

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

DANIELA MARQUES ANDRADE

***AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE UM  
BIOFILTRO DE TRATAMENTO DE VAPORES DE  
GASOLINA***

Florianópolis -SC  
2008

Daniela Marques Andrade

***AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE UM  
BIOFILTRO DE TRATAMENTO DE VAPORES DE  
GASOLINA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ambiental.

Orientadores: Prof. Dr. Henrique de Melo Lisboa  
Co-orientadores: Prof. Dr. Paulo Belli Filho  
Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis -SC

2008

**Andrade, Daniela Marques**

Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina.

Daniela Marques Andrade, Florianópolis – 79f. 2008.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental na área de Poluição Atmosférica

Título em inglês: Evaluation of bacteria from a biofilter treatment of fumes of gasoline.

**DANIELA MARQUES ANDRADE**

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE UM BIOFILTRO DE  
TRATAMENTO DE VAPORES DE GASOLINA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

**MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Sebastião Roberto Soares  
Coordenador do Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental

---

Prof. Dr. Henrique de Melo Lisboa (Orientador)

---

Prof. Dr. Paulo Belli Filho (Co-orientador)

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi (Co-orientador)

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Alexandre Verzani Nogueira

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Catia Regina Silva de Carvalho Pinto

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Paulo Belli Filho

*" Às vezes quando tudo dá errado acontecem coisas tão maravilhosas que  
jamais teriam acontecido se tudo tivesse dado certo"*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho e em especial:

1. Aos professores e orientadores Dr. Henrique de Melo Lisboa, Dr. Paulo Belli-Filho e Dr. Márcio José Rossi pelas críticas e sugestões indispensáveis para concretização deste trabalho e fundamentalmente para minha formação acadêmica e profissional.
2. Ao LCQAr pelo apoio financeiro.
3. A todos os Professores do curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.
4. Ao corpo Técnico-administrativo do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, especialmente Marilda e Arlete.
5. Aos colegas José Júlio, Dênio, Fábio, Marcos, Marcel, Marina, Gilson, Márcia, Amanda pelo apoio e amizade.
6. Aos professores, colegas e funcionários do MIP: Margarida Matos de Mendonça, Vetúria Lopes de Oliveira, Carla, Bianca, Paulo e Luiz.
7. Ao professor Alexandre Verzani Nogueira pelo empréstimo do laboratório, apoio e amizade.
8. A minha família, pelo companheirismo e crédito, principalmente nas horas mais difíceis enfrentadas na trajetória deste trabalho.
9. Aos meus amigos e ao meu amor Rafael pelo apoio.
10. À Deus, em quem me apoiei nas horas difíceis.

Obrigada.

## SUMÁRIO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                | <b>x</b>    |
| <b>LISTA DE QUADROS.....</b>                                | <b>x</b>    |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                           | <b>xi</b>   |
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>                               | <b>xii</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>xiii</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>xiv</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                   | <b>15</b>   |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                    | <b>18</b>   |
| <b>2.1 Objetivo geral.....</b>                              | <b>18</b>   |
| <b>2.2 Objetivos específicos.....</b>                       | <b>18</b>   |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                        | <b>19</b>   |
| <b>3.1 Poluição ambiental.....</b>                          | <b>19</b>   |
| <b>3.2 Poluição atmosférica e contaminação por COV.....</b> | <b>20</b>   |
| <b>3.3 Principais fontes de COV.....</b>                    | <b>21</b>   |
| 3.3.1 Petróleo.....   | 22          |
| 3.3.2 Gasolina.....   | 22          |
| 3.3.3 Hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) .....           | 23          |
| <b>3.4 Toxicidade dos BTEX.....</b>                         | <b>24</b>   |
| <b>3.5 Tratamento dos COV.....</b>                          | <b>25</b>   |
| Tratamento biológico de COV.....                            | 26          |
| <b>3.6 Atividade microbiológica.....</b>                    | <b>29</b>   |
| <b>3.7 Biodegradação dos componentes do petróleo.....</b>   | <b>31</b>   |
| <b>3.8 Biosurfactantes.....</b>                             | <b>34</b>   |
| <b>3.9 Técnicas de estudo dos microrganismos.....</b>       | <b>36</b>   |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.9.1 Cultivo microbiano.....  | 36        |
| 3.9.2 Enriquecimento das culturas.....   | 37        |
| 3.9.3 Obtenção de culturas puras.....  | 38        |
| 3.9.4 Repicagem e manutenção dos isolados.....                                   | 38        |
| 3.9.5 Quantificação de microrganismos e avaliação da biomassa.....               | 39        |
| 3.9.6 Curva de crescimento.....  | 39        |
| 3.9.7 Cinética de crescimento celular.....                                       | 41        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>4.1 Fonte de microrganismos.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>4.2 Meio de cultura.....</b>  | <b>45</b> |
| Fonte decarbono.....   | 45        |
| <b>4.3 Contagem de unidades formadoras de colônia na amostra inicial.....</b>    | <b>45</b> |
| <b>4.4 Enriquecimento da cultura inicial .....</b>                               | <b>46</b> |
| <b>4.5 Obtenção de culturas puras -isolamento .....</b>                          | <b>46</b> |
| <b>4.6 Caracterização dos microrganismos.....</b>                                | <b>46</b> |
| <b>4.7 Estudos preliminares.....</b>   | <b>47</b> |
| 4.7.1 Avaliação do crescimento em meio líquido.....                              | 47        |
| 4.7.2 Crescimento em diferentes concentrações de gasolina.....                   | 47        |
| 4.7.3 Determinação da biomassa e crescimento bacteriano.....                     | 48        |
| <b>4.8 Avaliação da produção de biosurfactante .....</b>                         | <b>49</b> |
| <b>4.9 Teste de degradação.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>4.10 Velocidade específica de crescimento.....</b>                            | <b>49</b> |
| <b>4.11 Conversão de substrato em biomassa.....</b>                              | <b>50</b> |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>5.1 Caracterização dos microrganismos.....</b>                                | <b>51</b> |
| 5.1.1 Contagem de células na amostra inicial.....                                | 51        |
| 5.1.2 Isolamento e estudo morfológico.....                                       | 53        |
| <b>5.2 Estudos preliminares.....</b>   | <b>57</b> |
| 5.2.1 Avaliação do crescimento em meio líquido e produção de biosurfactante..... | 57        |
| 5.2.2 Crescimento em diferentes concentrações de gasolina.....                   | 60        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2.3 Obtenção das curvas de calibração para o crescimento microbiano..... | 62        |
| <b>5.3 Avaliação do crescimento e comportamento do pH.....</b>             | <b>63</b> |
| 5.3.1 Velocidade específica de crescimento.....                            | 64        |
| <b>6.CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....</b>                                   | <b>68</b> |
| <b>6.1 Sugestões para futuros trabalhos.....</b>                           | <b>68</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                  | <b>69</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 3.1  | Representação da estrutura química do BTEX                                 | 23 |
| Figura 3.2  | Representação do princípio de biofiltração                                 | 27 |
| Figura 3.3  | Esquema da mineralização do poluente pelos microrganismos                  | 32 |
| Figura 3.4  | Representação esquemática da degradação aeróbica do benzeno                | 33 |
| Figura 3.5  | Ação esquemática do biosurfactante na degradação do óleo                   | 35 |
| Figura 3.6  | Curva de crescimento microbiano em sistemas fechados                       | 40 |
| Figura 4.1  | Tratamento ex-situ de solo contaminado através de biofiltração             | 44 |
| Figura 5.1  | Material suporte do biofiltro  | 51 |
| Figura 5.2  | Aspecto das colônias bacterianas em quatro diluições                       | 51 |
| Figura 5.3  | a) Material utilizado para o isolamento das bactérias                      | 54 |
|             | b) Semeadura em linhas cruzadas para isolamento                            | 54 |
| Figura 5.4  | Exemplos de diferenças morfológicas entre as colônias                      | 54 |
| Figura 5.5  | Coloração diferencial de Gram para os diferentes isolados                  | 54 |
| Figura 5.6  | Avaliação do crescimento em meio líquido                                   | 58 |
| Figura 5.7  | Avaliação do teste de emulsificação  | 58 |
| Figura 5.8  | Curvas de crescimento em meio líquido para concentrações de gasolina de 1% | 61 |
| Figura 5.9  | Curvas de calibração para determinação da biomassa                         | 63 |
| Figura 5.10 | Curvas de crescimento e pH ao longo do tempo de cultivo                    | 64 |
| Figura 5.11 | Curvas de velocidade específica de crescimento                             | 66 |

## LISTA DE QUADROS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Quadro 3.1 | Lista de gêneros microbianos degradadores de hidrocarbonetos                | 31 |
| Quadro 5.1 | Características morfológicas dos isolados                                   | 57 |
| Quadro 5.2 | Produção de biosurfactantes verificada através da emulsificação da gasolina | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| BTEX    | Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno          |
| EPA     | Agência de Proteção Ambiental Americana         |
| LCQAR   | Laboratório de Controle da Qualidade do Ar      |
| MIP     | Laboratório de Microbiologia e Parasitologia    |
| UFSC    | Universidade Federal de Santa Catarina          |
| CONCAWE | Conservation of Clean Air and Water in Europe   |
| SSST    | Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho     |
| ETE     | Estação de Tratamento de Efluente               |
| SVE     | Extração por ventilação do solo                 |
| ER      | Eficiência de remoção                           |
| HPA     | Hidrocarbonetos poliaromáticos                  |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                       |
| RNA     | Ácido ribonucleico                              |
| NADH    | Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo              |
| NADPH   | Fosfato de nicotinamida- adenina- dinucleotídeo |
| ATP     | Adenosina trifosfato                            |
| BH      | Bushnell-Haas                                   |
| rpm     | Rotação por minuto                              |
| UFC     | Unidade formadora de colônia                    |
| pH      | Potencial hidrogênico                           |
| DO      | Densidade ótica                                 |
| ppm     | Parte por milhão                                |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                    |   |
|--------------------|---|
| $X$                | concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ )                                |
| $\mu_X$            | velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )                  |
| $S$                | concentração de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )                           |
| $r_x$              | velocidade de crescimento das células ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) |
| $r_s$              | velocidade de consumo do substrato ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )    |
| $t$                | tempo (h)   |
| $X_0$              | concentração celular no instante inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )            |
| $\mu_{\text{máx}}$ | velocidade específica de crescimento máximo $\text{h}^{-1}$               |
| $K$                | constante de saturação ( $\text{mg.L}^{-1}$ )                             |
| $t_d$              | tempo de duplicação   |
| $Y_{x/s}$          | coeficiente de produção celular   |
| $m$                | coeficiente de manutenção ( $\text{t}^{-1}$ )                             |
| $S_0$              | substrato no instante inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ )                       |
| $m_{a+f}$          | massa da amostra seca + massa do filtro (g)                               |

## RESUMO

Em todo o mundo a preocupação em relação à poluição atmosférica é crescente, mais especificamente com relação à contaminação por substâncias com características de toxicidade e persistência que as tornam perigosas à saúde humana, às plantas e aos animais. A indústria do petróleo e o uso de seus derivados contribuem significativamente na liberação dos compostos orgânicos voláteis. A problemática ambiental da presença de compostos voláteis na atmosfera deve-se ao fato de alguns serem tóxicos, apresentarem forte odor e estarem envolvidos com chuva ácida, *smog* fotoquímico e efeito estufa. Os tanques de gasolina representam uma grande fonte de emissões atmosféricas, com perdas de  $65,64 \text{ t.ano}^{-1}$ . O vapor da gasolina consiste em uma mistura de aproximadamente 90 hidrocarbonetos voláteis, incluindo cadeias alifáticas, cicloalcanos e aromáticos. Devido ao problema ambiental desses poluentes, torna-se necessário medidas de redução e tratamento, tanto por métodos físico-químico quanto por biológicos. A biofiltração é aponada pela EPA como a melhor tecnologia para tratamento de vapores de gasolina emanados de postos de combustíveis e liberados pelos solos contaminados. Essa tecnologia é baseada na transferência do gás para uma fase líquida dentro de um meio suporte contendo microrganismos, onde ocorrerá a oxidação do poluente liberando  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Este trabalho teve como objetivo isolar microrganismos provenientes de um biofiltro utilizado para tratamento de vapores de gasolina, estudar a abundância, morfologia e avaliar o crescimento utilizando gasolina como fonte de carbono e energia. Foi realizada a contagem das UFC/g, a avaliação do crescimento em meio líquido com diferentes concentrações de gasolina, a produção de biosurfactantes e a determinação da velocidade específica de crescimento para três bactérias com diferentes habilidades na utilização do substrato. Os resultados mostraram que a microbiota predominate em biofiltros de tratamento de vapores de gasolina é Gram negativa, apresentando contagem da ordem de  $1,8 \times 10^7$  UFC/g, o que é coerente para esses sistemas. Também foi verificado que nem todos os isolados que utilizam de alguma forma a gasolina são capazes de produzir biosurfactantes. Entretanto, observou-se uma relação positiva entre a produção de biosurfactantes e o crescimento bacteriano. A presença de bactérias na amostra do suporte do biofiltro que isoladamente não cresceram na presença de gasolina sugere uma co-relação inter-específica com bactérias degradadoras de gasolina. Concentrações de gasolina da ordem de 0,2 % e superiores são tóxicas para microrganismos isolados de zonas do biofiltro que operam com baixas concentrações de vapores de gasolina. Os isolados produtores de biosurfactante apresentam maior crescimento, representando um potencial maior para utilização como inoculantes para sistemas de tratamento de vapores de gasolina.

*Palavras-chave: microrganismos, COV, biofiltro, biosurfactantes, gasolina*

## ABSTRACT

Throughout the world the concern about air pollution is increasing, especially with respect to contamination by substances with characteristics of toxicity and persistence that make them dangerous to human health, to plants and animals. The oil industry and the use of derivatives contribute significantly on the release of volatile organic compounds. The environmental issue of the presence of volatile compounds in the atmosphere due to the fact that some are toxic, make strong odor and are involved with acid rain, photochemical smog and greenhouse effect. The tanks of gasoline represent a major source of atmospheric emissions, with losses of 65.64 t.ano<sup>-1</sup>. The vapour of gasoline is a mixture of approximately 90 volatile hydrocarbons, including aliphatic chains, cycloalcanos and aromatic. Due to the environmental problem of these pollutants, it is necessary measures for the reduction and treatment, both by physical and chemical methods, or biological. The biofiltration is indication by the EPA as the best technology for treatment of the gasoline vapors emanating from posts fuels and released by contaminated land. This technology is based on the transfer of the gas into a liquid phase within a half holder containing microorganisms, where the oxidation of pollutant releasing CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. This study aimed to isolate microorganisms from a biofilter used for treatment of vapors from gasoline, to study the abundance, morphology and growth rate using gasoline as a source of carbon and energy. It was held on counts of CFU/g, the assessment of growth in the liquid medium with different concentrations of gasoline, the production of biosurfactant and determination of the speed of growth for three specific bacteria with different skills in the use of the substrate. The results showed that the microorganism predominate in biofilter treatment of vapors of gasoline is Gram negative, showing counting of the order of 1,8 x10<sup>7</sup> CFU/g, which is consistent for such systems. It was also established that not all isolated using some form of a gasoline are capable of producing biosurfactant. Meanwhile, there was a positive relationship between the production of biosurfactant and bacterial growth. The presence of bacteria in the sample of the support of biofilter that alone did not grow in the presence of gasoline suggests a co-relation with inter-specific bacteria degradation of gasoline. Concentrations of gasoline in the order of 0.2% and higher are toxic to micoorganismos isolated areas of the biofilitro operating with low concentrations of vapors from gasoline. Isolates producers of biosurfactant show greater growth, representing a greater potential for use as inoculants systems for treatment of vapors of gasoline in biofilter.

*Key-words: microorganisms, VOCs, biofilter, biosurfactant, gasoline*

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos problemas relativos aos contaminantes ambientais estão, de uma maneira ou de outra, associados aos crescentes processos de industrialização verificados, principalmente, a partir da revolução industrial, no século XVIII. O aumento das pesquisas e da difusão de novas tecnologias tem buscado minimizar os efeitos gerados pelos processos de produção, que contribuem para pôr em perigo à saúde do homem e dos ecossistemas.

Devido às normas de condutas ambientais e às novas legislações, cada vez mais restritivas, a indústria passou a assumir uma postura mais evolutiva em relação ao manejo ambiental, resultando na implementação do conceito de desenvolvimento sustentável. Reduzir e controlar a poluição, tem sido um desafio, especialmente porque o impacto ambiental e os acidentes ecológicos são dois fatores ainda não totalmente dominados.

A exploração expressiva do petróleo deu-se a partir século XIX devido à invenção dos motores a gasolina e a diesel. A indústria petrolífera é uma das grandes causadoras de impactos ambientais, sendo que seu potencial de derramamento e contaminação existe em todas as fases do processo produtivo: na exploração, no refinamento, no transporte, na estocagem do produto cru ou dos subprodutos e na utilização do produto final (SCHIRMER, 2004; CARMO JUNIOR, 2005). Posteriormente, o petróleo também foi incorporado como matéria-prima para a fabricação de plásticos, borrachas sintéticas, tintas, corantes, adesivos, solventes, detergentes, explosivos, cosméticos entre outros. Este fato tornou esse produto, a principal matéria prima para as duas indústrias mais rentáveis do século XX, a automobilística e a petroquímica. Isto requereu uma maior produção do produto, aumentando, conseqüentemente, os acidentes e derramamentos no meio ambiente (FATORELLI, 2005).

As operações envolvendo refino do petróleo estão associadas à emissão de várias substâncias na atmosfera, dentre as quais, algumas causadoras de odores e maus cheiros; os compostos orgânicos voláteis (COV) são responsáveis por grande parte dessa emissão

(SCHIRMER, 2004). Cerca de 1% da produção total de combustível é anualmente perdida na transferência entre reservatórios, tanques e refinarias (ROGER et al., 1988).

O vapor da gasolina consiste em uma mistura de aproximadamente 90 hidrocarbonetos voláteis, incluindo cadeias alifáticas, cicloalcanos e aromáticos. Os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos - *orto-*, *meta-* e *para-*), são considerados substâncias perigosas por serem agentes carcinogênicos e são classificados como poluentes prioritários, pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (JUTRAS et al., 1997; SOLANO-SERENA et al., 1999).

A recuperação e o tratamento de vapores da gasolina diminuem os riscos ao meio ambiente e à saúde dos trabalhadores, consumidores e vizinhança dos locais que produzem, armazenam e comercializam este combustível.

A maior contaminação do ar com emissões de gasolina ocorre durante as operações de carga e descarga de tanques não equipados com sistemas de recuperação de voláteis, nos diferentes níveis de distribuição. Os vapores liberados durante a remediação de áreas contaminadas também devem ser considerados e controlados (CHOI e OH, 2002; SOARES, 2006).

Uma grande variedade de processos físico-químicos e biológicos é utilizada na remoção de compostos orgânicos voláteis (COV). Métodos diretos de controle incluem técnicas destrutivas, como incineração e biofiltração, e técnicas recuperativas, como absorção, adsorção, condensação e separação por membranas. Assim, compostos voláteis provenientes de industriais, refinarias, estações de tratamento de águas residuais ou evacuados do solo contaminado, podem ser coletados para serem destruídos ou reutilizados através de uma destas técnicas (KHAN e GHOSHAL, 2000).

Os tratamentos biológicos vêm ganhando espaço devido às suas vantagens quando comparadas com as técnicas convencionais de despoluição. Estes processos fundamentam-se na oxidação biológica por microrganismos, os quais decompõem a matéria orgânica em substâncias mais simples como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (ou CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>), com custos relativamente baixos e sem impacto ao meio ambiente (LIN et al., 2007). Inúmeras pesquisas indicam a degradação biológica como sendo o principal mecanismo para a eliminação das características tóxicas de poluentes (PARALES et al., 2002).

A biofiltração pode ser empregada como tecnologia complementar, com vantagens econômicas e ambientais, aos tratamentos de remediação de áreas

contaminadas e, também, na destruição de vapores emanados em todo sistema de armazenamento e distribuição de gasolina (CHOI e OH, 2002). Esse tratamento consiste na transferência de compostos voláteis para uma fase líquida e, em seguida, na degradação destes compostos por meio de microrganismos. Na sua maioria, os biofiltros que atualmente encontram-se em funcionamento podem tratar odores e COV com eficiências superiores a 90 %.

