



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Francisco Beltrão

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA AMBIENTAL: ANÁLISE E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**



DANIELA DA SILVA

**BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO POR CONSÓRCIO
MICROBIANO BIOESTIMULADO COM SORO DE LEITE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FRANCISCO BELTRÃO/PR

2020

DANIELA DA SILVA

**BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO POR CONSÓRCIO
MICROBIANO BIOESTIMULADO COM SORO DE LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental como requisito parcial ao título de Mestra em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Linha de Pesquisa: Tecnologia Ambiental

Orientador: Prof^o. Dr^o Eder da Costa dos Santos

Coorientador: Prof^a Dr^a Ivane Benedetti Tonial

FRANCISCO BELTRÃO/PR

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Silva, Daniela da

Biodegradação de diesel no solo por consórcio microbiano bioestimulado com soro de leite / Daniela da Silva. – Francisco Beltrão, 2020.

1 arquivo de texto (64 f):PDF ; 2,11 MB.

Orientador: Eder da Costa dos Santos

Coorientador: Ivane Benedetti Tonial

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Francisco Beltrão, 2020.

Inclui bibliografia: f. 61-63

1. Biorremediação. 2. Hidrocarbonetos. 3. Diesel. 4. Solos – Poluição por óleo. I. Santos, Eder da Costa dos, orient. II. Tonial, Ivane Benedetti. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Biblioteca da UTFPR - Câmpus Francisco Beltrão

Bibliotecária/Documentalista:

Ana Paula de Moraes da Silva – CRB-9/1863



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Francisco Beltrão

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA AMBIENTAL: ANÁLISE
E TECNOLOGIA AMBIENTAL**



**TERMO DE APROVAÇÃO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO POR CONSÓRCIO
MICROBIANO BIOESTIMULADO COM SORO DE LEITE**

por

DANIELA DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentado às 16 horas, do dia 11 de maio de 2020, como requisito para obtenção do título de mestre do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Rodrigo Lingnau

Coordenador programa de pós-
graduação em Engenharia Ambiental

(Eder da Costa dos Santos)

Professor Orientador

Thalita Grando Rauen

Membro da Banca

Rafael Valadares Borges da Silva

Membro externo da Banca

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de pós
graduação: análise e tecnologia ambiental”

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, autor da vida, que me manteve firme para chegar até aqui, me concedendo fé, discernimento e sabedoria para ultrapassar tudo que eu julgava ser um obstáculo intransponível.

Agradeço aos meus pais, Lúcia e Joaquim, e às minhas irmãs Valéria, Vânia e Joelma, por todo o apoio que sempre me deram em todos os momentos.

Agradeço aos amigos que sempre se dispuseram a me ajudar de alguma forma, mesmo que com uma palavra de otimismo, dizendo que daria tudo certo.

Agradeço ao meu grande amigo Padre Danilo, que de longe sempre me deu suporte, principalmente nas ocasiões de angústia e saudade.

Agradeço à minha amiga Thays Majara Silva Araújo, por se dispor de uma forma inimaginável a me assistir em uma parte fundamental do trabalho.

Agradeço ao meu amigo Jemison Santos, que me auxiliou por diversas vezes em momentos difíceis.

Agradeço às minhas amigas que dividiram apartamento comigo e aos meus amigos da universidade, pelo carinho e companheirismo.

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Francisco Beltrão por toda a assistência para a realização desse trabalho.

Agradeço aos técnicos de laboratório João Paulo Fernando Mileski, que de boa vontade se dispôs a me ajudar trabalhando horas a mais no laboratório, e Ronaldo Follmann, por toda a ajuda prestada.

Agradeço aos alunos Renata Calegari, que me ensinou e ajudou por inúmeras vezes no laboratório, e Vinícius Raffler, uma pessoa que esteve ali para o que eu precisei e sempre de boa vontade.

Agradeço ao Prof. Renato e à sua esposa Rubia, que sempre me deram suporte nas fases mais complexas.

Agradeço à Prof.^a. Dr^a Fernanda Souza, que sempre torceu por mim e me apoiou.

Agradeço à Prof.^a Dr^a. Naimara Vieira, por todo o auxílio na parte estatística e imensa boa vontade em ajudar.

Agradeço ao Prof. Dr^o. Eder da Costa dos Santos, que generosamente foi meu orientador, não desistindo de mim e nem do trabalho mesmo com todas as dificuldades.

Agradeço à Prof.^a. Dr.^a. Ivane Benedetti Tonial, que aceitou ser minha coorientadora, me ajudando no laboratório.

Agradeço aos professores que me apoiaram de alguma forma, com esclarecimento de dúvidas e com incentivo para que eu não desistisse.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação: obrigada.

“Todas as vitórias ocultam uma
abdicação”. (Simone de Beauvoir).

RESUMO

O petróleo e seus derivados quando mal administrados podem acarretar diversos problemas ao meio ambiente e um exemplo é a contaminação do solo por hidrocarbonetos. A biorremediação é uma técnica que pode ser empregada no tratamento deste poluente, por ser uma tecnologia de grande potencial e que pode ser aplicada empregando a bioaugmentação e a bioestimulação. O soro de leite é um aliado neste tipo de técnica devido ao seu alto valor nutricional que auxilia na biodegradação e de contrapartida é uma opção de reaproveitamento para este resíduo que se descartado incorretamente também provoca impactos ambientais tanto no solo quanto na água. Neste trabalho uniu-se a biorremediação com a bioestimulação por meio do soro de leite, a fim de criar um consórcio microbiano bioestimulado. Utilizou-se frascos de vidro hermeticamente fechados e foi acrescentado o solo sem histórico de contaminação juntamente com o diesel em concentrações diferentes de [2%] e [10%]. Foram criadas as cápsulas de alginato de sódio contendo os consórcios microbianos nas diferentes concentrações de diesel, a fim de comparar tais fatores e foi realizada uma análise para verificar o potencial de emulsificação desses microrganismos em ambientes contaminados por BTEX. A análise estatística desse ensaio foi efetuada aplicando um experimento fatorial com dois fatores: os tratamentos e os níveis que são as concentrações de diesel em [2%] e [10%] e com [5%] de significância. No entanto para a respirometria não foram encontrados resultados significativos estatisticamente, visto que os tratamentos obtiveram valores acumulados das médias de titulações, bem próximos. Os consórcios sem a bioestimulação com soro de leite apresentaram um desempenho melhor na análise respirométrica quando comparados ao consórcio bioestimulado. A análise de emulsificação destes microrganismos mostrou-se com grande potencial de crescimento no diesel, visto que o consórcio de soro de leite, apresentou [63,51%] de índice emulsificante, seguido pela bactéria ISB 45 com [56,58%] e ISB 42 com [45,57]. São resultados promissores que mostram que estes isolados quando presentes em um ambiente de estresse, se sobressaem por possuírem capacidade de degradação destes hidrocarbonetos.

Palavras-chave: Biorremediação. Hidrocarbonetos. Óleo diesel. Emulsificação. Solo contaminado.

ABSTRACT

Petroleum and its derivatives, when mismanaged, can cause several problems to the environment and an example is the contamination of the soil by hydrocarbons. Bioremediation is a technique that can be used in the treatment of this pollutant, as it is a technology with great potential and that can be applied using bio-enhancement and biostimulation. Whey is an ally in this type of technique due to its high nutritional value that aids in biodegradation and on the other hand it is a reuse option for this waste which, if improperly disposed of, also causes environmental impacts on both soil and water. In this work, bioremediation was combined with biostimulation through whey, in order to create a biostimulated microbial consortium. Hermetically sealed glass flasks were used and the soil with no history of contamination was added together with diesel in different concentrations of [2%] and [10%]. Sodium alginate capsules containing microbial pools in different concentrations of diesel were created in order to compare these factors and an analysis was carried out to verify the emulsification potential of these microorganisms in environments contaminated by BTEX. The statistical analysis of this test was carried out by applying a factorial experiment with two factors: the treatments and the levels that are the concentrations of diesel in [2%] and [10%] and with [5%] of significance. However, for respirometry, no statistically significant results were found, since the treatments obtained cumulative values of the titration averages, very close. Consortia without biostimulation with whey showed a better performance in respirometric analysis when compared to the biostimulated consortium. The analysis of emulsification of these microorganisms showed great growth potential in diesel, since the whey consortium presented [63.51%] of emulsifying index, followed by the ISB 45 bacterium with [56.58%] and ISB 42 with [45,57]. These are promising results that show that these isolates, when present in a stressful environment, stand out for having the ability to degrade these hydrocarbons.

Keywords: Bioremediation. Hydrocarbons. Diesel oil. Emulsification. Contaminated Soil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. HORIZONTES DO SOLO.....	23
FIGURA 2. MODELO DE LATOSSOLO VERMELHO DISTROFÉRICO	24
FIGURA 3. ATIVIDADE DO MICRORGANISMO DURANTE A BIORREMEDIAÇÃO	25
FIGURA 4. ESTRUTURA DOS BTEX.....	35
FIGURA 5. ESTRUTURA DOS METABÓLITOS.....	35
FIGURA 6. SISTEMA DE DEGRADAÇÃO AERÓBIA DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO	36
FIGURA 7. LOCAL DE COLETA DO SOLO COM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO POR HIDROCARBONETOS	37
FIGURA 8. LOCAL DA COLETA DO SOLO UTILIZADO NO EXPERIMENTO	38
FIGURA 9. EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA PENEIRAR O SOLO	39
FIGURA 10. MESA AGITADORA COM OS CONSÓRCIOS MICROBIANOS	40
FIGURA 11. LOCALIZAÇÃO DA EMPRESA.....	41
FIGURA 12. CÁPSULAS CONTENDO ALGINATO DE SÓDIO E CONSÓRCIOS MICROBIANOS.	43
FIGURA 13. EXPERIMENTO DA RESPIROMETRIA.	44
FIGURA 14. KIT EXTRAÇÃO DE DNA.	47
FIGURA 15. PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO DE MASSA CELULAR – PÓS AUTOCLAVE.....	47
FIGURA 16. HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POR 48 HORAS.....	48
FIGURA 17. DILUIÇÃO SERIADA 10-3	50
FIGURA 18. DADOS DA RESPIROMETRIA	53
FIGURA 19. HISTOGRAMA DA RESPIROMETRIA.....	54
FIGURA 20. BOXPLOT DOS TRATAMENTOS DA ANÁLISE RESPIROMÉTRICA.....	54
FIGURA 21. COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS	56
FIGURA 22. FORMAÇÃO DE EMULSÃO NO CONSÓRCIO DE SORO	59
FIGURA 23. FORMAÇÃO DE EMULSÃO.....	58
FIGURA 24. FORMAÇÃO DE EMULSÃO ISB 45	59
FIGURA 25. FORMAÇÃO DO PELLETT	60
FIGURA 26. DNA EXTRAÍDO.....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ELEMENTOS QUE COMPÕEM O PETRÓLEO	30
TABELA 2. PRODUTOS À BASE DE PETRÓLEO	30
TABELA 3. CONFECÇÃO DE CÁPSULAS MICROBIANAS	43
TABELA 4. TRATAMENTOS DA ANÁLISE RESPIROMÉTRICA	45
TABELA 5. TRATAMENTOS DA ANÁLISE RESPIROMÉTRICA E QUANTIDADE DE MICROORGANISMOS INOCULADOS	45
TABELA 6. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS MICROORGANISMOS ISOLADOS	49
TABELA 7. CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE	51
TABELA 8. TRATAMENTOS COM 2% DE DIESEL – DADOS ACUMULADOS.....	52
TABELA 9. TRATAMENTOS COM 10% DE DIESEL – DADOS ACUMULADOS.....	52
TABELA 10. ÍNDICE EMULSIFICANTE DAS BACTÉRIAS ISOLADAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP – Agência Nacional do petróleo

BTEX- Benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

DBO - Demanda Bioquímica De Oxigênio

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LGQ – Laboratório para garantia da qualidade

NR – Norma regulamentadora

USEPA – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 SORO DE LEITE	20
3.2 MICRORGANISMOS	21
3.3 O SOLO	23
3.3.1 LATOSSOLO DISTROFÉRRICO VERMELHO	24
3.4 BIORREMEDIAÇÃO	25
3.4.1 Atenuação natural.....	26
3.4.2 Bioaugmentação	26
3.4.3 Bioestimulação.....	26
3.5 ÍNDICE EMULSIFICANTE	27
3.6 PETRÓLEO	29
3.6.1 Produtos obtidos a partir do petróleo.....	30
3.6.2 Óleo Diesel	31
3.7 HIDROCARBONETOS BTEX PRESENTES NO DIESEL	31
3.7.1 Benzeno.....	32
3.7.2 Tolueno.....	33
3.7.3 Etilbenzeno.....	33
3.7.4 Orto-, meta- e para-xileno.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 COLETAS DO SOLO.....	37
4.1.1 Local de coleta do solo com histórico de contaminação	37
4.1.2 Local de coleta do solo sem histórico de contaminação	38

4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE DIESEL	39
4.2.1 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados coletados do solo com histórico de contaminação	39
4.2.2 Preparo dos consórcios microbianos isolados com diesel	40
4.2.3 Preparo do consórcio contendo soro de leite	40
4.2.4 Diluição seriada e contagem dos microrganismos	41
4.2.5 Preparo das cápsulas com consórcios microbianos	42
4.3 DEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO	44
4.3.1 Respirometria	44
4.4 ÍNDICE EMULSIFICANTE	46
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA	46
4.5.1 Obtenção de massa celular	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Isolamento dos consórcios microbianos	49
5.1.1 Diluição seriada	50
5.1.2 Caracterização do soro de leite	50
5.2 RESPIROMETRIA	52
5.2.1 Análise estatística	53
5.3 ÍNDICE EMULSIFICANTE	57
5.4 EXTRAÇÃO DE DNA	60
5.4.1 Obtenção de massa celular	60
6 CONCLUSÃO	62
7 REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O petróleo foi uma descoberta valorosa especialmente para as indústrias, pois por meio de suas propriedades é possível produzir muitos outros produtos derivados que são distribuídos a diversos valores e contribuem para a economia. Os combustíveis para automóveis e transportes rodoviários são os derivados de petróleo mais conhecidos e comercializados mundialmente, dentre eles a gasolina e o diesel.

