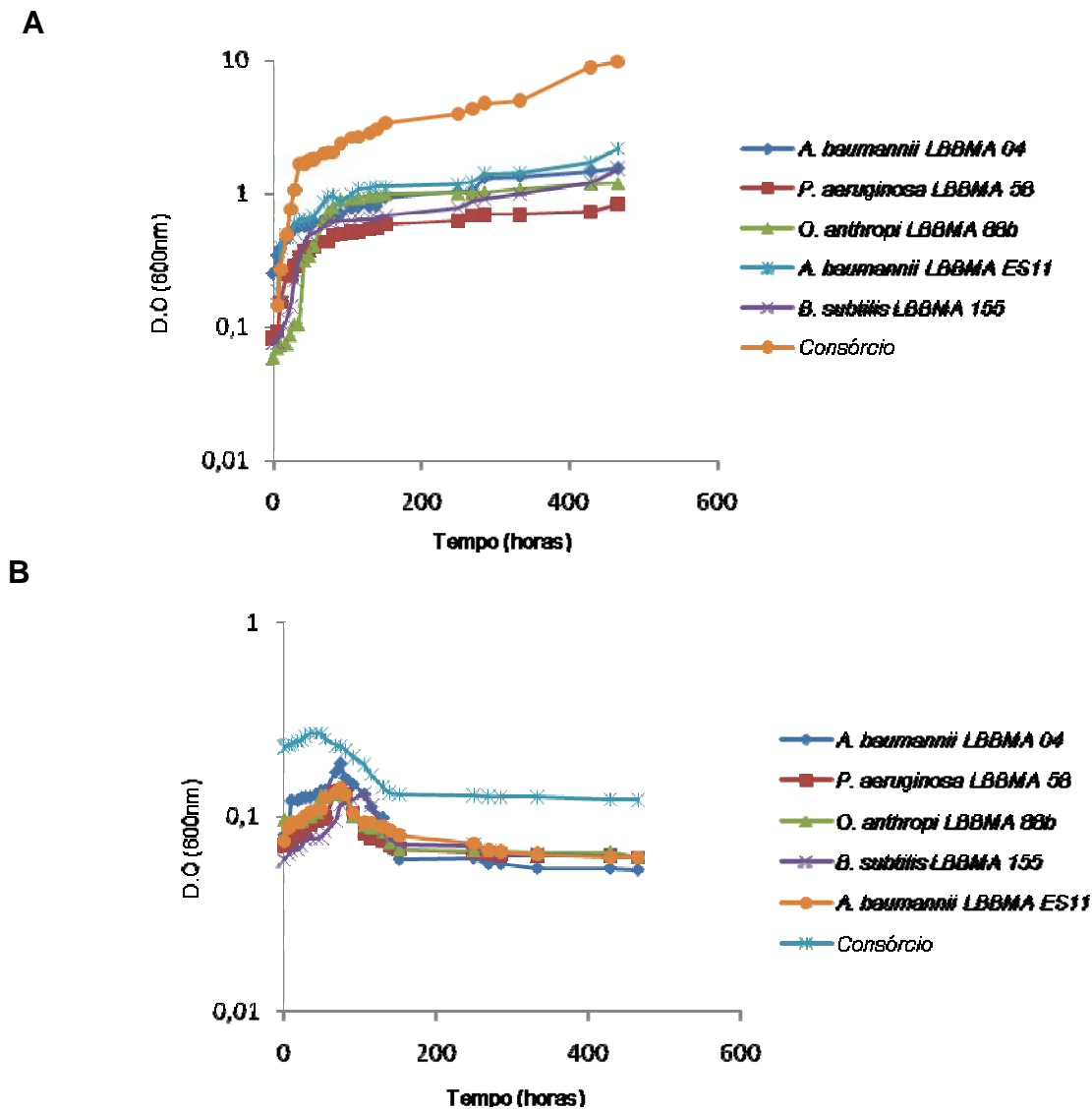


Figura 2 – Curvas de crescimento das linhagens bacterianas em culturas puras e em consórcio, em meio mineral acrescido de óleo diesel (A) e em meio mineral sem adição de óleo diesel (B). Os microrganismos foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral NMP e óleo diesel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

3.2 Degradação de hidrocarbonetos alcanos do óleo diesel em meio de cultura por membros do consórcio bacteriano

Todas as linhagens foram competentes em utilizar os hidrocarbonetos nonano, decano e undecano como fonte de carbono (Tabela 2). Altas porcentagens de degradação foram obtidas, tanto pelos isolados em culturas puras quanto pelo consórcio, ao final de 30 dias.

Contudo, o consórcio apresentou a maior eficiência de degradação já nos primeiros dias de incubação, obtendo ao final do experimento valores superiores a 99% de degradação para os três hidrocarbonetos analisados (Tabela 2).

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

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

4 DISCUSSÃO

4.1 Utilização do óleo diesel como fonte de carbono por culturas puras e consórcio bacteriano, em meio de cultura

A utilização do óleo diesel como fonte de carbono pelos isolados bacterianos foi constatada tanto pelo ensaio respirométrico como pelas curvas de crescimento em meio mineral contendo óleo diesel como única fonte de carbono (Figuras 1 e 2). A evolução de CO₂ entre os isolados foi similar; contudo, no tratamento inoculado com o consórcio, a produção de CO₂ foi aproximadamente 64% maior que a obtida com *Ochrobactrum anthropi*, espécie que apresentou a maior produção de CO₂, dentre as diferentes linhagens. O resultado é uma indicação de que a associação entre as espécies neste consórcio foi benéfica para a utilização dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel (Figura 1).

As linhagens componentes do consórcio pertencem a gêneros bacterianos citados na literatura científica como potencialmente capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo (VINÃS et al., 2005; OGBONNA et al., 2007; UENO, et al., 2007; YUCHENG WU et al., 2008). Além disso, vale ressaltar que os membros do consórcio bacteriano empregados neste trabalho foram isolados de ambientes com histórico de contaminação, e que a maioria contém genes relacionados com o catabolismo de hidrocarbonetos (Tabela 1). Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos encontram-se com frequência no ambiente natural, e as liberações acidentais de hidrocarbonetos levam a um enriquecimento seletivo *in situ* desses organismos (MÁRQUEZ-ROCHA et al., 2004).

O crescimento dos isolados em culturas puras e em consórcio foi acompanhado ao longo de 20 dias. A fase exponencial teve início nas primeiras horas do experimento, provavelmente sustentada pela concentração de óleo diesel que se encontrava solúvel no meio de cultura (Figura 2 A). Assim, a quantidade de óleo diesel solúvel no meio pode ter sido maior que a demandada pela biomassa, que ainda era pequena, fazendo com que as bactérias obtivessem altas taxas de crescimento. Verifica-se ainda um perfil de degradação caracterizado pela diauxia, onde a estirpe consome, primeiramente, os compostos de fácil assimilação e passa por um período de adaptação aos compostos menos favoráveis que, posteriormente, são consumidos (Figura 2 A). A rápida adaptação das bactérias ao meio contendo óleo diesel pode ser relacionada à origem destas linhagens, uma vez que essas foram isoladas de ambientes com histórico de contaminações por hidrocarbonetos de petróleo. Isso explicaria a ausência de efeito tóxico do óleo diesel e a rápida adaptação metabólica das

bactérias para o catabolismo de hidrocarbonetos. Desta forma, estes microrganismos podem ser considerados candidatos em potencial para aplicação biotecnológica ao simplificar o processo de produção de inóculo.

O crescimento mais expressivo foi o do consórcio bacteriano, promovido provavelmente pelas interações entre as espécies que atuaram de forma a estimular as reações co-metabólicas envolvendo os diferentes hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel, possibilitando um aumento das interfaces microbianas em íntimo contato e, desta forma, permitindo uma maior troca de intermediários ou produtos do metabolismo entre as espécies. Além disso, vale ressaltar a capacidade de produção de biosurfactantes por algumas linhagens que constituem o consórcio bacteriano, o que facilita o acesso dos microrganismos às frações de hidrocarbonetos de menor solubilidade. É possível ainda que interações entre as populações do consórcio tenham induzido a ocorrência de alterações de hidrofobicidade dos envoltórios celulares, o que poderia auxiliar no acesso direto de compostos hidrofóbicos pelo consórcio como um todo, conforme sugerido por SIKKEMA *et al.* (1995). Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos podem ter acesso direto aos hidrocarbonetos solúveis no meio aquoso. Quanto aos hidrocarbonetos de caráter hidrofóbico, o acesso pode se dar pela aderência direta dos microrganismos a superfícies hidrofóbicas (reduzindo a distância entre a célula e o substrato) ou pela produção de biosurfactantes ou de componentes específicos de superfície celular com propriedades emulsificantes (RON & ROSENBERG 2002). Observou-se nos tratamentos-controle (sem adição de óleo diesel ao meio de cultura) o crescimento de todos os isolados nas primeiras horas após a inoculação, seguido por morte celular (Figura 2B). O crescimento inicial, na ausência de fonte externa de carbono orgânico, se deve à utilização de reservas de energia endógenas pelos isolados bacterianos.

Em apenas 15 dias, a degradação dos hidrocarbonetos nonano, decano e undecano foi próxima ou maior do que 90%, tanto nos tratamentos inoculados com isolados em culturas puras quanto em consórcio (Tabela 2). O resultado demonstra a elevada eficiência desses isolados em utilizar hidrocarbonetos de petróleo, o que possivelmente está relacionado com a ocorrência de processos de adaptação e seleção nos ambientes de origem desses microrganismos (Tabela 1). Meyer *et al.* (1999) sugeriram que isolados a partir da mesma amostra ambiental apresentam-se mais similares entre si quanto ao seu potencial degradativo, comparando-se com representantes da mesma espécie, mas isolados de outro local. Segundo HERBES (1981), citado por WILBERG (2006), solos e microrganismos previamente

expostos a contaminantes não possuem ou possuem menor período de aclimação do que aqueles sem prévia exposição.

5 CONCLUSÕES

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

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

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

6 BIBLIOGRAFIA

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP), disponível: www.anp.gov.br, acessada em 30 de abril de 2009.

ATAGANA, H. I., Biodegradation of polyacyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by biostimulation and bioaugmentation in the presence of copper(II) ions. **World J Microbiol Biotechnol.** v.22, p.1145–1153, 2006.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R. TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology.** v. 97, p. 868-875, 2006.

BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D. C. Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 249-255, 2005.

BEWLEY, R. J. F. Bioremediation of contaminated ground. Contaminated land treatment technologies. Papers presented at na international conference. Barking, uk; **Elsevier Science Publishers.** London, p. 270-284, 1992.

BRAKSTAD, O. G.; NONSTAD, I.; FAKSNESS, L-G.; BRANDVIK, P. J. Responses of Microbial Communities in Arctic Sea Ice After Contamination by Crude Petroleum Oil. **Microb Ecol.**, v.55, p.540–552, 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB), disponível:http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp, acessada em 02 de maio de 2009.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2008. Disponível em <http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em 18 Mai. 2008.

DEOTTI, L. O. G. **Controle de pH na técnica de biorremediação eletro cinética.** Tese (Mestrado em Engenharia Civil), Rio de Janeiro RJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro– UFRJ, 138p., 2005.

DEPPE, U., RICHNOW, H., MICHAELIS, W., ANTRANIKIAN, G. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. **Extremophiles** v.9, p.461–470, 2005.

DOMDE, P.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H. J. Impact of Bioaugmentation with a Consortium of Bacteria on the Remediation of Wastewater-Containing Hydrocarbons, **Env Sci Pollut Res**, v.14 (1), p. 7 – 11, 2007.

FANTROUSSI, S. E.; AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 268–275, 2005.

FERREIRA, J.; ZUQUETTE, L. V. **Considerações sobre as interações entre contaminantes constituídos de hidrocarbonetos e os compostos do meio físico**. Instituto de Geociências, 557p, 1998.

HEINEMEYER, O.; INSAM, H.; KAISER, E. A.; WALENZIK, G. Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant and Soil*, v.116(2), p.191-195, 1989.

HERBES, S. E. Rates of microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments in the vicinity of a coal-cooking wastewater discharge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41(1), p. 20-28, 1981.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

JØRGENSEN, K. S.; PUUSTINEM, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environ. Int., Elmsford**, v.107, p.245-254, 2000

KAPLAN, C. W., KITTS, C. L. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. **Appl. and Environ. Microb.**, p. 1777–1786, 2004.

KAZUNGA, C.; AITKEN, M. D. Products from incomplete metabolismo f pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. **Applied Environmental and Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 1917-1922, 2000.

KIM, P.; OH, D.; KIM, S.; KIM, J. Relationship between emulsifying activity and carbohydrate backbone structure of emulsan from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 457- 459, 1997.

LIMA, C. B. S. Efluentes: a qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R. et al. (Ed). **Atlas ambiental de Porto Alegre**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, p.157-158, 1998.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007.

MÁRQUEZ- ROCHA, F. J.; HERNANDÉZ-RODRÍGUEZ, V.; LAMELA, M. T. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 128, p. 313-320, 2001.

MARSAGIN & SCHINNER. **Applied Microbiology Biotechnol.**, v. 47, p. 462- 468, 2008

MELO JUNIOR, H. R.; COSTI, A. C. Z. **Avaliação da contaminação das Águas subterrâneas por hidrocarbonetos na vila Tupi, Porto Velho (RO)**. XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, Cuiabá, 2004. Disponível: www.cprm.gov.br/publique/media/avali_contami.pdf, acessada em 12 de fevereiro de 2008.

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R. C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, n.4, p.1675-1681, 2001.

MORALES, M.; VELÁZQUEZ, E.; JAN, J.; REVAH, S.; GONZÁLEZ, U.; RAZO-FLORES, E. Methyl *tert*-butyl ether biodegradation by microbial consortia obtained from soil samples of gasoline-polluted sites in Mexico. **Biotechnology Letters** v. 26, p. 269–275, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª Edição, Editora UFLA, 729p., 2006.

OGBONNA, D. N. et al. Effect of bioremediation on the growth of Okro (*Abelmoshus esculetus*) in the Niger Delta soils. **Environmentalist**, v. 27, p. 303-309, 2007.

PRPICH, P. G., DAUGULIS, A. J. Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid–liquid two phase partitioning bioreactor. **Biodegradation**, v.16, p.329–339, 2005.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresour. Technol. Essex**, v.90, p.159-168, 2003.

RAHOMA S. M. **A Fração Pesada de Petróleo e Gás Natural: Propriedades e Implicações**. Dissertação (tese de mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

RAIMUNDO, R. S. e RIZZO, A. C. L. “**Utilização de Biorreatores no Tratamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**”. X Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT, 2002.

REASONER, D. J. E GELDREICH, E. E., A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49 (1), p.1-7, 1985.

RICHARD, J. Y., VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **Int. Biodet. Biod**, v. 44, p.93–100, 1999.

RÖLING, W. F.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; LEE, K., DANIEL, F.; SWANNELL, R. P. J.; HEAD, I. M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. **Appl Environ Microbiol** v. 68, p.5537–5548, 2002.

RON, E. Z.; ROSEMBERG, E. Natural role of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.

RONCEVIC, S., DALMACIJA, B., IVANCEV-TUMBAS, I., TRICKOVIC, J., PETROVIC, O., KLADNJA, M., AGBABA, J. Kinetics of Degradation of Hydrocarbons in the Contaminated Soil Layer. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v.49, p.27–36, 2005.

SERRANO, A; GALAGO, M. Direct screening and confirmation of benzene, tolueno and etylbenzene and xylenes in water. **Journal of Chromatograph**, v. 1045, p. 181-188, 2004.

SIKKEMA, J., BONT, J. A. M., POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SKLADANY, G.J., METTING JR., F.B. Bioremediation of contaminated soil. p. 483–513. In: WILBERG, D. Q. A espécie *Trifolium repens* L. como bioindicadora de estado de Biorremediação do solo contaminado com óleo diesel. Tese (Mestrado em Ciências Agrárias), Paraná, PR – Universidade Federal do Paraná – UFPR, 172p., 2006.

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

THOMASSIN-LACROIX, E. J. M.; ERIKSSON, M.; REIMER, K.; MOHN, W. W. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 59, p. 551–556, 2002.

URURAHY, A. F. P.; MARINS, M. D. M.; VITAL, R. L. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. *Revista de Microbiologia*, 1998.

UENO, A., ITO, Y., YUMOTO, I., OKUYAMA, H. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p.1739–1745, 2007.

VAN VEEN, J. A.; VAN OVERBEEK, L. S., VAN ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 121-135, 1997.

VIDALI, M. Biorremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, p. 1163-1172, 2001.