Vários autores reportam a habilidade dos microrganismos para utilizar diferentes COV com única fonte de carbono (NOCENTINI et al., 2000; SOLANO-SERENA et al., 2000 (a); SOLANO-SERENA et al., 2000 (b); VAN HAMME e WARD, 2001; PRANTERA et al., 2002). Para muitas bactérias esta capacidade está associada ao potencial dos microrganismos em produzir biosurfactantes. Os biosurfactantes são compostos biodegradáveis que possuem propriedades emulsificantes, equivalentes às dos surfactantes químicos (BANAT, 1995). De acordo com Cameotra e Bollag (2003), os biosurfactantes podem ser utilizados para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos, facilitando o acesso dos microrganismos, aumentando a biodegradação.

A utilização de culturas puras e mistas de microrganismos em processos de descontaminação vem sendo uma alternativa tecnológica bastante promissora, por muitas vezes ser capaz de proporcionar limpeza ou diminuição da carga poluidora (EDMONDS e COONEY, 1967; SOLANO-SERENA et al., 1998; RICHARD e VOGEL, 1999; MÁRQUEZ-ROCHA et al., 2001; CHOI e OH, 2002; HONG et al., 2005; SHIM et al., 2005). Entretanto, antes de tomar qualquer decisão quanto a escolha dos microrganismos que serão utilizados no tratamento biológico, torna-se necessário determinar sua capacidade em degradar o contaminante e o tempo necessário para que isto ocorra (GEERDINK et al., 1996). Experimentos prévios em laboratórios podem auxiliar nessas respostas, pois permitem selecionar linhagens microbianas capazes de assimilarem determinados compostos, para suprir suas necessidades metabólicas. Neste contexto, o presente estudo visa isolar microrganismos de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina proveniente de solos contaminados com combustíveis, e avaliar suas capacidades de degradação, com o objetivo de utilizá-los futuramente para inocular biofiltros, aumentando a eficiência do sistema pela redução do tempo de aclimação dos microrganismos.

Este estudo integra-se as demais pesquisas que vêm sendo realizadas pelo Laboratório de Controle da Qualidade do Ar (LCQAR) vinculado ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina. Essa linha de pesquisa preocupa-se em contribuir com estudos referentes à poluição atmosférica gerada por odores e COV, bem como suas técnicas de análise, amostragem e tratamento.

O desenvolvimento desta pesquisa ocorreu em colaboração com os Laboratórios de Microbiologia e de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da UFSC. Os laboratórios possuem as condições adequadas para trabalhar assepticamente com microrganismos, como estufas, câmara de fluxo laminar e autoclave, entre outros equipamentos. Também foi utilizado o Laboratório de Controle da Qualidade do Ar (LCQAR) do Departamento de Engenharia Sanitária para a realização de algumas análises.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial de biodegradação da gasolina por bactérias provenientes da microbiota existente num biofiltro de tratamento vapores de solos contaminados com combustíveis.

### **2.2 Objetivos específicos**

Isolar e selecionar as bactérias com capacidade de degradar gasolina;

Caracterizar morfológicamente as colônias bacterianas e classificar através da coloração de Gram os diferentes isolados;

Avaliar a cinética de crescimento, variação do pH e a produção de biosurfactante.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Poluição ambiental**

A poluição ambiental e os padrões de desenvolvimento tecnológicos e industriais estão interligados, ameaçando o desenvolvimento econômico e o meio ambiente. Portanto, a economia e a ecologia devem integrar-se perfeitamente nos processos decisórios e legislativos, não só para proteger o ambiente, mas também para garantir e promover o desenvolvimento das nações. A economia não é apenas a produção de riqueza, e a ecologia não é apenas a proteção da natureza, ambas são também muito importantes para a qualidade de vida da humanidade (COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO, 1991).

A contaminação é definida por Bacci (1994), como uma ação humana capaz de modificar as propriedades das condições ambientais ou a disponibilidade e a qualidade dos recursos naturais numa determinada área, durante um intervalo de tempo. É essencial a percepção de que a contaminação por si só já é um prejuízo ambiental, conseqüentemente, todas as ações deveriam ser direcionadas para prevenir ou pelo menos minimizar esse problema.

A Lei nº 6.938, de 31/07/81, que trata da Política Nacional de Meio Ambiente, define a poluição como sendo "a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população, criem condições adversas às atividades

sócio-econômicas, afetem desfavoravelmente a biota, afetem condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente e lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos". A poluição ambiental ocorre apenas quando uma contaminação produz danos negativos a organismos, populações ou comunidades biológicas e ao ser humano (LANDIS e YU, 1995).

Após sua emissão por uma fonte qualquer, os poluentes percorrem diversos caminhos, em sua difusão no ambiente, até chegarem ao solo, ar e/ou água. Seu nível de concentração em cada ponto do percurso dependerá de diversos fatores: carga de emissão, características de dispersão e velocidade de remoção do meio por agentes físicos, químicos e/ou biológicos ao longo de todo percurso (FELLENBERG, 1980).

O enfoque tradicional de saúde pública se combina com modernos conceitos da interdependência da saúde com os fatores ambientais, afirmando que todos os aspectos do meio ambiente afetam potencialmente a saúde. A melhora da qualidade da saúde ambiental estará necessariamente ligada ao desenvolvimento de processos ecologicamente sustentáveis (BRILHANTE, 1999).

### **3.2 Poluição atmosférica e contaminação por COV**

Em todo o mundo a preocupação em relação à poluição atmosférica é crescente, mais especificamente à contaminação por substâncias com características de toxicidade e persistência que as tornam perigosas à saúde humana, às plantas e aos animais.

A poluição do ar é provocada por uma mistura de substâncias químicas, lançadas no ar ou resultantes de reações químicas, que alteram o que seria a constituição natural da atmosfera. O nível de poluição do ar é medido pela quantificação das substâncias poluentes nele encontradas. Considera-se poluente qualquer substância presente no ar e que pela concentração possa torná-lo impróprio,

nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade. A qualidade do ar é o termo que se usa, normalmente, para traduzir o grau de poluição no ar atmosférico (ÁLVARES Jr., 2002).

As fontes emissoras dos poluentes atmosféricos são numerosas e variáveis, podendo ser antropogênicas ou naturais. As fontes antropogênicas são as que resultam das atividades humanas, como a atividade industrial ou o tráfego de automóvel, enquanto as fontes naturais englobam fenômenos da natureza, tais como emissões provenientes de erupções vulcânicas ou incêndios florestais de origem natural (LYRA, 2001).

Os poluentes incluem qualquer elemento ou composto químico natural ou artificial, capaz de permanecer em suspensão ou ser arrastado pelo vento. Essas substâncias podem existir na forma de gases, no estado líquido, em formas de gotículas ou partículas sólidas (ÁLVARES Jr., 2002).

Os compostos orgânicos voláteis (COV) incluem a maioria dos solventes, lubrificantes e combustíveis em geral, sendo comumente emitidos por indústrias químicas e petroquímicas. De modo geral, são definidos como compostos orgânicos de elevada pressão de vapor e são facilmente vaporizados às condições de temperatura e pressão ambiente. A maioria dos hidrocarbonetos, incluindo orgânicos nitrogenados, clorados e sulfurados são designados como COV (CHU et al, 2001). Suas fontes mais abundantes são antropogênicas, onde 46 % das emissões são advindas de processos industriais e 30 % do transporte automotivo (LORA, 2000).

A problemática ambiental da presença de compostos voláteis na atmosfera deve-se ao fato de alguns serem tóxicos, apresentarem forte odor e estarem envolvidos com chuva ácida, *smog* fotoquímico e efeito estufa (SOUZA, 2004; WU et al., 2006; SINGH, et al., 2006).

Martins (2004) avaliou as emissões de compostos orgânicos voláteis em tanques de armazenamento de produtos químicos. Os tanques de gasolina figuraram como a segunda maior fonte de emissões atmosféricas, com perdas de 65,64 t.ano<sup>-1</sup>. Em 1998, uma pesquisa realizada pela CONCAWE (organização europeia que reúne várias companhias de

petróleo), em 64 terminais marítimos da Comunidade Européia, concluiu que 13,2 mil toneladas de gasolina foram emitidas sem controle para a atmosfera (CONCAWE, 2002). Segundo Souza (2004), a perda total estimada foi de 13,4 mil t.ano<sup>-1</sup>, considerando que durante o abastecimento de tanques a evaporação de gasolina com 25 % (V) de etanol é de 200 g.m<sup>-3</sup>.

Existem diferentes estratégias para controle da emissão de voláteis e, apesar de inúmeras variações serem possíveis, as mais aplicadas são: adsorção (para baixas concentrações), condensação (para altas concentrações), oxidação térmica e lavagem de gases (esta combinada ou não com tratamento biológico) (IKEMOTO et al., 2006). A escolha entre as tecnologias de recuperação ou destruição depende da natureza química do contaminante, das concentrações e das características operacionais do sistema (WU et al., 2006).

A recuperação e o tratamento de vapores da gasolina diminuem os riscos ao meio ambiente e à saúde dos trabalhadores, consumidores e vizinhança de sistemas que produzem, armazenam e comercializam este combustível.

### **3.3 Principais fontes de COV**

#### **3.3.1 Petróleo**

O petróleo, ou óleo cru, é uma mistura complexa de milhares de compostos, a maioria deles hidrocarbonetos. A proporção desses compostos varia de um campo petrolífero para outro por influência das condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente de formação (BAIRD, 2002).

Entre os constituintes do petróleo, os hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio. Eles apresentam características apolares (hidrofóbicos), ou seja, não apresentam atração pela água. Desse modo, eles

têm uma maior tendência de associação às fases sólidas, tais como as partículas em suspensão, os tecidos biológicos e os sedimentos. Em alguns tipos de óleos, os hidrocarbonetos chegam a atingir até 98 % da composição total (BÍCEGO, 1988). Além dos hidrocarbonetos, existem outros componentes em menor quantidade, tais como, enxofre, nitrogênio e oxigênio, há ainda metais-traço como vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio (API, 2001).

As principais classes de hidrocarbonetos constituintes do petróleo são os alifáticos e os cíclicos. Os hidrocarbonetos alifáticos se dividem em: n-alcenos ou parafinas, alcenos ramificados ou isoprenóides e alcenos. Os hidrocarbonetos cíclicos são divididos em ciclos alcenos ou naftenos e aromáticos. Em média, o petróleo apresenta cerca de 30 % de alcenos, 50 % de ciclo alcenos e 15 % de aromáticos (UNEP, 1991).

Em geral, quanto maior é o número de átomos de carbono do composto presente no petróleo, maior será sua persistência no ambiente, mais lenta será sua evaporação e sua solubilidade, e menor, também, será a sua susceptibilidade à biodegradação (MARQUES Jr., 2002).

### 3.3.2 Gasolina

A gasolina é uma mistura complexa de mais de 200 compostos, sendo constituída por uma extensa composição de hidrocarbonetos hidrofóbicos relativamente voláteis, com a maior parte dos seus constituintes classificados como cadeias ramificadas de parafinas, cicloparafinas e compostos aromáticos, com destaque para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (conhecidos como BTEX). As características físico-químicas determinam o comportamento da gasolina e de seus constituintes no ambiente (POULSEN et al., 1992).

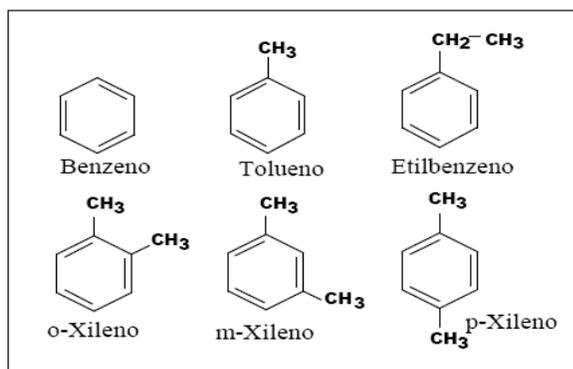
A gasolina comercializada no Brasil é bastante diferenciada de outros países, pois, atualmente, é misturada com 24 % de álcool (etanol). Essa adição tem como objetivo aumentar a octanagem do combustível, contribuindo também para diminuir a

poluição atmosférica oriunda da combustão, porém trás conseqüências no processo de biodegradação e deslocamento dos compostos (CORSEUIL e FERNANDES, 1999).

### 3.3.3 Hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX)

Os componentes BTEX (benzeno, etilbenzeno, tolueno e os três isômeros do xileno) são classificados como poluentes ambientais primários (Figura 3.1). Eles são hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis que são normalmente encontrados juntos em petróleo cru e seus produtos derivados, tais como, gasolina e óleo diesel.

Segundo Baird (2002), o benzeno ou anel benzênico é considerado o composto fundamental de seus derivados (tolueno, etilbenzeno e xilenos), os quais possuem o hidrogênio do anel benzênico substituído por grupos metil ( $\text{CH}_3$ ) ou etil ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ). Eles são produzidos em larga escala para suprir a indústria química, onde são usados como solventes e matéria prima para fabricação de pesticidas, plásticos, etc. (MARTINS,



2004).

Figura 3.1 Representação da estrutura química do BTEX (MAZZUCO, 2004)

Os compostos aromáticos (BTEX e outros alquilbenzenos) perfazem cerca de 10 a 59 % da gasolina (massa/massa), enquanto que os hidrocarbonetos alifáticos compreendem 41 a 62 %. Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos

que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos (TIBURTIUS et al., 2004).

### **3.4 Toxicidade dos BTEX**

A presença destes hidrocarbonetos no ambiente é um perigo para a saúde pública e para o ecossistema, devido a sua toxicidade e habilidade de bioacumular ao longo da cadeia alimentar (TIBURTIUS, 2004).

Bono e colaboradores (2001), investigando a poluição de aromáticos no ar, destacam que os hidrocarbonetos aromáticos provocam danos à saúde, principalmente devido à toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade dos BTEX. Eles também advertem que a inalação, de tolueno ou xilenos, pode induzir distúrbios no modo de falar, na visão, audição, no controle dos músculos e outros, além de sugerirem a associação entre benzeno e xilenos e o surgimento de tumores cerebrais. A “Internation Agency for Research on Câncer” e o “National Institute for Occupational Safety and Health” incluem o benzeno em suas listas de produtos cancerígenos.

No Brasil, a ação cancerígena do benzeno foi também reconhecida oficialmente a partir de 1994, pela portaria da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho (SSST nº3), de 10 de março de 1994. A sua capacidade em provocar danos cromossômicos e à medula óssea já foram amplamente demonstradas em seres humanos e animais. Foram observadas alterações cromossômicas numéricas e estruturais em linfócitos e células da medula óssea de trabalhadores expostos ao benzeno (MITILÃO e RAFAELI, 2007).

Devido ao seu grande perigo à saúde a legislação tem se tornado cada vez mais restritiva. A Portaria da Secretaria de Segurança e Saúde do Trabalho (SSST) número 14, de 20 de dezembro de 1995, define os valores de referência para o benzeno, obtidos na zona de respiração dos trabalhadores, de 1 ppm ( $3,19 \text{ mg.m}^{-3}$ ) e 2,5 ppm para as empresas siderúrgicas, numa jornada de trabalho de 8 h.

Em relação ao etil-benzeno, cerca de 200 ppm de vapor pode ocasionar irritação na pele, olhos e aumento da respiração. A absorção sistêmica causa náusea, vômito e dores de cabeça (MANCINI, 2002).

A resolução normativa - RN 15 do Ministério do Trabalho estabelece as atividades ou operações nas quais os trabalhadores ficam expostos a agentes químicos, abordando a questão de insalubridade, que ocorrerá quando forem ultrapassados os limites de tolerância. Essa legislação estabelece que o etilbenzeno, o tolueno e o xileno possuem grau de insalubridade médio, com valores de 78 ppm para o três compostos e de 340, 290 e 340 mg/m<sup>3</sup> para etilbenzeno, tolueno e xileno respectivamente. Sendo o tolueno absorvido também por via cutânea, além das vias respiratórias.

Padrões americanos estabelecem uma redução de vapores de benzeno, tolueno e isômeros de xileno inferiores a 0,12, 1200 e 1400 µg/m<sup>3</sup>, respectivamente, em efluentes gasosos antes de sejam lançados na atmosfera (OH e BARTHA, 1997). Apesar das emissões de COV ainda não estarem regulamentadas, a tendência será a exigência de instalação de sistemas de controle, a partir da definição dos padrões de emissões nacionais.

O benzeno é um dos constituintes do petróleo em menor quantidade, sendo que geralmente constitui apenas 2 % do petróleo. Todavia, ainda que em menor concentração, não deixa de ser perigoso, considerando sua alta estabilidade, que lhe designa maior toxicidade e persistência em relação aos outros componentes (JOHNSON et al., 2003).

### **3.5 Tratamento dos COV**

Não existe uma tecnologia de tratamento de correntes gasosas poluídas que seja eficiente e econômica para todas as unidades industriais. A eficiência da tecnologia é normalmente definida levando em conta o fluxo volumétrico e a concentração do poluente. Os custos dependem da aplicação em particular, da corrente gasosa a ser tratada, dos materiais necessários para a construção, dos sistemas de monitorização, etc.

Esses parâmetros levam à dificuldade para comparar custos específicos das tecnologias.

Há dois métodos básicos pelos quais pode-se controlar a emissão de COV e odores nos processos industriais. Estas técnicas são divididas em dois grupos: a) modificação do processo e/ou equipamento; b) técnicas de tratamento. O primeiro grupo é um método indireto de controle de COV e compreende as chamadas “tecnologias limpas” (SCHIRMER e De MELO LISBOA, 2003; De MELO LISBOA, 2008). O segundo grupo abrange os métodos diretos de controle e inclui técnicas destrutivas como incineração e biofiltração, e técnicas recuperativas, como absorção, adsorção, condensação e separação por membranas.

Os custos das tecnologias de controle de uma corrente gasosa variam devido às diferenças de processamento. Quanto aos custos de energia, os incineradores são melhor aplicados no tratamento de correntes gasosas com elevadas concentrações de poluentes. Os incineradores necessitam de elevadas quantidades de combustível para o tratamento de correntes gasosas com baixas concentrações de poluente, de modo a atingir a eficiência de tratamento. A incineração também pode produzir sub-produtos, como os NOx que contribuem para a degradação do meio ambiente, nomeadamente as chuvas ácidas, *smog*, etc.

A tecnologia de adsorção em carvão ativado tem elevados custos de capital e operação devido ao custo do material, e é apropriada para correntes gasosas de baixa carga orgânica e solventes que possam ser recuperáveis. Esta tecnologia transfere, no entanto, a carga poluente da fase gasosa para a fase sólida, que posteriormente necessitará de tratamento (VOICE et al., 1992).

A regeneração ou a reativação do carvão utilizado, necessita de técnicos especializados e equipamento adicional, o que aumenta os custos. O reator tipo *airlift* úmido pode ser utilizado em algumas aplicações onde é necessário a remoção de odores ou quando existem gases corrosivos. Não necessita de deposição de qualquer meio, mas gera efluentes líquidos e implica custos elevados em produtos químicos para sua eliminação.

Os processos de separação por membrana são capazes de tratar elevadas cargas

de COV. A maior desvantagem desse sistema é que exige elevada energia elétrica para manter um significativo diferencial de pressão na membrana, de modo a atingir eficiências elevadas de remoção.

A biofiltração tem custos operacionais mais baixos e produz o mínimo de subprodutos poluentes, no entanto é inapropriada para o tratamento de correntes gasosas com elevadas cargas poluentes ou compostos de baixa degradabilidade (WU et al., 2006).

## Tratamento biológico de COV

Os tratamentos biológicos estão incluídos na família de tecnologias que se baseia em processos microbianos de conversão de poluentes ambientais em produtos não tóxicos, como dióxido de carbono (via degradação aeróbia), água e sais inorgânicos simples ou, algumas vezes  $\text{CH}_4$  (via degradação anaeróbia) (AELION E BRADLEY, 1991).

A elevada potencialidade do uso de microrganismos, apontados na literatura como agentes degradadores das mais diversas substâncias, aliada ao cada vez mais freqüente emprego da biotecnologia, indica o tratamento biológico como um dos mais eficientes meios de reduzir os efeitos adversos dos hidrocarbonetos sobre o meio ambiente (ALEXANDER, 1994). A descontaminação de ambientes atingidos por óleos e gasolina através de processos biológicos representa uma técnica eficiente, econômica e uma alternativa versátil para os tratamentos físico-químicos (MARGESIN e SCHINNER, 1997).