No entanto, a indústria petrolífera é uma das fontes de muitos impactos ambientais causados ao solo, ar e água. A alta exploração e exportação de petróleo acarreta em alguns impactos ambientais devido a sua composição tóxica, falhas na hora do manuseio dos processos que causam derramamentos que prejudicam o solo e podem ainda contaminar a água superficial e subterrânea.

Estima-se que as etapas de extração, transporte e refino do petróleo são as que mais contribuem para a contaminação do solo e isto se aplica também aos vazamentos que ocorrem destes compostos durante todo o processo. São muitos os locais que contêm seus solos contaminados, pois é onde ocorre o transporte de petróleo e seus derivados e desta forma há um dispendioso investimento na tentativa de remediar tais lugares.

Os hidrocarbonetos são moléculas que contêm apenas carbono e hidrogênio em sua composição e os compostos formados por benzeno, tolueno, etil-benzeno e os xilenos - BTEX, advindos da fração monoaromática do petróleo e que são de grande dificuldade de remoção, devido a sua facilidade em aderir as partículas do solo.

A biorremediação surge como uma técnica capaz de recuperar solos contaminados por hidrocarbonetos sem dispendir grandes gastos. Utilizar microrganismos com potencial degradador desses contaminantes é algo que vem sendo empregado cada vez mais por pesquisadores a fim de descobrir alternativas ao tratamento destas áreas contaminadas.

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos objetivando métodos de tratar os solos contaminados por BTEX's. Os microrganismos são uma alternativa promissora que podem ser aplicados em tratamentos do solo, por possuírem capacidade de aproveitar determinados poluentes como fonte de alimentação.

Outra alternativa é identificar a capacidade que tais microrganismos possuem na produção de biossurfactantes, que são compostos anfífilicos, produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras e comumente encontrados em locais onde há presença de petróleo (LIMA, 2018).

A utilização de um consórcio de microrganismos é uma alternativa, visto que um conjunto de bactérias degradadoras pode ser mais eficaz do que aplicar apenas uma única espécie de microrganismo no local de estudo, porém o tratamento deste solo contaminado com tais microrganismos irá depender da sua capacidade de assimilação desses compostos.

Outra possibilidade é acrescentar ao consórcio algum tipo de bioestimulante, como por exemplo o soro de leite que é um subproduto da indústria de laticínios que muitas vezes não é aproveitado e torna-se um problema na hora do descarte devido ao volume que é elevado e assim o tratamento torna-se custoso. A incorporação do soro de leite é uma ideia nova que visa contribuir com nutrientes para estes consórcios, assim a degradação do diesel no solo tende a acontecer com maior agilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar um consócio de microrganismos bioestimulado com soro de leite para verificar sua eficácia na degradação de hidrocarbonetos de um solo sem histórico de contaminação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar microrganismos com capacidade de degradação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos;
- Coletar o solo de um local sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos para realizar o experimento;
- Preparar um consócio de microrganismos no soro de leite para verificar seu potencial de crescimento;
- Determinar o potencial de degradação de diesel através dos consórcios microbianos com e sem bioestimulação por meio da técnica da respirometria;
- Comparar os tratamentos com a inserção da concentração de diesel em 2% e 10%.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SORO DE LEITE

O soro de leite é um subproduto resultante da fabricação de queijo. Possui uma forma líquida e uma cor amarelada. O soro representa cerca de 75% dos sólidos que fazem parte do leite, além das próprias proteínas presentes no soro – cerca de 20%, compõem ainda lactose, vitaminas hidrossolúveis e minerais (LIMA et al., 2017).

O soro contém proteínas com uma surpreendente composição de aminoácidos com alta digestibilidade, ou seja, que pode ser digerido e biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais, logo é por este motivo que o soro de leite é caracterizado como de alto valor nutritivo e suas propriedades possuem capacidade emulsificante (LIMA et al., 2016).

No entanto, estudos apontam que cerca de 40% do soro de leite que o Brasil produz é descartado de maneira inapropriada, o que pode acarretar em problemas ambientais e danos à fauna e flora, visto que a sua demanda bioquímica de oxigênio - DBO é de 10 a 100 vezes superior a DBO do esgoto doméstico (NUNES et al., 2018).

Os benefícios que o soro de leite proporciona, deixam de ser aproveitados quando este é descartado de maneira inadequada no meio ambiente, se descartado no solo, o soro de leite prejudica as colheitas, pois a quantidade de matéria orgânica que ele possui danifica a estrutura físico-química do solo e se descartado na água, ele aumenta a sua turbidez e prejudica a presença microbiana ali existente (NUNES et al., 2018).

Desse modo, visando essas problemáticas que o soro de leite acarreta, vem sendo desenvolvidos estudos que possam sugerir tratamentos para os efluentes gerados antes do descarte e/ou opções de reaproveitar esse soro de leite em algum outro processo, de forma que ele não seja descartado no meio ambiente.

No tratamento de um solo contaminado com hidrocarbonetos, que é o caso deste estudo, o soro de leite atuará como um bioestimulante, ou seja, a fonte de carbono para os microrganismos isolados que forem inseridos no solo contaminado, objetiva –se que ele proporcione uma degradação mais eficaz dos componentes desse contaminante, visto a sua riqueza em matéria orgânica.

3.2 MICRORGANISMOS

De acordo com Madigan et.al (2016), a microbiologia é uma ciência a qual de se dedica a estudar os microrganismos e seu funcionamento, em particular as bactérias que são um grupo amplo de células pequenas.

A existência dos microrganismos na Terra ocorre há cerca de bilhões de anos, inclusive o surgimento deles é anterior ao das plantas e dos animais e sua fisiologia é também maior que a das plantas e animais (MADIGAN et al, 2016).

Microrganismos são constituídos por uma única célula e não é possível visualiza-los a olho nu, somente com o auxílio de um microscópio e eles podem ser encontrados na água, no ar, no próprio homem e no solo (CORIOLANO et al, 2016).

Os microrganismos exercem papel importante na indústria alimentícia e também podem ser aplicados na degradação de poluentes na técnica da biorremediação, onde por meio dela, a limpeza é acelerada pela introdução de tais microrganismos e existem ainda outras áreas da indústria, como por exemplo a microbiologia industrial, em que os microrganismos podem ser aproveitados na fabricação de produtos que possuem um alto valor comercial, como antibióticos, enzimas e diversos outros compostos químicos (MADIGAN et al, 2016).

Camacho (2015), relata que no ano de 1928 é que foi constatada a primeira degradação natural de BTEX em solos e tal degradação foi proporcionada pelos microrganismos e as pesquisas mostram que já foram encontradas mais de 245 espécies de bactérias em solos contaminados e que são aptas a degradar hidrocarbonetos e o gênero mais detectado são as *Pseudomonas* e que a utilização de microrganismos aplicados ao tratamento de solos – a biorremediação, é uma prática ainda bastante discutida no Brasil

Madigan et al (2016), explica ainda, que os tipos de bactérias são divididos em dois grupos, que são os *gram-positivos* e *gram-negativos* e que estes são diferenciados utilizando o método da coloração de Gram, que após ser efetuado, confere a cor roxo-violeta as gram-positivas e cor de rosa para as gram-negativas. A distinção de cores entre as bactérias é explicada devido a estrutura da parede celular da gram-negativa ser composta por duas camadas e da gram-positiva ser muito mais densa.

Padilha et al (2017), esclarece que as gram-negativas se comportam de forma diferente na presença de hidrocarbonetos, em relação as gram-positivas e relata ainda que grande parte das bactérias encontradas em ambientes contaminados por BTEX são do grupo gram-negativas e assim ele sugere que a característica da parede celular favoreça a

sobrevivência dessas populações nesse ambiente de estresse e tal fato se explica devido a composição da parede celular da gram-negativa, visto que ela é composta por duas camadas e assim proporciona maior proteção, além de dificultar a introdução no interior da célula.

De acordo com Coriolano et al (2016), os microrganismos possuem essencial participação na formação dos hidrocarbonetos, visto que a geração do petróleo advém de restos de matéria orgânica de origem animal ou vegetal depositadas ao fundo de lagos e rios e com o passar do tempo estes restos são sobrepostos por mais camadas de sedimentos e com a ação de microrganismos e bactérias e a junção da alta pressão e temperatura, este compósito é transformado em hidrocarboneto.

3.3 O SOLO

O solo é um agrupamento entre os variados geossistemas do planeta e está em uma contínua ação de fluxos de matéria e energia. Dessa forma, o solo evolui de maneira ininterrupta no ambiente em que se encontra.

A formação do solo se inicia por meio de ações do intemperismo, assim, a matéria orgânica vai se depositando em camadas e desta maneira se compõem os horizontes do solo, como mostra a figura 1 a seguir. O processo de formação do solo é lento e pode levar cerca de 400 anos para desenvolver 1 cm de solo (EMBRAPA, 2019).

Figura 1. Horizontes do solo.



Fonte. Google, 2019

3.3.1 LATOSSOLO DISTROFÉRRICO VERMELHO

De acordo com o Manual técnico de pedologia (IBGE, 2007), os solos do tipo latossolo vermelho distroférrico, possuem uma homogeneidade considerável ao longo do seu perfil, são drenados e a sua tonalidade é de um vermelho escuro e de estrutura granular e assemelha-se ao pó de café. A figura 2 abaixo mostra uma imagem deste solo no ponto de coleta na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Francisco Beltrão.

Figura 2. Modelo de latossolo vermelho distroférrico



Fonte: Autoria Própria, 2017

Este tipo de solo, apresenta ainda uma relativa riqueza em micronutrientes. São originados de rocha básica e sua ocorrência no País em especial na bacia do Paraná. Possuem excelente potencial agrícola, destacando-se a grande diversidade de produção de grãos na região Sul do Brasil (IBGE, 2007).

3.4 BIORREMEDIAÇÃO

A utilização de microrganismos biodegradadores aplicados em locais contaminados com o intuito de reduzir estes impactos, é um procedimento conhecido como biorremediação. É uma técnica que vem sendo amplamente utilizada pelo fato de ser viável ao modificar compostos químicos de alta complexidade em compostos mais simples de serem degradados por estes microrganismos (PADILHA, et al, 2017).