VIÑAS, M., SABATE, J., ESPUNY, M. J., SOLANAS, A. M. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. **Appl. and Environ. Microb.**, p. 7008–7018, 2005.

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

WU, Y., LUO, Y., ZOU, D., NI, J., LIU, W., TENG, Y., LI, Z. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. **Biodegradation**, v.19, p.247–257, 2008.

CAPÍTULO II

DINÂMICA POPULACIONAL DE UM CONSÓRCIO BACTERIANO DURANTE A DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL

RESUMO

LEAL, Patrícia Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Dinâmica populacional de um consórcio bacteriano durante a degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo em solo contaminado com óleo diesel.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura, umidade e relação C:N:P na dinâmica populacional de um consórcio bacteriano e na seqüência de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo em solo contaminado com óleo diesel. O consórcio bacteriano estudado foi composto pelos isolados *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 e *Bacillus subtilis* LBBMA 155, isolados de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. As variações de temperatura, umidade e relação C:N:P geraram 18 tratamentos e o delineamento experimental adotado para se avaliar os efeitos desses fatores na biodegradação foi o composto central rotacionado (DCCR). A temperatura foi o fator ambiental que mais influenciou a biodegradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo. As condições ótimas para a biodegradação dos hidrocarbonetos foram 35°C, relação C:N:P 125:10:1 e teor de água equivalente a 60% da capacidade máxima de retenção. Os hidrocarbonetos de menor cadeia carbônica (C12-C17, exceto C14) foram rapidamente degradados nos primeiros 15 dias de incubação. Nessa fase, 24% de HTP presentes no solo haviam sido degradados. Ao final do período de avaliação (60 dias), 90% dos HTP haviam sido degradados. Todos os membros do consórcio foram capazes de se multiplicar no solo contaminado com óleo diesel. Houve ampla oscilação das populações ao longo do período de incubação. A maior densidade das populações de todos os membros do consórcio foi observada aos 30 dias de incubação, coincidindo com a fase de maior intensidade de degradação de HTP. Ao final de 60 dias, observou-se diminuição das populações de todos os isolados componentes do consórcio, as quais se mantiveram em torno de $2,0 \times 10^7$ UFC g⁻¹. Conclui-se que o consórcio bacteriano foi eficiente tanto na colonização do ambiente em que foi inoculado quanto na degradação de hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel.

ABSTRACT

LEAL, Patrícia Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, september 2009.
Population dynamics of a bacterial consortium during the degradation of total petroleum hydrocarbons in soil contaminated with diesel oil. Advisor: Marcos Rogério Tótola. Committee Members: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

This study aimed at evaluating the effect of temperature, humidity, and the C:N:P ratio on population dynamics of a bacterial consortium and the sequence of petroleum hydrocarbons degradation in soil contaminated with diesel oil. The bacterial consortium was composed of the strains *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* ES11 LBBMA, and *Bacillus subtilis* LBBMA 155, isolated from environments contaminated with petroleum hydrocarbons. Variations in temperature, humidity and the C: N: P ratio generated 18 treatments and the experimental design to evaluate the effects of these factors on biodegradation and on microbial populations was the central composite rotational (DCCR). The temperature was the main environmental factor influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons. The optimum conditions for the biodegradation was 35 °C, C:N:P 125:10:1 and water content equivalent to 60% of the maximum retention. The hydrocarbons of lower carbon chain (C12-C17, except C14) were rapidly degraded during the first 15 days. In this phase, 24% of HTP in the soil were degraded. At the end of the evaluation period (60 days), 90% of TPH were degraded. All members of the consortium were able to multiply in the soil contaminated with diesel oil. There was wide oscillation of populations throughout the incubation period. The highest population density of all members of the consortium was obtained at 30 days of incubation, what coincided with the highest degradation rate of TPH. After 30 days, there was a steep decrease in the number of cells of all members of the consortium, although the numbers were still at the order of $2,0 \times 10^7$ CFU g⁻¹ by the end of the experiment, at 60 days.

1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos do petróleo e de seus derivados são poluentes de grande relevância ambiental, em razão dos grandes volumes dessas fontes que são produzidos, transportados e armazenados. Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser transformados em substâncias inertes, por meio da atividade catabólica de microrganismos presentes em solos e em corpos de água contaminados. No entanto, a biodegradação pode ser dificultada se as condições ambientais não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores (FANTROUSSI e AGATHOS, 2005). Limitações dessa natureza podem ser superadas pela modificação das condições de umidade, de disponibilidade de oxigênio, de pH, de temperatura e de disponibilidade de nutrientes inorgânicos.

A disponibilidade de água em solos contaminados com hidrocarbonetos pode ser considerada como um dos fatores ambientais mais limitantes da biodegradação. Isso decorre do fato de que a água é essencial ao metabolismo microbiano, mas o seu teor no solo apresenta relação inversa com a disponibilidade de oxigênio interferindo, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pela degradação dos hidrocarbonetos (HAIDER, 1999). Valores entre 50 e 70% de umidade no solo são considerados como ótimos para que ocorra a biodegradação (CASARINI *et al.*, 1991), embora haja relatos de efetiva degradação de hidrocarbonetos aromáticos por microrganismos em solos com teores de água entre 30 e 90 % (DIBBLE e BARTHA, 1979a).

A temperatura também tem um papel significativo para o sucesso da biorremediação, por afetar diretamente a atividade metabólica dos microrganismos. Além disso, aumento ou diminuição de temperatura promovem alterações no comportamento físico ou químico das moléculas de hidrocarbonetos do petróleo, tais como viscosidade e potencial de volatilização (COULON *et al.*, 2005). Muitos estudos sobre biodegradação de hidrocarbonetos consideram 30°C a temperatura ideal para atividade dos microrganismos degradadores desses poluentes (MARGESIN & SCHINNER 1997; PARASKEVI *et al.*, 2005; LOH e YU, 2000; ANNADURAI *et al.*, 2002), embora a oxidação de compostos oleosos possa geralmente ocorrer no intervalo de 0 até 55 °C (WILBERG, 2006).

No processo de biorremediação, é necessário que o pH seja o compatível com o requerido para a manutenção de elevada atividade dos microrganismos. O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos, em razão dos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade de membranas e na atividade enzimática; indiretamente, tem influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e de outros metais

pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos (WILBERG, 2006). Valores de pH próximos à neutralidade, entre 6,5 e 8, favorecem a atividade microbiana e também a precipitação de metais pesados (LEEPER, 1978). ATAGANA et al. (2003) observaram que as maiores contagens de microrganismos degradadores e maior degradação de hidrocarbonetos no solo ocorreu em valores de pH de 6,5 e 7. A contaminação por hidrocarbonetos pode alterar o pH do solo (AMADI *et al.* 1996) e promover alterações na microbiota. Em ambientes com baixo pH, pode haver a predominância de fungos, uma vez que estes são mais aptos a crescerem em condições ácidas quando comparados com as bactérias (DEOTTI, 2005).

O requerimento nutricional dos microrganismos que participam da biorremediação em ambientes contaminados com hidrocarbonetos, principalmente de N e P, está estreitamente relacionado com a espécie microbiana, com o tipo de contaminante e com o ambiente. A relação C:N:P depende da taxa de crescimento específica, da composição elementar da biomassa microbiana e da eficiência de conversão máxima de C ou coeficiente de rendimento (Y) (VREDE *et al.*, 2002). Baixa disponibilidade do composto poluente, assim como a competição por N e P entre raízes de plantas e microrganismos, podem tornar as condições nutricionais no ambiente limitantes ao crescimento e à atividade microbiana, havendo a necessidade do aporte desses nutrientes (LEYS, *et al.*, 2006). Embora os efeitos da adição de N e P na biodegradação de poluentes no solo sejam conflitantes, a relação C:N:P de 100:10:1 é geralmente usada e recomendada na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (BOUCHEZ *et al.*, 1995).

O tipo de solo, além de influenciar a biodisponibilidade dos contaminantes, também afeta a estrutura, a atividade e a densidade das populações que compõem a comunidade microbiana (SCHERR et al., 2007; LABUD et al., 2007). Os hidrocarbonetos de petróleo, por serem poluentes hidrofóbicos, tendem a ser adsorvidos na matriz do solo, o que diminui a sua disponibilidade aos microrganismos e a conseqüente biodegradação. Essa tendência é ainda maior em solos com altos teores de matéria orgânica e de argila (LABUD et al., 2007).

As condições ambientais, além de serem determinantes para a sobrevivência e atividade dos microrganismos envolvidos na biodegradação de poluentes, podem também promover mudanças na dinâmica populacional de uma comunidade microbiana e na atividade de biodegradação (Vinãs et al., 2005). Por essa razão, o monitoramento da dinâmica populacional dos microrganismos envolvidos na biorremediação de ambientes contaminados com petróleo ou com seus derivados, é parte importante em operações de biorremediação. A integração desse monitoramento com a avaliação da seqüência de degradação de moléculas

específicas, presentes em misturas complexas, é um refinamento que pode auxiliar na identificação de populações que possam, eventualmente, ser utilizadas como marcadores do processo de biorremediação. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre o padrão de flutuação das populações de um consórcio bacteriano e o padrão de consumo de hidrocarbonetos em um solo contaminado com óleo diesel, em resposta aos fatores temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Montagem dos Microcosmos

O solo utilizado foi proveniente de um corte localizado na rodovia Viçosa/Paula Cândido, MG. O material foi peneirado em peneira de 5mm e analisado quanto às características físicas e químicas (Tabela 1), sendo enquadrado na classe textural de muito argiloso. Este solo foi esterilizado com a dose de 25 Mrad de radiação γ por uma fonte de ^{60}Co no Laboratório de Irradiações no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, MG. A umidade do solo foi ajustada para 40, 60 e 80 % (v/p) da capacidade máxima de retenção de água. Foram feitos ajustes nutricionais para diferentes valores C:N:P (50:10:1; 100:10:1 e 200:10:1). O pH foi ajustado para 7, por meio da aplicação de CaCO_3 e MgCO_3 na proporção de um grama de CaCO_3 para 0,21 g de MgCO_3 .

O solo foi dividido em microcosmos de aproximadamente 30 g de solo, os quais foram mantidos em incubadora tipo BOD nas temperaturas de 20, 30 e 50°C. A umidade foi corrigida frequentemente para se manterem os valores acima referidos. Parte dos microcosmos, uma semana após a adição de nutrientes, foi contaminada com óleo diesel (20 ml Kg^{-1}). Amostras não-contaminadas serviram como controle experimental.

Cada linhagem bacteriana componente do consórcio foi cultivada em meio R₂A até o valor de D.O. correspondente ao final de fase logarítmica de crescimento. As culturas assim preparadas foram misturadas de modo a se obter uma concentração final de 10^6 UFCmL⁻¹ de cada isolado. Em seguida, 2 mL da mistura foram adicionados a frascos contendo 30g de solo previamente preparado e contaminado, como descrito anteriormente.

Tabela 1 - Características físicas e químicas do solo utilizado no experimento de biodegradação de óleo diesel por um consórcio bacteriano

Característica	Unidade	Valor
Areia grossa	dag kg ⁻¹	12
Areia fina	dag kg ⁻¹	11
Silte	dag kg ⁻¹	4
Argila	dag kg ⁻¹	73
pH (H ₂ O)	unidade de pH	4,8
CRA	%	48,89
C org	dag kg ⁻¹	3,20
N total	dag kg ⁻¹	0,06
P	mg dm ⁻³	0,5
K	mg dm ⁻³	39
Ca ²⁺	cmol _c dm ⁻³	0,33
Mg ²⁺	cmol _c dm ⁻³	0,01
Al ³⁺	cmol _c dm ⁻³	0,77

Capacidade máxima de retenção de água (CRA); carbono orgânico (C org); dag kg⁻¹ (%).

2.2 Determinação da degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo no solo sob diferentes condições de temperatura, nutricionais e umidade

O solo contaminado com óleo diesel e inoculado com o consórcio bacteriano foi mantido em BOD durante 60 dias sob as diferentes condições de temperatura, umidade e disponibilidade nutricional, conforme anteriormente descrito. Amostras dos solos incubados foram retiradas a cada 15 dias para verificação da seqüência de degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) pelo consórcio bacteriano. A extração de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) foi realizada em extrator Soxhlet, segundo o método 3540C (EPA, 1996). Para isso, utilizaram-se 2 g de solo e 200 mL dos solventes hexano e

acetona (1:1). O período de extração foi de 6 horas. Os extratos foram analisados em cromatógrafo a gás (QP 5000) acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu®, modelo 17-A), utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-1 (30m x 0,25 mm x 0,25 µm), nas seguintes condições: temperatura inicial de 40°C (2 min), rampa de aquecimento de 8°C min⁻¹ até 240°C. A temperatura do injetor foi de 260°C e do detector 280°C. O fluxo do gás hélio foi de 1 mL min⁻¹ e o modo de injeção foi *splitless*.

2.3 Avaliação da dinâmica populacional dos membros do consórcio bacteriano

Para verificação da flutuação populacional, foi realizada contagem de UFC g⁻¹ massa seca do solo, em placas contendo meio seletivo adicionado dos antibióticos requeridos para cada um dos isolados (Tabela 2). Para isso, 10 g de cada amostra foram diluídos em 95 mL de pirofosfato de sódio a 0,1 % (massa/volume). Após agitação a 200 rpm por 20 min, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento de 0,1 mL em placas contendo meio Miller Hinton adicionado dos antibióticos. Para inibir o crescimento de fungos, foi adicionada ciclohexamida (100 mg L⁻¹) ao meio. As placas foram mantidas a 30°C até a contagem das colônias formadas na superfície do meio de cultura.

Tabela 2 – Antibióticos específicos selecionados para contagem das bactérias componentes do consórcio (UFC g⁻¹ massa seca do solo).

Linhagens bacterianas	Antibióticos
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Ampicilina + Cefoxitina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imepenem
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Amoxicilina + Clavulanato
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Penicilina
<i>Bacillus subtilis</i>	Gentamicina + Cefoxitina

2.4 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado para as análises dos efeitos dos fatores temperatura, teor de umidade e relação C:N:P na biodegradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo foi o delineamento composto central rotacionado (DCCR), conforme descrito na tabela 3.

A significância estatística do modelo foi avaliada empregando-se o teste de Fisher para a análise da variância (ANOVA). O teste t de Student foi utilizado para se determinar a significância estatística dos coeficientes da regressão. As análises de regressão e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando-se o software estatístico MINITAB[®] (versão demo 15, Minitab Inc.). A análise de fatores permite estudar t tratamentos avaliados por um número relativamente grande de variáveis-resposta Y_s , por meio de um menor número de fatores de agrupamento das mesmas em função das suas correlações. Portanto, aquelas pertencentes a um mesmo fator serão fortemente correlacionadas entre si, mas pouco com as de outro fator. Desse modo, o objetivo é representar a informação do conjunto de valores de cada variável resposta Y_w ($w = 1, 2, \dots, p$) por outro que envolve os valores de cada fator F_j ($j = 1, 2, \dots, k \leq p$), por meio da decomposição da matriz de variâncias e covariâncias referente aos valores originais de Y . Para agrupamento dos diferentes hidrocarbonetos (C12 a C22) foram estimados fatores rotacionados, parâmetro varimax, baseando-se nos autovalores obtidos pela matriz de correlações. Os fatores foram escolhidos segundo Jolliffe 1992, ou seja, foram analisados aqueles com autovalor maior que 0,7. Os hidrocarbonetos não representados pelos fatores estimados (comunalidade $< 0,64$) foram analisados separadamente. A representatividade foi avaliada pelos valores de comunalidade de cada variável no conjunto de fatores estimados.

Tabela 3 – Modelo do delineamento experimental DCCR utilizado para as análises dos efeitos dos fatores temperatura, teor de umidade e relação C:N:P na biodegradação dos hidrocarbonetos em solo contaminado com óleo diesel

Trat	Temp. (c°)	C:N:P	Umidade (%)
1	26	80:10:1	48
2	43	80:10:1	48
3	26	16:10:1	48
4	43	169:10:1	48
5	26	80:10:1	71
6	43	80:10:1	71
7	26	169:10:1	71
8	43	169:10:1	71
9	20	125:10:1	60
10	50	125:10:1	60
11	35	50:10:1	60
12	35	200:10:1	60
13	35	125:10:1	40
14	35	125:10:1	80
*15	35	125:10:1	60
*16	35	125:10:1	60
*17	35	125:10:1	60
*18	35	125:10:1	60

* Ponto central

3 RESULTADOS

3.1 Efeito da temperatura, umidade e relação C:N:P na biorremediação de solo contaminado com óleo diesel por consórcio bacteriano

A análise de fatores para diminuição do número de variáveis a serem avaliadas, segundo metodologia apresentada acima, precedeu a análise de variância e ajuste do modelo de resposta da degradação em função dos fatores temperatura, umidade e relação C:N:P. Os coeficientes utilizados na estimativa de cada fator e para cada tempo avaliado, bem como as respectivas comunalidades destes fatores, são apresentados em anexo nas tabelas 1, 2, 3 e 4. Estimativas dos coeficientes dos fatores analisados e os modelos ajustados para resposta de degradação, em cada tempo de atuação do consórcio bacteriano, estão apresentados nas tabelas 5 e 6 em anexo, respectivamente.