Os processos biológicos de tratamento de gases consistem na transferência de compostos voláteis, para uma fase líquida e, em seguida, na degradação destes compostos por meio de microrganismos (Figura 3.2). Aplica-se esse processo a produtos biodegradáveis e relativamente solúveis em água. Compostos tratados biologicamente são primariamente orgânicos voláteis, compostos sulfurados e nitrogenados reduzidos,

tipicamente degradados como substratos primários ou como co-metabólitos (BELLI FILHO et al., 2000).

Há basicamente três grupos de processos biológicos de tratamento de gases. Eles se diferem segundo as características móveis ou estáticas da fase e da biomassa (células livres ou immobilizadas sobre o suporte) no interior do reator biológico: o biofiltro, a lavagem biológica e os leitos percolados. Percentuais de eficiência vão de 85 a 99 % (KHAN e GHOSHAL, 2000; BELLI, 2001; ÁLVARES Jr., 2002; De MELO LISBOA, 2008).

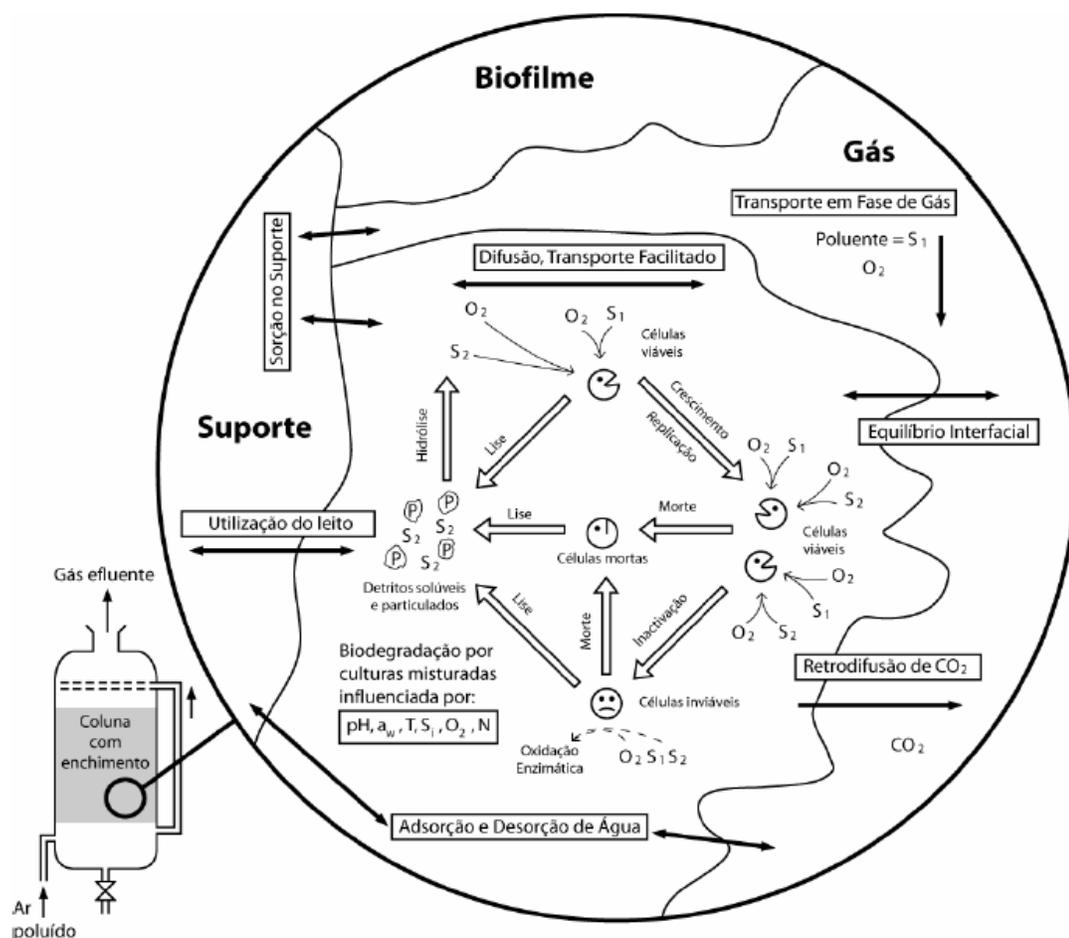


Figura 3.2 Figura representativa do princípio de biofiltração (DESHUSSES, 1997)

A biofiltração é uma opção para controle da poluição atmosférica, sendo um sistema de destruição de contaminantes gasosos, orgânicos ou inorgânicos. Há aproximadamente 60 anos já era aplicada na Comunidade Européia, para o controle de emissões de gases na suinocultura e em estações de tratamento de efluentes (ETE). A partir da década de 80, passou a ser utilizada em escala industrial também nos Estados Unidos, no tratamento de odores e solventes. Cabral (2003), estudou a remoção de ácido sulfídrico e amônia liberados no processo anaeróbico em estações de tratamento de esgoto, tendo como resultado a remoção de 98 % de H<sub>2</sub>S e 86 % de NH<sub>3</sub> em biofiltros preenchidos com composto orgânico. Na sua maioria, os biofiltros que atualmente encontra-se em funcionamento podem tratar odores e COV com eficiências superiores a 90 %, através do controle dos parâmetros. Lopez (2007), avaliou um biofiltro em escala piloto de tratamento de vapores de gasolina comercial, utilizando turfa como material suporte durante 140 dias a uma taxa de aplicação superficial (TAS) de 62 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>.h e um tempo de contato (TC) de 52 segundos. A eficiência do sistema foi avaliada através de análises olfatométricas e análises físico-químicas. No final do experimento obteve-se uma eficiência na remoção do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno de 89,98 %, 46,43 %, 25,0 % e 68,60 % respectivamente. A biofiltração mostrou-se uma alternativa promissora no combate às emissões odoríferas provenientes do setor petrolífero.

O sistema de biofiltração é economicamente competitivo para concentração de poluentes até 5 g.m<sup>-3</sup> (WU et al., 2006), entretanto em estudos realizados por Singh e colaboradores (2006), no tratamento de vapores de tolueno, foi atingido uma eficiência de remoção de 90% com concentrações de entrada de 34,73 g.m<sup>-3</sup>.

A biofiltração pode ser empregada como tecnologia complementar aos tratamentos de remediação de áreas contaminadas e, também, na destruição de vapores emanados em todo sistema de armazenamento e distribuição de gasolina.

Nos últimos anos, cerca de 100 biofiltros vêm sendo usados para tratar emissões

gasosas de solos contaminados com gasolina, complementando sistemas de extração por ventilação do solo (SVE), sendo recomendada pelo *U.S. Environmental Protection Agency* como a mais efetiva tecnologia na remediação de emissões de solos contaminados de postos de revenda de combustíveis. Nas últimas décadas a biofiltração vem sendo aprimorada para purificação destes gases. Em relação às pesquisas com BTEX as principais conclusões são de que, em condições operacionais adequadas, pode-se efetivamente tratá-los com eficiência de remoção (ER) superior a 95 %, mesmo a partir do uso de suportes comuns, como terra ou composto (SOARES, 2006; LOPEZ, 2007).

### **3.6 Atividade microbiológica**

Os microrganismos desempenham um papel importante na ciclagem de nutrientes. Eles estão distribuídos em todos os ambientes realizando a mineralização dos compostos orgânicos, sendo de fundamental importância para manutenção da vida na terra, pois fazem retornar ao ambiente os compostos de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre até o seu estado inorgânico (PELCZAR et al., 1996).

A microbiota é a principal responsável por essas modificações ao longo do tempo. As comunidades naturais de microrganismos têm uma incrível versatilidade fisiológica, elas são capazes de metabolizar e as vezes mineralizar um enorme número de compostos orgânicos. Provavelmente todos os compostos naturais, sem considerar sua complexidade, será degradado por uma ou outra espécie em algum ambiente particular. Algumas espécies de *Pseudomonas* podem degradar mais de 100 substratos utilizando-os como fonte de carbono (ALEXANDER, 1994).

Entretanto existem substâncias resistentes à biodegradação, chamadas recalcitrantes ou bioimunes. Muitas destas substâncias, como muitos compostos orgânicos, biodegradam-se apenas parcialmente, em vez de mineralizar-se completamente; elas são transformadas em compostos orgânicos, alguns dos quais podem ser bioimunes ou mesmo mais tóxicos que as substâncias originais.

A degradabilidade da maioria dos componentes da gasolina, tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno, compostos conhecidos como BTEX, tiveram sua degradação bem estabelecida através de culturas puras. Entretanto, a biodegradabilidade não é simples de avaliar pois a gasolina é constituída por mais de 200 compostos e a interação entre eles podem afetar a cinética dos BTEX e a rota de degradação (ALVAREZ e VOGEL, 1991).

Existem muitos estudos utilizando microrganismos no tratamento de compostos de petróleo (AELION e BRADLEY, 1991; RICHARD e VOGEL, 1999; GALLEGO et al., 2001; MÁRQUEZ-ROCHA et al., 2001; PENET et al., 2004;). Microrganismos do solo vêm sendo isolados, baseado em suas capacidades de degradar compostos orgânicos naturais. Ridgway e colaboradores (1990), isolaram aproximadamente 300 bactérias de poços subterrâneos com a capacidade de degradar compostos de gasolina. Entre os gêneros encontrados estão *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, e *Micrococcus*, sendo que as *Pseudomonas* representaram 86,9 % das espécies identificadas. Embora as bactérias sejam responsáveis pela biodegradação da maioria dos hidrocarbonetos, algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras também têm habilidade de degradar esses compostos (ROSATO, 1997).

O uso de microrganismos em biotratamentos, está baseado na sua grande diversidade metabólica e sua rápida capacidade de divisão celular, desenvolvendo assim, características que permitem o uso da fonte mais disponível de nutriente, mesmo sendo resíduos químicos (NOCENTINI et al., 2000)

A eficiência da biodegradação depende da microbiota presente (microrganismos com enzimas capazes de degradar o contaminante), das propriedades do contaminante (o contaminante tem que estar biodisponível), das condições físico-químicas, tais como pH e temperatura adequadas, da biodisponibilidade dos nutrientes necessários aos microrganismos, da presença de receptores de elétrons, da ausência de substâncias tóxicas aos microrganismos (ALEXANDER, 1994; CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Além disso, as bactérias apresentam baixa eficiência na degradação de compostos

insolúveis em água, ou ligados ao solo, e seu sistema enzimático pode ser induzido somente na presença do contaminante. Níveis muito baixos do contaminante podem ser insuficientes para induzir a produção ou a atividade das enzimas desses organismos, diminuindo significativamente o processo de biodegradação (DUA et al., 2002).

Em ambientes impactados com os derivados do petróleo, ocorre o fenômeno de adaptação ou aclimatação de certas populações de bactérias, que passam a reconhecer os componentes do petróleo como fonte de carbono, iniciando o processo de degradação (CRAPEZ, 1998). Populações de degradadores de hidrocarbonetos geralmente constituem menos de 1 % do total de espécies de microrganismos decompositores, mas quando poluentes derivados de petróleo estão presentes, esses microrganismos aumentam para cerca 10 % das espécies deste grupo de biodegradadores. Essas espécies estão amplamente distribuídas nos solos e ecossistemas aquáticos (LANDIS e YU, 1995).

A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação pode levar à formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações do contaminante (CRAPEZ, 1998) (Quadro 3.1).

|                   |                            |                         |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|
| <i>Bactérias:</i> | <i>Fungos (Leveduras):</i> | <i>Fungos (bolors):</i> |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|

| <i>Bactérias:</i>   | <i>Fungos (Leveduras):</i>   | <i>Fungos (bolos):</i>  |
|---|--|---|
| <i>Achromobacter,</i><br><i>Acinetobacter,</i><br><i>Aeromonas, Agrobacterium,</i><br><i>Alcaligenes, Arthrobacter,</i><br><i>Bacillus, Brevibacterium,</i><br><i>Burkholderia,</i><br><i>Chromobacterium,</i><br><i>Comamonas,</i><br><i>Corynebacterium, Cytiphaga,</i><br><i>Flavobacterium,</i><br><i>Gluconobacter, Micrococcus</i><br><i>Mycobacterium, Nocardia,</i><br><i>Pasteurella, Proteus,</i><br><i>Pseudomonas, Rhodococcus,</i><br><i>Sarcina, Serratia,</i><br><i>Shingomonas, Spirillum,</i><br><i>Streptomyces, Vibrio,</i><br><i>Xanthomonas.</i> | <i>Candida,</i><br><i>Debaryomyces,</i><br><i>Rhodotorula,</i><br><i>Sporobolomyces.</i> | <i>Acremonium, Aspergillus, Aureobasidium,</i><br><i>Beauveria, Botrytis,</i><br><i>Ceriporiopsis, Chrysosporium,</i><br><i>Cladosporium, Cochliobolus, Colorospora,</i><br><i>Coniothyrium, Corioloropsis, Cryphonectria,</i><br><i>Cylindrocarpon, Dendryphiella,</i><br><i>Drechslera, Fusarium, Geotrichum,</i><br><i>Glicocladium, Gongronella, Graphium,</i><br><i>Humicola, Lulwortria, Mortierella, Mucor,</i><br><i>Oxyoirus, Paecilomyces, Penicillium,</i><br><i>Phialophora, Phoma, Pleurotus, Rhizopus</i><br><i>Scolecobasidium, Scopulariopsis,</i><br><i>Sprotrichum, Spicaria, Tolypocladium,</i><br><i>Trametes, Trichoderma, Varicosporina,</i><br><i>Verticilium.</i> |

Quadro 3.1: Lista de gêneros microbianos degradadores de hidrocarbonetos  
(TRINDADE, 2002)

### 3.7 Biodegradação dos componentes do petróleo

Existem aproximadamente 200 mil compostos diferentes no óleo cru. Geralmente, todos aqueles que têm cadeias carbônicas curtas são facilmente degradados. Já o aumento das cadeias implica em uma maior complexidade estrutural e, conseqüentemente, em uma diminuição do número de microrganismos capazes de

degradá-los. Algumas das maiores estruturas moleculares são insolúveis e a maioria dos microrganismos pode utilizar apenas os compostos dissolvidos em água. Como consequência, observa-se entre os diversos hidrocarbonetos uma diferença em relação a sua suscetibilidade ao ataque microbiano. A velocidade de biodegradação desses compostos é inversamente proporcional ao número de anéis da molécula. Em geral, a ordem decrescente de suscetibilidade é: n-alcenos > alcanos ramificados > compostos aromáticos de baixo peso molecular > ciclo-alcenos > compostos poliaromáticos > compostos polares (LEAHY e COLWELL, 1990). Sabe-se que os principais processos de remoção desses poluentes do ambiente são a biotransformação e a biodegradação (CERNIGLIA, 1992).

Sabe-se que os hidrocarbonetos podem ser degradados através de três vias metabólicas: respiração aeróbica, respiração anaeróbia e via fermentativa (RATLEDGE, 1994). Na via aeróbia, a primeira etapa da biodegradação consiste na oxidação do hidrocarboneto, que é promovida por enzimas oxigenases. Nesta via, o oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons e os produtos finais são, principalmente, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Se houver incorporação de uma molécula de oxigênio, a enzima chama-se monoxigenase (Via TOL), esta enzima é responsável pelo ataque de substituintes metil; possivelmente, é a via de degradação do tolueno e dos xilenos. Se houver incorporação de duas moléculas de oxigênio, a reação ocorre devido a dioxigenase, onde anéis aromáticos são atacados (Via TOD), sendo o benzeno provavelmente degradado por essa via metabólica. Na respiração anaeróbia, substratos inorgânicos desempenham a função de aceptores finais de elétrons, onde o CO<sub>2</sub> é reduzido a metano, sulfato a sulfeto, nitrato a nitrogênio molecular ou íon amônio. Já a degradação por via fermentativa caracteriza-se por empregar os substratos fosforilados como aceptores finais de elétrons, resultando em compostos como CO<sub>2</sub>, acetato, etanol, propionato e butirato (ENGLER et al., 1993).

No caso dos processos aeróbios, o termo mineralização é empregado para caracterizar a degradação completa do poluente a formas inorgânicas, como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub> e outros (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Muitas vezes esse termo é considerado um sinônimo de biodegradação, porém, nem sempre o processo de biodegradação leva a

mineralização completa do poluente

(Figura 3.3).

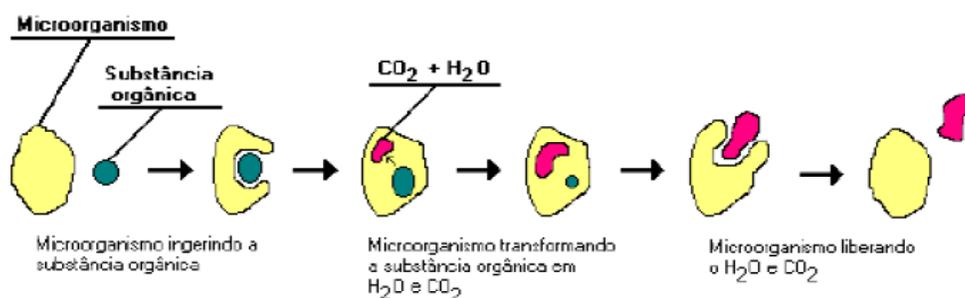


Figura 3.3 Esquema da mineralização do poluente pelos microrganismos (MELLO, 2007).

A decomposição aeróbica de um composto orgânico poluente (geralmente uma macromolécula) é um processo biocatalítico complexo que envolve a ação das enzimas que produzem monômeros específicos em função da composição do substrato disponível. Durante a decomposição, processos distintos, porém simultâneos, ocorrem (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Conhece-se, atualmente, uma grande variedade de bactérias e fungos, além de algumas algas, que apresentam a habilidade de metabolizar os hidrocarbonetos aromáticos e os poliaromáticos (HPA). No entanto, a recalcitrância destes compostos é diretamente proporcional ao número de anéis condensados compreendidos na molécula do contaminante. Apesar de pouco elucidadas, existem fortes indicativos que o consumo de tais substâncias segue vias similares ao das estruturas monocíclicas (ALEXANDER, 1994).

De uma forma geral, observa-se que dois tipos de reações ocorrem na degradação de hidrocarbonetos aromáticos. A primeira é a quebra do anel aromático, pela atuação enzimática localizada e específica. A segunda reação é, aparentemente, uma hidroxilação não específica na qual as enzimas catalisam uma reação de adição de um

grupamento hidroxila ( $-OH$ ) em uma ou mais posições no substrato (ALEXANDER, 1994).

Geralmente, a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos não substituídos, como, por exemplo, o benzeno, inicia-se com a formação de catecol (Figura 3.4). Em seguida, este pode ser catabolizado tanto pela enzima catecol 1,2-desidrogenase, entrando na via cetodipato, quanto pela enzima catecol 2,3-dioxigenase, mais comum em organismos eucariotos (URURAHY, 1998). Nos hidrocarbonetos aromáticos substituídos, o ataque inicial das enzimas pode ocorrer tanto na substituição quanto diretamente no anel.

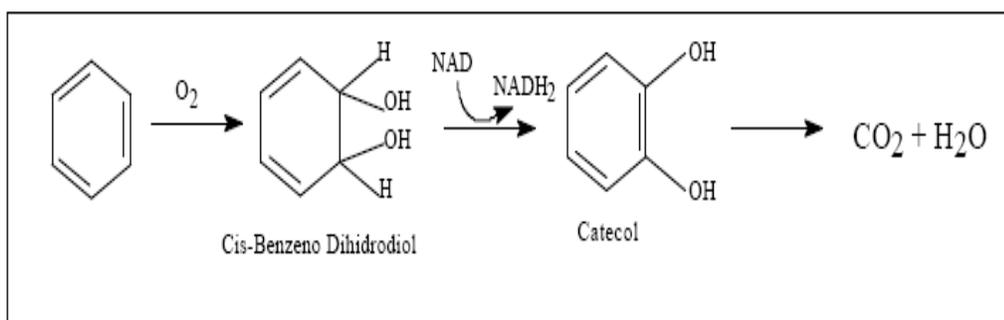


Figura 3.4 Representação esquemática da degradação aeróbica do benzeno(MAZZUCO, 2004).

Dentre os compostos presentes na gasolina, BTEX, *n*-alcanos, metil e dimetil alcanos, que representam 80 % da gasolina, são totalmente degradados. Somente alguns compostos, entre eles, trimetil alcanos, 2,2-dimetilbutano, 2,2,4-trimetilpentano (isooctano), 2,3,3-trimetil pentano e 2,2,5-trimetil hexano são degradados de maneira incompleta ou por cometabolismo (SOLANO-SERENA et al., 1999).

O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de  $CO_2$  na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados como glóbulos e alguns podem ser incorporados como biomassa, porém os produtos

parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto original. Portanto existe a preocupação que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação (WANG et al., 1990).