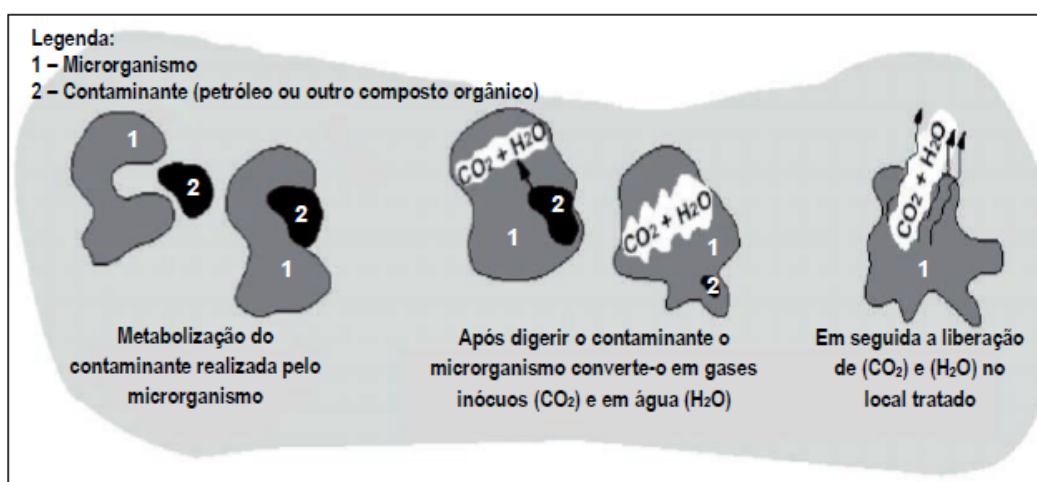
A biorremediação do solo pode ser realizada no local onde ocorreu a contaminação, a este tipo de tratamento dá-se o nome de biorremediação *in-situ*, por outro lado, se esta for realizada fora do local de origem do solo contaminado chama-se biorremediação *ex-situ* (MORAES et al., 2016).

A biorremediação em ambientes contaminados por petróleo ou derivados, pode ser restrita devido a inaptidão dos microrganismos de converter estes poluentes em outros menos agressivos ao meio ambiente e isso pode ocorrer por circunstâncias ambientais adversas a sobrevivência do microrganismo. (ARAÚJO, 2017).

Para que a biorremediação possa ocorrer de forma mais eficiente é importante que sejam observados alguns fatores, tais como temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio e nutrientes. (CORIOLANO e FILHO, 2016).

A figura 3 abaixo demonstra de forma resumida como ocorre o processo de biorremediação com a ação do microrganismo.

Figura 3. Atividade do microrganismo durante a biorremediação



Fonte: Adaptado de Coriolano e Filho (2016)

A biorremediação pode ser vista como um meio de refinar a biodegradação e ela possui três intermediários: Biorremediação por atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação.

3.4.1 Atenuação natural

Ocorre sem a adição de microrganismos. Observa-se no período de tratamento se os microrganismos presentes no solo são capazes de degradar o contaminante presente de forma natural sem a adição de nutrientes, desta forma a sua única fonte de carbono será o próprio contaminante.

3.4.2 Bioaugmentação

Dentre as técnicas de biorremediação está a bioaugmentação que consiste em incorporar microrganismos selecionados para degradar cadeias de hidrocarbonetos em um composto natural contaminado. Os microrganismos que são inseridos podem ser derivados de algum consórcio que já tem seu potencial de degradação dos contaminantes comprovado ou podem ser adaptados para serem introduzidos neste tipo de ambiente e com este histórico de contaminação (DEON et al., 2012 e POI et al., 2017).

3.4.3 Bioestimulação

A bioestimulação objetiva aumentar as comunidades de microrganismos através da introdução de nutrientes que podem ser fosfatos e nitratos, de modo que sejam fertilizantes orgânicos ou mesmo inorgânicos na área contaminada de estudo. Com o aumento da população microbiana a degradação do contaminante tende a ser mais rápida (POI et al., 2017 e DEON et al., 2012).

3.5 ÍNDICE EMULSIFICANTE

Diversos microrganismos como as bactérias, arqueas, leveduras e fungos filamentosos são capazes de produzir os biossurfactantes e esta produção se dá a partir de substratos que são insolúveis em água (LIMA, 2018).

Biossurfactantes são compostos biológicos anfífilicos, que possuem uma parte apolar – que não interagem com a água e outra polar – que interage com a água, geralmente em locais onde há grandes concentrações de petróleo e seus derivados, é possível encontrar microrganismos geradores de biossurfactantes. (LIMA, 2018).

Bueno (2008), relata que os biossurfactantes gerados pelos microrganismos apresentam estrutura química variada e esta pode ser de alto ou baixo peso molecular, sendo geralmente Glicolipídios os de baixo peso e os de alto peso caracterizados por Biopolímeros e estes estão associados a emulsão.

A emulsão é um composto heterogêneo, expressa-se por meio de um líquido imiscível e inteiramente difuso em outro por forma de gotículas e estas demandam energia para que estas gotículas permaneçam dispersadas na fase contínua (LEONEL et al, 2015).

Por meio dos surfactantes, a remoção de poluentes em ambientes naturais, como os hidrocarbonetos, torna-se um procedimento natural (SILVA et al, 2017).

Quando ocorrem derramamentos de petróleo no meio ambiente, é por meio dos biossurfactantes que estes são dispersados na água ou no solo de forma que ele fique biodisponível para os microrganismos promoverem a degradação e este regime de degradação acontece naturalmente no meio ambiente e pode suceder-se em degradação integral do contaminante ou modificação em produtos inofensivos (SILVA et al, 2017).

A capacidade de utilização de um biossurfactante é embasada em suas propriedades funcionais que vão incluir a emulsificação, separação, solubilização, desmulsão, redução da viscosidade líquida e da tensão superficial e estas propriedades se empregam em esferas da indústria de alimentos, têxteis, papéis, bebidas, farmacêuticas, cosméticos e agrícola (LIMA et al, 2018).

De acordo com Kreischer e Silva (2017), os surfactantes que agem como emulsificantes são os intermediários na dispersão de um líquido em outro, como a água em óleo e estes compostos químicos que influem nas tensões superficiais e interfaciais são aptos a desenvolverem micro emulsões, de forma que os hidrocarbonetos possam se solubilizar em água e vice-versa e desta maneira a degradação é facilitada.

Decesaro et al (2015), explica que os animais, as plantas e os microrganismos podem gerar os biossurfactantes, mas que a produção se apresenta mais favorável por meio das bactérias, leveduras e fungos e que os biossurfactantes são bem semelhantes as surfactantes sintéticos, entretanto o diferencial está justamente na sua biodegradabilidade e mínima toxicidade para o meio ambiente.

3.6 PETRÓLEO

A contar da antiguidade o petróleo já era aplicado em algumas atividades. Em determinadas regiões o seu surgimento já ocorria de forma natural, regiões tais como o Oriente Médio, em que os povos utilizavam o petróleo para fixar pedras e ladrilhos, engraxar couros e mais à frente era empregado para lubrificar as rodas de carruagens e devido a algumas propriedades antissépticas que possui era manuseado também como cicatrizante, no tratamento da surdez, bronquite, tosse, reumatismo (MBP COPPE/ UFRJ).

A partir do ano de 1850 é que se deu efetivamente o início da comercialização do petróleo, quando foi aplicado na cura de uma doença e a partir de então vendido a cerca de um dólar como uso medicinal (MBP COPPE/ UFRJ).

Em 1859 houve a primeira extração de petróleo do subsolo comandada pelo Coronel Drake, a broca atingiu uma fenda de 23 metros e com esta profundidade foi possível deslizar cerca de mais uns 15 centímetros e a partir daí era visível o líquido escuro na superfície da água. Deu-se então origem ao famoso petróleo que inovou a indústria (MBP COPPE/ UFRJ).

O petróleo possui em sua composição óleo, é inflamável, com densidade comumente menor que a água, possui um odor característico e cor diversa. Em resumo, é uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. Pode conter ainda a presença de nitrogênio e oxigênio, além de compostos de íons metálicos e de enxofre (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO – ANP, 2018).

A teoria de sua origem é caracterizada pelo acúmulo de matéria orgânica em condições específicas de pressão e através do isolamento de camadas do subsolo que com o decorrer de milhares de anos sofreu transformações dando origem a esta substância (ANP, 2018)

Para extraí-lo utiliza-se equipamentos próprios, pois este fica aprisionado em rochas porosas e tais equipamentos precisam ser capazes de perfurar as camadas destas rochas de forma que o petróleo chegue até a superfície. Sua extração requer recursos financeiros e técnicos e desta maneira nem sempre pode ser considerada viável, dependendo da dificuldade de acesso (ANP, 2018).

A tabela 1 abaixo descreve uma distribuição das proporções presentes no petróleo.

Tabela 1. Elementos que compõem o petróleo.

Elemento	%	Descrição
Carbono	82	Predominante no petróleo
Hidrogênio	12	Atua com o carbono na formação de moléculas
Nitrogênio	4	Encontrado como amina
Oxigênio	1	Encontra-se muito pouco
Sais	0,5	Raramente encontrados
Metais (ferro, cobre...)	0,5	Apontados como resíduos

Fonte: Adaptado de Agência Nacional do Petróleo, 2018.

3.6.1 Produtos obtidos a partir do petróleo

O petróleo em sua forma bruta é uma mistura complexa de hidrocarbonetos que são separados através de processos de refinamento a fim de que possam ser utilizados pelas indústrias e os consumidores. Inicialmente aquece-se o petróleo e as cadeias de hidrocarbonetos são separadas conforme as taxas de temperatura e ebulição de cada uma.

A partir dos processos de refino do petróleo pode se obter alguns produtos conforme elencados na tabela 2.

Tabela 2. Produtos à base de petróleo

Produto	Aplicação
Gás residual	Utilizado para aquecimento e para a indústria
Gás liquefeito (GLP)	Gás de cozinha
Gasolina	Combustível
Querosene	Combustível para turbinas a jato e outras aplicações
Óleo lubrificante	Lubrificação de motores e engrenagens/ matéria prima para graxas
Óleo Diesel	Combustível principal para transporte rodoviário/ Utilizado em termoeletricas e para aquecimento

Fonte: Adaptado de Agência Nacional do Petróleo, 2018.

3.6.2 Óleo Diesel

O óleo diesel é obtido por meio do petróleo e em sua composição existe hidrocarbonetos, cerca de 13 a 18 carbonos, em concentrações menores possui frações de nitrogênio, enxofre e oxigênio. É utilizado principalmente para o transporte rodoviário e aquaviário e em motores de ciclo diesel e em termoelétricas (ANP, 2018).

Possui propriedades de inflamabilidade, medianamente tóxico, volátil e com odor forte e característico. Acarreta um problema para o meio ambiente quando ocorre o vazamento dos tanques de armazenamento ou através de derramamentos acidentais que podem atingir o solo afetando a sua microbiota e os lençóis freáticos, ocasionando problemas nos cursos d'água.

Quando ocorrem vazamentos de óleo diesel, antes de realizar a remoção é necessário que seja efetuada uma mediação de limpeza do local, visto que este pode perdurar nos costões, estruturas, sedimentos de praia, entre outros locais que ocorram derramamentos, por cerca de seis a sete dias ou mesmo vários anos, variando de acordo com o volume que foi derramado (ARAÚJO, 2017).

3.7 HIDROCARBONETOS BTEX PRESENTES NO DIESEL

Os hidrocarbonetos BTEX são compostos formados por benzeno, tolueno, etil-benzeno e os xilenos, advindos da fração monoaromática do petróleo. São largamente utilizados pela indústria petrolífera e fazem parte da composição de combustíveis utilizados para abastecer os veículos como o diesel e a gasolina.

Os BTEX representam um problema para o meio ambiente devido a sua composição tóxica e pela facilidade que ele possui de volatilizar, diluir e desta forma aderir as partículas do solo e se mover facilmente na água, além de causar efeitos nocivos à saúde humana em virtude da sua toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (PADILHA, et al, 2017).

Camacho (2015), relata que quando ocorre a biodegradação anaeróbia, os BTEX são os que concedem elétrons e também são eles a fonte de carbono, porém essa degradação é moderada devido a ociosidade de receptores de elétrons, como o nitrato, sulfato, dióxido de carbono ou ferro (III).

3.7.1 Benzeno

O benzeno (C_6H_6) é volátil, incolor e possui uma densidade¹ de $0,87 \text{ g.cm}^{-3}$, além de ser inflamável. Sua formação se dá através de processos naturais e antropogênico.

Os incêndios florestais e emissões gasosas de vulcões, constituem fontes naturais de benzeno e estas favorecem a presença deste no meio ambiente. As atividades de fabricação de detergentes, tintas, pigmentos e alguns produtos químicos favorecem a emissão de benzeno para o meio. No entanto a emissão originária das indústrias petroquímicas, a transferência de combustível para o veículo no momento do abastecimento e a própria emissão veicular são os principais fatores da difusão de benzeno para a atmosfera (CETESB, 2016).