De acordo com o modelo estimado para resposta de degradação em função da temperatura, umidade e relação C:N:P, os níveis representados pelo ponto central (Tabela 3) associaram-se aos valores máximos de degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo C12 – C22.

Dentre os fatores ambientais estudados, a temperatura apresentou efeito quadrático significativo sobre a eficiência de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo pelo consórcio bacteriano, em todos os tempos avaliados (15, 30, 45 e 60 dias de incubação do solo). Aos 15 dias de incubação do solo, a máxima degradação foi associada à temperatura de 35°C (Figura 1). Os demais fatores (umidade e relação C:N:P) não apresentaram, nessa fase, efeito significativo sobre a capacidade de biodegradação pelo consórcio bacteriano.

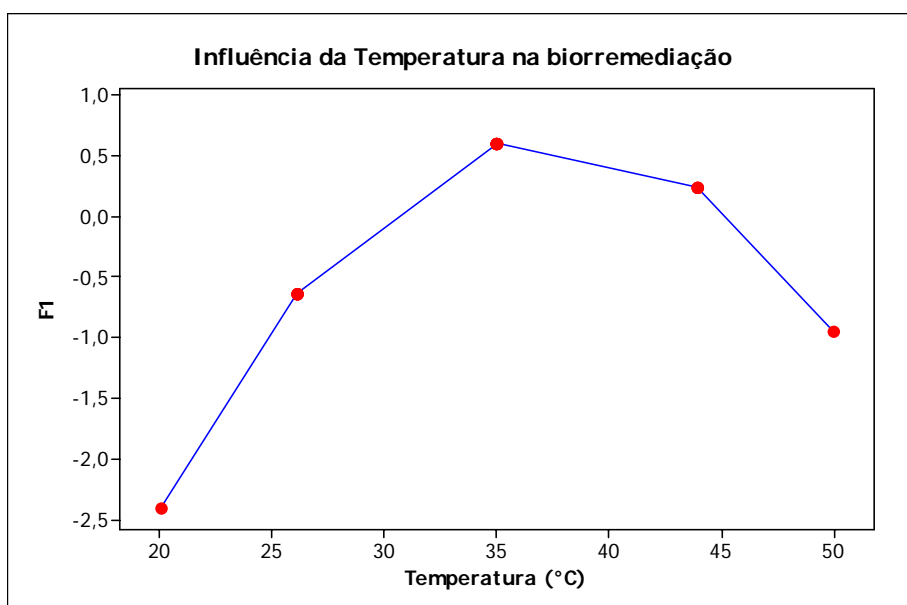


Figura 1 – Efeito quadrático da temperatura na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 15 dias de incubação. O pico do gráfico representa a máxima degradação dos hidrocarbonetos.

Aos 30 e aos 45 dias, houve efeito quadrático da temperatura, da umidade e da relação C:N:P sobre a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo (Figuras 2 a 7). A máxima degradação foi observada sob temperatura de 35°C, teor de água equivalente a 60% da capacidade máxima de retenção de água e relação C:N:P de 125:10:1, valores correspondentes aos níveis do ponto central.

Aos 60 dias, ocorreu efeito significativo para a interação entre temperatura e relação C:N:P na biodegradação dos hidrocarbonetos (Figura 8). A máxima degradação foi observada sob temperatura de 35°C e relação C:N:P de 125:10:1, valores correspondentes aos níveis do ponto central. Nessa fase, não foi verificado efeito significativo do teor de água sobre a degradação de hidrocarbonetos, na faixa avaliada (40 a 80% da capacidade máxima de retenção de água). Ao final do experimento, os resultados revelaram efeito quadrático da relação C:N:P e da interação entre a temperatura e relação C:N:P sobre a biodegradação. Novamente, a máxima degradação obtida foi associada aos níveis do ponto central (Figura 6 e 7).

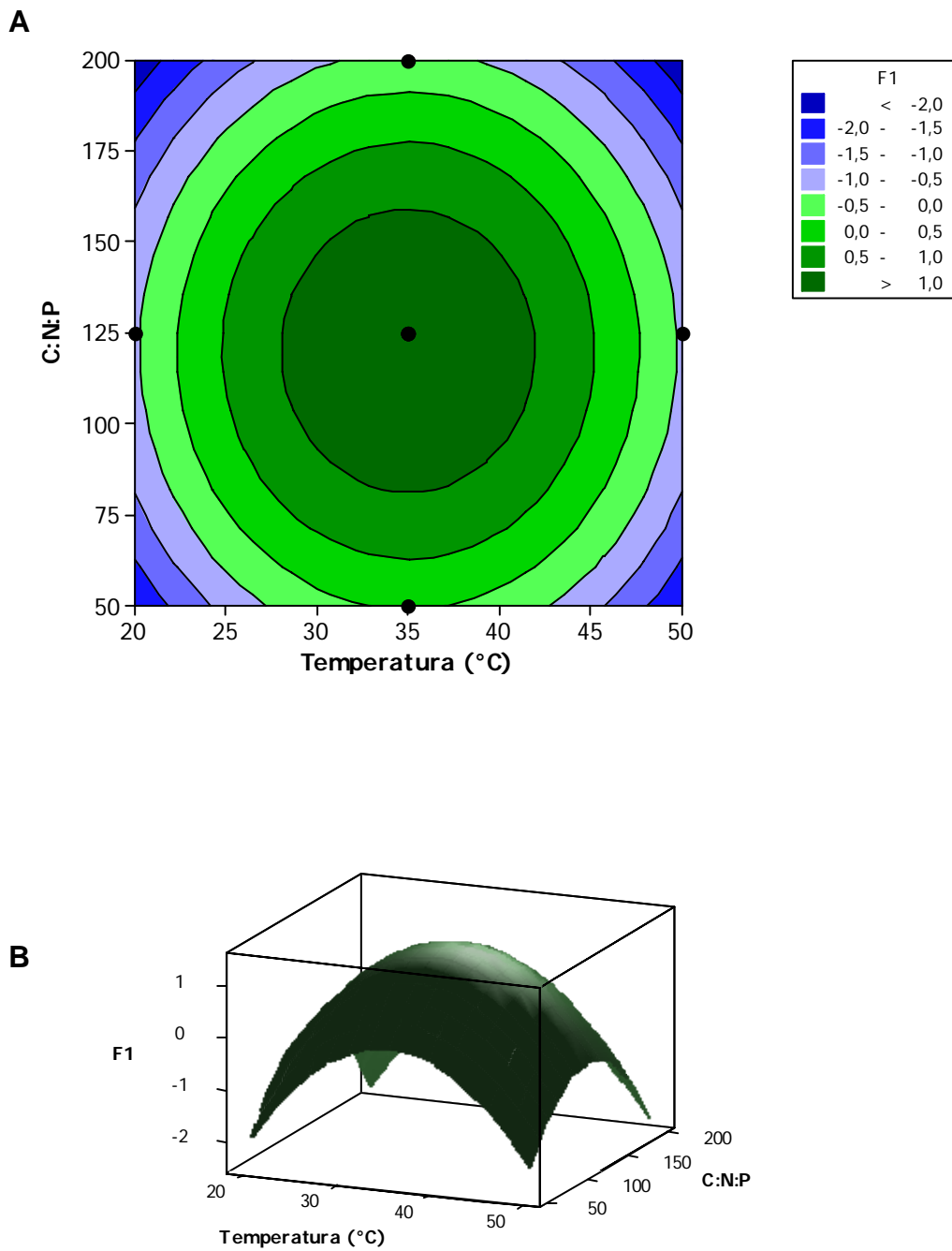


Figura 2 – Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da temperatura e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 30 dias de incubação. A área com $F1 > 1$ do gráfico de contorno (A) e o pico do gráfico de superfície de resposta (B) representam a máxima biodegradação de hidrocarbonetos. A relação C:N:P é dada na forma de C:10:1.

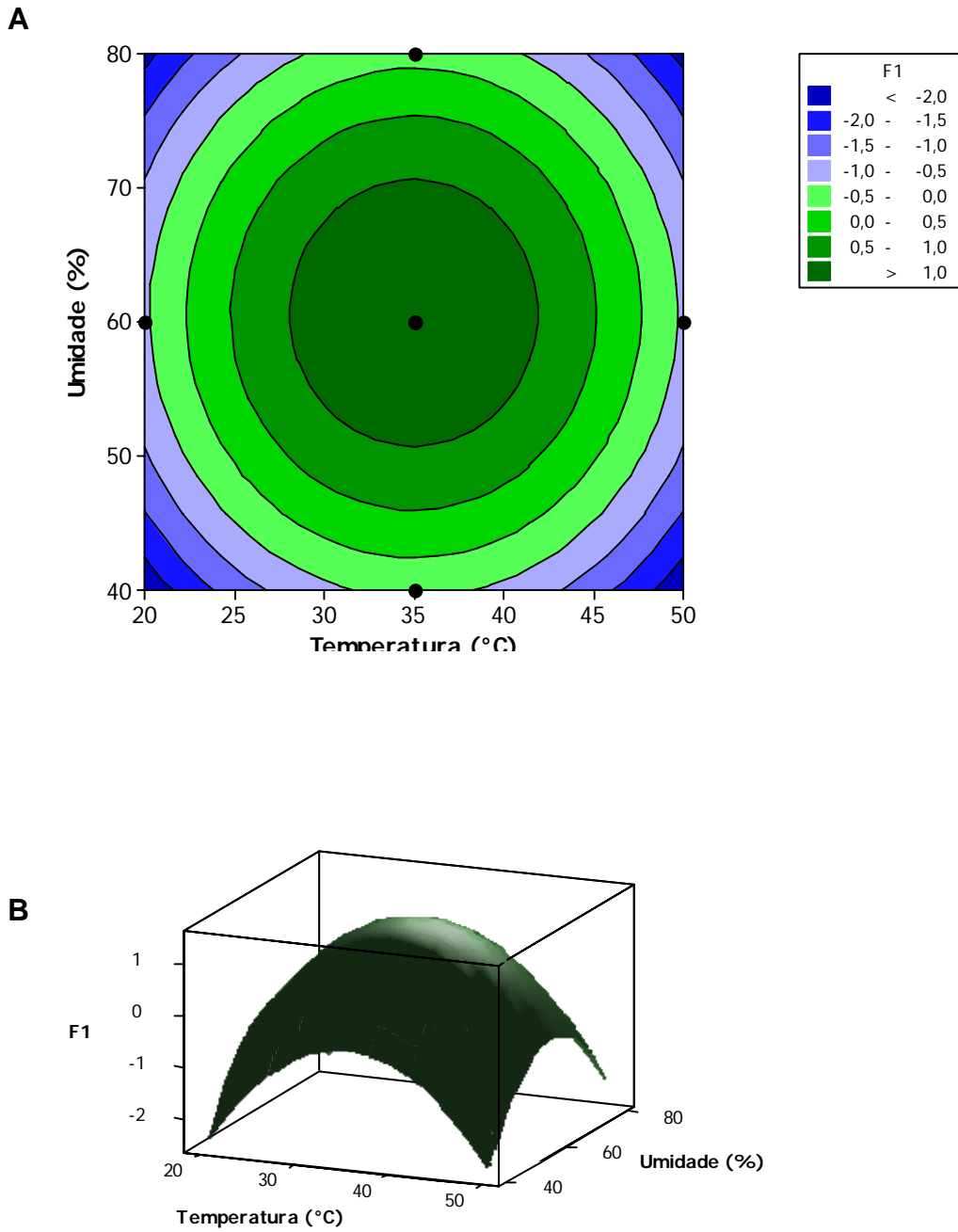


Figura 3 – Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da temperatura e umidade na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 30 dias de incubação. A área com $F1 > 1$, no gráfico de contorno (A) e o pico do gráfico de superfície de resposta (B) representam a máxima biodegradação de hidrocarbonetos.

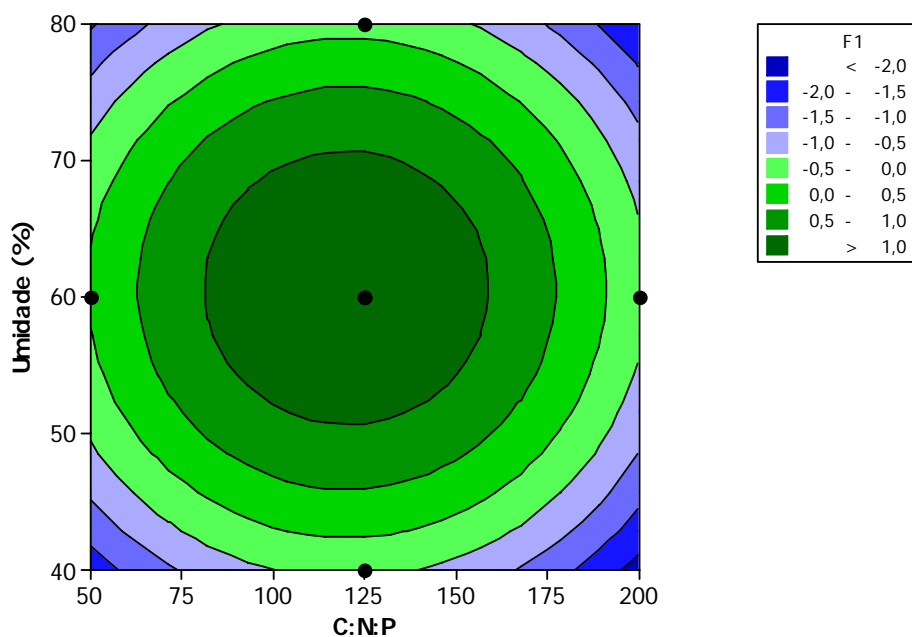
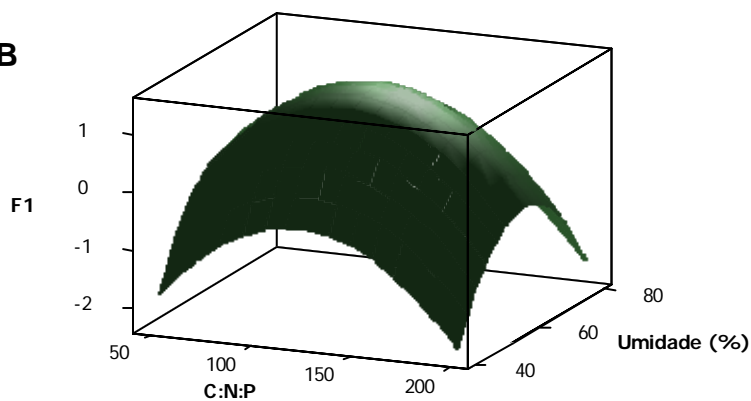
A**B**

Figura 4 – Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da umidade e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 30 dias de incubação. A área com $F1 > 1$ do gráfico de contorno (A) e o pico do gráfico de superfície de resposta (B) representam a máxima biodegradação de hidrocarbonetos. A relação C:N:P é dada na forma de C:10:1.