Além do estresse ambiental, a presença de etanol na gasolina interfere no processo de degradação dos BTEX. Segundo Corseuil e colaboradores (2002), um dos fatores da redução de degradação, é a depleção dos receptores de elétrons causado pelo etanol. Além do etanol ser energeticamente mais favorável a biodegradação, sendo consumido preferencialmente em relação ao benzeno, como foi demonstrado em experimentos de microcosmos por Corseuil e colaboradores (1998). O etanol pode interferir diretamente na solubilização dos compostos tóxicos BTEX e/ou pode ser tóxico ou inibitório para os microrganismos degradadores de BTEX (FERNANDES e CORSEUIL, 1997).

### **3.8 Biosurfactantes**

Biosurfactantes são moléculas de superfície ativa que apresentam uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, produzidos na superfície da célula microbiana, ou excretado extracelularmente, que reduzem tensões superficiais, interfaciais e apresentam propriedades de emulsificação (BANAT, 2000) (Figura 3.4).

Os biosurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Eles são sintetizados por diversos microrganismos entre bactérias, fungos e leveduras. O biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, conhecido como rhamnolipídio e a chamada surfactina produzida por *Bacillus subtilis* são os mais conhecidos, eles interferem na formação da arquitetura

celular de ambas as espécies. Nas *Pseudomonas aeruginosa* são responsáveis pela formação de biofilmes e nos *Bacillus subtilis* responsáveis pela formação dos corpos de frutificações (MULLIGAN et al., 2001).

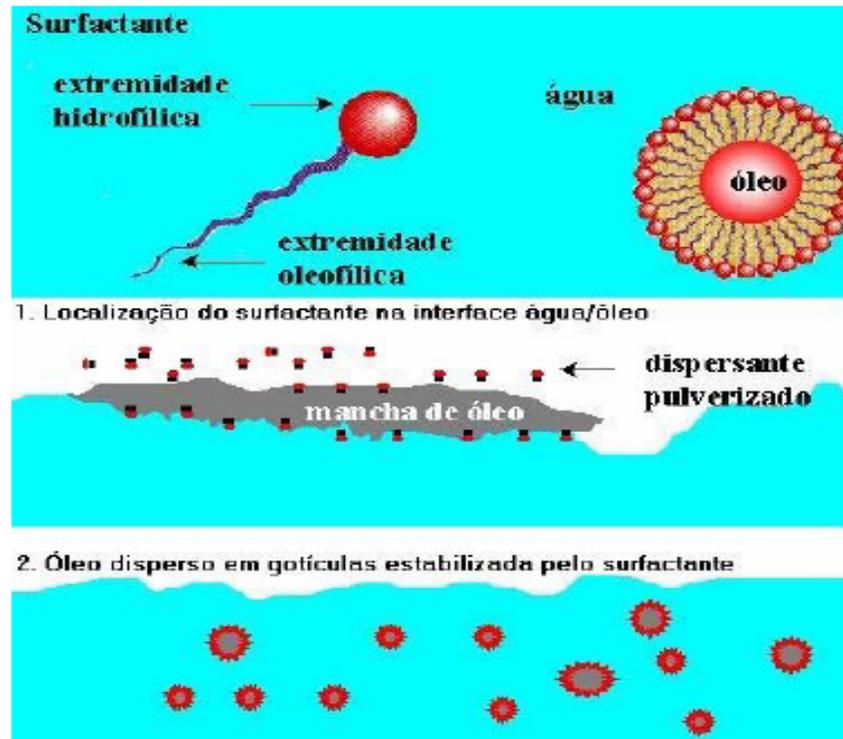


Figura 3.5: Ação esquemática do biosurfactante na degradação do óleo (BENTO, 2005).

A maior utilização dos biosurfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza, na indústria de cosméticos, na indústria farmacêutica e na indústria de petróleo. Estima-se que em 2010, os biosurfactantes poderão atingir 10 % do mercado de surfactantes, alcançando US\$ 200 milhões em vendas, sendo a área ambiental, biorremediação, considerada como a mais promissora para uso destes compostos (RON e ROSEMBERG, 2002).

O custo da produção em larga escala pode ser reduzido através de processos de otimização (CUNHA e LEITE, 1997). As condições de crescimento (pH, temperatura,

substrato e nutriente) podem influenciar no tipo e na quantidade de biosurfactante produzido, adição de substratos não solúveis como hidrocarbonetos e ácidos graxos podem aumentar a produção destas moléculas (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

A vantagem mais importante dos biosurfactantes com relação aos surfactantes químicos é a sua aceitabilidade ambiental. Muitos surfactantes sintetizados quimicamente ocasionam problemas ecológicos devido a sua resistência a degradação, toxicidade, e acúmulo em ecossistemas naturais (VANCE-HARROP et al., 2003).

A capacidade do biosurfactante emulsificar misturas de hidrocarboneto/água tem sido muito bem documentada (ZANG, 1992; PRUTHI, 1997; BICCA, 1999; BONGNOLO, 1999; NITSCHKE et al., 2005). Essa propriedade é demonstrada pelo aumento significativo de degradação de hidrocarbonetos e por isso é utilizado na biorremediação de solos e mananciais contaminados (KREPSKY et al., 2006). A capacidade de aumentar a degradação ocorre pelo aumento da superfície celular do contaminante hidrofóbico que permite o contato direto entre a célula e a gotícula hidrofóbica, aumentando sua solubilidade e biodisponibilidade (BOGNOLO, 1999).

Os biosurfactantes são produzidos principalmente por microrganismos aeróbicos a partir de uma fonte de carbono. Embora a produção destes compostos ocorra entre os diferentes grupos microbianos, muitas vezes o tipo de biosurfactante produzido é específico do gênero e às vezes da espécie. As espécies predominantes de bactérias que produzem biosurfactante são *Pseudomonas aeruginosa*, *P. Fluorescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhodococcus erythropolis* e *Bacillus subtilis* (BENTO et al., 2005).

### **3.9 Técnicas de estudo dos microrganismos**

Entender a estrutura e o funcionamento de um ecossistema depende muito mais do que simplesmente reconhecer as interações entre as populações; requer informações quantitativas sobre o número dos microrganismos, biomassa da população, velocidades

de crescimento e morte, frequência de ciclagem e transferência de materiais no ecossistema (ATLAS e BARTHA, 1993).

A escolha do melhor método para avaliar a diversidade de bactérias deve ser feita de acordo com a natureza da investigação, o conhecimento profissional, a habilidade do pesquisador ou da equipe técnica e a disponibilidade do laboratório (YAMAOKAYANO e VALARINI, 1998).

### 3.9.1 Cultivo microbiano

Os microrganismos são organismos altamente adaptáveis capazes de crescer, utilizando um elevado número de distintas fontes de carbono e nitrogênio, e de ocupar uma variedade inesgotável de nichos ecológicos (HAVEN, 1999).

Alguns microrganismos podem crescer com algumas poucas substâncias inorgânicas como sua única exigência nutricional, enquanto outros microrganismos assemelham-se aos organismos superiores na sua necessidade de compostos orgânicos complexos, mas todos os organismos compartilham algumas necessidades de carbono, nitrogênio e água. A água é particularmente importante para os microrganismos, porque a maioria deles pode absorver nutrientes somente quando substâncias químicas estão dissolvidas na água (PELCZAR et al., 1996).

Os microrganismos requerem certos nutrientes básicos e condições físicas que lhes possibilitem a vida, com grandes variações referentes às particularidades de cada espécie. Dessa forma, essas condições devem ser oferecidas no laboratório, quando em cultivo, ou de acordo com as necessidades de cada pesquisa, usando os chamados meios seletivos e provendo as condições físicas necessárias para o seu desenvolvimento (CAPPUCCINO e SHERMAN, 1996).

Meios de cultura são substratos adequados ao crescimento, multiplicação e desenvolvimento de microrganismos fora de seu hábitat natural. Quando os meios utilizados são de composição química definida, são denominados meios sintéticos, e complexos quando sua composição não é conhecida completamente (ALCAMO, 1987).

### 3.9.2 Enriquecimento das culturas

Raramente ocorre na natureza ambientes contendo apenas um tipo de microrganismos. Em vez disso, uma comunidade de microrganismos estão interagindo no ambiente natural, por isso, métodos e procedimentos são desenvolvidos para isolar e cultivar o organismo de interesse (ATLAS e BARTHA, 1993)

O método mais comum e usado para esse objetivo é a técnica de enriquecimento de cultura. Nesta técnica um meio mineral e condições de incubação são escolhidas para selecionar o organismo alvo e eliminar os organismos indesejáveis. A estratégia do enriquecimento aumenta as chances de encontrarmos em uma amostra ambiental o organismo de interesse que se adapte as condições escolhidas (BROCK, 2002).

O enriquecimento será estabelecido através da escolha do inóculo apropriado em um meio altamente seletivo. Centenas de estratégias de enriquecimento podem ser desenvolvidas, entretanto ambos, o meio de cultura e as condições de incubação, são críticas para o sucesso do enriquecimento (GASKIN e BENTHAM, 2005). Essa técnica auxilia no isolamento dos microrganismos que são capazes de metabolizar um determinado substrato e que podem estar presentes em pequena quantidade na amostra original. O meio precisa ter como fonte principal de carbono o composto que desejamos degradar. Após vários dias de incubação, uma alíquota da primeira amostra é transferida para um segundo frasco contendo a mesma constituição do primeiro. Esse processo é repetido várias vezes com o objetivo de eliminar toda a matéria orgânica que possa ter vindo com a amostra ambiental (CUNHA e LEITE, 2000). Após a incubação do último frasco, o material é transferido para um meio solidificado contendo a mesma fonte de carbono utilizada no meio líquido. Após a incubação os microrganismos que se desenvolveram no ágar podem ser constituídos por organismos que degradam aquele substrato como fonte de carbono e/ou energia.

### 3.9.3 Obtenção de culturas puras

A obtenção de culturas puras, também denominadas culturas axênicas, que são adquiridas através do isolamento, é um dos primeiros procedimentos para que se possa realizar estudos sobre microrganismos.

O desenvolvimento de meios de cultura sólidos permitiu o desenvolvimento de métodos mais eficientes para o isolamento de microrganismos, chamados métodos de plaqueamento. O princípio geral desses métodos, reside no fato de que uma célula viável, ao ser colocada em um meio adequado, cresce, originando uma colônia viável a olho nú. Essa colônia pode ser, então, transferida para novo meio onde se multiplicará livre da presença de outros microrganismos, obtendo-se, desta forma, uma cultura pura (SILVA FILHO e OLIVEIRA, 2004).

O método mais prático para obtenção de colônias isoladas consiste na semeadura em superfície, no meio de cultura, até o esgotamento do inóculo. Neste caso, os microrganismos são inoculados na superfície de um meio de cultura sólido com o auxílio de uma alça de platina, fazendo-se estrias na superfície do meio. O inóculo é progressivamente diluído, de modo a obter-se no final células isoladas que darão origem a uma colônia pura.

#### 3.9.4 Repicagem e manutenção dos isolados

Uma vez obtida uma colônia pura, ela precisa ser mantida em meio adequado, ou dependendo da finalidade ser multiplicada para obtenção de maior quantidade de células ou biomassa. Em qualquer dos casos, o microrganismo necessita ser transferido periodicamente para o meio novo, de mesma composição. A porção transferida chama-se inóculo, e a operação deverá ser feita com todos os cuidados de assepsia a fim de se evitarem contaminações, garantindo, assim, a qualidade do trabalho (SILVA FILHO e OLIVEIRA, 2004).

### 3.9.5 Quantificação de microrganismos e avaliação da biomassa

A biomassa de uma população bacteriana tem sido reconhecida como importante parâmetro em relação à ecologia microbiana, cinética e estimativas de velocidades respiratórias. A quantificação destes microrganismos é frequentemente requerida quando se deseja estimar a produtividade de um sistema, a produção da biomassa ou o potencial de utilização do substrato (BROCK, 2002).

A enumeração de microrganismos, ou determinação de sua biomassa, é um dado fundamental para estudo microbiológico de qualquer ambiente. Sua avaliação em processos biológicos é de fundamental importância, pois estabelece a efetividade do sistema. Existem muitos métodos para determinar o crescimento bacteriano: a contagem celular por métodos diretos e indiretos, determinação da massa celular (por peso seco ou por turbidimetria) ou através da avaliação da atividade celular (SILVA FILHO e OLIVEIRA, 2004).

Os dois métodos quantitativos mais comuns são aqueles que avaliam o número de células e aqueles que medem o peso celular. O número também pode ser determinado pelas medidas das quantidades dos vários constituintes celulares, como DNA, RNA, NADH, NADPH, ATP ou proteínas, bem como a quantidade de certos produtos metabólicos como CO<sub>2</sub> liberado na respiração.

### 3.9.6 Curva de Crescimento

O termo crescimento bacteriano aplica-se ao aumento do número de microrganismos. O principal modo de reprodução das bactérias é por fissão binária, isto é, quando a célula atinge um determinado tamanho, divide-se em duas células, as quais irão posteriormente gerar quatro novas células, e assim por diante. Assim, após  $n$  divisões o número formado de células é  $2^n$ . O tempo de geração bacteriano (tempo necessário para uma célula formar duas outras prontas para também se dividirem) varia entre os

microrganismos e também depende das condições ambientais. Na maioria das espécies dura entre 1 e 3 horas, porém podem ocorrer em 24 horas ou em apenas 20 minutos. Assim, ao se inocular um volume de líquido com uma certa quantidade inicial de células e uma quantidade limitada de substrato e nutriente, o número de bactérias progredirá segundo uma curva típica de crescimento bacteriano, expressa abaixo (TORTORA et al., 2000). Este crescimento de biomassa apresenta quatro fases distintas: (1) aclimatação, (2) crescimento exponencial, (3) estacionária e (4) decaimento.

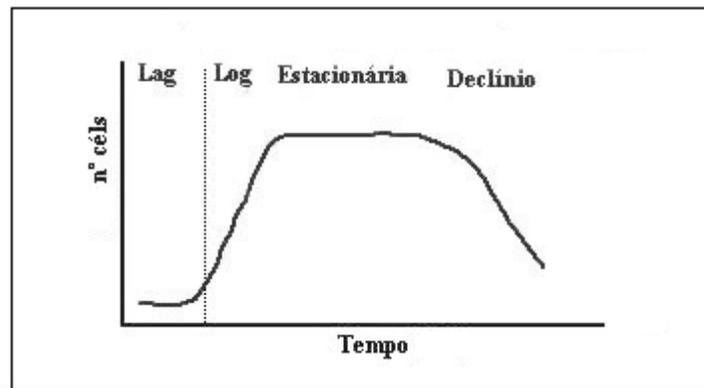


Figura 3.6 Curva de crescimento microbiano em sistemas fechados.

- Fase de aclimatação ou Lag (1): esta fase é um período de adaptação enzimática e não ocorre aumento do número de microrganismos. Na fase de aclimatação ou fase “lag” a concentração dos microrganismos permanece constante, entendendo-se que o microrganismo está rearranjando seu sistema enzimático, a fim de dar início à metabolização do substrato proposto. Esta fase, não apresenta interesse do ponto de vista prático, pois tem sua duração dependente do meio e condições de cultivo empregadas para o preparo do inóculo. Desta forma, quanto mais aclimatado estiver o microrganismo, às condições de cultivo que se pretende impor, menor será o tempo de duração desta fase (PELCZAR, 1996; TORTORA et al., 2000).
- Fase exponencial ou Log (2): as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os

nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. Deve ser levado em conta também que neste momento, a quantidade de produtos finais de metabolismo ainda é pequena. A velocidade de crescimento exponencial é variável, de acordo com o tempo de geração da bactéria em questão. Nesta fase os microrganismos são particularmente sensíveis a mudanças ambientais (TORTORA et al., 2000).

- Fase estacionária (3): a velocidade de crescimento dos microrganismos volta a ser nula; os nutrientes estão diminuindo e os produtos tóxicos estão tornando-se mais abundantes. Nesta etapa não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Na fase estacionária são sintetizados vários metabólitos secundários, que incluem antibióticos e algumas enzimas (TORTORA et al., 2000).
- Fase de declínio ou morte (4): ocorre a diminuição do número de microrganismos (velocidade de crescimento negativa) causada pela sua morte. A redução da concentração celular pode ser em virtude do consumo das reservas alimentares intracelulares, ou mesmo em virtude de lise celular, com a conseqüente redução do número de células presentes. Vários fatores podem contribuir para a mortalidade bacteriana, mas os principais são falta de nutrientes essenciais e acúmulo de substâncias inibidoras (como ácidos) (TORTORA et al., 2000).

### 3.9.7 Cinética de crescimento celular

Efetuar o estudo cinético de um dado fenômeno ou processo, significa estudar a evolução no tempo desse processo, através da quantificação de certas grandezas que definem adequadamente esta evolução. Informações sobre a cinética de degradação de compostos químicos são de extrema importância porque possibilitam estimar a persistência dos contaminantes no ambiente, prever suas concentrações em um determinado tempo de modo a determinar a possibilidade de completa degradação destes compostos, antes que atinjam sítios de exposição aos organismos (ALEXANDER, 1994).

Os parâmetros cinéticos são dependentes do tipo e da concentração do substrato, da cultura microbiológica utilizada no processo, da presença de fatores inibitórios e estimulantes, aclimatação microbiológica e outras condições de cultura tais como temperatura e pH (YERUSHALMI, 1998); portanto a comparação de dados cinéticos entre diferentes estudos torna-se muito complicada (GOUDAR e STREVETT, 1998).

Estudos cinéticos envolvem a determinação da velocidade específica de crescimento, a concentração de substrato (S) e  $K_s$  que representa a afinidade do organismo em relação ao substrato.

A velocidade de crescimento das células microbianas pode ser definida pela Equação 1, enquanto a velocidade do consumo de substrato pode ser definida pela Equação 2:

$$\frac{dX}{dt} = r_X = \mu X \quad (1)$$

$$-\frac{dS}{dt} = r_s \quad (2)$$

Onde:

- X = concentração celular de microrganismos ( $\text{g.L}^{-1}$ )
- $r_X$  = velocidade de crescimento das células ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
- $\mu_X$  = velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
- $r_s$  = velocidade de consumo de substrato ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
- S = concentração de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )
- t = tempo (h)

Outra grandeza que deve ser definida é o coeficiente de produção celular  $Y_{X/S}$  ou fator de conversão de substrato em biomassa. Tal grandeza define a quantidade de células que irão surgir em virtude do consumo de uma dada quantidade de substrato (Equação 3). Desde que as condições de um cultivo não sejam alteradas significativamente, entende-se que  $Y_{X/S}$  deve ser constante, caso contrário devem ser considerados os valores instantâneos  $ds/dt$ .

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

Onde:

$Y_{X/S}$  = fator de conversão de substrato em biomassa ( $\text{g}_{\text{cel}} \cdot \text{g}_{\text{sub}}^{-1}$ )

$X_0$  = concentração celular no instante inicial ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$S_0$  = concentração de substrato no instante inicial ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Representando-se os dados em um gráfico  $X = f(S)$ , o coeficiente angular da tangente à curva em qualquer instante é  $Y_{X/S}$ . A partir de seu valor, é possível calcular o valor da concentração da biomassa ( $X$ ), a partir de um valor conhecido da concentração de substrato ( $S$ ).

Nos reatores biológicos nem todo o substrato é utilizado para formação de novas células. Uma parte do substrato serve como fonte de energia para a manutenção das células já existentes, energia que é quantificada através da velocidade específica de utilização do substrato para a manutenção das células, vulgarmente designado por coeficiente de manutenção,  $m$  ( $\text{t}^{-1}$ ), conforme Equação 4.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} + mX \quad (4)$$

É uma prática comum descrever a degradação de um contaminante e sua relação com o crescimento bacteriano através da equação de Monod (Equação 5):

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_S + S} \quad (5)$$

Onde:

$\mu_{\text{máx}}$  = velocidade específica de crescimento máximo ( $\text{h}^{-1}$ ),

$K_S$  = (constante de saturação) ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$S$  = concentração de substrato ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Admitindo que na fase de aclimatação o consumo de substrato é desprezível,  $\mu$  pode ser determinado para cada valor de concentração de substrato inicial. Admite-se também que, durante a fase de crescimento exponencial, a variação da concentração de substrato é desprezível face à concentração inicial, não provocando variação de  $\mu$ . Em decorrência da Equação 1 tem-se a Equação 6:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

A integração da Equação 6 e sua linearização resulta na Equação 7, da qual pode-se obter o valor da velocidade específica de crescimento na fase exponencial a partir dos dados de  $X=f(t)$ .

$$\ln X = \ln X_0 + \mu(t - t_0) \quad (7)$$

Define-se tempo de duplicação,  $t_d$ , como o tempo ao fim da qual a concentração de biomassa duplica na fase exponencial, isto é,  $X = 2.X_0$ . Logo, a partir da Equação 7 obtem-se a Equação 8:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (8)$$

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Fonte de microrganismos

Os microrganismos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de uma amostra do material suporte (casca de Acácia) de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina. Esse biofiltro (Figura 4.1) opera *ex-situ*, em escala real, tratando vapores emanados de solos provenientes de áreas contaminadas com derivados do petróleo pertencente a empresa Sapotec Sul, com sede em Nova Santa Rita/ RS. Cada container possui dimensões de 6 m x 2,5 m x 3 m, (comprimento, altura e largura), e opera com concentrações de entrada de 30 a 40 ppm de COV e atinge eficiência de remoção entre 90 e 95 %.