A agência ambiental dos Estados Unidos (USEPA) classifica o benzeno como carcinogênico para as pessoas e destaca que a exposição a este ocasiona danos ao sistema imunológico (com alteração aos níveis de anticorpos que o corpo possui) e se a exposição for a curto prazo pode provocar tontura, sonolência, dores de cabeça e perda de consciência e a Organização Mundial da Saúde (OMS), destaca que não há nenhum nível de exposição a este poluente que possa ser considerado como seguro (Cetesb, 2016).

A utilização do benzeno está proibida desde 01 de janeiro de 1997, exceto para as indústrias e laboratórios que o produzem, utilizam em processos de síntese química, empreguem nos combustíveis derivados de petróleo e o empreguem na investigação ou análises de trabalhos realizados no laboratório (NORMA REGULAMENTADORA - NR 15, 2019).

O benzeno possui três vias de degradação anaeróbia:

- Hidroxilação do anel benzênico, resultando no fenol como produto, seguido da acetofenona;
- Metilação do benzeno, resultando no metilbenzeno (tolueno);
- Carboxilação do anel que resulta no benzoato ou ácido benzoico.

Todavia, estas três vias encaminham-se ao mesmo intermediário que é o benzoil-coA, que é uma molécula participante do ciclo metabólico do ácido nítrico (CAMACHO, 2015).

¹ Densidade estabelece a quantidade de matéria existente em uma unidade de volume.L

3.7.2 Tolueno

O tolueno (C_7H_8) é líquido, volátil, incolor e assim como o benzeno, inflamável, sua densidade está em $0,86 \text{ g.cm}^{-3}$. Advém principalmente da emissão dos combustíveis fósseis e faz parte da composição da gasolina, é empregado na produção de benzeno e pode ser utilizado como solvente. A produção de produtos industriais e a utilização em residências de thinners, adesivos e esmalte de unha, contribuem para a emissão do tolueno (CETESB, 2016).

O ser humano e os animais quando exposto ao tolueno pode ter o sistema nervoso central acometido e se a exposição for intensa acarreta em ardência nos olhos, irritação no trato respiratório superior, dor de garganta, dor de cabeça e tonturas. A OMS recomenda que a exposição ao tolueno em uma média de 30 minutos deve se manter em uma concentração abaixo de $1000 \mu\text{g/m}^3$ (CETESB, 2016).

A norma regulamentadora NR 15 estabelece o limite de tolerância de 78 ppm^2 e 290 mg/m^3 em até 48 horas de exposição por semana e grau médio de insalubridade (NR 15, 2019).

Para a biodegradação do tolueno, Camacho (2015) orienta que se estude o benzilsuccinato ou ácido benzilsuccínico e os seus homólogos metilbenzilsuccinatos, que se formam por meio da reação com o fumarato perante condições anaeróbias.

3.7.3 Etilbenzeno

O etilbenzeno (C_8H_{10}) é líquido, incolor e volátil e apresenta uma densidade de $0,867 \text{ g.cm}^{-3}$, possui um odor análogo ao da gasolina. O petróleo e produtos manufaturados como as tintas de impressão, tintas e inseticidas possuem etilbenzeno, além de ser utilizado na fabricação de acetato de celulose e de borracha sintética. Utiliza-se etilbenzeno como solvente na indústria de borracha e sua produção pode se dar a partir de combustões incompleta de materiais em incêndios florestais e está presente na fumaça do cigarro.

A exposição intensa ao etilbenzeno ocasiona problemas respiratórios, irritação dos olhos e garganta e tonturas. A USEPA não o classifica como carcinogênico para humanos (CETESB, 2016). Porém a Norma regulamentadora NR 15 estabelece os limites de tolerância

² Ppm – partes de vapor ou gás por milhão de partes. mg/m^3 – miligramas por metro cúbico de ar.

de 78 ppm³ e 340 mg/m³ em até 48 horas de exposição por semana e grau médio de insalubridade (NR 15, 2019).

Na biodegradação do etilbenzeno ocorre a hidroxilação, mas esta é distinta do benzeno, pois acontece na cadeia alifática e forma o 1-feniletanol e por meio e uma outra via é acrescentada uma molécula de fumarato, a qual origina o 1-fenil-etil succinato (CAMACHO, 2015).

3.7.4 Orto-, meta- e para-xileno

Xileno (C₈H₁₀) é um termo que se refere a três isômeros⁴, que são o orto-xileno, meta-xileno e para-xileno e diferenciam-se pela sua posição relativa dos grupos metila. O meta xileno é prevalente encontrado no xileno comercial, cerca de 40% a 65% e o orto e para-xilenos na ordem de 20%. O xileno é líquido, incolor, inflamável, quase insolúvel em água e possui um odor adocicado.

Encontra-se xilenos na indústria de petróleo, em fragrâncias sintéticas e na fabricação de tintas, borrachas e vernizes. Na produção de ácido benzoico, anidrido ftálico e ácido tereftálico o xileno é aplicado como matéria prima e solvente e tais indústrias lançam xilenos na atmosfera através de emissões fugitivas, porém a emissão veicular, os incêndios florestais e a volatilização dos solventes também são responsáveis por tais emissões.

Inalar xileno ou ficar exposto de forma aguda ocasiona irritação nos olhos, garganta e nariz, além de provocar efeitos gastrointestinais e neurológicos, se a exposição for crônica pode afetar o sistema nervoso central, causando dores de cabeça, fadiga, tonturas e tremores, mas isto vai variar da concentração em que o indivíduo for exposto. A USEPA não o classifica como carcinogênico para humanos (CETESB, 2016). Já a norma regulamentadora também estabelece para o xileno o limite de tolerância de 78 ppm⁵ e 340 mg/m³ em até 48 horas de exposição por semana e grau médio de insalubridade (NR 15, 2019).

A biodegradação dos xilenos, Camacho (2015) também indica que se estude o benzilsuccinato ou ácido benzilsuccínico e os homólogos (2,3 ou 4 – metilbenzilsuccinato), que se formam por meio da reação com o fumarato perante condições anaeróbias.

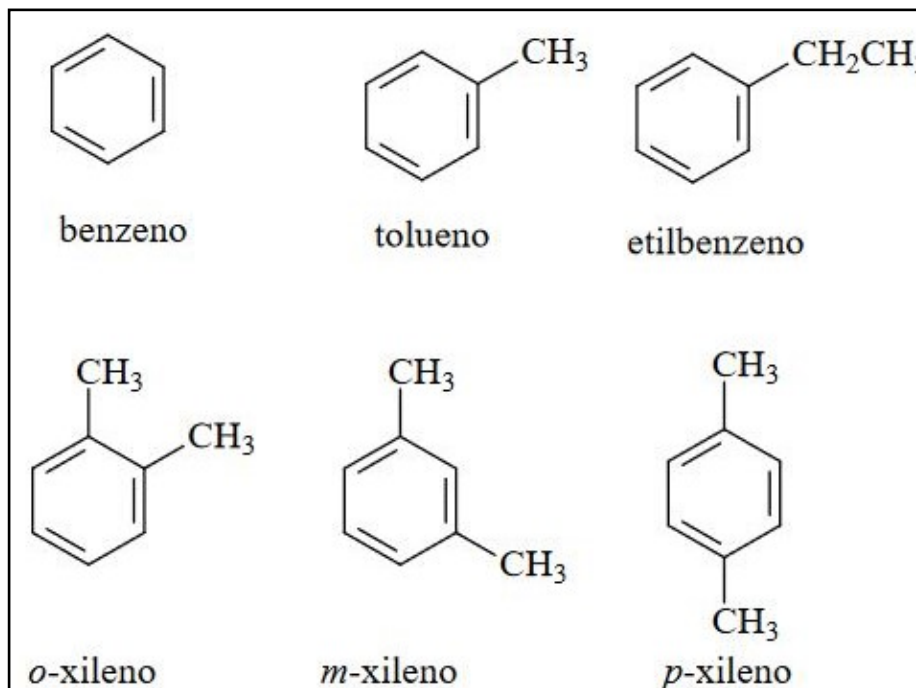
³ Ppm – partes de vapor ou gás por milhão de partes.mg/m³ – miligramas por metro cúbico de ar.

⁴ Isômeros são duas ou mais substâncias com a mesma fórmula molecular, porém com diferentes fórmulas estruturais.

⁵ Ppm – partes de vapor ou gás por milhão de partes.mg/m³ – miligramas por metro cúbico de ar.

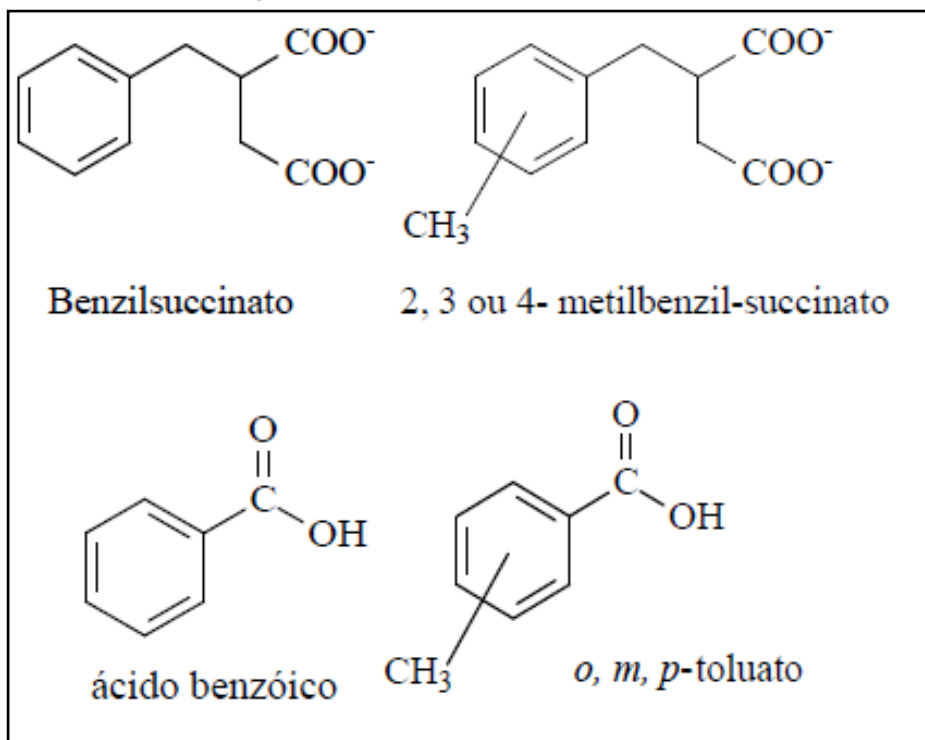
Na fase de conclusão da biodegradação de todos esses compostos dos BTEX, é criado o ácido benzoico. As figuras 4 e 5 abaixo mostram as estruturas destes compostos tratados neste trabalho.

Figura 4. Estrutura dos BTEX



Fonte: Adaptado de Camacho, 2015.

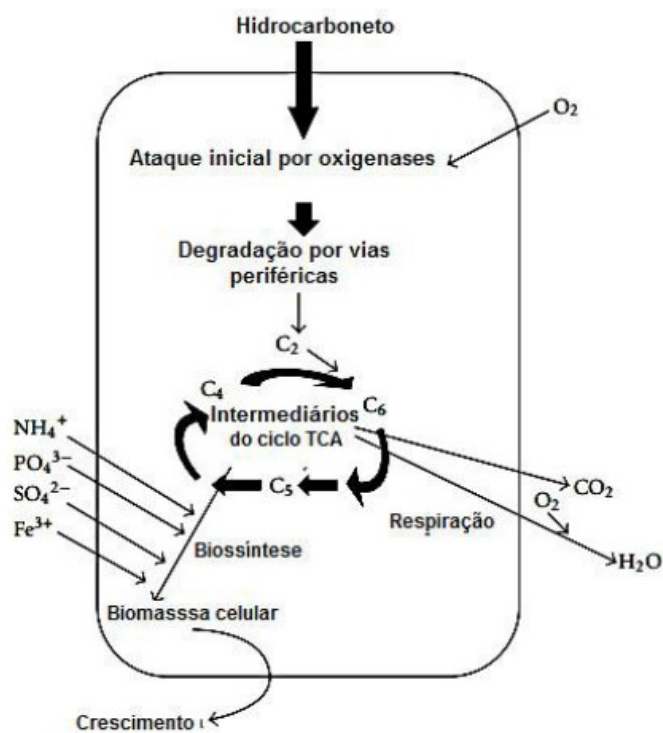
Figura 5. Estrutura dos metabólitos



Fonte: Adaptado de Camacho, 2015.