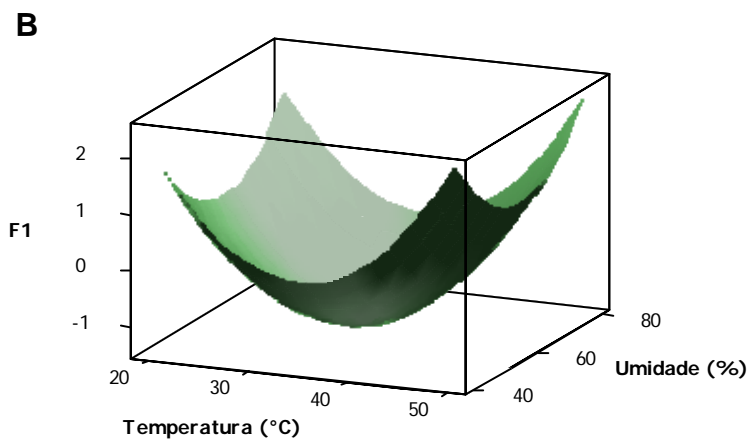
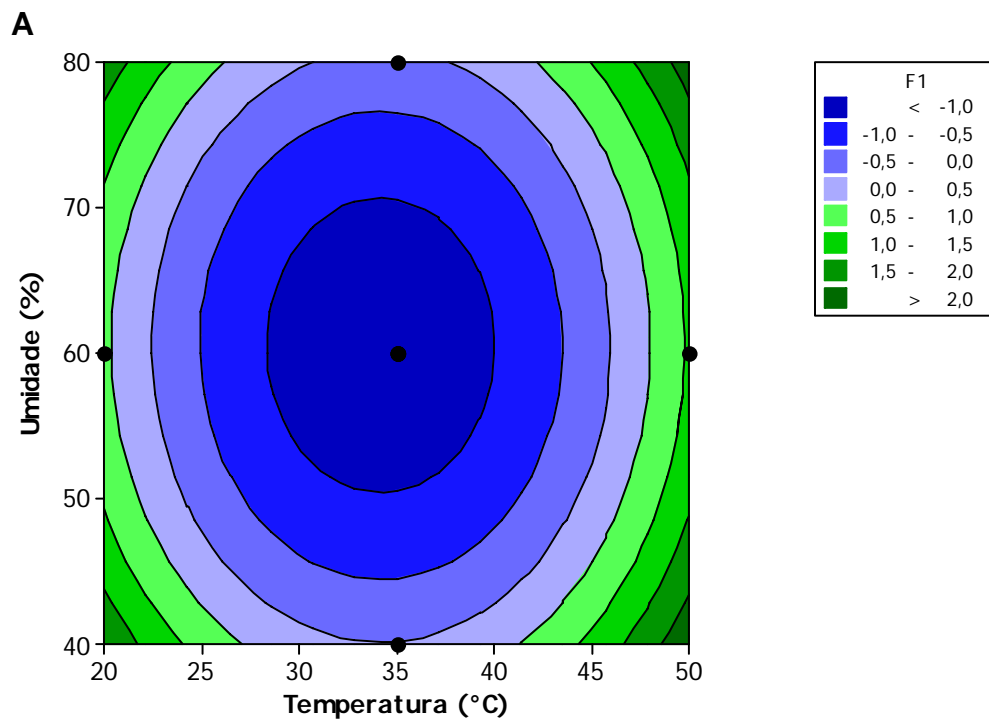


Figura 5 – Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da temperatura e umidade na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 45 dias de incubação. A área com $F1 < -1$ do gráfico de contorno (A) e a máxima depressão do gráfico de superfície de resposta (B) representam a máxima biodegradação de hidrocarbonetos.

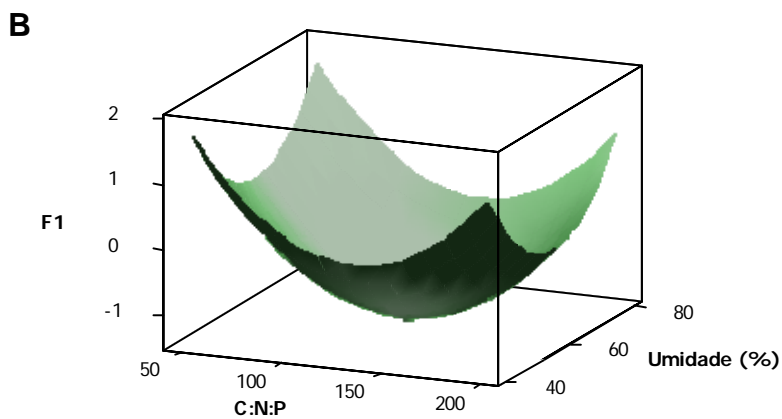
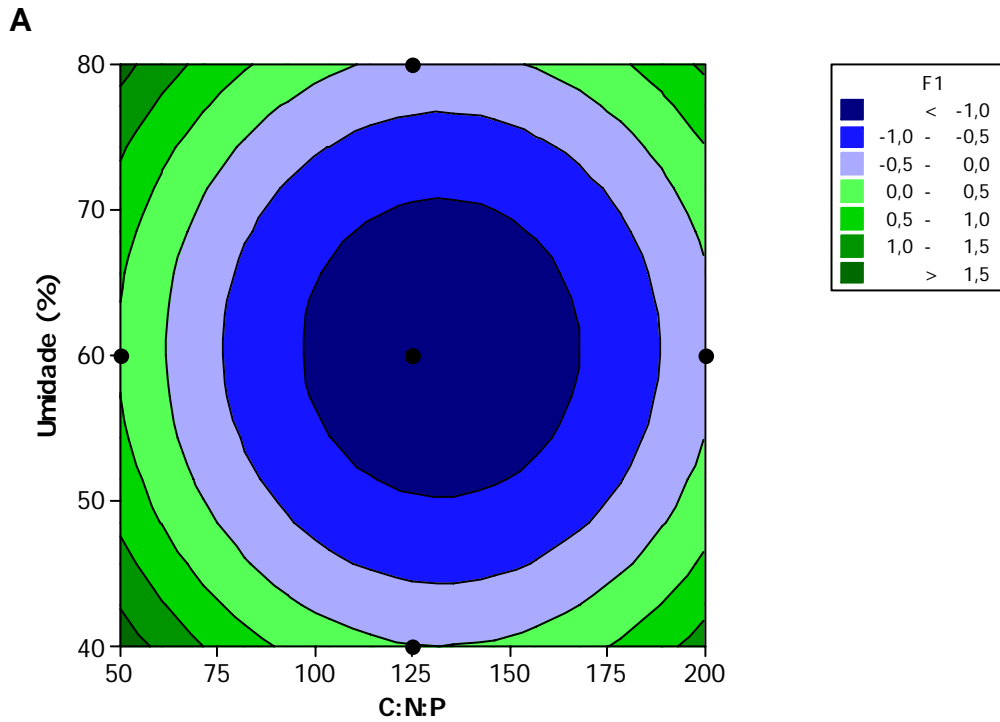


Figura 6 – Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da umidade e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 45 dias de incubação. A área com $F1 < -1$ do gráfico de contorno (A) e a máxima depressão do gráfico de superfície de resposta (B) representam a máxima biodegradação de hidrocarbonetos. A relação C:N:P é dada na forma de C:10:1.

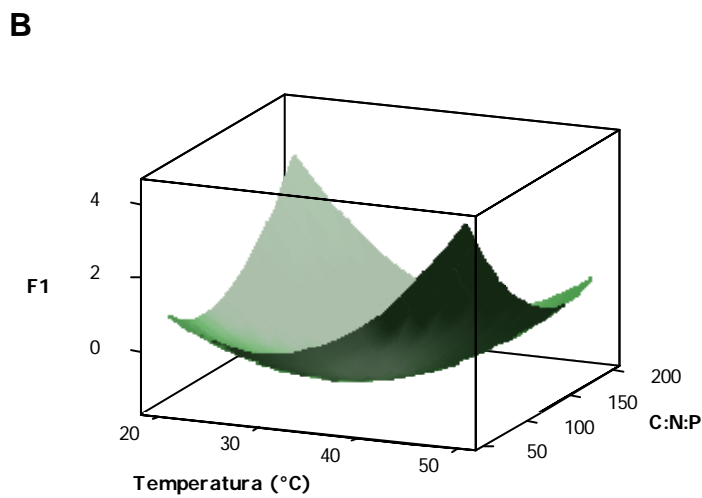
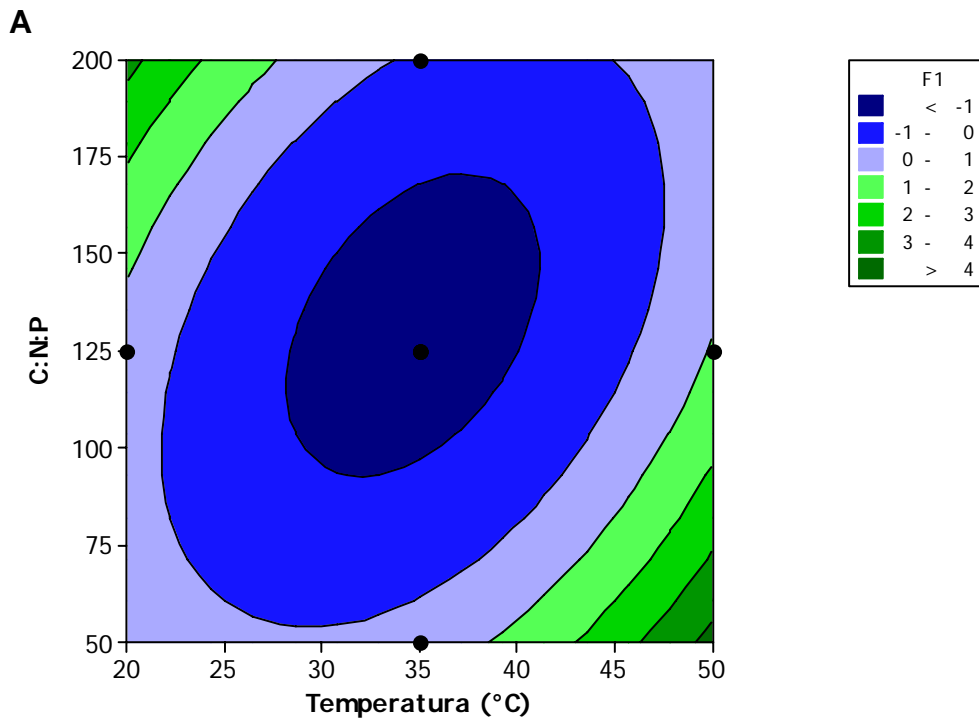


Figura 7 – Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da interação entre temperatura e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 45 dias de incubação. A área com $F1 < -1$ do gráfico de contorno (A) e a máxima depressão do gráfico de superfície de resposta (B) representam a máxima biodegradação de hidrocarbonetos. A relação C:N:P é dada na forma de C:10:1.

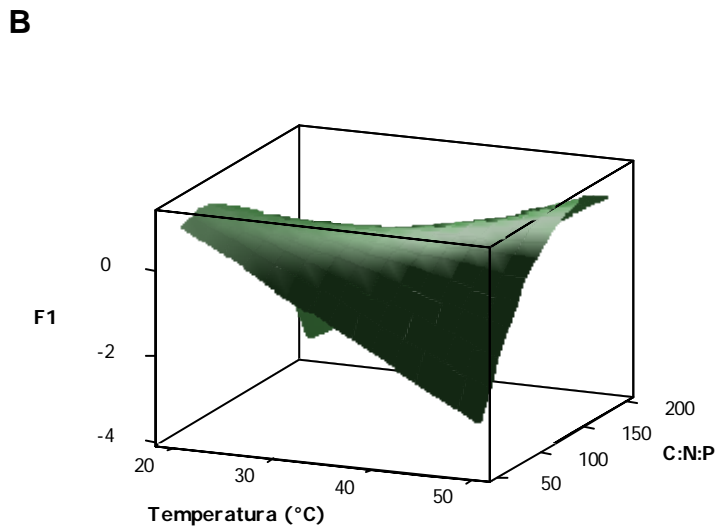
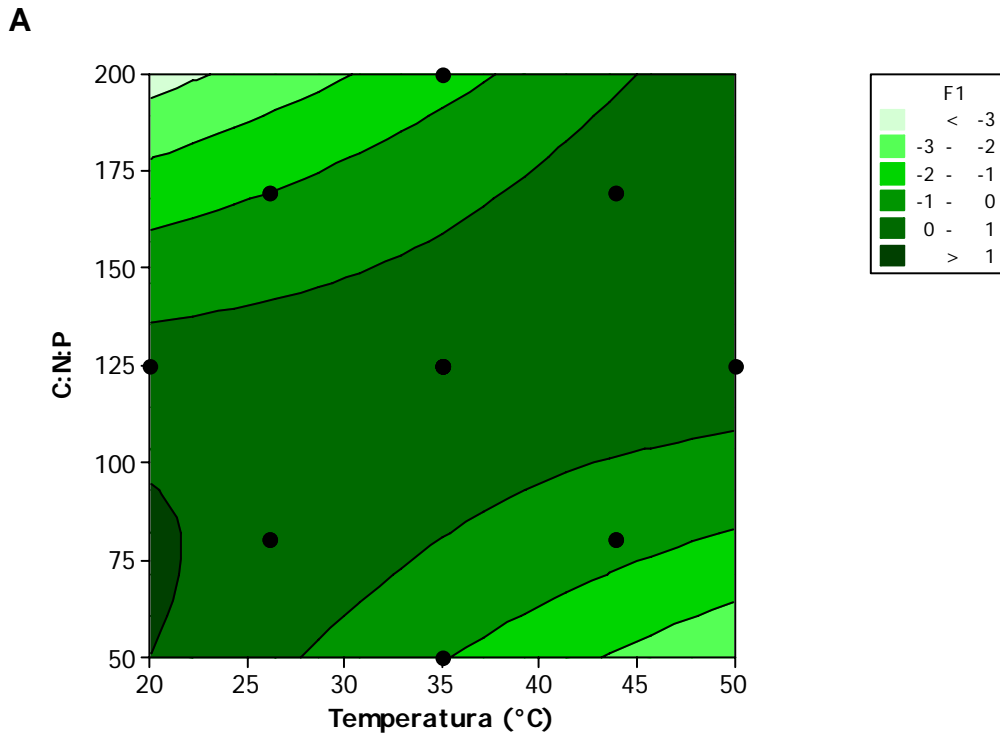


Figura 8 – Gráficos de contorno e superfície de resposta do efeito da temperatura e relação C:N:P na biodegradação de HTP no solo contaminado com óleo diesel, após 60 dias de incubação. A área com $F1 > 1$ do gráfico de contorno (A) e o pico do gráfico de superfície de resposta (B) representam a máxima biodegradação de hidrocarbonetos. A relação C:N:P é dada na forma de C:10:1.

3.2 Degradação de HTP por consórcio bacteriano em solo contaminado com óleo diesel

O consórcio bacteriano foi capaz de degradar os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em solo contaminado com óleo diesel, ao longo dos 60 dias de incubação (Figura 9). Aos 15 dias, aproximadamente 40% dos HTP presentes no solo haviam sido degradados. A degradação, ao final de 60 dias de incubação, foi de 90% dos HTP do óleo diesel.

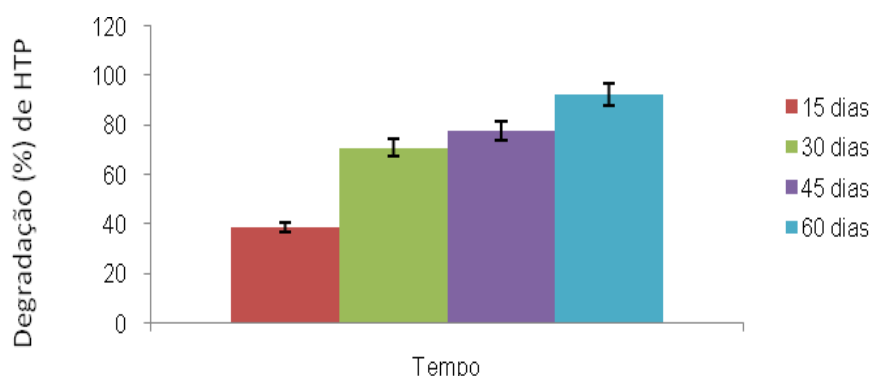


Figura 9 - Degradação (%) de HTP em solo inoculado com um consórcio bacteriano. O solo foi contaminado com óleo diesel (20 mL kg^{-1}) e incubado por 60 dias em câmara de crescimento ventilada, a 30°C , 80% de retenção de umidade e relação C:N:P de 125:10:1. Amostras do solo foram retiradas para análise de cromatografia gasosa no início do experimento (A), aos 15 dias (B), 30 dias (C), 45 dias (D) e 60 dias (E).

Os hidrocarbonetos de menor cadeia carbônica (C12, C14 e C15) foram os mais rapidamente degradados pelo consórcio bacteriano (Figura 10 B). Verificou-se ainda, ao longo do tempo, que dentre os HTP analisados, o hidrocarboneto com 17 átomos de carbono foi o menos eficientemente degradado pelo consórcio bacteriano (Figura 10 E). É importante ressaltar, porém, que o aumento da concentração desse hidrocarboneto, entre o 30^o e o 60^o dia de incubação (Figuras 10 D e 10 E), pode indicar a ocorrência de conversão de hidrocarbonetos de cadeia maior a hidrocarbonetos de cadeia mais curta, incluindo o C17.