Figura 4.1 Tratamento dos vapores de solo contaminado com gasolina utilizando biofiltros

A amostra do material foi homogeneizada e depois pesou-se uma alíquota de 10 g,

a qual foi adicionada com água deionizada, previamente esterilizada, até completar o volume de 100 mL. A suspensão foi diluída em 4 séries decimais ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) em solução salina (0,85 % de NaCl) e uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi transferida para placas com meio de cultura sólido Bushnell-Haas e meio ágar nutriente.

## 4.2 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi o Bushnell-Haas (BH) que continha (por Litro): 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,0 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05g  $\text{FeCl}_3$ , 0,02 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , e gasolina como única fonte de carbono. O pH foi 7,0, como sugerido em diversos trabalhos (URURAHY et al, 1998; CUNHA e LEITE, 2000; PRANTERA et al, 2002, HONG et al, 2005, SHIM et al., 2006) e comumente empregado em estudos de biodegradação de hidrocarbonetos.

Para a contagem total dos microrganismos realizada em meio de cultura sólido, em placas, também utilizou-se o meio ágar nutriente composto de 3,0 g/L de extrato de carne, 5,0 g/L de peptona bacteriológica e 15 g/L de ágar. O meio foi ajustado em pH 7,0 e autoclavado. Esse meio foi utilizado para contagem do número de microrganismos heterótrofos totais, servindo para comparar o resultado entre os dois meios.

### Fonte de carbono

Foi utilizada como fonte de carbono gasolina comercial do posto de combustível de bandeira Petrobrás. A esterilização do combustível foi realizada através de filtração utilizando membranas com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . O combustível filtrado foi mantido em frascos esterilizados e fechados hermeticamente com tampa de teflon e lacre de alumínio, cobertos com papel alumínio para evitar a fotoxidação, e mantidos a temperatura de 4 °C.

## 4.3 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) na amostra

## **inicial**

Alíquotas de 0,1 mL das diluições da suspensão da amostra inicial foram transferidas para placas com os meio de cultura sólido descritos anteriormente, e gentilmente espalhada utilizando uma alça de Drigalski. Após 48 horas de incubação em estufa a 30 °C foi realizada a contagem das colônias das placas que continham entre 30 e 300 colônias. Esses valores servem de referência, pois números inferiores a 30 são considerados muito baixos e acima de 300 as colônias podem se sobrepor interferindo nos resultados. O número de UFC/g da amostra se obtém pelo número de colônias da placa multiplicado pela diluição e ainda por 10, já que foi utilizada apenas uma alíquota de 0,1 mL.

### **4.4 Enriquecimento da cultura mista inicial**

A partir da amostra original, foi realizado o enriquecimento da cultura com o objetivo de aumentar o número de indivíduos das espécies com potencial de degradação da gasolina. Em frascos de 100 mL, foi acrescentado 20 mL de meio BH, 10 mL da amostra homogenizada e 1 % (v/v)<sup>15</sup> de gasolina esterilizada. O meio sem gasolina havia sido previamente autoclavado por 20 min a uma temperatura de 121 °C. A mistura foi mantida sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 5 dias. Depois desse período, uma alíquota de 1mL foi transferida para um novo frasco contendo o mesmo meio estéril e a mesma quantidade de gasolina. Esse procedimento foi repetido mais 3 vezes (CUNHA e LEITE, 1997).

### **4.5 Isolamento e obtenção de culturas puras**

---

<sup>15</sup>(v/v) foi acrescentado 1% de gasolina em relação ao volume total de meio líquido.

Após o enriquecimento, a cultura mista foi diluída em 4 séries decimais em solução salina (0,85 % de NaCl) e plaqueada em duplicada, em meio BH com gasolina. As placas foram incubadas a 30 °C e após 48 horas as colônias que apresentaram aspectos morfológicos diferentes, tais como tamanho, cor, textura, forma e borda da colônia, foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina para placas contendo meio BH. Através da técnica de semeadura, foram feitas estrias cruzadas com o objetivo de diluir progressivamente a concentração de bactérias de modo a obter-se células isoladas. As placas foram utilizadas para o isolamento e obtenção das culturas puras. As novas colônias foram transferidas para tubos com meio mineral inclinado e mantidas em estufa a 30°C. Esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, próximo a chama para evitar a contaminação das culturas.

A manutenção das culturas puras foi realizada através de repicagens semanais utilizando tubos com meio BH inclinado, todos os isolados foram preservados em geladeira a 4°C.

#### **4.6 Caracterização dos microrganismos**

A caracterização foi realizada através da observação das características morfológicas das colônias crescidas em meio sólido em placas de Petri (cor, forma da borda, brilho e consistência) com o auxílio de uma lupa com aumento de 100x. Os isolados também foram submetidos à coloração diferencial pela técnica de Gram, onde as células foram caracterizadas com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 1000x.

#### **4.7 Estudos preliminares**

#### 4.7.1 Avaliação do crescimento em meio líquido

Para que o teste de degradação da gasolina fosse realizado, foi necessário avaliar, previamente, a capacidade individual de crescimento das bactérias em meio líquido. Em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio BH previamente esterilizado e 1 % (v/v) de gasolina foi acrescentado, com o auxílio de uma alça de platina, uma porção da cultura pura. Os tubos foram fechados e colocados na estufa a 30 °C por 72 horas, cada cultura pura foi analisada em duplicata. Após esse período foi observado o crescimento dos microrganismos através da observação da turbidez dos frascos e comparados com o tubo controle, sem microrganismos. Os tubos que apresentaram crescimento foram utilizados para avaliação da produção de biosurfactante. Todo o procedimento foi realizado na câmara de fluxo laminar.

#### 4.7.2 Crescimento em diferentes concentrações de gasolina

Em frascos Erlenmayer de 250 mL foram adicionados 100 mL de meio mineral BH esterilizado, 2 mL de inóculo e diferentes concentrações de gasolina (1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,12 % e 0,05 %). Para o preparo do inóculo, foi acrescentado 3 mL de água deionizada autoclavada nos tubos contendo as colônias puras e agitados em vórtex para que os microrganismos se desprendessem do meio sólido formando um caldo com maior número de células. Após a inoculação, os frascos foram fechados e mantidos por 72 horas a 30 °C. Após esse período foi determinado o crescimento bacteriano através da medida da massa seca em amostras de 10 mL. Para isso foram utilizadas membranas filtrantes de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm e peso conhecido. As amostras foram secadas em forno microondas durante 15 minutos sob potência de 180 W e imediatamente pesadas em balança analítica (OROZCO et al., 2003). Foi escolhida a concentração de gasolina que proporcionou o maior crescimento celular.

### 4.7.3 Determinação da biomassa e crescimento bacteriano

A concentração celular foi determinada através da massa seca e também utilizando a turbidimetria. Para determinação através da massa seca, amostras de volume conhecido foram filtradas utilizando membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ , de massa previamente determinada, e secas por 15 minutos em microondas na potência de 180 W. O filtro de maior porosidade foi utilizado para permitir a filtração de um maior volume de biomassa. A concentração celular foi, então, determinada através da Equação 9:

$$X = \frac{m_{a+f} - m_f}{V_a} \quad (9)$$

Onde:

$m_{a+f}$  = massa da amostra seca + massa do filtro (g)

$m_f$  = massa do filtro (g)

$V_a$  = volume da amostra (L)

Devido a baixa concentração celular obtida em cultivos com gasolina e o pequeno volume das amostras, não foi possível determinar com segurança a concentração diretamente nas amostras, nos experimentos para verificação da cinética de crescimento. Assim, foram realizados cultivos utilizando glicose como fonte de carbono de modo a obter concentrações celulares mais elevadas e, desse modo, poder obter curvas de crescimento co-relacionadas com a densidade ótica. Ao longo de 72 horas foram retiradas 8 amostras de 20 mL, as quais foram filtradas utilizando-se membranas filtrantes de acetato de celulose com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e secadas em forno microondas durante 15 minutos sob potência de 180 W, sendo imediatamente pesadas em balança analítica.

Paralelamente à determinação do peso seco, a densidade ótica foi medida através de um espectrofotômetro Bel Photonics<sup>®</sup> SP1105 num comprimento de onda de 660 nm (ATTAWAY e SHMIDT, 2002; SHIM et al., 2005). Esse procedimento foi realizado para elaboração da curva de calibração de crescimento das diferentes bactérias utilizadas

no teste de degradação. Nos cultivos utilizando gasolina como fonte de carbono, o crescimento foi monitorado através da densidade ótica e a concentração da biomassa obtida através das referidas curvas de calibração.

#### **4.8 Avaliação da produção de biosurfactante**

A produção de biosurfactante foi avaliada através da emulsificação da gasolina na presença das células microbianas. Para isso, 2 mL do meio de cultura apresentando crescimento bacteriano ao longo de 72 horas, verificado pela turbidez, foram misturados a 2 mL de gasolina em tubos de ensaio com fundo chato (100 mm x 15 mm), sendo a mistura agitada em vórtex por 2 minutos e os frascos deixados em repouso por 24 horas. Após este período, foi analisada visualmente a emulsificação. Os resultados foram apresentados em três classificações: alta produção, média produção e baixa/nada de produção de biosurfactante (RIZZOLO et al., 2007).

#### **4.9 Teste de degradação**

O teste de degradação foi avaliado a partir do crescimento microbiano determinado pelo aumento do peso seco. Em frascos de 50 mL foram adicionados 15 mL de meio BH, previamente esterilizado, 2 mL de inóculo de cultura pura obtidos pela agitação dos tubos com água deionizada autoclavada, e 0,2 % (v/v) de gasolina comercial filtrada. Os frascos foram mantidos sob agitação magnética a 150 rpm a 30 °C. As análises do crescimento bacteriano, pH e produção de biosurfactante foram feitas a partir de amostras retiradas da fase líquida do microcosmos.

#### **4.10 Velocidade específica de crescimento**

Pelo fato de a concentração celular aumentar durante um cultivo fechado,

aumentando, conseqüentemente, a concentração das enzimas responsáveis pela transformação do substrato, é mais coerente analisar o valor da velocidade instantânea com relação à referida concentração celular. Por esta razão, o estado em que se encontra o sistema é melhor definido pela velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) e velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_p$ ), conforme a Equação 6 expressa anteriormente e Equação 10:

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (10)$$

$\mu_p$  = velocidade específica de consumo do substrato ( $h^{-1}$ )

As curvas de velocidade específica de crescimento e de consumo de substrato expressas pelas equações 6 e 10 foram obtidas através do método geométrico de cálculo das derivadas proposto por Le Duy e Zajic (HISS, 2001), utilizando-se uma planilha de cálculo do Microsoft Excel<sup>®</sup>.

Através da curva de velocidade específica de crescimento é possível estimar uma velocidade média e com ela determinar o tempo de duplicação da biomassa ou geração (Equação 8).

#### 4.11 Conversão de substrato em biomassa

A conversão de substrato em biomassa em um cultivo batelada a volume constante é:

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{-dS} \quad (11)$$

Essa grandeza é útil na análise de processos e na definição do substrato limitante. Desde que as condições não sejam alteradas significativamente ao longo do cultivo,  $Y_{x/s}$  deve ser constante, e a integração da Equação 11 fornece a Equação 3, descrita

anteriormente. Caso contrário, somente seu valor instantâneo deve ser levado em conta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos microrganismos

#### 5.1.1 Contagem e enriquecimento de células na amostra inicial

Os microrganismos, objeto deste estudo, são provenientes do material suporte de um biofiltro que opera em escala real, *ex-situ*, que trata vapores de solos contaminados com gasolina. O referido material era composto de casca de Acácia (Figura 5.1) misturado com cal virgem. O biofiltro opera com carga de entrada entre 30 e 40 ppm de COV, garantindo uma eficiência entre 90 e 95%.



Figura 5.1 Material constituído de casca da Acácia utilizado como suporte de um biofiltro para tratamento de vapores de gasolina

A quantificação das bactérias (Figura 5.2) da microbiota existente no suporte do biofiltro apresentou resultados diferentes entre os dois meios utilizados.

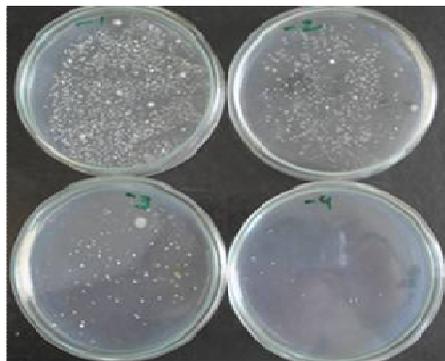


Figura 5.2 Placas utilizadas para contagem das colônias bacterianas em quatro diluições

( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) em meio BH.

Em meio ágar nutriente obteve-se a contagem de  $1,8 \times 10^7$  UFC/g, enquanto que em meio BH com gasolina como fonte de carbono, a contagem foi de  $1,5 \times 10^6$  UFC/g. Os resultados da contagem são inferiores aos números encontrados na maioria dos trabalhos citados na literatura, que apresentam uma contagem típica de bactérias em biofiltros entre  $10^8$  e  $10^{10}$  UFC por grama de amostra (VAN GROENESTIJN e HESSELINK, 1993; DEVINNY et al., 1999). Entretanto, os resultados de contagem obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados por Jutras e colaboradores (1997) que apresentaram resultados da quantificação dos microrganismos viáveis em dois meios diferentes, sendo um para crescimento de organismos heterótrofos apresentando  $1,3 \times 10^7$  UFC/g, e o outro, utilizando hexadecano como fonte de carbono, apresentando  $7 \times 10^6$  UFC/g.

A variação observada no número de bactérias nesses sistemas pode ser explicada tanto pelo meio utilizado, quanto pelo local de coleta das amostras. O biofiltro que serviu de fonte dos microrganismos desse estudo possui dimensões de 6 m x 2,5 m x 3 m, (comprimento, altura e largura). Por ser um container fechado, o único local possível para coleta foi o topo do biofiltro. De acordo com Deviny e colaboradores (1999), existe uma estratificação ao longo de um biofiltro fazendo com que a densidade e diversidade de microrganismos sejam maiores na entrada do biofiltro, devido as características de umidade e concentração da carga poluidora.

A contagem maior de microrganismos em meio sem gasolina indica que nem todos têm a capacidade de degradação direta do contaminante. Apesar de um microrganismo ter sido retirado de um biofiltro de tratamento de gasolina, não quer dizer que seja capaz de degradar esse combustível. É provável que algumas espécies sejam tolerantes aos compostos dissolvidos no meio e/ou tenham se mantido no cultivo por co-metabolismo ou, ainda, pela degradação de matéria orgânica proveniente da morte celular. Nos estudos de Jutras e colaboradores (1997), poucos dos microrganismos isolados do biofiltro foram capazes de degradar todos os componentes do BTEX sugerindo que uma ótima performance do biofiltro requer um consórcio de

bactérias.

A quantificação dos microrganismos viáveis é limitada por alguns fatores, sendo que condições de cultivo e composição do meio podem interferir no resultado. O resultado final reflete essa limitação, muitas vezes subestimando o número de microrganismos presentes, sendo importante, portanto, a padronização dos procedimentos. Apesar das limitações, a técnica de contagem em placas é bastante utilizada para conhecimento do número de microrganismos em biofiltros (JUTRAS et al., 1997; SOARES, 2006), além de muitos outros sistemas (CASSIDY e HUDAK, 2001).

Embora o número de UFC/g encontrado na amostra seja inferior aos recomendados para utilização em biofiltros, eles estão dentro dos padrões sugeridos para uso em biorremediação e dos encontrados em crescimento de solos férteis que são de  $10^6$  (STOTSKY, 1974). Para ilustrar, Cassidy e Hudak (2001) estimaram em  $6,4 \times 10^6$  UFC/g o número de microrganismos em reatores de tanque agitado utilizados em tratamento de efluentes.

O grande número de microrganismos encontrados em biofiltros que tratam poluentes específicos, deve-se à abundância e não à variabilidade de espécies. Isso fica evidenciado na análise das placas, que apesar de se observar um número de UFC constante no decorrer do enriquecimento, ocorreu uma redução na variabilidade das colônias, possibilitando que bactérias com capacidade de degradação formassem maior número de colônias. De acordo com Okerentugba e Frankenberger (2003) as comunidades expostas a hidrocarbonetos tornam-se adaptadas, exibindo enriquecimento seletivo e mudanças genéticas resultando no aumento das proporções dessas bactérias.

Apesar do maior crescimento de bactérias ter ocorrido em meio ágar nutriente, foi escolhido o meio BH para dar continuidade aos testes de isolamento e degradação. Sabe-se que a capacidade de degradação está ligada ao aparato enzimático previamente organizado. Se houvesse uma troca de fonte de carbono esses organismos poderiam perder a capacidade de degradação ou levar algum tempo para reativá-las, período chamado de aclimação, aumentando o tempo necessário para observar seu

crescimento e degradação.

### 5.1.2 Isolamento e estudo morfológico

As semeaduras em placas feitas a partir da amostra da última etapa do enriquecimento permitiram obter inicialmente 37 isolados microbiológicos (Figura 5.3). Posteriormente esses isolados foram agrupados em 15 sub-grupos, tendo como base as características morfológicas tais como cor, forma da borda, brilho e consistência da colônia (Figura 5.4) e a coloração diferencial de Gram (Figura 5.5), amplamente utilizada para identificar e classificar bactérias, porque reflete uma diferença fundamental na estrutura da parede celular.