Na sequência a figura 6 exemplifica como ocorre o processo de degradação aeróbia de hidrocarbonetos de petróleo, a qual em um primeiro momento necessita de reações enzimáticas de ativação e incorporação de oxigênio (ARAÚJO, 2017).

Figura 6. Sistema de degradação aeróbia de hidrocarbonetos de petróleo



Fonte: Adaptado de Araújo, 2017.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As metodologias utilizadas para a realização deste estudo, foram desenvolvidas nos laboratórios de Microbiologia e de Solos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Nesta etapa, todo material que adentrou em contato com os microrganismos, foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C, por 15 minutos.

4.1 COLETAS DO SOLO

4.1.1 Local de coleta do solo com histórico de contaminação

A coleta do solo foi realizada em março de 2017, o local escolhido possui histórico de contaminação por diesel, originado do abastecimento de veículos na propriedade rural localizada no município de Francisco Beltrão – PR, como mostra a figura 7.

Figura 7. Local de coleta do solo com histórico de contaminação por hidrocarbonetos.



Fonte: Shimabukuro, 2017

A coleta de solo foi realizada a uma profundidade de 0 a 15 cm, por ser o local de maior concentração de população microbiana, pois o horizonte A é a camada com mais microbiota como mostra a figura 6 e o solo foi coletado em três pontos distintos. Coletou se um total de 15kg de solo contaminado com diesel e estas amostras foram armazenadas em sacos plásticos e conduzidas ao laboratório da UTFPR – FB em temperatura ambiente.

No laboratório as amostras foram peneiradas a fim de retirar os sólidos grosseiros presentes e na sequencia as amostras foram misturadas para que se tornassem uma amostra homogênea.

4.1.2 Local de coleta do solo sem histórico de contaminação

O solo para a realização do experimento foi coletado nas dependências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, um local sem histórico de contaminação.

Foram coletados cerca de 5 Kg de solo e levados ao laboratório de solos da universidade, onde foi realizado o peneiramento do solo através das peneiras e a porção grosseira do solo foi descartada. A figura 8 mostra o local da coleta e a figura 9 mostra o equipamento utilizado para peneirar e deixar este solo o mais homogêneo possível.

Figura 8. Local da coleta do solo utilizado no experimento



Fonte: Autoria própria, 2017

Figura 9. Equipamento utilizado para peneirar o solo



Fonte: Autoria própria, 2017

4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE DIESEL

4.2.1 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados coletados do solo com histórico de contaminação

Para esta parte do experimento foi utilizado o livro de *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* de Alef e Nannipieri (1995).

Após homogeneizadas as amostras preparou-se uma solução com 0,5% de NaCl e 5% da amostra de solo. Retirou-se uma alíquota de 0,1 mL desta solução e foi pipetado em placas de Petri com 20 mL de meio de cultura. Inoculou-se em 60 placas de Petri esta solução com meios de cultura distintos: ágar nutriente (A.N), batata dextrose ágar (BDA) e meio solo que foram primeiramente esterilizadas em autoclave a 121° por 15 minutos a fim de evitar quaisquer contaminações. Na sequência da inoculação incubou-se as placas a 30° C por 24 horas. Das colônias que cresceram e mostraram diferenças visuais em sua morfologia, como aspecto, tamanho e coloração, foram repicadas em placas de Petri com meio ágar nutriente.

Submeteu-se os microrganismos isolados a um meio seletivo com meio mineral Tanner, que é uma solução de micronutrientes e 100 µL de diesel que era a única fonte de carbono, e nestas condições, as culturas que mostraram potencial de degradação foram

conduzidas as análises fenotípicas através da coloração de Gram e as análises de morfologia: cor e aspecto das colônias. Na sequência destas análises repicou-se estes microrganismos em ágar nutriente e incubou-os por 24 horas a 28°C e em seguida armazenados a 4°C.

4.2.2 Preparo dos consórcios microbianos isolados com diesel

Foram 12 isolados deste solo e integrados em meio líquido utilizando erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral e 1000 µL de diesel sendo o diesel a única fonte de carbono. A partir das colônias em meio sólido, cada cultura isolada foi utilizada como inóculo e com o auxílio de uma alça de platina que foi previamente flambada no bico de Bunsen é que as cepas foram retiradas das placas e adicionadas aos erlenmeyers.

O consórcio permaneceu sob agitação na mesa agitadora a 150 rpm e em temperatura ambiente por cerca de 48 horas, como mostra a figura 10.

Figura 10. Mesa agitadora com os consórcios microbianos



Fonte: Autoria própria, 2017

4.2.3 Preparo do consórcio contendo soro de leite

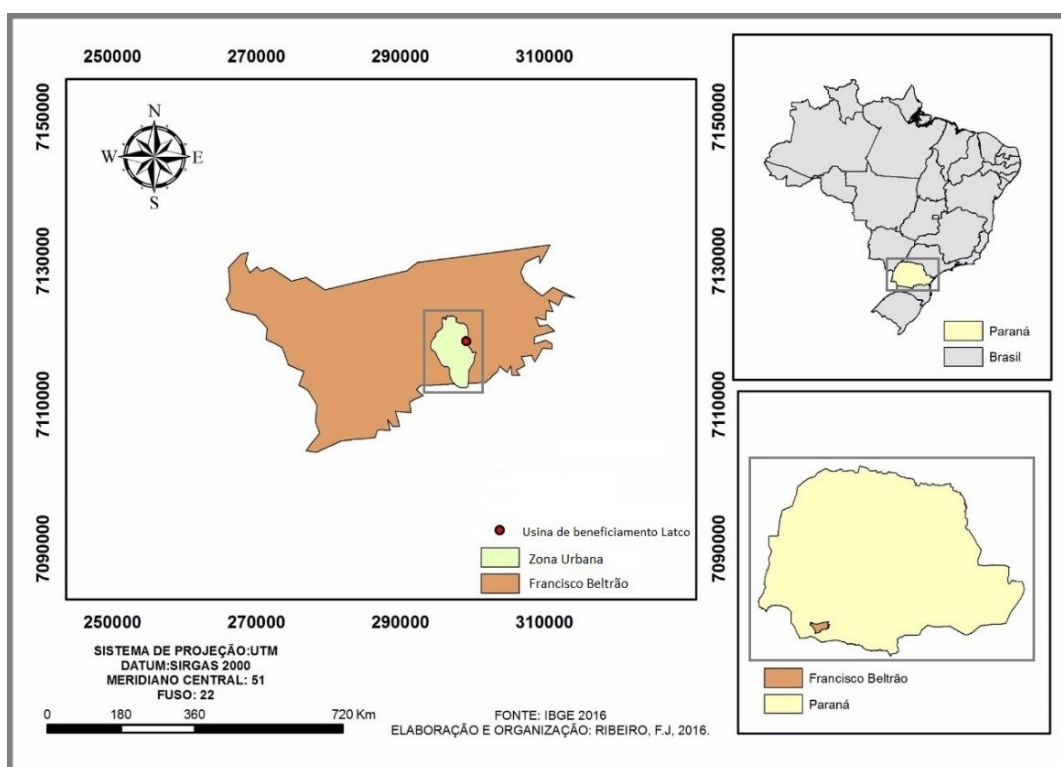
O soro de leite utilizado neste experimento foi cedido por uma indústria de laticínios localizada no município de Francisco Beltrão, como mostra a figura 11 abaixo.

Foi coletado 5L de soro de leite e os próprios funcionários da empresa que realizaram esta coleta.

Após chegar ao laboratório da universidade, a amostra foi armazenada na geladeira para posteriormente ser autoclavada e utilizada no experimento.

Para o preparo deste consórcio foi adicionado 50 mL de soro de leite autoclavado e 1 mL de diesel, juntamente com os 12 isolados e este consórcio também permaneceu em agitação a 150 rpm e temperatura ambiente por 48 horas. Nesta etapa do experimento, além do diesel como fonte de carbono há também o soro de leite como nutriente para as bactérias.

Figura 11. Localização da empresa.



Fonte: IBGE, 2019

4.2.4 Diluição seriada e contagem dos microrganismos

Após o preparo dos consórcios se faz necessário realizar a contagem de quantos microrganismos estão presentes em cada consórcio a fim de se obter uma base da quantidade que será incorporada ao solo e assim definir qual será o melhor tratamento.

Para esta diluição, utilizou-se a metodologia presente em Madigan et al. (2016), em que são utilizados 1000 µL de cada consórcio em 5 tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina em cada um (tubos e solução autoclavados), após adicionar o consórcio foi necessário

homogeneizar a solução cerca de 8 a 9 vezes com a própria pipeta ou com o auxílio do aparelho vórtex e desta retirou-se uma alíquota de 1000 μL e passou para o segundo tubo e assim sucessivamente até o 5° tubo, sempre retirando 1000 μL do tubo anterior, desta forma se dará uma diluição de valores 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Em seguida foi plaqueada uma alíquota de 100 μL dessas diluições em duplicata ou triplicata e incubada na BOD por 24 horas e após este prazo procedeu-se a contagem dos microrganismos presentes em cada consórcio.

Lembrando que as diluições podem ser realizadas em valores maiores, porém geralmente não se faz necessário plaquear todas, pois as que contém maior quantidade de microrganismos não vão dar contagem nas placas, visto que só se conta placas entre 30 e 300 colônias.

4.2.5 Preparo das cápsulas com consórcios microbianos

Para preparar as cápsulas foram utilizados os seguintes materiais:

- Bomba peristáltica;
- Substância geleificante;
- Solução de cloreto de cálcio anidro puríssimo;
- Alginato de sódio.

Preparou-se uma substância geleificante e a cultura microbiana. Com o auxílio da bomba peristáltica a amostra passa e ao entrar em contato com o líquido geleificante, esta se solidifica formando cápsulas (figura 12) que posteriormente serão adicionadas ao solo contaminado com diesel.

Figura 12. Cápsulas contendo alginato de sódio e consórcios microbianos.



Fonte: Autoria própria, 2018

A tabela 3 abaixo exemplifica as quantidades que foram utilizadas para a confecção destas cápsulas.

Tabela 3. Confecção de cápsulas microbianas

Composto	Consórcio Bactéria	Consórcio Soro de leite Bactéria
Alginato de sódio (g)	0,4	0,4
Cloreto de Cálcio (g)	3,325	3,325
Quantidade de consórcio (mL)	20	20
Quantidade de meio tanner (mL)	2	6
Rendimento (g)	23	19

Fonte: Autoria própria, 2018

4.3 DEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO

Para o preparo do experimento separou-se 39 frascos (Figura 13) que são hermeticamente fechados, contendo os tratamentos em triplicata, pesou-se 100 g de solo sem histórico de contaminação e adicionou aos frascos, juntamente com a solução de NaOH a 1mol para captura do CO₂ liberado e um copinho com água ao fundo para manutenção da umidade.

Figura 13. Experimento da respirometria.



Fonte: Autoria própria, 2018

4.3.1 Respirometria

A análise respirométrica é realizada para verificar as atividades metabólicas dos microrganismos presente no solo. A metodologia utilizada é de Silva et al., 2007

O princípio do método é que no frasco já com as 100 gramas de solo, um copo descartável pequeno de 50 mL na base do frasco contendo água e um copo na parte superior do frasco através de um suporte de arame contendo uma solução de 10 mL de NaOH a 1mol e que na retirada será titulada com HCL. Para a titulação adiciona-se 2 mL cloreto de bário a 10% na solução de NaOH e algumas gotas de indicador fenolftaléina e titula-se com HCl a 1 mol até observar a mudança de coloração de rosa para o incolor.

A expressão dos resultados para verificar a liberação de CO₂ se dará pela equação 1 abaixo.

$$\text{RBS (mg de C- CO}_2\text{ kg}^{-1}\text{ solo hora}^{-1}) = (((\text{VB} - \text{VA}) \cdot \text{M.6.1000}) / \text{Ps/T})$$

Em que:

- RBS = Carbono da respiração basal no solo;
- Vb = volume de HCl gasto na titulação da solução controle branco;
- Va = volume gasto na titulação da amostra;

- M = molaridade exata do HCL;
- Ps (g) = massa de solo seco;
- T = tempo de incubação da amostra.