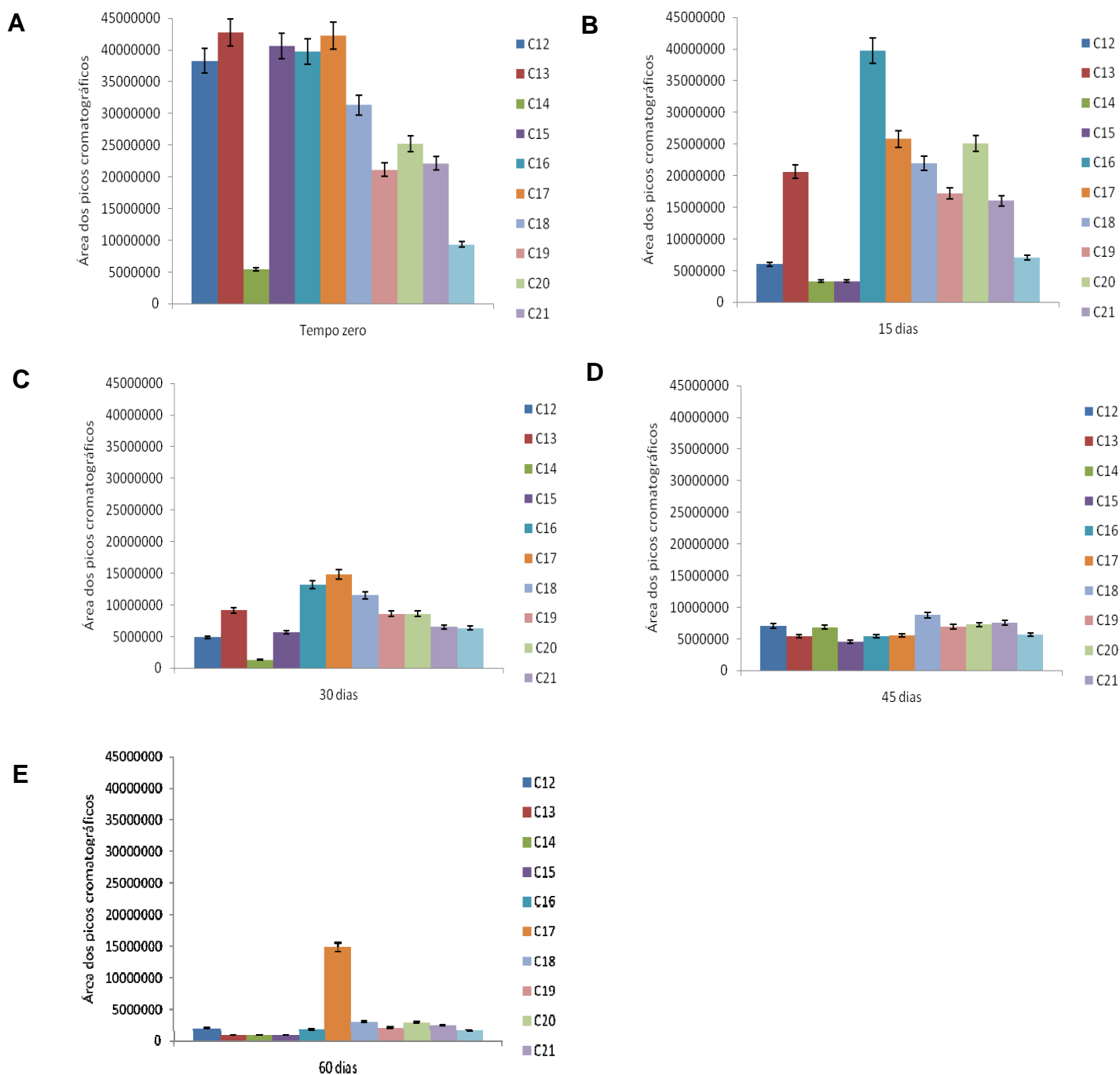


Figura 10 – Degradação de HTP (C12 – C22) no solo, representada pelas áreas dos picos cromatográficos, após inoculação do consórcio bacteriano. O solo foi contaminado com óleo diesel (20 mL kg^{-1}) e incubado por 60 dias em câmara de crescimento ventilada, a 30°C , 60% de retenção de umidade e relação C:N:P de 125:10:1. Amostras do solo foram retiradas para análise por cromatografia gasosa no início do experimento (A), aos 15 dias (B), 30 dias (C), 45 dias (D) e 60 dias (E).

3.3 Avaliação das populações constituintes do consórcio bacteriano durante a degradação de hidrocarbonetos em solo contaminado com óleo diesel

As populações de todos os isolados constituintes do consórcio bacteriano apresentaram ampla flutuação ao longo dos 60 dias de incubação do solo contaminado com óleo diesel (Figura 11). Aos 15 dias de incubação, ocorreu um aumento expressivo do número de células do consórcio; nessa fase, foi constatada uma predominância do isolado *Bacillus subtilis* LBBMA 155 e uma similaridade entre as populações de *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58 e *Ochrrobactrum anthropi* LBBMA 88b (Figura 11). Aos 30 dias de incubação, foi verificada a maior densidade populacional de todos os membros do consórcio, exceto para o isolado *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11. Após 45 dias, houve redução do número de células de todos os membros do consórcio (Figura 11). O isolado *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 apresentou, dentre os membros do consórcio, a menor densidade populacional, ao longo dos 60 dias de incubação do solo contaminado com óleo diesel. No solo não-contaminado, os isolados bacterianos apresentaram crescimento nos primeiros dias de incubação, seguido de declínio do número de células (Figura 12).

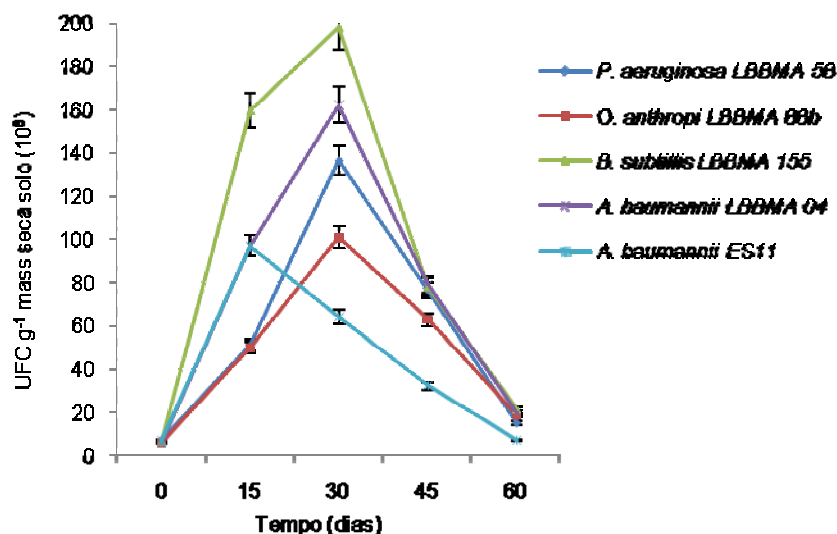


Figura 11 - Contagem de células do consórcio bacteriano presentes em solo contaminado com óleo diesel. O solo foi contaminado com óleo diesel (20 mL kg⁻¹) e incubado por 60 dias em câmara de crescimento ventilada, a 30°C, 60% de retenção de umidade e relação C:N:P de 125:10:1. Amostras do solo destinadas ao plaqueamento em meio de cultura contendo antibióticos específicos para cada membro do consórcio bacteriano foram retiradas no início do experimento aos 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias.

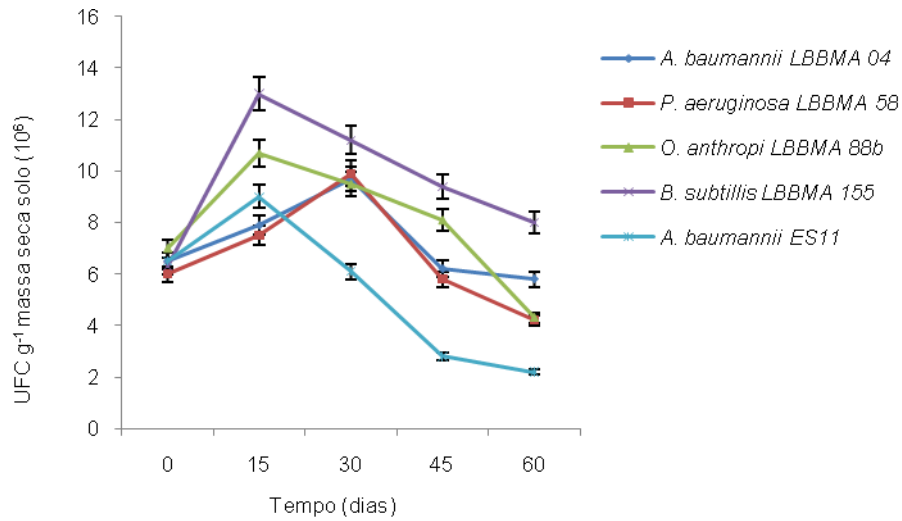


Figura 12 - Contagem de células do consórcio bacteriano presentes em solo sem adição de óleo diesel. O consórcio bacteriano foi inoculado em solo estéril e mantido por 60 dias em câmara de crescimento ventilada, a 30°C, 60% de retenção de umidade e relação C:N:P de 125:10:1

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeito dos fatores temperatura, umidade e relação C:N:P na biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo no solo contaminado com óleo diesel

Dos fatores ambientais avaliados, a temperatura foi a única que influenciou significativamente a biodegradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo, em todos os tempos analisados. A temperatura mais favorável para a biodegradação de HTP constituintes do óleo diesel pelo consórcio bacteriano foi 35°C (Figura 1). A temperatura afeta diretamente a atividade metabólica dos microrganismos, além de promover alterações físico-químicas nas moléculas de hidrocarbonetos do petróleo, tais como viscosidade e volatilização (COULON et al., 2005). Embora a biodegradação dos hidrocarbonetos possa ocorrer numa faixa de temperatura relativamente ampla, de 0°C a 70°C (SORKHOH *et al.*, 1993), muitos estudos sobre biodegradação de hidrocarbonetos consideram 30°C a temperatura ideal para a atividade dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (MARGESIN & SCHINNER 1997; PARASKEVI et al., 2005; LOH e YU, 2000; ANNADURAI et al., 2002). De modo geral, em baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta e a volatilização dos alcanos de cadeia curta se torna reduzida, acarretando num processo de biodegradação mais lento. Além disso, máximas atividades de enzimas envolvidas no catabolismo de hidrocarbonetos são observadas em temperaturas variando entre 30 e 40°C (BENTO, 2005).

O efeito exercido pela relação C:N:P na degradação de HTP ocorreu a partir de 15 dias após o início do experimento. Neste trabalho, a relação C:N:P que propiciou a maior biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo foi a de 125:10:1. Houve ainda efeito significativo da interação deste fator com a temperatura sobre a degradação dos HTP após 45 dias (Figuras 7 e 8). A relação C:N:P de 100:10:1 tem sido normalmente recomendada em operações de biorremediação de hidrocarbonetos (CHENG & MULLA, 1999). Entretanto, as pesquisas que avaliaram os efeitos da adição de N e P ao solo demonstram resultados conflitantes, o que provavelmente se deve às especificidades de cada ambiente, no que se refere a teores de nutrientes no solo, tipo de contaminante e populações microbianas envolvidas (LEYS et al., 2005). ATAGANA et al. (2003) reportaram que a degradação de hidrocarbonetos foi muito baixa na relação C:N natural do solo de 130:0,08. Nas relações C:N de 25:1, 20:1, 15:1, 10:1 e 5:1, e C:N:P de 10:1:2, as porcentagens de degradações foram próximas, com valor médio de 55%. MILLS & FRANKENBERGER (1994) obtiveram aumentos de aproximadamente 50% na mineralização do óleo diesel com a adição de 100 a

500 mg kg⁻¹ de fósforo ao solo. Por outro lado, BENTO et al. (2005) não observaram diferenças entre a biorremediação passiva e a bioestimulação com N e P na remoção de hidrocarbonetos leves e pesados do solo.

O efeito da umidade na biodegradação de HTP foi significativo após 15 dias de incubação do solo contaminado com óleo diesel (Figuras 3 a 6). No entanto, esse fator não apresentou influência na biodegradação aos 60 dias de incubação do solo. O teor de água mais favorável encontrado neste experimento foi o equivalente a 60% da capacidade máxima de retenção de água. A umidade do solo é considerada por HAIDER (1999) o fator ambiental mais crítico na biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos. Além disso, o teor de água no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pela degradação dos HTPs. Segundo ALEXANDER (1999), as condições ótimas para a biodegradação de hidrocarbonetos em solo ocorrem entre 50 e 70% de retenção de água. ATAGANA et al. (2003), avaliando a influência de diferentes teores de água do solo sobre a biodegradação de hidrocarbonetos, confirmaram a faixa de 60 – 70% de retenção de água como a mais favorável ao crescimento da comunidade microbiana degradadora e à degradação dos contaminantes.

4.2 Degradação de HTP e flutuação populacional do consórcio bacteriano em solo contaminado com óleo diesel

Ao final de 60 dias de incubação do solo contaminado com óleo diesel, a degradação de HTP no solo inoculado com o consórcio bacteriano chegou a 90% (Figura 9). Esse resultado é superior ao obtido por MARIANO et al. (2007), que utilizaram um consórcio contendo as espécies bacterianas *Ochrobactrum anthropi*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus cereus*. Naquele trabalho, 45,5% de HTP foram degradados após 55 dias de incubação de um solo contaminado com 6 mL Kg⁻¹ de óleo diesel.

Os hidrocarbonetos totais de petróleo de menor peso molecular foram mais rapidamente degradados pelo consórcio bacteriano (Figura 10 B). Isso se deve ao fato dos microrganismos apresentarem uma habilidade degradadora decrescente com o aumento da cadeia dos hidrocarbonetos, bem como com o aumento da complexidade de suas estruturas (TRINDADE, 2002; LOEHR et al. 2001). Em geral, quanto maior o número de átomos de carbono de um hidrocarboneto, maior é a sua persistência no ambiente, como conseqüência de

uma menor perda por evaporação e menor solubilidade, a qual dificulta a biodegradação (MARQUES JR., 2002).

A contagem de células revelou a ocorrência de amplas flutuações populacionais do consórcio bacteriano ao longo da biorremediação do solo contaminado com óleo diesel. Após 15 dias da inoculação dos microrganismos no solo, ocorreu um aumento expressivo do número de células de todos os membros do consórcio. Esse resultado demonstra a capacidade dos membros do consórcio em utilizar os hidrocarbonetos totais de petróleo como fonte de carbono e energia, o que possivelmente está relacionado com a ocorrência de processos de adaptação e seleção nos ambientes de origem desses microrganismos (Tabela 1, Capítulo I).

No solo não-contaminado com óleo diesel, os isolados bacterianos do consórcio apresentaram um aumento inicial do número de células (Figura 12), resultado atribuído à utilização de matéria orgânica do solo ou de reservas das próprias células como fonte de carbono e de energia. Esse aumento foi acompanhado de um rápido decréscimo das populações, cujas densidades populacionais no solo não-contaminado foram cerca de uma ordem de magnitude menor do que as alcançadas nas fases de máximo crescimento no solo contaminado com óleo diesel.

Dentre os membros do consórcio, o isolado *Bacillus subtilis* LBBMA 155 foi o que apresentou a maior densidade populacional em todos os tempos avaliados. Por outro lado, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 foi o que esteve em menor número ao longo de todo o período de incubação. A dinâmica populacional de consórcios microbianos, durante a biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados, tem sido abordada em muitos trabalhos (FRIES et al., 1997; MACNAUGHTON et al., 1999; ADMON et al., 2001; CHRISTOPHER et al., 2004). A flutuação das populações bacterianas de um consórcio pode estar relacionada à especificidade das bactérias quanto às fases inicial e posterior da biorremediação, que por sua vez se relaciona com a ordem de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (alcanos > cicloalcanos > aromáticos policíclicos) (DELILLE et al., 2007). As bactérias apresentam atividades metabólicas específicas para degradarem os diferentes hidrocarbonetos de petróleo (MARGESIN et al., 2007). O caminho metabólico responsável pela biodegradação aeróbica completa dos *n*-alcanos é dado, inicialmente, pela incorporação do oxigênio ao substrato, envolvendo a atividade de monoxigenases e com a conseqüente geração de álcoois. Estes são oxidados a aldeídos e, posteriormente, a ácidos graxos, seguindo seu caminho metabólico até serem completamente mineralizados a CO₂ e H₂O (HUBERT et al., 2005). O caminho metabólico para biodegradação dos isoalcanos inicia-se pela oxidação das ramificações mais suscetíveis à degradação, e assemelha-se a seguir ao da degradação dos

alcanos lineares (PETERS & MOLDOWAN,1993). Os hidrocarbonetos insaturados são menos suscetíveis à biodegradação, quando comparados aos hidrocarbonetos saturados. O ataque bacteriano pode iniciar-se tanto pela ligação dupla, como pela ramificação encontrada na cadeia de carbono (DEL'ARCO, 1999). O potencial de biodegradação dos cicloalcanos varia em função da sua complexidade estrutural. A biodegradação desses compostos é mais lenta que a dos *n*-alcanos, em função da presença de cadeias de carbono fechadas na forma de anéis naftênicos. A decomposição desses compostos pode ocorrer mais eficientemente na presença de outros compostos orgânicos que possam ser usados como fonte de energia pelas bactérias (cometabolismo). O caminho metabólico da transformação dos cicloalcanos é semelhante ao dos alcanos, ou seja, inicia-se pela oxidação da molécula a cetonas e alcoóis, após a clivagem do anel da molécula (COOKSON,1995).