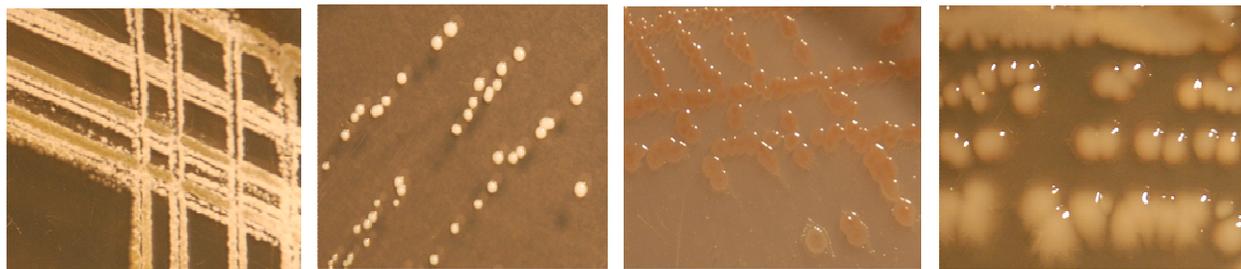
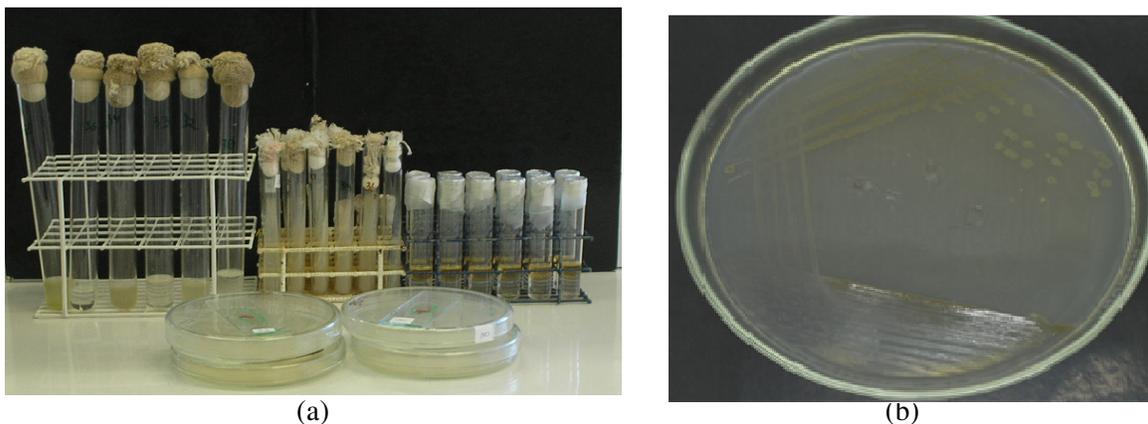


Figura 5.4 Exemplos de diferenças morfológicas entre as colônias, observadas nas culturas isoladas de amostra de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina.(aumento 100X)

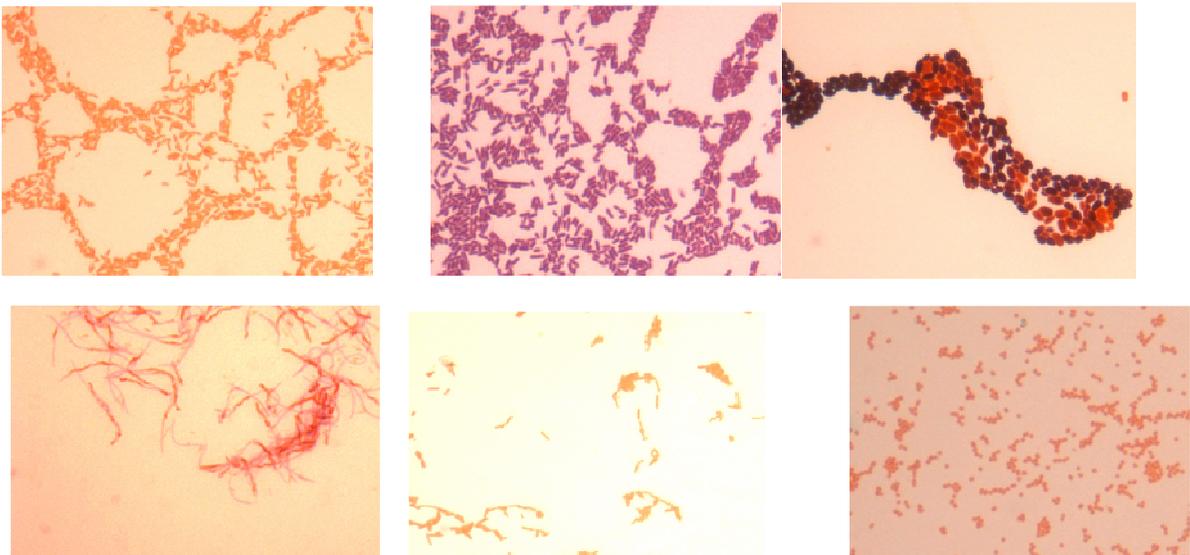


Figura 5.5 Coloração de Gram para diferentes grupos de microrganismos isolados da amostra de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina.- Fotografias tiradas em microscópico Olympus BX41 com programa de captura de imagem(aumento 1000X)

A caracterização morfológica das colônias de bactérias, embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas. O estudo de um maior número de representantes das populações pode tornar-se viável com o agrupamento morfológico de indivíduos semelhantes. Dessa forma, a seleção de representantes dos grupos permitiu que nas etapas

posteriores do estudos, um número menor de isolados possa ser avaliado com menor perda de informação. Observou-se que a caracterização morfológica e a observação da coloração de Gram, foi relevante como ponto de partida no estudo da diversidade das populações, pois reduziu através do agrupamento o números de isolados estudados.

O estudo morfológico apresentou uma grande variedade de bactérias, não apresentado o crescimento de fungos (com exceção de uma levedura), apesar da presença destes microrganismos ser freqüente em biofiltros (VEIGA et al., 1999).

As características que os microrganismos apresentam ao crescer em meios de cultura são expressões fenotípicas do seu material genético e, portanto, são úteis na sua identificação. Embora muitas vezes elas sejam consideradas de importância secundária e utilizadas apenas na identificação preliminar, em muitos casos elas são essenciais e, às vezes, representam a única característica que permite a distinção e a identificação das espécies. No quadro 5.1 estão apresentadas as características morfológicas observadas para os representante de cada sub-grupo.

Houve um predomínio de bactérias de coloração clara, sendo a grande maioria esbranquiçada, algumas de cor bege e uma colônia amarela e outra marrom. A coloração clara observada na maioria das colônias indica que o ambiente não recebe muita luz, desenvolvendo bactérias com pouca pigmentação (ELSAS et al., 1997). As colônias apresentaram formas, bordas, aspectos e consistência bastante variadas. Foram observadas formas fusiformes, circulares, irregulares, puntiformes e filamentosa e as bordas das colônias variaram em irregulares, lisas, lobadas e erodida. Colônias de aspecto brilhoso, transparente e opaca foram observadas, e a consistência variou entre viscosa e seca, apresentando apenas um exemplar de consistência quebradiça. As bactérias apresentaram três formas diferentes: esféricas (cocos), alongadas (bacilos) e uma forma intermediária denominada coco-bacilo quando o comprimento não atinge duas vezes o diâmetro. Outra característica observada foi a formação de endósporos, que são estruturas de resistência formadas em situação de adversidade ambiental, essa característica também pode ser utilizada para identificação de gêneros.

Houve uma dominância das bactérias Gram-negativas que representaram 86 %

dos isolados observados, apenas um isolado apresentou parede celular Gram-positiva. Isso pode estar relacionado com a constituição mais complexa da parede celular, que funciona como uma barreira celular, além de apresentar uma maior quantidade de pontos de ligação (cargas elétricas) com as partículas coloidais do solo ou do substrato. A coloração diferencial de Gram, como dito anteriormente, é uma análise bastante difundida na identificação e classificação das bactérias. Esses seres podem ser divididos em dois grandes grupos, com base na capacidade de suas paredes celulares fixarem o corante violeta cristal. As paredes que fixam o corante são denominadas Gram-positivas, enquanto que as que não o fazem são chamadas de Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas diferem notadamente em relação à estrutura de suas paredes celulares. Nas bactérias Gram-positivas, a parede celular apresenta aparência homogênea, tendo em sua composição, pelo menos 90% de peptinoglicanos. Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular é composta de duas camadas: uma interna de peptinoglicano, e uma camada externa de lipopolissacarídeos e proteínas. As moléculas da camada externa são arranjadas na forma de bicamada, com estrutura semelhante à da membrana plasmática. Essa bicamada das células Gram-negativas confere uma maior proteção contra agentes estressores, que terão maior dificuldade em penetrar no interior da célula. Outros estudos também estabelecem uma relação entre bactérias Gram-negativas e ambientes contaminados.

Batista e colaboradores (2006), ao selecionarem bactérias com poder de produção de biosurfactante, verificaram que das 192 bactérias isoladas, 84 % eram Gram-negativas. Esse resultado também foi observado por Mehdi e Giti (2008) quando avaliaram a degradação de óleo cru por diferentes isolados. As espécies Gram-negativas apresentaram o melhor desempenho no crescimento e degradação do substrato.

Richard e Vogel (1999), isolaram 7 bactérias após terem realizado o enriquecimento de suas amostras em óleo diesel, e todas apresentaram coloração Gram-negativa. Estudos reportam que a maioria das bactérias isoladas de áreas com histórico de contaminação por óleo ou sub-produtos são Gram-negativas, sugerindo que a característica da parede celular contribua para a sobrevivência das populações nesses ambientes de

estresse.

<sup>16</sup>Quadro 5.1 Características morfológicas dos isolados.

| Isolado                    | Forma da célula e Gram            | Colônia       |                             |                  |                |
|----------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------------|------------------|----------------|
|                            |                                   | Coloração     | Forma e bordas              | Aspecto          | Consistência   |
| UFSC 01 <sup>2</sup>       | <b>bacilo G<sup>-</sup></b>       | <b>bege</b>   | <b>fusiforme, erodida</b>   | <b>Brilhante</b> | <b>viscosa</b> |
| UFSC 02                    | bacilo G <sup>-</sup>             | bege          | circular, lisa              | Transparente     | viscosa        |
| UFSC 03                    | bacilo G <sup>+</sup>             | branca        | circular, lisa              | Brilhante        | viscosa        |
| UFSC 04                    | bacilo G <sup>-</sup>             | marrom        | irregular, lobada           | Brilhante        | viscosa        |
| UFSC 05                    | bacilo G <sup>-</sup>             | branca        | puntiforme, lisa            | Opaca            | seca           |
| UFSC 06                    | bacilo G <sup>-</sup> c/endósporo | branca        | irregular, lobada           | Brilhante        | viscosa        |
| UFSC 07                    | bacilo G <sup>-</sup>             | bege          | circular, lisa              | Brilhante        | viscosa        |
| <b>UFSC 08<sup>2</sup></b> | <b>cocos G<sup>-</sup></b>        | <b>branca</b> | <b>circular, lobada</b>     | <b>Brilhante</b> | <b>viscosa</b> |
| UFSC 09                    | Bacilo G <sup>-</sup>             | amarela       | circular, irregular         | Brilhante        | viscosa        |
| UFSC 10                    | cocos G <sup>-</sup>              | bege          | circular, lisa              | Opaca            | seca           |
| UFSC 11                    | bacilo G <sup>-</sup>             | branca        | circular, lisa              | Transparente     | viscosa        |
| <b>UFSC 12<sup>2</sup></b> | <b>coco-bacilo G<sup>-</sup></b>  | <b>marrom</b> | <b>fusiforme, irregular</b> | <b>Brilhante</b> | <b>viscosa</b> |
| UFSC 13                    | coco-bacilo G <sup>-</sup>        | branca        | circular, lisa              | Brilhante        | viscosa        |
| UFSC 14                    | actinomiceto                      | branca        | filamentosa                 | Opaca            | quebradiça     |
| UFSC 15                    | levedura                          | branca        | circular, lisa              | Opaca            | seca           |

## 5.2 Estudos preliminares

---

<sup>16</sup>os isolados apresentados em negrito foram escolhidos para dar continuidade aos testes de degradação.

### 5.2.1 Avaliação do crescimento em meio líquido e produção de biosurfactante

Numa etapa posterior, os 15 isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio mineral BH, 1% de gasolina e 1 mL de inóculo. Após 72 horas de incubação a 30 °C, dos 15 isolados inicialmente inoculados apenas 10 cresceram em meio líquido com gasolina como única fonte de carbono (Figura 5.6). Com os isolados que apresentaram crescimento foram realizados testes para verificar a produção de biosurfactante através do índice de emulsificação. Os isolados foram classificados de acordo com o grau de emulsificação, observados visualmente em alto (\*\*\*), médio (\*\*) e baixo (\*) (Figura 5.7).

Conforme mostra o quadro 5.2 os isolados UFSC 1, UFSC 7 e UFSC 9 apresentaram elevada produção de biosurfactante. Já os isolados UFSC 2, UFSC 4 e UFSC 12 tiveram uma produção considerada intermediária, enquanto os isolados UFSC 3, UFSC 8, UFSC 13 e UFSC 15 apresentaram baixa produção de biosurfatante ou não produziram. O teste de emulsificação se baseia no fato de que, se o isolado produziu biosurfactante, ocorrerá a emulsificação da gasolina com o meio de cultivo, formando uma única fase. Mesmo os isolados que apresentaram baixa emulsificação, também foram considerados degradadores de gasolina, pois cresceram utilizando essa fonte de carbono.

Isso indica que apesar de auxiliar na degradação, a produção de biosurfactante não é o único fator que determina esse processo; outros mecanismos estão envolvidos na degradação justificando desta forma o crescimento de culturas puras não produtoras de biosurfactante. Como esses microrganismos foram isolados de um biofiltro que continha grande número e diversidade de espécies, podemos sugerir que exista uma relação simbiótica entre as espécies produtoras de biosurfactante com as espécies que não produzem esse metabólito na degradação do contaminante.

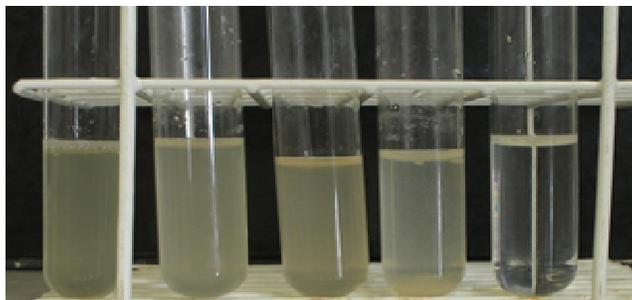


Figura 5.6 Crescimento em meio líquido apresentando diferentes afinidades dos isolados pelo substrato, verificadas através do grau de turbidez do meio de cultivo.

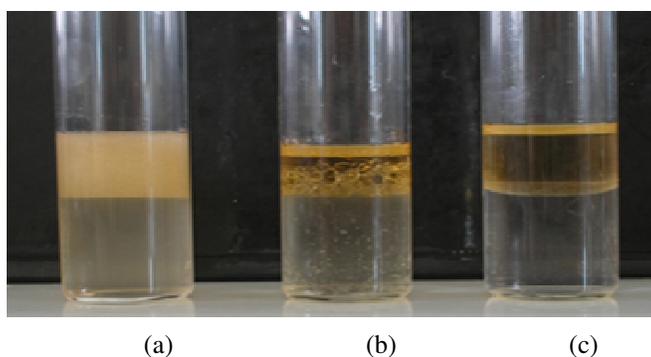


Figura 5.7 Três isolados apresentando índice de emulsificação alto (a), médio (b) e baixo (c).

A partir dos 10 isolados mostrados na tabela abaixo, foram selecionadas 3 bactérias com poder de emulsificação diferentes para os testes de degradação (UFSC1, UFSC 12 e UFSC 8).

Quadro 5.2 Produção de biosurfactantes verificada através do índice de emulsificação da gasolina.

| Isolado | Índice de emulsificação |
|---------|-------------------------|
| UFSC 1  | ***                     |
| UFSC 2  | **                      |
| UFSC 3  | *                       |

| <b>Isolado</b> | <b>Índice de emulsificação</b> |
|----------------|--------------------------------|
| UFSC 4         | **                             |
| UFSC 7         | ***                            |
| UFSC 8         | *                              |
| UFSC 9         | ***                            |
| UFSC 12        | **                             |
| UFSC 13        | *                              |
| UFSC 15        | *                              |

Estudos realizados por Whang e colaboradores (2007), mostram que a adição de 40 mg/L de surfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* aumentou de 40 % para 94 % a degradação do diesel.

Plaza e colaboradores (2007), isolaram as espécies *Ralstonia picketti* e *Alcaligenes piechaudii* e observaram que ambas espécies foram capazes de produzir biosurfactantes e degradar compostos BTEX. Os autores sugerem que a chave da degradação seja a produção desses compostos emulsificantes. A produção de biosurfactante vem sendo demonstrada como um mecanismo biológico para aumentar a biodegradação de hidrocarbonetos (McINERNEY et al., 2005).

Ilori e colaboradores (2005) avaliaram diferentes parâmetros ambientais e fontes de carbono na produção de biosurfactante produzido pelo isolado *Aeromonas sp.* A capacidade de emulsificação foi diferente entre os substratos utilizados, sendo que o isolado produziu 65 % de emulsificação em diesel e 24% em hexano como fonte de carbono, não apresentando produção de emulsificante na presença de benzeno. Outras fontes, que não os hidrocarbonetos, também são capazes de servir de substrato para produção de biosurfactante, sendo a glicose e o óleo de soja alguns exemplos.

Batista e colaboradores (2006) avaliaram a produção de biosurfactante em diferentes níveis de pH e temperatura. Esses autores observaram que o aumento da temperatura de 25 para 35 °C acelerou a produção de biosurfactante. Com temperatura mais baixa precisou de 40 horas para iniciar a produção de biosurfactante, enquanto que

com o aumento da temperatura, o início ocorreu nas primeiras 15 horas. A diferença de pH não apresentou alteração na produção. Em estudos realizados por Makkar e Cameotra 1998 também foi observado que o pH não interfere na atividade de emulsificação.

Encontrar uma espécie que produza este metabólito (biosurfactante), através da utilização do poluente que se deseja tratar e nas condições de operação de um reator é de fundamental importância quando se pretende inocular um reator com organismos que aceleram a degradação.

### 5.2.2.Crescimento em diferentes concentrações de gasolina

Para dar início aos testes de degradação, foi realizado uma curva de crescimento analisando o aumento de biomassa em relação ao tempo de cultivo. Os testes preliminares utilizaram concentrações de gasolina de 1% (v/v) em meio de cultura líquido. O resultado do cultivo apresentou uma possível intoxicação das culturas, sugerida pela observação através de um crescimento bastante limitado seguido de lise das células (Figura 5.8).

Foi observado que as culturas cresciam até uma concentração celular que não ultrapassava 0,25 g/L, apesar do longo tempo de cultivo e do potencial da biomassa atingir concentrações mais de 10 vezes superiores.

Esses mesmos isolados, quando cultivados em meio sólido em placas apresentaram um crescimento visual considerado bom, apesar de conterem a mesma concentração de gasolina que o meio líquido.

Essa aparente contradição pode ser explicada pelas diferentes condições entre os dois meios. Quando cultivados em placas, as bactérias crescem na superfície do meio podendo controlar, de certa forma, os efeitos da concentração do substrato e, além disso, como os componentes mais tóxicos da gasolina são altamente voláteis não permanecem por muito tempo no meio sólido. Quando se trata de meio líquido, as bactérias ficam imersas na solução sofrendo mais diretamente os efeitos de qualquer tóxico, inclusive seus próprios metabólitos, e a concentração dos voláteis permanece por muito mais tempo afetando o crescimento. Além disso, os isolados foram obtidos de um ambiente em que as concentrações de vapores de gasolina eram da ordem de 500 vezes mais baixas.

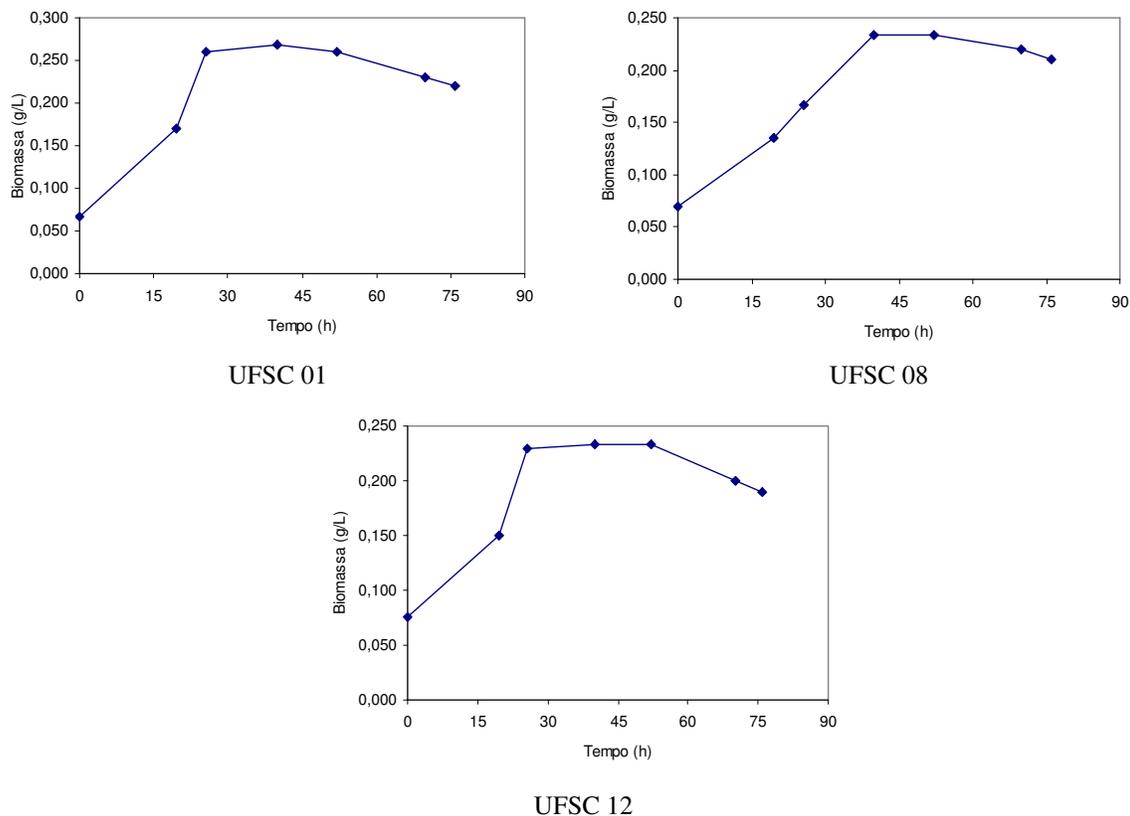


Figura 5.8 Curvas de crescimento em meio líquido para concentrações de gasolina de 10 g/L (1 %)

Assim, para as 5 diferentes concentrações de gasolina avaliadas (1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,12 % e 0,05 %), o maior rendimento foi verificado entre as concentrações de 0,25 % e 0,12 %. Com esse resultado, estabeleceu-se a média 0,2 % de gasolina (2 g/L) para utilização como fonte de carbono para os experimentos cinéticos e de degradação.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que houve uma inibição do crescimento devido a concentração de gasolina, pois outros fatores que podem gerar a diminuição do crescimento, como redução da fonte de nutrientes, foram previamente balanceados, não faltando os nutrientes essenciais ao crescimento.