4.3.2 Tratamentos da análise respirométrica

Para a análise respirométrica foram realizados 12 tratamentos que estão elencados na tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Tratamentos da análise respirométrica

Controles	Tratamentos 2%	Tratamentos 10%
Branco		
Solo + diesel 2%	Bactéria	Bactéria
Soro + diesel 2%	Soro Bactéria	Soro Bactéria
Solo + diesel 10%	Cápsula Bactéria	Cápsula Bactéria
Soro + diesel 10%	Cápsula Soro Bactéria	Cápsula Soro Bactéria

Fonte: Autoria própria, 2018

O objetivo é além de avaliar a degradação com o soro de leite como bioestimulante e os tratamentos sem o soro de leite, apenas com o diesel como fonte de carbono, é analisar ao mesmo tempo os dados de forma comparativa de acordo com a concentração de diesel que foi inoculado nos tratamentos, ou seja, as quantidades de 2% e 10%.

A tabela de nº 5, mostra as quantidades de cada material nos frascos da análise respirométrica.

Tabela 5. Tratamentos da análise respirométrica e quantidade de microrganismos inoculados

Tratamento 2%	Inoculação	Tratamento 10%	Inoculação
Branco	-	-	-
Solo + Diesel	-	Solo + Diesel	-
Soro + Diesel	-	Soro + Diesel	-
Bactéria	10^7 UFC . mL ⁻¹	Bactéria	10^7 UFC . mL ⁻¹
Soro Bactéria	10^7 UFC . mL ⁻¹	Soro Bactéria	10^7 UFC . mL ⁻¹
Cápsula bactéria	0,44 g	Cápsula bactéria	0,44 g
Cápsula Soro bactéria	0,44 g	Cápsula Soro bactéria	0,44 g

Fonte: Autoria própria, 2018

4.4 ÍNDICE EMULSIFICANTE

Para a análise de índice emulsificante foi utilizada a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987). Foi transferido 5 mL do meio fermentado centrifugado para eppendorfs e acrescentou-se 5 mL de diesel, agitou a amostra em vórtex e após 24 horas de repouso em temperatura ambiente, foi calculada a porcentagem do índice emulsificante de acordo com a equação 2 abaixo:

$$\text{Índice emulsificante (\%)} = \frac{H_e}{H_t} * 100$$

Em que:

H_e = altura da emulsão (cm)

H_t = altura total da solução (cm).

O experimento foi realizado em triplicata.

O meio fermentado referido é o mesmo descrito no item 4.4.1 abaixo.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

4.5.1 Obtenção de massa celular

Precedente a extração de DNA, foi realizado um procedimento para que se obtivesse massa celular dos isolados de bactérias e desta forma obter uma extração de DNA satisfatória.

Foi preparado 10 mL de caldo nutriente em um erlenmeyer de 250 mL, a proporção de caldo nutriente são de 8g para 1litro. Preparou-se 1 erlenmeyer para cada isolado de bactéria, logo foram 12 erlenmeyers como mostra a figura 14.

Esta solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C, após aguardou esfriar e para cada erlenmeyer foi transferida uma alçada correspondente a cada tipo de bactéria isolada, na sequência estes frascos foram para agitação na mesa agitadora por 48 horas e temperatura ambiente, conforme a figura 15.

Posterior as 48 horas, transferiu o volume do erlenmeyer para um eppendorf de 45 mL e centrifugou a 3000 rpm's por 5 minutos cada um, em seguida o sobrenadante foi colocado de volta no próprio erlenmeyer, utilizou-se um pouco de água destilada estéril para “desgrudar” o pellet e após foram iniciados os procedimentos de extração de DNA.

A extração de DNA foi executada por meio do protocolo da Promega como mostra a figura 14 abaixo.

Figura 14. Kit extração de DNA.



Fonte: Autoria própria, 2018

Figura 15. Procedimento de obtenção de massa celular – pós autoclave



Fonte: Autoria própria, 2018

Figura 16. Homogeneização das amostras por 48 horas



Fonte: Autoria própria, 2018

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento dos consórcios microbianos

Os consórcios que foram isolados apresentaram crescimento no diesel e desta forma foram repicados para que não fossem perdidos uma vez por mês. Da mesma forma, os consórcios em meio líquido eram renovados a cada mês.

Dos microrganismos que foram isolados, foram identificadas as características fenotípicas, conforme mostra a tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Características fenotípicas dos microrganismos isolados

Código	Microrganismo	Morfologia	Gram
ISA¹ 11	Bactéria	Cocos	-
ISA 14	Bactéria	Cocos	+
ISA 41	Bactéria	Coco	-
ISA 15	Bactéria	Cocos	-
ISA 10	Bactéria	Cocos	-
ISA 01	Bactéria	Cocos	+
ISA 04	Bactéria	Diplococos	-
ISA 05	Bactéria	Estafilococos	+
ISB² 42	Bactéria	Estreptococos	+
ISB 45	Bactéria	Cocos	-
ISA 12	Bactéria	Bastonetes	+
ISS³ 33	Bactéria	Cocos	-
ISA 09	Bactéria	Diplococos	-

Fonte: Adaptado de Shimabukuro (2017).

1 - ISA – Ágar Nutriente.

2 - ISB – Batata Dextrose Ágar.

3 - ISS – Meio Solo.

4 - ND – Não Determinado.

As bactérias gram-negativas de acordo com Padilha et al (2017), devido a estrutura da sua parede celular, proporcionam uma maior resistência a inserção de agentes no seu interior, o que pode lhes conferir uma resistência maior para sobrevivência em ambientes de grande estresse.

5.1.1 Diluição seriada

A diluição seriada foi realizada a fim de verificar a quantidade de consórcio que seria inoculada no experimento e o quanto os microrganismos estava crescendo em cada um dos consórcios. É uma forma de observar se está ocorrendo desenvolvimento de microrganismos no consórcio criado. A figura 17 abaixo, demonstra o resultado de uma das diluições que foi realizada no experimento.

Figura 17. Diluição seriada 10^{-3}



Fonte: Autoria própria, 2018

Consórcio Bactéria

Consórcio Soro

Observa-se que o consórcio de soro de leite apresentou um crescimento maior de colônias em relação ao consórcio de bactérias e tal fato pode ser explicado devido a disponibilidade de nutrientes que cada consórcio possuía, visto que o de soro de leite era composto por mais de um nutriente para as bactérias e dessa forma elas se desenvolveram mais.

5.1.2 Caracterização do soro de leite

O soro foi armazenado em um galão de 5 litros e permaneceu na geladeira do laboratório de microbiologia da universidade.

A tabela 7 abaixo mostra a caracterização obtida deste soro e que foi realizada pelo Laboratório para garantia da qualidade (LGQ) localizado em Francisco Beltrão.

Tabela 7. Caracterização do Soro de leite

Ensaio	Resultado	LQ ¹	Incerteza
Determinação de pH	4,25	4,00	-
Acidez	0,50 g de ácido láctico/100g	0,08	-
Lipídios (Gordura)	0,80 g/100g	0,46	-
Sólidos solúveis	5,00 °B	-	-

1- LQ – Limite de Quantificação

Fonte: Laboratório para Garantia da qualidade

5.2 RESPIROMETRIA

Os tratamentos permaneceram incubados nos frascos por um período de 30 dias e a cada sete dias foi realizada a titulação utilizando HCL e o indicador fenolftaleína.

Para analisar melhor os dados, primeiramente foi realizada a média por semana das titulações de cada triplicata referente aos tratamentos e posteriormente somou-se o acumulado das médias diárias. Essa soma acarretou um resultado em que é possível avaliar qual tratamento obteve uma respiração maior em relação ao controle.

As tabelas 8 e 9 abaixo mostram os resultados obtidos nos tratamentos em que foi disposto 2% e 10% de diesel respectivamente.

Tabela 8. Tratamentos com 2% de diesel – dados acumulados.

Frasco	Controle Solo diesel	Controle soro diesel	Bactéria	Soro Bactéria	Cápsula Bactéria	Cápsula Soro
72,17	69,16	61,21	68,23	65,15	73,4	68,9

Fonte: Autoria própria, 2018

Tabela 9. Tratamentos com 10% de diesel – dados acumulados.

Frasco	Controle Solo Diesel	Controle soro diesel	Bactéria	Soro Bactéria	Cápsula Bactéria	Cápsula Soro
72,17	59,68	55,98	70,85	62,83	66,27	66,52

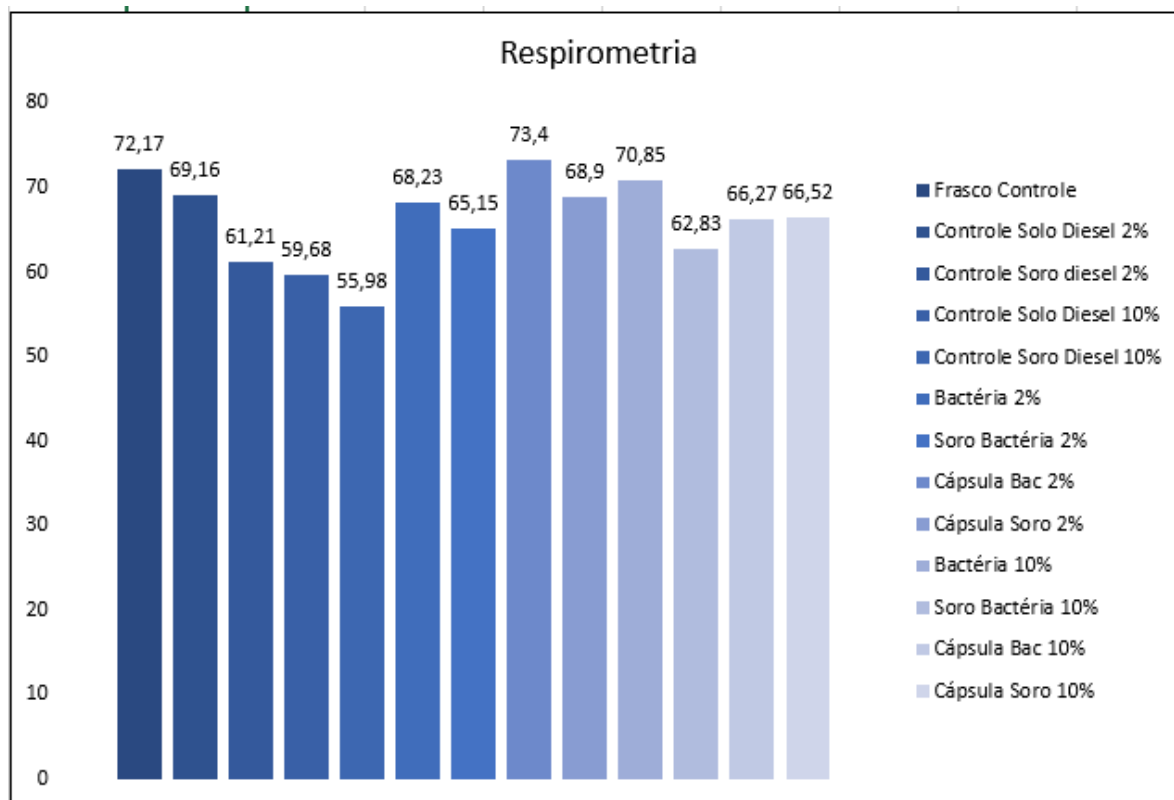
Fonte: Autoria própria, 2018

Com base nessas duas tabelas, pode se observar que o tratamento com 2% de diesel para Bactéria e os microrganismos encapsulados, obtiveram minimamente valores maiores em relação aos mesmos tratamentos com 10%. Tal fato pode ser explicado devido a disponibilidade de nutriente, pois os microrganismos encapsulados com soro possuíam duas fontes de carbono para se alimentar – o diesel e o soro de leite propriamente dito.

Ainda relacionando as tabelas com a figura 18 abaixo e de acordo com os estudos semelhantes de Padilha et al (2017), as bactérias biodegradadoras apresentam um crescimento considerável em ambientes com concentração de 10% de BTEX e esse fato se explica devido a maior disponibilidade de uma fonte de carbono, de contrapartida, isso não minimiza o fato de elas também crescerem em concentrações menores como o de 2%, porém

em concentrações acima de 10% o crescimento já não é muito observado e pode estar relacionado com a resistência de tais microrganismos de se adaptarem a tais ambientes.