A diminuição das populações bacterianas ao final de 60 dias (Figura 3E) coincide com a menor disponibilidade das fontes de carbono, uma vez que 90% dos HTP no solo já haviam sido biodegradados pelo consórcio. Dentre as frações degradadas, destacam-se a dos hidrocarbonetos alifáticos, cujas moléculas são mais acessíveis às bactérias (DELILLE ET AL., 2007). Bactérias não-especializadas em promover a quebra de moléculas mais complexas, como as dos hidrocarbonetos aromáticos, podem sofrer estresse nutricional e diferentes estratégias de sobrevivência podem ocorrer, tais como a evolução para o estágio fisiológico viável não-cultivável (VNC), alteração da composição da membrana celular, esporulação, alteração da síntese protéica, utilização de reservas intracelulares, dentre outras (SMITH et al., 1997; GUPTE et al., 2003; KAUR et al., 2005; GOMES, 2007; KALSCHUEER et al., 2007).

5 CONCLUSÕES

A biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo pelo consórcio bacteriano foi influenciada pelas variações de temperatura, umidade e relação C:N:P.

A temperatura foi o único fator ambiental que influenciou a biodegradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo em todos os intervalos de tempo avaliados.

O melhor tratamento para a biodegradação de solo contaminado com óleo diesel foi 35°C, relação C:N:P de 125:10:1 e teor de água equivalente a 60% da capacidade máxima de retenção.

O consórcio bacteriano apresentou habilidade degradadora decrescente com o aumento da cadeia dos hidrocarbonetos totais de petróleo.

Aos 30 dias de incubação do solo contaminado com óleo diesel, foi observada a maior densidade das populações de todos os membros do consórcio, coincidindo com a fase de maior degradação de HTP.

A redução da disponibilidade de fontes de carbono e energia, ao final de 60 dias de incubação, causou a diminuição das populações bacterianas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMON, S., GREEN, M.; AVNIMELECH, Y. Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. **Bioremediat. J.** v.5, p.193–209, 2001.

ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation. In JACQUES, R. J. S., BENTO, F. M., ANTONIOLLI, Z. I., CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Rev. Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1192-1201, 2007.

AMADI, A., ABBEY, S.D., NIMA, A.. Chronic effects of oil spill on soil proprieties and microflora of a rainforest ecosystem in Nigeria. *Water Air Soil Pollut.*, v.86(1-4), p.1-11, 1996.

ATAGANA, H.I. et al. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote contaminated soil. **Biodegradation**, Dordrecht, v.14, n.4, p.297-307, 2003.

BENTO, D. M. **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS.** Dissertação apresentada na Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica.

BENTO, F.M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v.96, n.9, p.1049-1055, 2005.

BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J. P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. **Appl Environ Microbiol** v.43, p.156–164, 1995.

CASARINI, D. C. P., CUNHA, R. C. A., SATO, M. I. Z., SANCHES, P. S. Evaluation of toxicity test procedure to define loading rates in a land treatment system. **Water Science Technology**, v. 24(12), p. 83-188, 1991.

CHENG, H. H.; MULLA, D. J. The soil environment. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**, p.1-13, 1999.

CHRISTOPHER W. KAPLAN, CHRISTOPHER L. K. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1777–1786 Vol. 70, No. 3, 2004

COOKSON, T. Bioremediation Engineering: Design and Application. In. **Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de Campos - experimentos laboratoriais**. Tese (Mestrado em Engenharia de Reservatório e de Exploração), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 2001.

CORT, T., BIELEFELDT, A. Effects of surfactants and temperature on PCP biodegradation. **J. Environ. Eng.**, v. 126, p. 635–643, 2000.

COULON, F., PELLETIER, E., GOURHANT, L., DELILLE, D. Effects of nutrients and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antartic soil. **Chemosphere**, v. 58, p. 1434-1448, 2005.

DEL 'ARCO, J. P. **Degradação de Hidrocarbonetos por Bactérias e Fungos em Sedimento Arenoso**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, Rio de Janeiro, 169p,1999.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. Long-term changes of bacterial abundance, hydrocarbon concentration and toxicity during a biostimulation treatment of oil-amended organic and mineral sub-Antarctic soils. **Polar Biol.**, v.30, p.925–933, 2007.

DEOTTI, L. O. G. **Controle de pH na técnica de biorremediação eletro cinética**. Tese (Mestrado em Engenharia Civil), Rio de Janeiro RJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro– UFRJ, 138p., 2005.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.37, n.4, p.729-739, 1979.

EPA. **A citizen's guide to bioremediation**. EPA 542-F-96-007, p. 1-4, 1996

FANTROUSSI, S. E., AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 268-275, 2005.

FRIES, M. R. ; HOPKINS, G. D.; MCCARTY, P. L.; FORNEY, L. J.; TIEDJE, J. M. Microbial Succession during a Field Evaluation of Phenol and Toluene as the Primary Substrates for Trichloroethene Cometabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1515–1522 Vol. 63, No. 4, 1997.

GOMES , R. V., **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de camarão para o uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. Tese (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais), Fortaleza, CE – Universidade Federal do Ceará, 89p., 2007.

GUPTE, A. R.; REZENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. Induction and resuscitation of viable but nonculturable. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6669–6675, 2003.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: JACQUES, R. J. S., BENTO, F. M., ANTONIOLLI, Z. I., CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Rev. Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1192-1201, 2007.

HUBERT, C., SHEN, Y., VOORDOUW, G. Changes in soil microbial community composition induced by cometabolism of toluene and trichloroethylene **Biodegradation**, v. 16, p. 11–22, 2005.

KALSCHEUER, R.; STOVEKEN, T.; MALKUS, U.; REICHEL, R.; GOLYSHIN, P. N.; SABIROVA, J. S.; FERRER, M.; TIMMIS, K. N.; STEINBUCHER, A. Analysis of Storage Lipid Accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: Evidence for Alternative Triacylglycerol Biosynthesis Routes in Bacteria. **Journal of Bacteriology**, p. 918–928 Vol. 189, No. 3, 2007.

KAUR A, CHAUDHARY A, KAUR A, CHOUDHARY R, KAUSHIK R. Phospholipid fatty acid - a bioindicator of environmental monitoring and assessment in soil ecosystem. **Curr Sci.**, v. 89, p.1103–1112, 2005

KENNISH, M. J.. Pollution impacts on marine biotic communities. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 1997.

LABUD, V., GARCIA, C., HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, v. 66, p. 1863 –1871, 2007.

LEYS, N. M. et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by Mycobacterium and Sphingomonas in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.66, n.6, p.726–736, 2005.

LOEHR, R.C.; McMILLEN, S.J. E WEBSTER, M.T. “Predictions of biotreatability and actual results: soils with petroleum hydrocarbons”. **Pratice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management**, p; 78-87, 2001.

MACNAUGHTON, S. J.; STEPHEN, J. R.; VENOSA, A. D.; DAVIS, G. A.; CHANG, Y.; WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.3566–3574, 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**, 2007.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007.

MARQUES J. R. A. N., MORAES, R. B. C., MAURAT C. M. *Biologia Marinha Rio de Janeiro*. P: 311-334, IN: PEREIRA, R. C.; GOMES, A. S. **Interciência**, p 382., 2002.

MARSAGIN & SCHINNER. **Applied Microbiology Biotechnol.**, v. 47, p. 462- 468, 2008.

MILLS, S. A.; FRANKENBERG, W. T. Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.53, n.2, p.280-284, 1994.

PANICKER, G., AISLABIE, J., SAUL, D., BEJ, A. K. Cold tolerance of *Pseudomonas* sp. 30-3 isolated from oil-contaminated soil, Antarctica. **Polar Biology** v. 25, p. 5 – 11, 2002.

PARASKEVI N. P., EURIPIDES G. S. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*. **Biodegradation**, v.16, p. 403–413, 2005.

PETERS, K. E., MOLDOWAN, J. M. *The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossil in Petroleum and Ancient Sediments*. **Prentice Hall**, , 361p, 1993.

SMITH, P. V.; HERSON, D. S. Toluene Elicits a Carbon Starvation Response in *Pseudomonas putida* mt-2 Containing the TOL Plasmid pWW0. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1925–1932 Vol. 63, No. 5, 1997.

SORKHOH, N. A.; IBRAHIM, A. S; GHANNDI, M. A.; RADWAN, S. S. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-- polluted Kuwait desert. **Applied Microbiology & Biotechnology**, V.39, p. 123-126. 1993.

TRINDADE, P. V. O. “**Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**”. *Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p.,2002.*

VIÑAS, M., SABATE, J., ESPUNY, M. J., SOLANAS, A. M. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. **Appl. and Environ. Microb.**, p. 7008–7018, 2005

VREDE, K.; HELDAL, M.; NORLAND, S.; BRATBAK, G. Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. **Appl Environ Microbiol.**, v.68, p.2965–2971, 2002.

WANG, L., TANG, Y., WANG, S., LIU, L. R., LIU, M., ZHANG, Y., LIANG, F., FENG, L. Isolation and characterization of a novel thermophilic Bacillus strain degrading long-chain n-alkanes. **Extremophiles**, v.10, p.347–356, 2006.

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

CAPÍTULO III

DINÂMICA POPULACIONAL DE UM CONSÓRCIO BACTERIANO E SEQÜÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO EM SOLO SOB SUCESSIVAS CONTAMINAÇÕES COM ÓLEO DIESEL

RESUMO

LEAL, Patrícia Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009.
Dinâmica populacional de um consórcio bacteriano e seqüência de degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo em solo sob sucessivas contaminações com óleo diesel.
Orientador: Marcos Rogério Tótola. Conselheiros: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de sucessivas contaminações do solo com óleo diesel na dinâmica populacional de membros de um consórcio bacteriano e na seqüência de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). O consórcio bacteriano inoculado no solo foi composto pelos isolados *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 e *Bacillus subtilis* LBBMA 155, isolados de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Após cada contaminação com óleo diesel (20 mL Kg⁻¹ a cada 20 dias), amostras do solo foram retiradas para avaliação da dinâmica populacional do consórcio bacteriano e para verificação da seqüência de degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo. Aos 20 e aos 40 dias, correspondentes à primeira e à segunda contaminação do solo, as maiores porcentagens de degradação (45 a 50%), foram obtidas para os hidrocarbonetos de maior cadeia carbônica (C21 e C22). Após a terceira contaminação, observou-se uma considerável redução da degradação do C21. Foi observada ainda uma elevada degradação de C13-15, C17 e C19, a qual contrasta com os baixos valores de degradação desses hidrocarbonetos nas duas fases anteriores. Ao final de 60 dias, o consórcio bacteriano degradou aproximadamente 55% de HTP do solo, após sucessivas contaminações com óleo diesel. As sucessivas contaminações do solo com óleo diesel influenciaram a estrutura populacional do consórcio bacteriano. A partir da segunda contaminação do solo com óleo diesel, todas as populações constituintes do consórcio tiveram seu crescimento desacelerado, especialmente a linhagem *B. subtilis* LBBMA 155, cuja densidade populacional manteve-se estável. Apesar da observada desaceleração do crescimento de todos os membros do consórcio após a segunda contaminação do solo com óleo diesel, as densidades populacionais de todas as linhagens se mantiveram elevadas (1,2 a 2,8 x 10⁸ UFC g⁻¹). A linhagem *A. baumannii* LBBMA ES11 apresentou a menor densidade populacional ao longo de todo o período de incubação do solo contaminado com óleo diesel. Por outro lado, *A. baumannii* LBBMA 04 foi a linhagem que manteve as maiores densidades populacionais. O resultado evidencia a existência de diferenças significativas da capacidade

de degradação de hidrocarbonetos, competição ou adaptação às condições experimentais entre essas duas linhagens pertencentes à mesma espécie.

ABSTRACT

LEAL, Patrícia Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, september 2009.
Population dynamics of a bacterial consortium and sequence of degradation of total petroleum hydrocarbons in soil under successive contamination with diesel oil. Advisor: Marcos Rogério Tótola. Committee Members: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

This study aimed to evaluate the effect of successive soil contamination with diesel oil in the population dynamics of members of a bacterial consortium and the sequence of degradation of total petroleum hydrocarbons (TPH). The bacterial consortium inoculated in the soil was composed of the *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 and *Bacillus subtilis* LBBMA 155 strains, isolated from environments contaminated with petroleum hydrocarbons. After each contamination with diesel oil (20 mL kg⁻¹ each 20 days), soil samples were collected for assessment of population dynamics of the bacterial consortium and to verify the sequence of degradation of total petroleum hydrocarbons. At 20 and 40 days, corresponding the first and second soil contamination, the highest percentage of degradation (45-50%) were obtained for the higher carbon chain hydrocarbons (C21 and C22). After the third contamination, there was a considerable reduction of degradation of C21. It also noted a high degradation of C13-15, C17 and C19, which contrasts with the low values of degradation of these hydrocarbons in the two previous phases. The successive soil contamination with diesel oil affected the population structure of the bacterial consortium. From the second soil contamination with diesel oil, all the constituent of the consortium had their growth slowed, especially the *B. subtilis* LBBMA 155 strain, whose population has remained stable. Despite the observed slowdown in growth of all members of the consortium after the second soil contamination with diesel oil, the densities of all strains remained high (1.2 to 2.8 x 10⁸ CFU g⁻¹). The *A. baumannii* LBBMA ES11 strain had the lowest population density throughout the incubation period of soil contaminated with diesel oil. Moreover, *A. baumannii* LBBMA 04 strain was maintained that the highest population densities. After 60 days, the bacterial consortium degraded approximately 55% of TPH soil after repeated contamination with diesel oil. The result shows the existence of significant differences in the ability of hydrocarbon degradation, competition and adaptation to experimental conditions between these two strains of the same species.

1 INTRODUÇÃO

Técnicas de biorremediação aplicadas a ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo são amplamente descritas na literatura científica. Na maioria dos trabalhos publicados, o foco principal é a descrição da cinética de degradação dos contaminantes (KIM, *et al.* 1997; ATAGANA, *et al.* 2006; BRAKSTAD, 2008). No entanto, são poucos os que abordam a dinâmica das populações microbianas ao longo do processo de biorremediação (RONCEVIC, *et al.* 2005; RÖLLING, *et al.*, 2004).

A biodegradação de contaminantes orgânicos em solos é caracterizada por duas fases distintas. A fase inicial é caracterizada por uma rápida degradação, seguida por uma fase mais lenta (OLIVEIRA, *et al.*, 1998; ALEXANDER, 2000; ADMON, *et al.*, 2001). A diferença nas taxas de degradação é atribuída à utilização dos compostos disponíveis na fase aquosa do solo na fase inicial, em contraste com a segunda, na qual os compostos poluentes se encontram adsorvidos às partículas do solo ou em regiões de difícil acesso aos microrganismos envolvidos em sua biodegradação. Contribui ainda para a desaceleração do processo de biodegradação o acúmulo de moléculas mais recalcitrantes ou de intermediários tóxicos (JACQUES *et al.*, 2007).

Segundo CHRISTOPHER *et al.* (2004), bactérias específicas estão associadas com as diferentes fases da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo no solo. Entre 40 a 80% do óleo diesel podem ser degradados pela microbiota, na seguinte ordem decrescente: alcanos > cicloalcanos > aromáticos policíclicos. (DELILLE *et al.*, 2007).

A capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo pelas bactérias é maior quando esses compostos estão em mistura (GÜLENSOY e ALVAREZ, 1999). Em ambientes onde o contaminante é a principal fonte de carbono, bactérias não-especializadas na degradação de moléculas mais complexas, como as dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, podem sofrer processo de desnutrição, ainda que metabólitos secundários sejam gerados pela degradação dessas moléculas complexas por outras bactérias (SMITH e HERSON, 1997). Por outro lado, eventos repetidos de contaminação por derivados de petróleo podem resultar na eliminação de populações microbianas com potencial de degradação desses contaminantes (WEBER *et al.*, 1997). Os efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos são decorrentes da sua interação com os constituintes hidrofóbicos da membrana celular, tais como ácidos-graxos, fosfolipídeos e a região central de proteínas integrais de membrana (MROZIK *et al.*, 2004), o que leva à perda de sua integridade e do seu caráter de barreira seletiva (MROZIK, *et al.*, 2002.). Tal alteração afeta os processos de

transporte seletivo de solutos, estabelecimento da força próton-motora, excreção de produtos do metabolismo e manutenção do controle do pH intracelular (CRAPEZ, 2001).

Microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo podem apresentar formas de adaptação fisiológica capazes de reduzir os efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos sobre as células. Dentre essas adaptações, destacam-se a evolução para o estágio fisiológico viável não-cultivável (VNC), alteração da composição da membrana celular, esporulação e alteração da síntese protéica (GUPTE et al., 2003; VAN HAMME et al., 2003; GOMES, 2007; KALSCHEUER et al., 2007). No entanto, algumas destas estratégias não garantem a sobrevivência sob longos ou repetidos períodos de estresse. Em processos de biorremediação em que se utiliza a inoculação de microrganismos especializados na degradação de hidrocarbonetos, a toxicidade de algumas frações pode causar a redução ou mesmo a extinção de algumas das populações introduzidas. Neste caso, podem ser necessárias inoculações periódicas dessas populações em ambientes onde a biorremediação for uma opção de tratamento (Müller et al., 1996), o que tornaria o processo mais complexo e de maior custo operacional.

Neste estudo, avaliaram-se a flutuação populacional e a sobrevivência de isolados bacterianos componentes de um consórcio ao longo de ciclos de biorremediação e recontaminação de um solo com óleo diesel.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Determinação da degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo no solo ao longo ciclos de recontaminação/biorremediação

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b, *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11 e *Bacillus subtilis* LBBMA 155 pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. As culturas-estoque foram ativadas em meio R₂A (REASONER & GELDREICH, 1985) por 18 h a 30°C e a suspensão celular foi submetida a sucessivas lavagens em solução salina estéril. Um volume de inóculo das linhagens, suficiente para se obter uma densidade populacional de cerca de 2×10^6 UFC g⁻¹ foi adicionado a frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo 30 g de solo estéril, previamente contaminado com óleo diesel a 20 mL Kg⁻¹. A umidade e a relação C:N:P do solo foram ajustadas para 60% da capacidade máxima de retenção e 125:10:1, respectivamente. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento ventilada, a 30°C, durante 60 dias.

Aos 20, 40 e 60 dias após o início da incubação, amostras do solo foram retiradas para avaliação da densidade populacional dos membros do consórcio e da seqüência de degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). As unidades experimentais utilizadas para coleta das amostras, em cada tempo de avaliação, foram descartadas. Nas demais unidades experimentais, foram realizadas novas adições de óleo diesel aos 20 e aos 40 dias do início da incubação (20 mL Kg⁻¹). Após cada contaminação com óleo diesel, o solo foi misturado de forma a favorecer a distribuição do contaminante. Os tratamentos-controle constituíram-se de amostras de solo contaminadas com óleo diesel na ausência do consórcio bacteriano e de amostras de solo não-contaminadas e inoculadas com o consórcio. Cada tratamento foi conduzido com três repetições.

A extração de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo contaminado com óleo diesel foi realizada em extrator Soxhlet, segundo o método 3540C (EPA, 1996). Para isso, utilizaram-se 2 g de solo e 200 mL dos solventes hexano e acetona (1:1). O período de extração foi de 6 horas. Os extratos foram analisados em cromatógrafo a gás (QP 5000) acoplado a espectrômetro de massa (Shimadzu®, modelo 17-A), utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-1 (30m x 0,25 mm x 0,25 µm), nas seguintes condições: temperatura inicial de 40°C (2 min), rampa de aquecimento de 8°C min⁻¹ até 240°C. A

temperatura do injetor foi de 260°C e do detector 280°C. O fluxo do gás hélio foi de 1 mL min⁻¹ e o modo de injeção foi *splitless*.

2.2 Avaliação da dinâmica populacional dos membros do consórcio bacteriano

Para se avaliar a flutuação das populações das linhagens bacterianas ao longo dos ciclos de recontaminação/biorremediação, foi realizada a contagem de UFC g⁻¹ massa seca do solo, em placas contendo meio seletivo adicionado dos antibióticos requeridos para cada um dos isolados (Tabela 2, capítulo II). Para isso, 10 g de cada amostra foram diluídos em 95 mL de pirofosfato de sódio a 0,1 % (massa/volume). Após agitação a 200 rpm por 20 min, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento de 0,1 mL em placas contendo meio Miller Hinton adicionado de antibióticos. Para inibir o crescimento de fungos, foi adicionada ciclohexamida (100 mg L⁻¹) ao meio. As placas foram mantidas a 30°C até a contagem das colônias formadas na superfície do meio de cultura.

3 RESULTADOS

3.1 Degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) pelo consórcio bacteriano após sucessivas contaminações do solo com óleo diesel

O consórcio bacteriano foi capaz de degradar os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em solo, após contaminações sucessivas com óleo diesel (20 mL kg^{-1}) realizadas no tempo 0, 20 e 40 dias (Figura 1). Ao final de 60 dias, após três contaminações, aproximadamente 55% dos HTP presentes no solo haviam sido degradados.

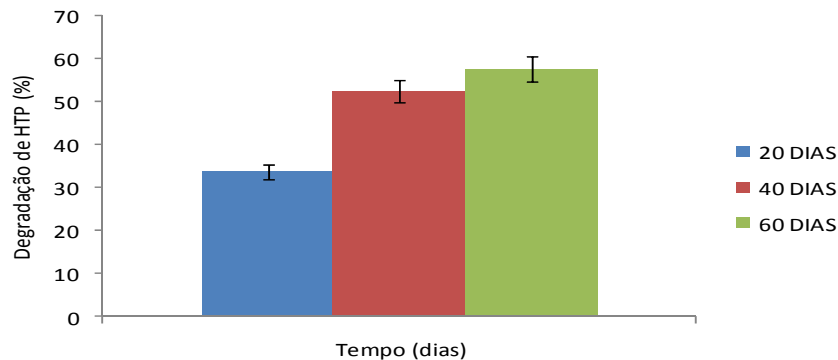


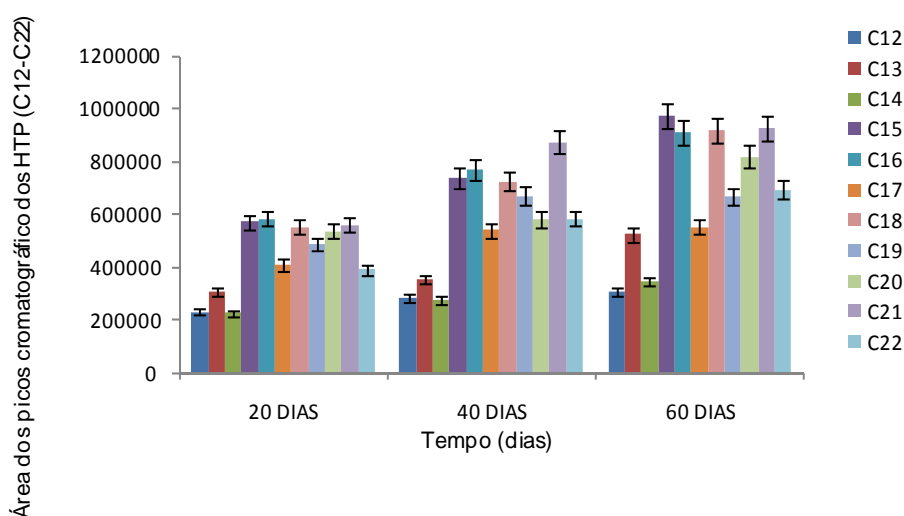
Figura 1 - Degradação (%) de HTP em solo inoculado com um consórcio bacteriano e incubado por 60 dias em câmara de crescimento ventilada, a 30°C , 80% de retenção de umidade e relação C:N:P de 125:10:1. Contaminações sucessivas do solo com óleo diesel (20 mL kg^{-1}) foram realizadas no tempo 0, 20 e 40 dias.

O perfil de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo foi diferente à medida que o solo recebeu novas doses de contaminação com óleo diesel (Figura 2B). Aos 20 e aos 40 dias, correspondentes à primeira e à segunda contaminação do solo, as maiores porcentagens de degradação (45 a 50%) foram obtidas para os hidrocarbonetos de maior cadeia carbônica (C21 e C22). Aos 60 dias, após a terceira contaminação do solo, os níveis dos hidrocarbonetos C12-C22, determinados pelos picos cromatográficos, não retornaram aos patamares observados no tratamento-controle com o tempo correspondente de incubação, demonstrando, portanto que mesmo após sucessivas contaminações o consórcio bacteriano se apresentou eficiente na biodegradação do óleo diesel. Destaca-se nessa fase, a considerável redução da degradação do C21 e por outro lado, uma elevada degradação de C13-15, C17 e C19, a qual contrasta com os baixos valores de degradação desses hidrocarbonetos nas duas fases anteriores. Esse resultado indica a ocorrência de adaptação das populações microbianas para utilização desses hidrocarbonetos, bem como a ocorrência de mudanças na estrutura da

comunidade microbiana, com dominância de populações que utilizam preferencialmente essas frações, especialmente a linhagem *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04 .

No tratamento-controle (Figura 2A) não-inoculado com o consórcio bacteriano, os hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel acumularam-se no solo. O acúmulo de hidrocarbonetos não foi proporcional à quantidade adicionada, indicando uma possível perda por volatilização ou uma menor eficiência na extração dos compostos, resultante de uma maior interação com o solo.

A



B

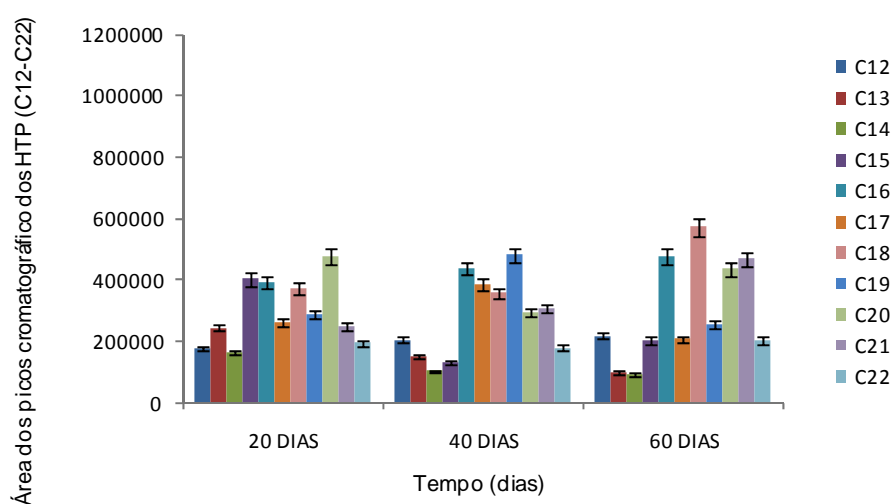


Figura 2 - Degradação de HTP (C12 – C22) no solo, representada pelas áreas dos picos cromatográficos. Contaminações sucessivas do solo com óleo diesel (20 mL kg⁻¹) foram realizadas no tempo 0, 20 e 40 dias na ausência do consórcio bacteriano (A) e na presença do consórcio bacteriano (B). Ambos os tratamentos foram incubados por 60 dias em câmara de crescimento ventilada, a 30°C, 80% de retenção de umidade e relação C:N:P de 125:10:1.

3.2 Dinâmica populacional do consórcio bacteriano em solo sob sucessivas contaminações com óleo diesel

Todas as linhagens componentes do consórcio bacteriano foram capazes de se multiplicar no solo contaminado com óleo diesel (Figura 3A). *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b e *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04 apresentaram um padrão de crescimento populacional similar a partir do momento da inoculação, até os 20 dias de incubação. Após essa fase, a linhagem *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04 se diferenciou das demais, exibindo o maior crescimento. As linhagens mencionadas anteriormente foram dominantes em todas as fases do experimento. Nenhuma das linhagens do consórcio apresentou fase de adaptação entre a inoculação e o vigésimo dia de incubação, sendo notável o crescimento acelerado das populações bacterianas nos tempos iniciais do experimento, com exceção da linhagem *A. baumannii* LBBMA ES11 que apresentou o menor crescimento populacional em relação aos demais membros do consórcio, aliás essa linhagem foi a menos abundante no solo contaminado, ao longo de todo ensaio experimental.

As linhagens bacterianas apresentaram um pequeno crescimento populacional no solo não-contaminado com óleo diesel, até o vigésimo dia (Figura 3B). Nas fases subsequentes, foi observado rápido declínio das populações bacterianas nesse tratamento. *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58 foi a linhagem que atingiu a maior densidade populacional no solo não-contaminado. Após 60 dias da inoculação, a densidade populacional de todos os membros do consórcio atingiu valores próximos ou abaixo dos valores do tempo zero, a exceção foi a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58.

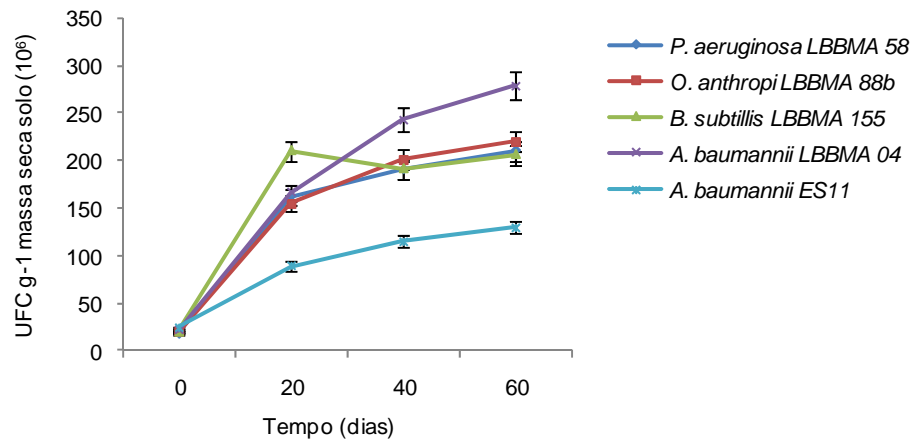
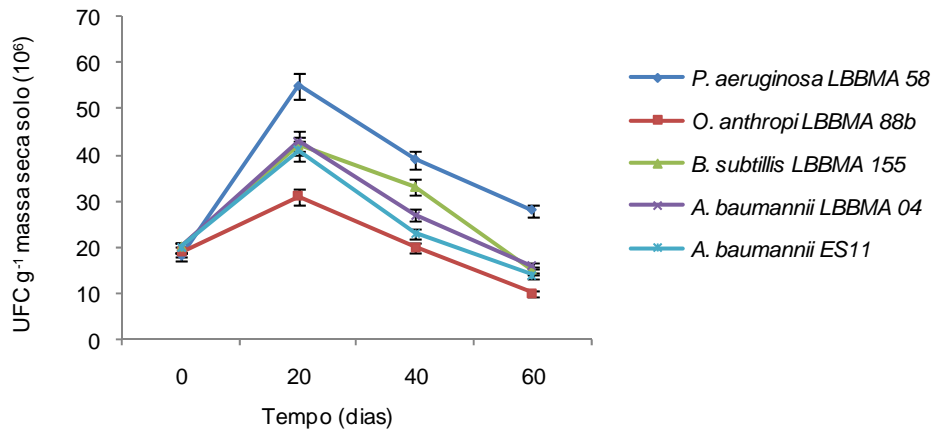
A**B**

Figura 3 - Contagem de células em meio de cultura contendo antibióticos específicos para cada membro do consórcio bacteriano inoculado no solo. O solo foi inoculado (10^6 UFC g⁻¹) e incubado por 60 dias em câmara de crescimento ventilada, a 30°C, com teor de água mantido em 60% da capacidade máxima de retenção de água e relação C:N:P de 125:10:1. (A) Solo contaminado com óleo diesel (20 mL kg⁻¹) nos tempos 0, 20 e 40 dias; (B) Solo não-contaminado (controle).