Diferentes concentrações de gasolina são utilizadas em experimentos de degradação, tanto por consórcios de microrganismos quanto por culturas puras. A concentração de 1 % (V/V) de gasolina foi utilizada em experimentos realizados por

Vecchioli (1990), Cunha e Leite (2000), Prantera et al. (2002) e Oliveira et al. (2007). Solano-Serena (1999) utilizou 400 mg/L, Ridgway (1990) 0,1 % (V/V) e Yerushalmi e Guiot (1998) 74 mg/L.

No estudo de Prantera (2002), 50 % da degradação ocorreu nas primeiras 24 horas, porém após 30 dias ainda não havia ocorrido a completa degradação de todos os componentes da gasolina. Isso sugere que os compostos mais facilmente degradados são consumidos rapidamente precisando de mais tempo para o consumo dos mais recalcitrantes.

Os trabalhos realizados em biofiltros utilizam concentrações bem menores de poluentes na entrada do sistema, entre 0,0053 g/L (CHOI e OH, 2005) e 0,0034 g/L (SINGH et al., 2006). Uma das principais diferenças entre os sistemas é a forma de alimentação; em estudos de degradação, normalmente são utilizados microcosmos fechados, enquanto em biofiltros a entrada do substrato é contínua. Se fosse colocada a concentração inicial de gasolina no microcosmos, semelhante a utilizada em biofiltros, o tempo de cultivo seria muito curto, dificultando os estudos cinéticos. Já altas concentrações não são tratadas em biofiltros, pois o tempo de permanência do poluente é muito curto e, como observado nas pesquisas, os compostos mais recalcitrantes não seriam degradados nessas condições. Outro fato que pode interferir na degradação é a baixa concentração do substrato que pode não estimular o crescimento bacteriano e a síntese de enzimas utilizadas na degradação.

Segundo Ururahy e colaboradores (1998), em altas concentrações as populações microbianas podem sofrer inibição pelo efeito tóxico do poluente. Assim, o aumento da concentração da gasolina pode diminuir o crescimento dos microrganismos devido ao seu efeito tóxico, representado principalmente pelos compostos aromáticos BTEX.

### 5.2.3.Obtenção das curvas de calibração para o crescimento microbiano

O crescimento bacteriano em meio líquido com gasolina apresentou um baixo rendimento dificultando as medidas diretas da biomassa utilizando o peso seco das

células. Desse modo, foram realizados cultivos em meio contendo glicose onde foi possível a obtenção de maiores concentrações de biomassa e sua correlação com a densidade ótica.

Na Figura 5.9 estão apresentadas as curvas de calibração biomassa X densidade ótica para três bactérias representantes dos três grupos distintos com relação a capacidade de emulsificação da gasolina (UFSC 01, UFSC 12 e UFSC 08). As equações também estão apresentadas na figura, apresentando coeficientes de correlação acima de 98 %, sendo utilizadas nos experimentos para determinação da velocidade de crescimento.

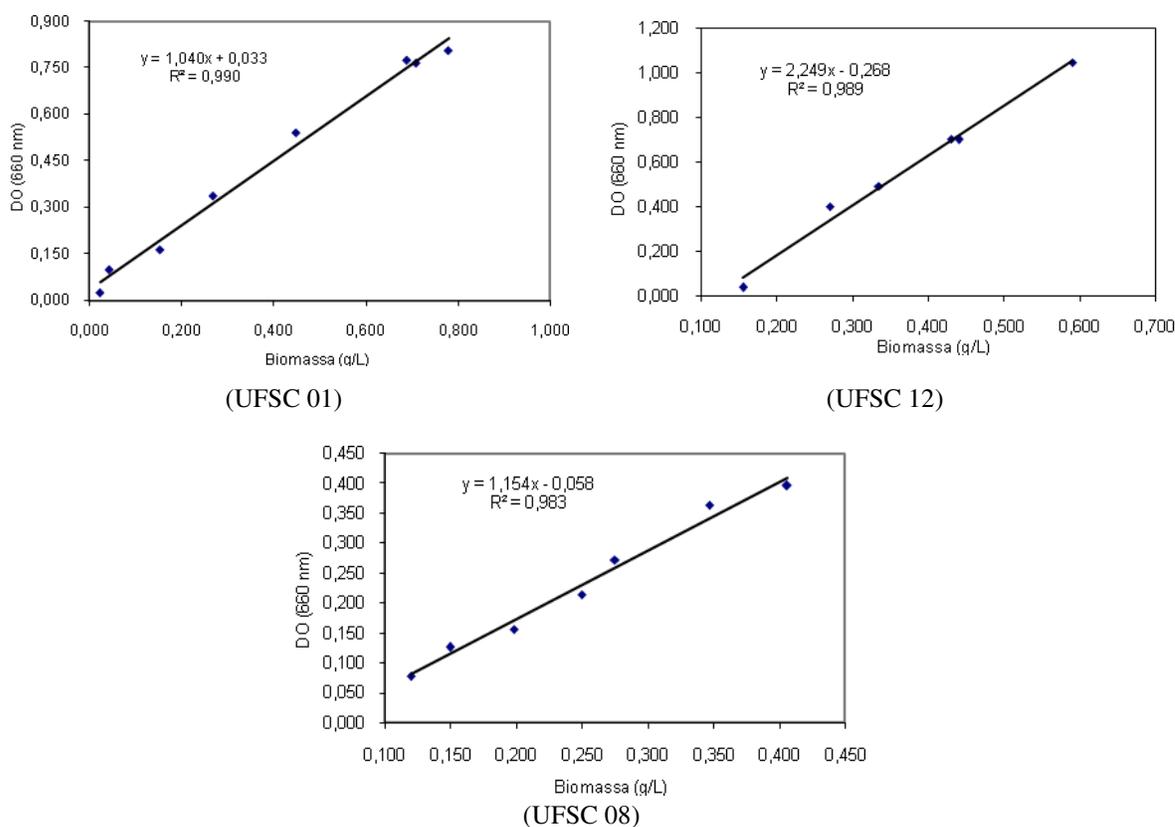


Figura 5.9 Curvas de calibração para determinação da biomassa em meio contendo gasolina através da densidade ótica.

### 5.3 Avaliação do crescimento e comportamento do pH

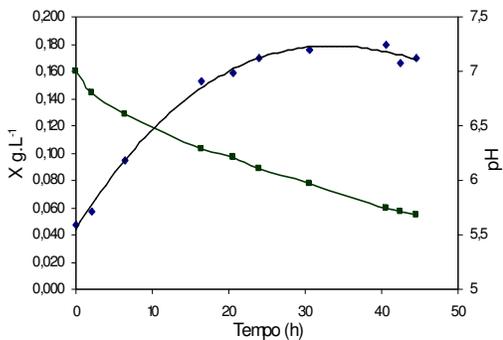
Para os experimentos de avaliação do crescimento bacteriano foram

selecionadas os três isolados com poder de emulsificação diferentes, com o objetivo de relacionar a cinética de crescimento da bactéria com seu potencial de produção de biosurfactante.

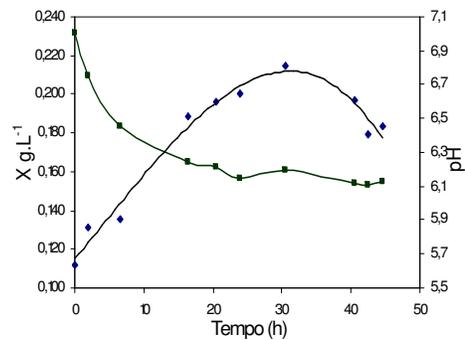
A Figura 5.10 apresenta as curvas de crescimento e variação do pH em função do tempo de cultivo. É possível observar que o crescimento máximo atingiu valores de biomassa semelhantes ao observado nos testes preliminares. Não fica evidenciado uma fase exponencial de crescimento, indicando um processo limitado. A queda brusca do pH e sua desaceleração coincide com a maior desaceleração do crescimento, a partir de cerca de 20 horas de cultivo, indicando uma possibilidade de limitação pelo pH, ou um aumento de toxidez resultante disso. A estabilização do pH, ou até uma possível reversão, normalmente está associada à lise celular com a degradação das proteínas bacterianas e liberação de amônia.

Embora o consumo do substrato não possa ter sido determinado nos presentes estudos, é possível considerar que nas condições experimentadas a utilização da gasolina tenha sido bastante baixa (não mais que 20 % do conteúdo total), considerando que as bactérias apresentam conversões típicas de 50 % de substrato em biomassa em processos aeróbios (LANGENHOV e DE HEYDER,2001), e que a concentração de gasolina (0,2%) equivalia a 1,44 g (densidade média da gasolina 0,72 g/mL).

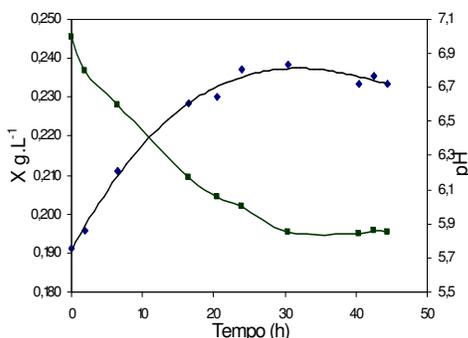
É importante considerar que os isolados foram obtidos de uma região de um biofiltro onde as concentrações de gasolina eram muito menores que as utilizadas no presente estudo, sendo da ordem de 4 mg/L, ou 500 vezes menores.



Isolado UFSC 01



Isolado UFSC 08



Isolado UFSC 12

Figura 5.10 Curvas de crescimento e pH ao longo do tempo de cultivo em meio com 0,2 % de gasolina.

### 5.3.1 Velocidade específica de crescimento

Na Figura 5.11 são apresentadas as curvas de velocidade específica de crescimento para os três isolados representantes dos grupos com diferentes potenciais para degradação da gasolina. Como as velocidades são baixas, os dados estão apresentados como a unidade de tempo em dias. Para ter-se os valores de velocidade específica em 1/h, basta dividir os valores por 24.

Estes resultados são concordantes com a produção de biosurfactante, isto é, o isolado que apresentou maior índice de emulsificação (UFSC 1), também apresentou as maiores velocidades específicas de crescimento, em média 1,06 1/d. Por outro lado, o isolado com menor índice de emulsificação (UFSC 8), apresentou a menor velocidade

específica de crescimento, em média 0,16 1/d. É interessante destacar que a velocidade específica média do isolado (UFSC 12) foi de 0,51 1/d, o que dá cerca da metade da velocidade da UFSC 1, e que representa o grupo com índice de emulsificação intermediário (50 % de emulsificação), indicando a coerência dos resultados e a relação do crescimento com a produção do biosurfactante. Em termos de comparação, estudos realizados por (YERUSHALMI e GUIOT, 1998) avaliaram parâmetros cinéticos da degradação da gasolina por um consórcio de bactérias. A concentração inicial de gasolina variou de 16,1 mg/L – 62,6 mg/L, alterando conseqüentemente a velocidade específica de crescimento entre 0,72 1/d para 5,04 1/d. No estudo realizado por Shim et al., 2005, é ressaltado o efeito inibitório do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na velocidade específica de crescimento na degradação dos compostos BTEX por culturas de *Pseudomonas putida* apresentando resultados entre 0,033 1/d, 0,034 1/d, 0,032 1/d, 0,012 1/d para benzeno, tolueno etilbenzeno e *p*-xileno respectivamente. Já no estudo realizado por (GOUDAR e STREVETT, 1998) que também avaliaram os parâmetros cinéticos de um consórcio de bactérias na degradação dos BTEX, obtiveram valores de velocidade específica de crescimento superiores ao citado anteriormente variando de 0,2 1/d, 0,36 1/d , 0,21 1/d , 0,14 1/d , 0,24 1/d , 0,38 1/d para benzeno, tolueno, etilbenzeno, *o*-xileno, *m*-xileno e *p*-xileno respectivamente. Esses dados comparativos confirmam que o parâmetro  $\mu_x$  é dependente do microrganismo, do meio de cultivo, do substrato limitante e das condições ambientais, servindo de respaldo no estudo do comportamento cinético de microrganismos específicos.

Os dados apresentados nos permitem também estimar o tempo de duplicação a partir das velocidades específicas médias. Para o isolado UFSC 01 foi de 16 h, para o UFSC 12 foi de 32 horas e para o UFSC 08 foi de 103 h. Esses valores extremamente elevados para bactérias indicam também que as células não estavam num processo contínuo de duplicação. Só para ilustrar, o isolado UFSC 01 no início do cultivo, onde as condições estavam mais favoráveis, a maioria das células poderiam estar se duplicando a cada 3 horas ou menos. Já no final do cultivo as velocidades chegaram a ficar negativas, indicando que a velocidade de morte das células superou a de duplicação.

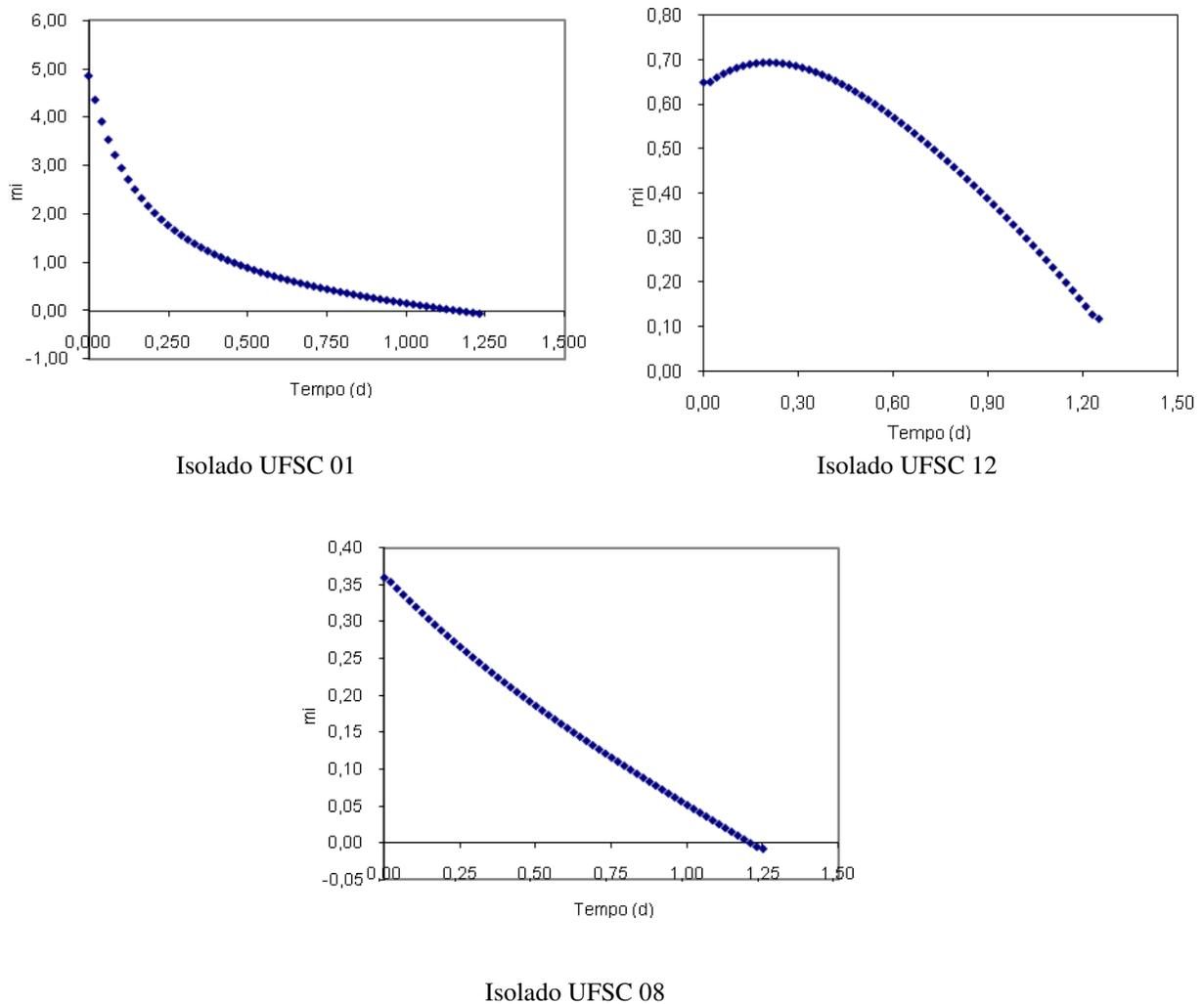


Figura 5.11 Curvas de velocidade específica de crescimento ao longo do tempo para três isolados cultivados em meio com 0,2 % de gasolina.

As velocidades se apresentaram, com exceção para o isolado UFSC 12, sempre decrescentes, indicando um processo de agravamento contínuo das condições de cultivo. Se o biofiltro fosse inoculado com apenas uma cultura pura e operado nas condições testadas, o sistema poderia colapsar em menos de 24 horas. Os perfis de queda são claramente distintos revelando as diferentes respostas dos microrganismos frente às transformações ambientais, e com isso a importância do estudo da diversidade da

microbiota de um sistema como um biofiltro. Nesses sistemas, por exemplo, os metabólitos excretados pelos microrganismos podem ser absorvidos/adsorvidos pelo material sólido de suporte e ainda ser utilizado por outros microrganismos não degradadores de gasolina, como aquele grupo que ao longo deste trabalho foram descartados por não crescerem em meio com apenas gasolina como fonte de carbono.

A velocidade específica de crescimento é uma grandeza cinética de grande utilidade, juntamente com a velocidade específica de consumo de substrato ou produção de metabólitos, pois independe da concentração inicial do inóculo, que é parâmetro de difícil padronização, para não dizer impossível. Através dessa grandeza é possível comparar a eficiência do microrganismo, do sistema e também das condições de cultivo, na transformação, produção ou degradação de um substrato ou produto qualquer.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1. Nem todos os microrganismos isolados do sistema de biofiltração de vapores de gasolina podem ser cultivados em meio líquido com gasolina, embora tenham se mantido viáveis em meio sólido com esse substrato.
2. A microbiota predominante em biofiltros de tratamento de vapores de gasolina é Gram negativa.
3. Nem todos os isolados que degradam ou utilizam de alguma forma a gasolina são capazes de produzir biosurfactantes.
4. Os isolados produtores de biosurfactantes apresentam um maior crescimento, representando um potencial maior para utilização como inoculantes em biofiltros.
5. A presença de bactérias, provenientes da amostra do meio suporte do biofiltro, que isoladamente não cresceram na presença de gasolina sugere uma co-relação inter-específica com bactérias degradadoras de gasolina.
6. Concentrações de gasolina da ordem de 0,2 % e superiores são tóxicas, em meio líquido, para microrganismos isolados de zonas do biofiltro que operam com baixas concentrações de vapores de gasolina.