Figura 18.Dados da respirometria



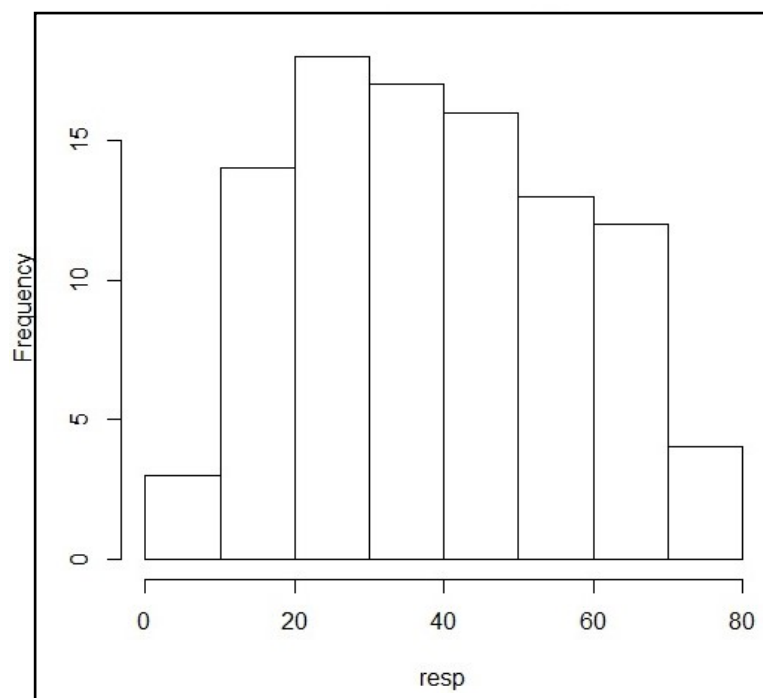
Fonte: Autoria própria, 2018

5.2.1 Análise estatística

Com a finalidade de verificar um resultado mais expressivo em relação aos dados da respirometria, foi realizada uma análise estatística desses resultados, aplicando um experimento fatorial com dois fatores, onde um dos fatores são os tratamentos e o outro são as concentrações de diesel em 2% e 10% que seriam os níveis.

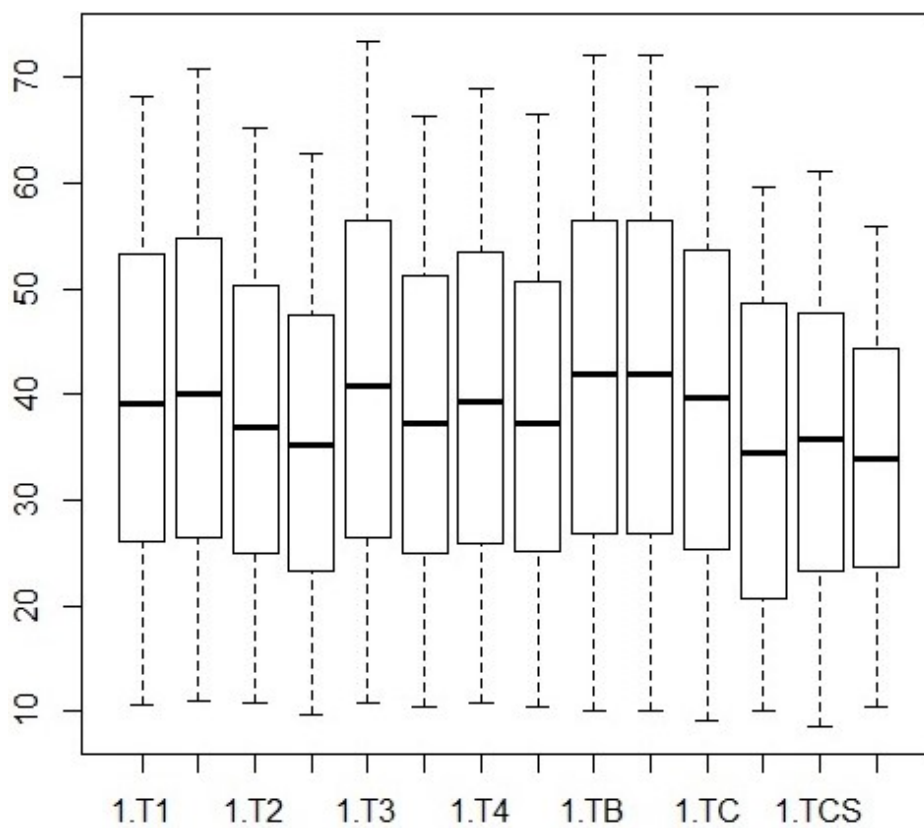
A figura 19 abaixo representa o histograma dos tratamentos, que tem por finalidade evidenciar a normalidade dos resultados e por meio deste, é possível observar que os tratamentos possuem um comportamento normal e a partir desse ponto os demais testes foram realizados e chegou-se ao boxplot da figura 20.

Figura 19. Histograma da respirometria



Fonte: Autoria própria, 2019

Figura 20. Boxplot dos tratamentos da análise respirométrica



Legenda:

- 1.T1 – Tratamento bactéria
- 1.T2 – Tratamento soro bactéria
- 1.T3 – Tratamento Cápsula bactéria
- 1.T4 – Tratamento cápsula soro bactéria
- 1.TB – Tratamento branco
- 1.TC - Tratamento Controle diesel
- 1.TCS – Tratamento controle soro.

Onde, respectivamente cada bloco lado a lado representa a concentração de 2% e 10% de diesel de cada tratamento.

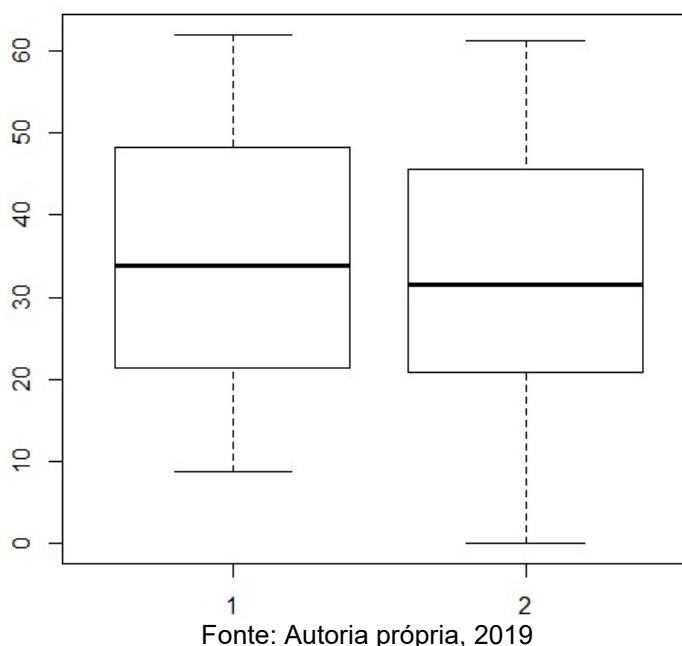
Fonte: Autoria própria, 2019

De acordo com Capela et al (2014), o Boxplot possibilita avaliar a simetria dos dados, a dispersão e se existem ou não outliers, ou seja, se existem valores discrepantes nos dados, além de mostrar se há diferença entre os tratamentos.

Assim, é possível observar na figura 20, que não existem valores discrepantes nos dados analisados e que há uma certa simetria entre os dados, indicando que não há uma diferença estatística significativa das amostras estudadas. A linha no centro do retângulo é a linha da mediana e por estar no centro, mostra esta simetria entre os tratamentos.

Considerando as circunstâncias do desenvolvimento do trabalho, como a variação de temperatura entre altas e baixas, este é um fato que pode ter influenciado no desempenho do experimento, de modo que os consórcios microbianos não fossem tão ativos no consumo do carbono que lhes era disponibilizado por meio do diesel e do soro de leite.

A figura 21 que mostra uma comparação entre os dois tratamentos de 2% e 10% onde observa-se uma paridade entre eles, reforçando que não há relação na quantidade de diesel que foi inserido no experimento.

Figura 21. Comparação entre tratamentos

Legenda:

- 1- Tratamento 2% de diesel
- 2- Tratamento 10% de diesel

Ponderando sobre os valores das médias obtidas sem análise estatística, observa-se que o tratamento cápsula bactéria - 2% de diesel foi o que obteve maior desempenho nas titulações, devido a maior média, ou seja, nesse tratamento houve um consumo maior de diesel por parte dos microrganismos e desta forma, há uma evidência de que a quantidade de fonte de carbono disponível não necessariamente influenciou no consumo desse material, visto que na sequência, vieram os tratamentos de soro bactéria 2% e o bactéria 10% com resultados similares e por serem valores tão próximos denotam este fato.

Shimabukuro (2017) em seu experimento, também obteve melhores resultados com tratamentos formados por consórcios de bactérias e alerta que a inferioridade nos resultados obtidos com as cápsulas pode estar relacionada com a quantidade de microrganismos inoculados, visto que foram 0,44 gramas e a proporção referente ao número de Unidades formadoras de colônias - UFC inseridas ser diferente.

5.3 ÍNDICE EMULSIFICANTE

Os resultados do índice emulsificante são mostrados na tabela 10 a seguir.

Tabela 10. Índice emulsificante das bactérias isoladas

ISOLADO	ÍNDICE EMULSIFICANTE (%)
CONS. Bactéria	0,00
CONS. Soro	63,51
ISA 01	20,00
ISA 09	25,97
ISA 10	0,00
ISA 11	12,82
ISA 12	15,19
ISA 15	0,00
ISS 39	13,92
ISB 41	16,25
ISB 42	45,57
ISB 45	56,58

Fonte: Autoria própria, 2019

Conforme descrito na metodologia, após o decorrer das 24 horas houve a formação de emulsão de alguns isolados, a tabela 11 mostra os resultados em porcentagem através do cálculo da equação 2, onde exibe que a maioria dos isolados formaram índice emulsificante, sendo a maior formação a do consórcio de soro, neste consórcio há a presença de todas as bactérias desta tabela que foram cultivadas em um meio contendo soro de leite e diesel e para testar a emulsificação adicionou-se mais diesel e esta mostra um valor considerável.

O consórcio de bactérias e o isolado 15 não apresentou nenhum índice de emulsificação, enquanto seis dos isolados apresentaram índice abaixo de 40% e três apresentaram acima de 40%. O índice variou de 12 a 64%.

Silva et al (2017), encontrou valores similares em seu teste de índice de emulsificação e na sua pesquisa também foi utilizado um hidrocarboneto como teste, o que mostra que microrganismos na presença de compostos hidrofóbicos possuem a capacidade de emulsão.

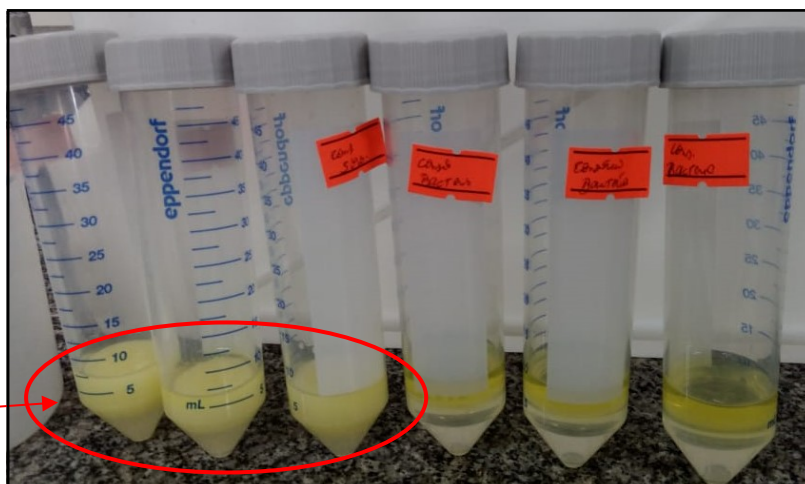
Araújo (2017) fez sua investigação e também utilizou os microrganismos cultivados em caldo nutriente com a adição de óleo diesel e obteve um índice de emulsificação de cerca de 40%.