4 DISCUSSÃO

4.1. Degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) pelo consórcio bacteriano após sucessivas contaminações do solo com óleo diesel

O consórcio bacteriano foi capaz de degradar os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em solo, após contaminações sucessivas com óleo diesel (20 mL kg^{-1}) realizadas no tempo 0, 20 e 40 dias (Figura 1). Ao final de 60 dias, após três contaminações, aproximadamente 55% dos HTP presentes no solo haviam sido degradados. A degradação de HTP foi crescente à medida que aumentava a concentração de óleo diesel no solo através de sucessivas contaminações. Resultados semelhantes foram obtidos por FLORES et al. (2004) que constataram a eficiência de um consórcio microbiano isolado de ambiente com histórico de contaminação recorrente por petróleo e derivados, em degradar de asfaleno após sucessivas contaminações do solo com esse hidrocarboneto.

A degradação dos hidrocarbonetos C12-C22 pelo consórcio bacteriano foi mantida ao longo de 60 dias, após sucessivas contaminações do solo com óleo diesel. As adições sucessivas de óleo diesel influenciaram a seqüência de degradação de HTP pelo consórcio bacteriano (Figura 2B). No presente trabalho, os maiores valores de degradação foram obtidos com os hidrocarbonetos C21 e C22 (55 e 49%, respectivamente), após a primeira contaminação do solo com óleo diesel. Esse resultado contrasta com o reportado por outros autores, que afirmam que os microrganismos apresentam uma habilidade degradadora decrescente com o aumento da cadeia dos hidrocarbonetos, bem como com o aumento da complexidade de suas estruturas (TRINDADE, 2002; LOEHR *et al.* 2001). Sustenta-se, portanto, que a eficiência de degradação de diferentes frações de hidrocarbonetos de petróleo esteja relacionada a processos de adaptação e de seleção dos microrganismos nos ambientes de origem.

As maiores porcentagens de degradação de C12-C19 ocorreram após a terceira contaminação com óleo diesel (Figura 2B). A contaminação contínua de solos com hidrocarbonetos resulta no aumento da habilidade das comunidades microbianas em utilizar esses compostos (HERBES, 1981 citado por WILBERG, 2006). Segundo o mesmo autor, solos e microrganismos previamente expostos aos contaminantes não possuem ou possuem menor período de aclimatação do que aqueles sem prévia exposição.

4.2 Dinâmica populacional do consórcio bacteriano em solo após sucessivas contaminações com óleo diesel

Sucessivas contaminações do solo com óleo diesel influenciaram a dinâmica das populações componentes do consórcio bacteriano. A adição repetida de óleo diesel ao solo resultou em aumento contínuo da densidade populacional de todos os membros do consórcio até o 60º dia após a inoculação (Figura 3A), exceto da linhagem *B. subtilis* LBBMA 155, a qual apresentou uma paralização no crescimento a partir do vigésimo dia. Esse resultado é coerente com a ocorrência da diminuição das áreas dos picos cromatográficos de hidrocarbonetos de petróleo nessa data de amostragem (Figura 2B), e inequivocamente estabelece o envolvimento das populações inoculadas na degradação dos hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel. Essa conclusão é confirmada pelo rápido declínio das populações microbianas inoculadas no solo não-contaminado (Figura 3B), resultado que supostamente demonstra a incapacidade dos isolados inoculados em utilizar a matéria orgânica presente neste solo, com exceção da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58. Esta trata-se de uma espécie metabolicamente muito versátil e, portanto, capaz de utilizar matéria orgânica mais recalcitrante presente no solo (UENO, et al., 2006). Isso poderia explicar sua maior capacidade de crescimento no solo não-contaminado.

A partir da segunda contaminação do solo com óleo diesel, todas as populações constituintes do consórcio tiveram seu crescimento desacelerado ou interrompido, como foi observado para a linhagem *B. subtilis* LBBMA 155 (Figura 3A). Esse comportamento é atribuído a efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos sobre as células microbianas. É reconhecido que alguns dos hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel são altamente tóxicos aos microrganismos, sendo capazes de alterar as propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares (MROZIK et al., 2004). Os efeitos tóxicos derivam da estrutura lipofílica dos hidrocarbonetos, o que possibilita a interação desses compostos com os constituintes hidrofóbicos da membrana celular, tais como ácidos-graxos, fosfolípídeos e a parte central de proteínas integrais da membrana (KALSCHEUER et al., 2007). O resultado dessa interação é a perda da integridade e do caráter de barreira seletiva das membranas, o que as torna mais permeáveis a prótons e a outros íons, como o sódio (MIROZIK e al., 2004). Nessa condição, processos de transporte seletivo de solutos, excreção de produtos finais do metabolismo, manutenção da força próton-motora e controle do pH intracelular são comprometidos (CRAPEZ, 2001), o que normalmente leva à perda de viabilidade celular. PEPI et al. (2008) verificaram que o aumento de concentrações de tolueno prejudicou a

sobrevivência de *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp., como conseqüência das alterações na membrana plasmática desses microrganismos provocadas pelo excesso do composto.

O comportamento diferenciado quanto ao crescimento apresentado pelas linhagens bacterianas LBBMA 04 e LBBMA ES11, ambas da espécie *A. baumannii*, pode estar relacionado ao ambiente original do qual foram isoladas.

Apesar da observada desaceleração do crescimento de todos os membros do consórcio após a segunda contaminação do solo com óleo diesel, a densidade populacional de todas as linhagens se mantiveram em patamar elevado, com exceção da linhagem *A. baumannii* LBBMA ES11, ao longo do experimento. Condizente com esse resultado foi a manutenção da atividade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo até a última data de amostragem, aos 60 dias (Figura 3A). Os dados demonstram a elevada capacidade de sobrevivência das linhagens bacterianas constituintes do consórcio em ambiente com sucessivas contaminações por hidrocarbonetos de petróleo. Essa capacidade de sobrevivência contrasta com resultados obtidos por outros autores, a exemplo de DELILLE et al. (2007), e indica que o consórcio bacteriano utilizado neste estudo é candidato em potencial para uso em operações de biorremediação de solos contaminados com óleo diesel, possivelmente dispensando inoculações freqüentes.

5 CONCLUSÕES

O padrão de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo pelo consórcio bacteriano estudado é alterado após sucessivos eventos de contaminação do solo com óleo diesel.

Os maiores valores de degradação de HTP pelo consórcio bacteriano ocorreram após a segunda contaminação do solo com óleo diesel, coincidindo com as maiores densidades populacionais dos membros do consórcio.

Adições frequentes de óleo diesel ao solo provocaram diminuição da velocidade de crescimento dos membros do consórcio, mas a densidade populacional foi crescente até a última avaliação, aos 60 dias.

O consórcio bacteriano apresentou atividade metabólica suficiente para degradar cerca de 55% dos hidrocarbonetos totais de petróleo, após três contaminações sucessivas do solo com óleo diesel.

O consórcio bacteriano utilizado neste estudo é candidato em potencial para uso em operações de biorremediação de solos contaminados com óleo diesel.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMON, S., GREEN, M.; AVNIMELECH, Y. Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. **Bioremediat. J.** v.5, p.193–209, 2001.

ALEXANDER, M. AGING, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. **Environ. Sci. Technol.**, v.34, p.4259–4265, 2000.

ATAGANA, H. I., Biodegradation of polyacyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by biostimulation and bioaugmentation in the presence of copper(II) ions. **World J Microbiol Biotechnol.** v.22, p.1145–1153, 2006

BRAKSTAD, O. G.; NONSTAD, I.; FAKSNESS, L-G.; BRANDVIK, P. J. Responses of Microbial Communities in Arctic Sea Ice After Contamination by Crude Petroleum Oil. **Microb Ecol.**, v.55, p.540–552, 2008

CHRISTOPHER W. KAPLAN AND CHRISTOPHER L. KITTS. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1777–1786 Vol. 70, No. 3, 2004

CRAPEZ, M. A. C. Efeitos de Hidrocarbonetos de Petróleo Na Biota Marinha. *In: Efeitos dos Poluentes em Organismos Marinhos.* (Moraes, R.; Crapez, M. A. C.; Pfeiffer, W.; Farina, M.; Bainy, A.; e Teixeira, V. Editores). Editora Arte e Ciência – Vilipress, São Paulo, p. 255-270, 2001. Acesso: <http://books.google.com.br>

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. Long-term changes of bacterial abundance, hydrocarbon concentration and toxicity during a biostimulation treatment of oil-amended organic and mineral sub-Antarctic soils. **Polar Biol.**, v.30, p.925–933, 2007.

EPA. **A citizen's guide to bioremediation.** EPA 542-F-96-007, p. 1-4, 1996

FANTROUSSI, S. E., AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 268-275, 2005.

FLORES, G. P., ARGÜELLO, G. B., GALEANA, C. L., MESTA-HOWARD, A. M. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. **Biodegradation** 15: 145–151, 2004.

GOMES, R. V. Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos. Tese de mestrado pela Universidade Federal do Ceará, 2007.

GÜLENSOY, N., ALVAREZ, J. J. Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. **Biodegradation**, v. 10, p. 331-340, 1999.

GUPTE, A. R.; REZENDE, C. L. E.; Joseph, S. W. Induction and resuscitation of viable but nonculturable. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6669–6675, 2003.

HUESEMANN, M. H. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil model soils. *Bioremediation Journal*, v.6, n.4, p. 321-336, 2002.

KALSCHUEER, R.; STOVEKEN, T.; MALKUS, U.; REICHEL, R.; GOLYSHIN, P. N.; SABIROVA, J. S.; FERRER, M.; TIMMIS, K. N.; STEINBUCHER, A. Analysis of Storage Lipid Accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: Evidence for Alternative Triacylglycerol Biosynthesis Routes in Bacteria. **Journal of Bacteriology**, p.918–928 Vol. 189, No. 3, 2007.

KIM, P.; OH, D.; KIM, S.; KIM, J. Relationship between emulsifying activity and carbohydrate backbone structure of emulsan from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 457-459, 1997.

MULLER, C. P.; WEICHAERT, D.; MCDUGALD, D.; KJELLEBERG, S. Analysis of starvation conditions that allow for prolonged culturability of *Vibrio vulnificus* at low temperature. **Microbiology**, v.142, p.1675-1 684, 1996.

MROZIK A., PIOTROWSKA-SEGET Z., LABUŹEK, S. Fatty acids of bacterial membranes as a biomarker of aromatic compounds toxicity (in Polish). **Post. Mikrobiol.**, v. 41(2), p.185, 2002.

MROZIK A., PIOTROWSKA-SEGET Z., LABUŹEK, S. Cytoplasmatic Bacterial Membrane Responses to Environmental Perturbations. **Polish Journal of Environmental Studies**, Vol. 13, No., 5 p.487-494, 2004.

OLIVERA, F. L.; LOEHR, R. C.; COPLIN, B. C.; EBY, H.; WEBSTER, M. T. Prepared bed land treatment of soils containing diesel and crude oil hydrocarbons. **J. Soil Contam.**, v.7, p.657–674, 1998.

RONCEVIC, S., DALMACIJA, B., IVANCEV-TUMBAS, I., TRICKOVIC, J., PETROVIC, O., KLADNJA, M., AGBABA, J. Kinetics of Degradation of Hydrocarbons in the Contaminated Soil Layer. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v.49, p.27–36, 2005.

RÖLING, W. F.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; LEE, K., DANIEL, F.; SWANNELL, R. P. J.; HEAD, I. M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. **Appl Environ Microbiol** v. 68, p.5537–5548, 2002.

UENO, A., HASANUZZAMAN, M., YUMOTO, I., OKUYAMA, H. Verification of degradation of n-alkanes in diesel oil by *Pseudomonas aeruginosa* strain watg in soil microcosms. **Current Microbiology**, Vol. 52, pp. 182–185, 2006.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiol Mol Biol Rev.**, 67(4): 503–549, 2003.

WEBER F.J., DE BONT J.A.M. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1286, p.225, 1996.

7 ANEXO

Estimativas de fatores rotacionados baseados na matriz de correlações, representantes da degradação em cada tempo de atuação do consórcio de bactérias

Tabela 1 - Fatores utilizados para análise da degradação dos hidrocarbonetos em 15 dias de atuação do consórcio

Variável	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Comunalidade
C12	0,903	-0,114	0,009	0,829
C13	0,685	-0,233	-0,413	0,695
C14	-0,011	-0,105	-0,949	0,912
C15	0,085	-0,968	0,004	0,945
C16	0,776	-0,573	-0,163	0,956
C17	0,787	-0,565	-0,147	0,961
C18	0,750	-0,612	-0,113	0,950
C19	0,693	-0,675	-0,184	0,970
C20	0,596	-0,666	-0,182	0,832
C21	0,791	-0,175	0,460	0,867
C22	0,815	-0,219	0,114	0,725
Auto valor	5,20	3,01	1,43	9,64
IR (%)	47,3	27,4	12,9	87,6

Tabela 2 - Fatores utilizados para análise da degradação dos hidrocarbonetos em 30 dias de atuação do consórcio

Variável	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Comunalidade
C12	0,871	0,146	-0,200	0,821
C13	0,931	0,032	-0,230	0,921
C14	0,106	-0,946	-0,152	0,930
C15	0,209	-0,157	-0,925	0,924
C16	0,982	-0,073	-0,124	0,986
C17	0,984	-0,069	-0,118	0,987
C18	0,964	-0,191	-0,136	0,984
C19	0,932	-0,260	-0,156	0,961
C20	0,945	-0,249	-0,087	0,962
C21	0,949	-0,264	-0,100	0,979
C22	0,767	-0,370	0,323	0,830
Auto valor	7,79	1,33	1,167	10,2851
IR (%)	70,8	12,0	10,6	93,5

Tabela 3 - Fator utilizado para análise da degradação dos hidrocarbonetos em 45 dias de atuação do consórcio. Os hidrocarbonetos C14, C15 e C22, que apresentaram comunalidade menor que 0,64, foram analisados separadamente

Variável	Fator 1	Comunalidade
C12	-0,916	0,839
C13	-0,961	0,923
C14	-0,580	0,337
C15	-0,331	0,110
C16	-0,990	0,979
C17	-0,991	0,983
C18	-0,985	0,970
C19	-0,975	0,951
C20	-0,929	0,863
C21	-0,973	0,946
C22	-0,753	0,566
Auto valor	8,47	8,47
IR (%)	77,0	77,0

Tabela 4 - Fatores utilizados para análise da degradação dos hidrocarbonetos em 60 dias de atuação do consórcio

Variável	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Comunalidade
C12	0,566	-0,522	0,313	0,692
C13	0,633	-0,728	0,126	0,947
C14	0,037	-0,872	-0,163	0,788
C15	0,178	0,255	0,847	0,814
C16	0,884	-0,433	-0,041	0,971
C17	0,869	-0,463	0,015	0,969
C18	0,685	-0,650	0,027	0,892
C19	0,886	-0,100	-0,147	0,816
C20	0,937	-0,100	0,021	0,888
C21	0,956	-0,059	0,005	0,917
C22	0,438	0,304	-0,737	0,827
Auto valor	5,53	2,57	1,43	9,52
IR (%)	50,2	23,3	13,0	86,6

Tabela 5 - Estimativas dos coeficientes dos fatores analisados em cada tempo de atuação do consórcio. Os fatores cuja ANOVA da regressão não foi significativa não são apresentados

Variável	Coeficientes			
	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
C12	0,903	0,144	-0,108	0,044
C13	0,685	0,134	-0,113	0,013
C14	-0,011	-0,135	-0,069	-0,179
C15	0,085	-0,096	-0,039	0,120
C16	0,776	0,140	-0,117	0,138
C17	0,787	0,142	-0,117	0,129
C18	0,750	0,119	-0,116	0,041
C19	0,693	0,101	-0,115	0,206
C20	0,596	0,113	-0,110	0,224
C21	0,791	0,110	-0,115	0,237
C22	0,815	0,114	-0,089	0,162

Tabela 6 - Modelos ajustados para resposta de degradação em cada tempo de atuação do consórcio bacteriano

Tempo de atuação	Modelo ajustado	p-valor	R² (%)
15 dias	$y = 0,6134 + 0,4365*T + -0,8084*T^2$	0,000	67,7
30 dias	$y = 1,42166 - 0,00249T - 0,12191CNP + 0,06755U - 0,70710*T^2 - 0,56242*CNP^2 - 0,60425*U^2$	0,043	64,0
45 dias	$y = -1,32110 + 0,13719T - 0,17780CNP - 0,03926U + 0,76175*T^2 + 0,52735*CNP^2 + 0,45214*U^2 - 0,51968*T*CNP$	0,020	74,8
60 dias	$y = 0,044 + 0,0335T - 0,126CNP - 0,559*CNP^2 + 0,70*TCNP$	0,049	49,2