### 6.1 Sugestões para futuros trabalhos

1. Identificação das espécies estudadas através de técnicas moleculares
2. Analisar a degradação dos BTEX utilizando cromatografia.
3. Realizar cultivos com controle de pH ou com utilização de sistemas tampão.
4. Inocular um biofiltro com as bactérias selecionadas e avaliar a eficiência de remoção da gasolina.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AELION, C. M.; BRADLEY, P. M. Aerobic biodegradation potencial of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer. **Applied Environmental and Microbiology**. 57: 57-63, 1991.
- ALCAMO, I. E. **Fundamentals of Microbiology**. The Benjamin Cummings. Publishing Company, Inc New York, 1994.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, San Diego, California, 302 p. 1994.
- ÁLVARES Jr.; O. M.; LAÇAVA, C. I. V.; FERNANDES, P. S. **Tecnologias e gestão ambiental – Emissões atmosféricas**. Brasília: Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), 373p., 2002.
- ALVAREZ, P.J.J.; ANID, P.J.; VOGEL, T.M. Kinetic and aerobic biodegradation of benceno and toluene in sandy aquifer material. **Biodegradation**, 2: 43-51, 1991.
- API. AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. **Risk-Based Methodologies for Evaluating Petroleum Hydrocarbon Impacts at Oil and Natural Gas E&P Sites**. API Publication Number 4709. API Publishing Services, Washington, D.C. 2001.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals And Applications**. 3rd Ed. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. Califórnia, 1993.
- ATTAWAY, H. H.; SCHMIDT, M. G. Tandem biodegradation of BTEX componentes by two *Pseudomonas* sp. **Current Microbiology**, 45: 30-36, 2002.
- BACCI, E. **Ecotoxicology of Organic Contaminants**. Florida: Boca Raton. 1994.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. Ed. Bookman. São Paulo. 662 p., 2002.
- BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a reiew. **Bioresource Technology** , 51: 1-12, 1995.
- BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53:495–508,

2000.

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**, 97: 868-875, 2006.

BELLI, P.F.; DA COSTA, R.H.R.; GONÇALVES, R.F; FILHO, B.C.; LISBOA, H.M. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. In: **Tratamento de odores em sistemas de esgotos sanitários. Programa de pesquisa em saneamento básico – PROSAB**. Segrac editora e gráfica. Belo Horizonte, 544p., 2001.

BELLI-FILHO, P.; WOLFF, D. B.; CARVALHO, C. M. DE; COSTA, R. H. R. DA; RIBEIRO, L. G. **Gestão de odores e biodesodorização em um sistema de tratamento de esgoto sanitário**. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, 96: 1049-1055, 2005.

BENTO, D. M. **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande do Sulanta Catarina, Florianópolis, 112f., 2005.

BICCA, C. F.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 30: 231–236, 1999.

BÍCEGO, M. C. **Contribuição ao estudo de hidrocarbonetos biogênicos e do petróleo no ambiente marinho**. Ed Resenha Tributária. São Paulo. 156p., 1988.

BONGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*. **Physicochemical and Engineering Aspects**. 52: 41-52, 1999.

BONO, R.; BUGLIOSI, H. E.; SCHILIRÓ, T.;GILLI, G. **Atmosphere Environmental**. 35: 107 - 113, 2001.

BRASIL. Lei nº. 6938, de 31 de agosto de 1981. Política Nacional do Meio Ambiente.

- Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/legislaçãp/Leis/L6938.htm>. Acesso em: 03 out 2007.
- BRASIL, RN 15, 3.214/78- Disponível em: [http://: www.mte.gov.br](http://www.mte.gov.br). Acessada em 23 de agosto de 2007.
- BRILHANTE, O. M. **Gestão e Avaliação de Risco em Saúde Ambiental**. Rio de Janeiro: editora FIOCRUZ ,155p., 1999.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. **Biology of Microorganisms**. Prentice Hall, Englewood Clifs, New Jersey 6 ed., 1991.
- CABRAL, F, A. **Biofiltração para desodorização de reatores anaeróbios**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 81f., 2003.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 50: 520–529, 1998.
- CAMEOTRA, S. S.; BOLLAG, J. M. Biosurfactant Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 30: 111-126, 2003.
- CARMO JR, G. N. R. **Otimização e aplicação de metodologias para análises olfatométricas integradas ao saneamento ambiental**. Tese de Doutorado em Engenharia Ambiental. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental/PPGEA.Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 182f., 2005.
- CAPPUCCINO, J.G.; SHERMAN, N. **Microbiology: a laboratory manual**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.Califórnia, 477 p.1996.
- CASSIDY, D. P.; HUDAK, A .J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. **Jounal of Hazardous Materials**. 84: 253–264, 2001.
- CERNIGLIA, G. E.; GIBSON, D. T. Metabolism of naphthalene by *Cunningbamella elegans*. **Appliedf Environmental and Microbiology**, 34: 363-370, 1992.
- CHOI, S-C.; OH,Y-S. Simultaneous removal of benzeno, tolueno and xylenes mixture by

- a constructed microbial consortium during biofiltration. **Biotechnology Letters**. 24: 1269-1275, 2002.
- CHU, H.; CHIOU, Y-Y.; HORNG, K-H.; TSENG, T-K. Catalytic incineration of C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>SH and its mixture with CH<sub>3</sub>SH over a Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst. **Journal of Environmental Engineering**, 127: 438-447, 2001.
- COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO **Nosso Futuro Comum**. 2º ed. Rio de Janeiro, Ed. Fundação Getúlio Vargas, 430p.,1991.
- CONCAWE. **VOC emissions from loading gasoline onto sea-going tankers in EU-15: control technology and cost-effectiveness**. Report No. 6/02. Brussels,2002.Disponível em: <http://www.concawe.be>. Acessado em:13 de junho 2007.
- CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, J. J. P. Natural Bioremediation Perspective for BTEX – Contaminated Groundwater in Brazil. **Revista de Microbiologia**., 27: 43-50, 1996.
- CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S.; SANTOS, R. C. F.; ALVAREZ, J. J. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Resource**, 32: 2065-2072, 1998.
- CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, 4: 71-75, 1999.
- CORSEUIL. H. X., SCHNEIDER, M., ROSÁRIO, M.. Natural Attenuation Rates of Ethanol and BTEX compounds in Groundwater contaminated with gasohol. **Appropriate Environmental and Solid Waste Management and Technologies for developing countries**. 4: 2121-2128, 2002.
- CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**. 30: 32-37, 2002.
- CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. Optimization of some environmental conditions to enhance gasoline biodegradation in soil microcosms bioaugmented with *Pseudomonas putida*. **Revista de Microbiologia**. 28: 129–34, 1997.
- CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms.

- Brazilian Journal of Microbiology**. 31: 45–49, 2000.
- DE MELO LISBOA, H. **Controle da poluição atmosférica**, Florianópolis, 352p., 2008.
- DE MELLO, J. M. M. Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 152f, 2007.
- DEVINNY, J. S.; DESHUSSES, M. A.; WEBSTER, T. S. **Biofiltration for air pollution control**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, CRC Press LLC, 299p.1999.
- DESHUSSES, M. A. Biological waste air treatment in biofilters. **Environmental Biotechnology Current Opinion in Biotechnology**, 8:335-339, 1997.
- DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N; JOHRI; A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology Biotechnology**, 59: 143-152, 2002.
- EDMONDS, P.; COONEY, J.J. Identification of microorganisms isolated from jet fuel systems, **Applied Microbiology**, 15: 411-416, 1967.
- ELSAS, J. D.V.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H.; DEKKER, M. **Modern soil microbiology**, INC, New York, 683p., 1997.
- ENGLERT, C.J., KENZIE, E.J., DRAGUN, J. **Bioremediation of petroleum products in soil. Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils**. Calabrese, E.J., KostECKI, P.T. – ed.). Boca Raton: Lewis Publishers, 111–129p., 1993.
- ERGAS S. J., SCHROEDER E. D., CHANG D. P. Y., MORTON, R. L., Control of volatile organic compound emissions using a compost biofilter, **Water Environmental Research**, 67:816–821, 1995.
- FATORELLI, L. **Proposta de Avaliação de Risco Ecológico para Contaminações de Petróleo e Derivados –Estudo de Caso**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental/ PPGEA. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 102f., 2005.
- FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo, EPU; Springer, EDUSP, 196p., 1980.

- FERNANDES, M.; CORSEUIL, H.X. **Efeito potencial do etanol na solubilização dos BTX em águas subterrâneas contaminadas com gasolina.** Anais do VI Congresso Brasileiro de Geoquímica, Salvador, Vol. I, p 150-153. 1997.
- GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, 12: 325- 335, 2001.
- GASKIN, S.; BENTHAM, R. Comparison of enrichment methods for the isolation of purene-degrading bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 56: 80-85, 2005.
- GEERDINK , M. J.; LOOSDRECHT , M. C. M.; LUYBEN, K .C. A. M. Biodegradability of oil diesel. **Biodegradation**, 7: 73-81, 1996.
- GOUDAR, C. T.; STREVETT, K. A. Comparison of relative rates of BTEX biodegradation using respirometry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 21: 11-18, 1998.
- HAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6 ed. New York. 906p., 1999.
- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica.** (Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 93-122p., 2001.
- HONG, J. H.; KIM, J.; CHOI, O. K.; CHO, K-S.; RYU, H. W. Characterization of a diesel-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* IU5, isolated from oil-contaminated soil in Korea. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 21: 381-384, 2005.
- ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* ssp. Isolated from a tropical environmental. **Chemosphere**, 61: 985-992, 2005.
- IKEMOTO, S.; JENNINGS, A.A.; SKUBAL, K L. Modeling hydrophobic VOC biofilter treatment in the presence of nutrient stimulation and hydrophilic VOC inhibition. **Environmental Modelling and Software**, 21: 1387-1401, 2006.

- JOHNSON, S. J.; WOOLHOUSE, K. J.; PROMMERA H.; BARRYA, D. A.; HRISTOFI, N. Contribution of Anaerobic Microbial Activity to Natural Attenuation of Benzene in Groundwater. **Engineering Geology**. 70:343-349, 2003.
- JUTRAS, E. M.; SMARI, C. M.; RUPERT, R.; PEPPER, I. L.; MILLER, R. M. Field-scale biofiltration of gasoline vapors extracted from beneath a leaking underground storage tank. **Biodegradation**. 8: 31-42, 1997.
- KHAN, F. I.; GHOSHAL, A. K. Removal of volatile organic compounds from polluted air. **Journal of Loss Prevention in the Process Industries**, 13: 527-545, 2000.
- KREPSKY, N.; SOBRINHO, F.S.; CRAPEZ, M.A.C. Biodetergentes para limpeza de petróleo. **Ciência Hoje**, 38: 70-73, 2006.
- LANGENHOVE, V, H; DE HEYDER, B. **In: Odours in wastewater treatment: measurement, modeling and control. Biological treatment of odours**. London. IWA publishing, 437p., 2001.
- LANDIS, W.G.; YU, M. **Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological system**. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in The Environment. **Microbiological Reviews**, 54:305-315, 1990.
- LIN, C-W.; TSAI, S-L; HOU, S-N. Effects of environmental settings on MTBE removal for a mixed culture and its monoculture isolation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74: 194-201, 2007.
- LOPEZ, M. S. **Avaliação de um biofiltro piloto para desodorização de compostos orgânicos do setor petroquímico**. Dissertação Mestrado em Engenharia Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. 148f., 2007.
- LORA, E. S. **Prevenção e controle da poluição nos setores energéticos, industrial e do transporte**. Brasília: ANELL, 862p., 2000.
- LYRA, D. G. P. **Caracterização e simulação das emissões atmosféricas de uma estação de tratamento de efluentes**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química -Universidade Federal das Bahia, Salvador. 239f .2001.

- MANCINI, T. M. **Métodos de caracterização de áreas potencialmente contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo.** Trabalho de Diplomação. Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2002.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 20:48-52, 1998.
- MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biorremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 47: 462-468, 1997.
- MARQUES JR. A. N.; MORAES, R. B. C.; MAURAT C. M. Biologia Marinha. Rio de Janeiro. P: 311-334, In: : **Interciência**, PEREIRA, R. C.; GOMES, A. S. (org.).382p., 2002.
- MÁRQUEZ-ROCHA, F. J.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, V.; LAMELA, M. A. T. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium – **Water, Air and Soil Pollution**, 128:313-320, 2001.
- MARTINS, D. O. **Estudo do controle de emissões de compostos orgânicos voláteis em tanques de armazenamento de produtos químicos.** Dissertação Mestrado do Programa de Pós – Graduação em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo – Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 179 p. 2004.
- MAZZUCO, L. M. **Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel.** Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 83f., 2004.
- McINERNEY, M. J.; NAGLE, D. P. ; KNAPP, R. M. Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future. In: **Petroleum microbiology**. Ollivier B, Magot M (eds) ASM Press. Washington DC, 215–237p., 2005.
- MEHDI, H.; GITI, E. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. **International Biodeterioration e Biodegradation**. No prelo.
- MELLO, J. M. M. **Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em

- Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. 152 p., 2007.
- MILITÃO, A. G.; RAFAELI, E. A. **Neuropatias por intoxicação ocupacional**. Disponível em: <http://www.eps.ufsc.br/ergon/revista/artigos/Angeliete.pdf>. Acesso em 25 de novembro de 2007.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora. UFLA, 626p., 2002.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. "Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review". **Engineering Geology**, 60: 371-80, 2001.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. 25:772-76, 2002.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, 21: 1562-1566, 2005.
- NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. Bioremediation of soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. **Chemosphere**, 41: 1115-1123, 2000.
- OH, Y.S.; BARTHA, R. Construction of a bacterial consortium for the biofiltration of benzene, toluene and xylene emissions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 13: 627-632, 1997.
- OKERENTUGBA, P. O.; FRANKENBERGER, O. U. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**. 2: 288-292, 2003.
- OLIVEIRA, N.M.; PERALBA, M.C.R.; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; CONCEIÇÃO, D.P.; WEISSHEIMER, M.I.K.; SCHONS, M.R.M. **Avaliação da degradação de BTEX por consórcio bacterianos em meio mineral com gasolina comercial**. XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Gramado, 2007.
- OROZCO, S. F. B.; PEREIRA, D. G.; KILIKIAN, B. V. **Influência do pH na produção de pigmentos vermelhos e na micromorfologia de *Monascus purpureus* CCT**

- 3802 em cultivo submerso.** In: Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações (CD-ROM), Florianópolis, SC, 2003.
- PARALES, R.E.; BRUCE, N.C.; SCHMID, A.; WACKETT, L.P. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3). **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 4699-4709, 2002.
- PELCZAR, M J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2. ed. São Paulo: Makron Books, 2v.,1996.
- PENET, S.; MARCHAL, R.; SGHIR, A.; MONOT, F. Biodegradation of hydrocarbon cuts used for diesel oil formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 66: 40–47, 2004.
- PLAZA, G. A.; WYPYCH, J.; BERRY, C.; BRIGMON, R. L. Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil. **World Journal Microbiology and Biotechnology.** 23: 533-542, 2007.
- POULSEN, M.; LEMON, L.; BARKER, J.F. Dissolution of Monoaromatic Hydrocarbons into Groundwater from Gasoline – Oxygenate mixtures. **Environmental Science and Technology.**, 26: 2483-2489, 1992.
- PRANTERA, M. T.; DROZDOWICZ, A.; LEITE, S. G.; ROSADO, A. S. Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N<sub>2</sub>-fixing soil bacteria. **Biotechnology Letters.** 24: 85–89, 2002.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Rapid identification of biosurfactant producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, 11: 671–674, 1997.
- RATLEDGE, C. **Biochemistry of microbial degradation.** Kluwer academic Publisher, The Netherlands, 1994.
- RICHARD, J. Y., VOGEL, T. M. Characterization of soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **Int. Biodeterior Biodegrad.** 44: 93-100, 1999.
- RIDGWAY, H.; SAFARIK, F. J.; PHIPPS, D.; CARL, P.; CLARK, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated

- aquifer. **Applied Environmental and Microbiology**. 56: 3565–3575, 1990.
- RIZZOLO, J. A.; WOICICCHOWSKI, A. L.; SOARES, M.; SOCCOL, C. R. **Produção e avaliação de biosurfactantes microbianos, a partir de cepas degradadoras de gasolina**. In: Anais do XVI Simpósio Nacional de Fermentações (CD-ROM), Curitiba, PR, 2007.
- ROGER, J.; DAVIS, R.; ZEISS, E. **Cryogenic condensation- a cost-effective technology for controlling VOC emissions**. American Institute of Chemical Engineers, Annual Meeting Miami Beach, Florida, 1988.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 249-252, 2002.
- ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: **Microbiologia Ambiental**. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPMA). Jaguariúna, SP. p.307-334. 1997.
- SCHIRMER, W. N. **Amostragem, análise e proposta de tratamento de compostos orgânicos voláteis (COV) e odorantes em estação de despejos industriais de refinaria de petróleo**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental – Pós-Graduação em Engenharia Ambiental/ PPGEA, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 140f., 2004.
- SCHIRMER, W. N.; LISBOA, H. M. **Uma revisão dos principais métodos de tratamento de compostos orgânicos voláteis e odorantes**. In: Congresso Interamericano de Qualidade do Ar, Canoas (RS), Anais Canoas: ABES, 1 CD-Rom.2003.
- SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S. S.; KONG, S. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**, 16: 319–327, 2005.
- SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia – manual de aulas práticas**. Florianópolis: Editora da UFSC. 155p., 2004.
- SINGH, R. S.; AGNIHOTRI, S. S.; UPADHYAY, S. N. Removal of toluene vapour using agro-waste as biofilter media. **Bioresource Technology**, 97: 2296–2301, 2006.

- SOARES, M. **Aplicação da biofiltração no tratamento de vapores de gasolina**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 209p., 2006.
- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J-P. Intrinsic capacities of soil microflorae for gasoline degradation, **Biodegradation**, 9: 319-326, 1998.
- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; ROPARS, M.; LEBEAULT, J. M.; VANDECASTEELE, J. P. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**. 86: 1008–1016, 1999.
- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; HUENT, J. M.; VANDECASTEELE, J. P. Biodegradability of volatile hydrocarbons of gasoline. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54: 121-125, 2000.
- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; LEBEAULT, J. M.; VANDECASTEELE, J. P. Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by monitoring of culture-headspace composition. **Letters in Applied Microbiology**, 30: 19-22, 2000.
- SOUZA, A. M. **Estudo de emissões de vapores orgânicos no carregamento de gasolina em caminhões tanque**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo, Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 169 p., 2004.
- STOTSKY, G. Activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in soil. In: **Microbial Ecology**. A Laskin e H. Lechevalier, eds. CRC Press, Cleveland, Ohio, 57-135p., 1974.
- TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, 27: 441-446, 2004.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6ª Ed., Editora Artmed. Porto Alegre, 2000.

- TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.** Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p., 2002.
- UNEP. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference methods for marine pollution studies**, nº 20, 97 p.1991.
- URURAHY, A. F. P.; MARINS, M. D. M.; VITAL, R. L.; GABARDO, I. T.; PEREIRA, N. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. **Revista de Microbiologia**, 29: 254-258, 1998.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Off-Gas Treatment Technologies for Soil Vapor Extraction Systems: State of the Practice. Prepared by: Office of Superfund Remediation and Technology Innovation Office Solid Waste and Emergency Response.** EPA-542-R-05-028. 2006.
- VAN GROENESTIJN, J. W.; HESSELINK, P.G.M. Biotechniques for air pollution control. **Biodegradation** 4: 283–301, 1993.
- VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Volatile hydrocarbon biodegradation by a mixed-bacterial culture during growth on crude oil. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, 26: 356-362, 2001.
- VANCE-HARROP, M. H.; GUSMÃO, N. B. De; CAMPOS-TAKAKI, G. M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using d-glucose and babassu oil as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34: 120-123, 2003.
- VECCHIOLI, G. I.; DEL PANNO, M. T.; PAINCEIRA, M. T. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. **Environmental Pollution**. 67:249-258, 1990.
- VEIGA, M. C.; FRAGA, M. , AMOR, L.; KENNES, C. Biofilter performance and characterization of a biocatalyst degrading alkylbenzene gases. **Biodegradation** 10: 169–176, 1999.
- VOICE, T. C., PAK, D.; ZHAO, X.; SHI, J.; HICKEY, R. F. Biological activated carbon

- in fluidized bed reactors for the treatment of groundwater contaminated with volatile aromatic hydrocarbons. **Water Research**. 26:1389-1401, 1992.
- WANG, X.; VU, T. X.; BADHA, R. Effect of Bioremediation on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues in Soil. **Environmental Science and Technology**. 24: 1086-1089, 1990.
- WU, D.; QUAN, X.; ZHAO, Y.; CHEN, S. Removal of *p*-xylene from an airstream in a hybrid biofilter. **Journal of Hazardous Materials**, 136: 288–295, 2006.
- YAMAOKA-YANO, D. M.; VALARINI, P. J. Métodos de identificação de bactérias. MELO, S, I; AZEVEDO, L, J. **In: Ecologia microbiana** - Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 488p, 1998.
- YERUSHALMI, L.; GUIOT, S. R. Kinetics of biodegradation of gasoline and its hydrocarbon constituents. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 49: 475-481, 1998.
- ZANG, Y.; MILLER, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfact. **Applied Environmental and Microbiology**, 58: 3276-3282, 1992.