Tais resultados mostram que os microrganismos cultivados neste meio possuem esta capacidade. O consórcio de soro obteve o maior índice de emulsão e isto pode ser explicado pelo fato de que as bactérias ali presentes possuíam duas fontes de carbono: o diesel e o soro de leite, além de estarem todas neste meio competindo pelo nutriente. Por outro lado, o consórcio de bactérias só com a adição de óleo diesel não mostrou nenhuma atividade emulsificante, porém estas mesmas bactérias isoladas apresentaram cada uma um índice, exceto a ISA 15, acredita-se que o tempo de repouso pode ter sido insuficiente para que elas apresentassem algum índice nesta condição, enquanto que para as isoladas em soro de leite o índice já ficou visível. De contrapartida este fato de não haver emulsificação no consórcio de bactérias pode ser explicado com os testes de diluição seriada que foram realizados para contagem dos microrganismos e neles o consórcio só de bactérias apresentava um crescimento mais lento em comparação ao consórcio de soro de leite e mais uma vez pode ser elucidado pelo fato do consórcio de soro possuir mais nutrientes para estes microrganismos se desenvolverem.

Silva et al (2017) descreve ainda que os microrganismos isolados de solos contaminados com hidrocarbonetos e que apresentam um índice de emulsificação, representam o potencial de remoção destes contaminantes no meio ambiente por meio de tais microrganismos.

As figuras 22, 23 e 24 abaixo mostram a emulsão no consórcio de soro e de contrapartida a do consórcio só de bactéria que nada formou e a emulsão da ISB 45 que entre os isolados foi a que obteve maior percentagem de índice de emulsão.

Figura 22. Formação de emulsão no consórcio de soro



Consórcio Soro

Fonte: Autoria própria, 2019

Figura 23. Formação de emulsão



Fonte: Autoria própria, 2019

Figura 24. Formação de emulsão ISB 45



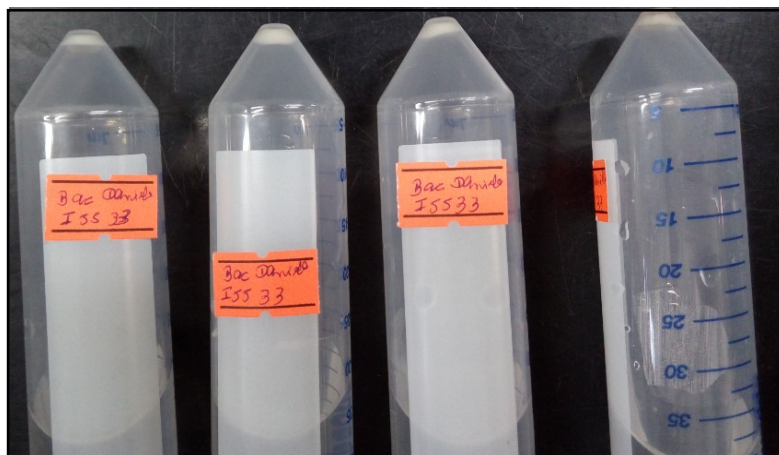
Fonte: Autoria própria, 2019

5.4 EXTRAÇÃO DE DNA

5.4.1 Obtenção de massa celular

O ensaio realizado previamente a extração de DNA para a obtenção da massa celular, mostra por meio da figura 25, a formação do pellet desejado para que as análises pudessem prosseguir. Este ensaio foi realizado em cada isolado de bactéria para que assim se pudesse obter o DNA de cada uma.

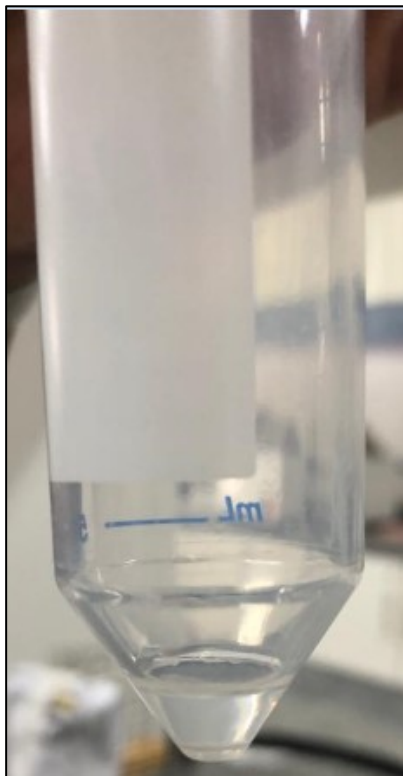
Figura 25. Formação do pellet



Fonte: Autoria própria, 2019

A figura 26 mostra o DNA extraído após todo o procedimento do protocolo da promega.

Figura 26. DNA extraído



Fonte: Autoria própria, 2019

O DNA fica submerso, mas é possível visualizar uma parte mais “escura” que indica a presença dele no líquido.

6 CONCLUSÃO

Os microrganismos foram isolados diretamente de um solo com histórico de contaminação e por meio deles foram construídos os consórcios microbianos que cresceram diariamente no período em que ficaram incubados, fato evidenciado pelas diluições seriadas que foram realizadas no período;

O consórcio microbiano com soro de leite (bioestimulante), não apresentou muita diferença em relação aos tratamentos sem o soro, tal resultado pode ser explicado devido a quantidade de soro que foi inoculada nos microrganismos, visto que o mesmo foi esterilizado e não há evidência de competição por nutrientes;

Os consórcios sem a bioestimulação por meio do soro de leite, tanto o de 2% como o de 10%, apresentaram um desempenho melhor na análise respirométrica quando comparados ao consórcio bioestimulado e este resultado foi confirmado pelas médias obtidas das titulações, ainda que sejam mínimas as diferenças, ela existe;

A análise de emulsificação dessas bactérias mostrou que elas possuem grande capacidade de crescimento em um meio contendo BTEX, fato que explica o crescimento dos consórcios tanto bacteriano apenas com diesel, quanto o que possuía soro adicionado;

O consórcio de soro de leite foi o que obteve o maior índice de emulsão e isto pode ser explicado pelo fato de que as bactérias ali presentes possuíam duas fontes de carbono para se alimentar, além da competição por nutrientes;

A concentração de 2% e de 10% de diesel adicionada aos tratamentos, não apresentou diferença significativa e este fato pode ser explicado devido a condições de temperatura e quantidade de microrganismos inoculados;

Por fim, a comparação entre a adição de 2% e 10% de diesel nos tratamentos não trouxe o resultado esperado e com isso sugere-se para novos estudos que sejam inoculadas maiores concentrações de microrganismos nos consórcios preparados e nas cápsulas de alginato de sódio. O tempo também pode ter influenciado neste resultado, desta forma seria interessante comparar estudos no verão e no inverno por exemplo e não na transição entre as duas estações (estação que foi realizado o experimento), pois neste período ainda há variabilidade de dias mais quentes e noites frias e vice-versa.

Porém, a análise de emulsificação apontou resultados promissores para estes isolados e com isso sugere-se que os estudos sejam aprofundados para se obter resultados mais completos.

7 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO – ANP. Petróleo. Disponível em:

<<http://www.anp.gov.br/petroleo-e-derivados2/petróleo>>. Acesso em 25 mai. 2018. 15:15.

ALEF, K. Estimation of soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. ISBN 0-12-513840-7. San Diego: Academic Press, 1995.

ARAÚJO, R.O. **Produção de biossurfactantes e potencial de degradação do óleo diesel por bactérias isoladas de ambientes contaminados por petróleo.** Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular) – Universidade Federal da Paraíba, 2017.

BUENO, S.M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo.** Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, 2008.

CAMACHO, L.R.N. **Avaliação do comportamento de BTEX e seus metabólitos de biodegradação em solos: Estudos de remediação em microcosmos.** Tese (Doutorado em ciências) – Universidade Federal de São Carlos, 2015.

CAPELA, M.V; CAPELA, J.M.V. **Elaboração de gráficos Box-plot em planilhas de cálculo.** Anais do I Congresso de matemática aplicada e computacional da região Sudeste – I CMAC Sudeste, Araraquara. ISSN 2237-7166. Dezembro, 2014.

CETESB –Companhia ambiental do Estado de São Paulo. **Avaliação de Benzeno; Tolueno; o-Xileno; m, p-Xileno e Etilbenzeno na Atmosfera da Estação de Monitoramento de Pinheiros - Município de São Paulo – SP 2013 – 2014.** Novembro, 2016.

COOPER, D.G; GOLDENBERG, B.G. Surface –Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applies and environmetal microbiology**. V.53. n.2. p.224-229. 1987

CORIOLANO, A.C.F; FILHO, M.C.M. **Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera.** Holos. Ano 32, v.7, 2016.

DECESARO, A. et al. Biossurfactantes em processos de biorremediação. **Research gate**. V.17 p. 119-143. Passo Fundo, 2015.

DEON, M.C et al. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 73-82, jan. /jun. 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **Manual técnico de pedologia**. 2º ed. Rio de Janeiro, 2007.

IBGE - **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 27 mar. 2019, 20h.

KREISCHER, A.C; SILVA, L.P. Bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes a partir de solo contaminado por agrotóxicos. **Revista eletrônica Estácio Saúde**. v.6, n.1, 2017.

LEONEL. T.F; FUNNICELLI, M.I.G; MORETTO, C; LEMOS, E.G.M. Atividade emulsificante de exopolissacarídeo produzido por isolados de *Mesorhizobium huakuii*. (LBMP-T01) **Ciência e Tecnologia**: Fatec –JB, Jaboticabal, v.7, 2015)

LIMA, F.A; FERREIRA, L.C; RIBEIRO, E.J; RESENDE, M.M; POMELLA, A.W.V. Utilização de meios de cultivo com baixo custo na produção de biossurfactantes totais. **Simpósio de Tecnologia ambiental e de biocombustíveis**. Ciência e Tecnologia: Fatec – JB, Jaboticabal. V.10, p.84-88, 2018.

LIMA, F.R et al. Aproveitamento do soro de leite proveniente da produção do queijo do serro para fabricação de doce de leite: viabilidade econômica. DOI: 10.14295/2238-6416.v. 71 i2.526. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 83-93, abr/jun, 2016.

LIMA, R.P. **PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO ISOLADAS DE ISÓPTEROS DA FLORESTA AMAZÔNICA NO MUNICÍPIO DE COARI**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2018.

MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; BENDER, K.S; BUCKLEY, D.H; STAHL, D.A. **MICROBIOLOGIA DE BROCK**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MBP COPPE/ UFRJ. **História do Petróleo**. Disponível em: <http://petroleo.coppe.ufrj.br/historia-do-petroleo/>. Acesso em 24 mai 2018. 20h.

MORAES, Lisana. G; SILVA, Cristiane. S; BERGER, Thomas Michael; FIPKE, Priscila Regina. Estudo comparativo sobre práticas de destinação para solos descontaminados por biorremediação ex-situ. **FÓRUM INTERNACIONAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS**. Anais: Porto Alegre, 2016.

NORMA REGULAMENTADORA 15 – **Atividades e operações insalubres**.

Disponível em: http://www.guiatrabalhista.com.br/legislacao/nr/nr15_anexoXI.htm. Acesso 19 mar. 2019.

NUNES, Luane.A; GERBER, Juliano. Z; COSTA, Flávio.P; SOUZA, Rafael.J.S; KALID, Ricardo.A. O soro de leite, seus principais tratamentos e meios de valorização. **Revista em agronegócio e meio ambiente**, vol 11, p 301-396, 2018. Disponível em: <<https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/5310>>. Acesso em 25 mai. 2020

PADILHA, T.M; SAMPAIO, J; LONGONI, L; BENEDUZI, A. Isolamento de linhagens bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos BTEX proveniente do setor petroquímico. **SCIENTIA PLENA**, vol 13, n. 9, 2017.

POI, G. et al. Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium. **Ecological Engineering**, v. 102, p. 64-71, May 2017. ISSN 0925-8574. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000399623700008 >. Acesso em 10 mai 2018. 19h34.

ROMANO, Jesuíno. **Avaliação de Benzeno; Tolueno; o-Xileno; m, p-Xileno e Etilbenzeno na Atmosfera da Estação de Monitoramento de Pinheiros - Município de São Paulo – SP 2013 – 2014**. Setor de Amostragem e Análise do Ar. Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br/ar/wp-content/uploads/sites/28/2013/12/Relatorio-BTEX.pdf>>. Acesso em 8 mai 2018. 18:40.

SHIMABUKURO, R.K.K. **BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO POR CONSÓRCIO MICROBIANO**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2017.

SILVA, E.E et al. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂). **Comunicado técnico, Embrapa**. Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, F.S.F; FERREIRA, V.C; CATTER, K.M; VIANA, A.D.Q; MENDONÇA, K.V; SOUSA, O.V; VIEIRA, R.H.F. Produção de biossurfactantes por cepas bacterianas de origem marinha utilizando querosene como fonte de carbono. **Revista de Ciências Ambientais – RCA**. ISSN 1981- 8858. V.11, n.1, 2017.