

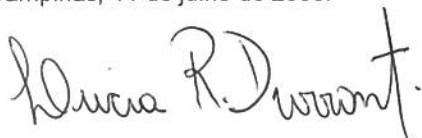
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**“ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE BIOSURFACTANTES NA
BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES OLEOSOS”**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Daniela Franco Carvalho Jacobucci, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de julho de 2000.

Campinas, 11 de julho de 2000.



Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
Presidente da Banca

Daniela Franco Carvalho Jacobucci

Bióloga



Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Campinas, junho de 2000



200012989

UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	7/Unicamp
	J159e
V.	Ex.
TOMBO BC/	42128
PROC.	06-278/00
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 00,00
DATA	09/09/00
N.º CPD	

CM-00144245-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

J159e Jacobucci, Daniela Franco Carvalho
 Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação
 de efluentes oleosos /Daniela Franco Carvalho Jacobucci. –
 Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

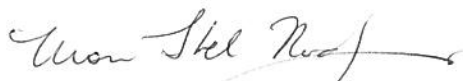
1. Agentes ativos de superfícies. 2. Tratamento.
 3. Bactérias. 4. Hidrocarbonetos. I. Durrant, Lúcia Regina.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



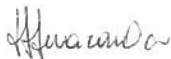
Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

Orientadora



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

MEMBRO



Profa. Dra. Tânia Akiko Anazawa

MEMBRO

Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos

MEMBRO

*Dedico este trabalho ao meu avô Benedito e ao meu tio
Paulo, que mesmo de longe continuam torcendo pelo meu
sucesso e felicidade*

Ofereço aos meus pais, Márcio e Jaine, pelo apoio em todos os momentos, dedicação, compreensão e grande amor dedicados

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à minha amiga e orientadora Profa. Dra. Lucia Regina Durrant pela confiança e encorajamento em todos os momentos da minha vivência acadêmica. Desejo que os seus votos de crescimento profissional a mim direcionados durante esses anos de convivência possam ser transformados em seu favor, trazendo prosperidade e harmonia, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Tânia Akiko Anazawa, Profa. Dra. Maria Isabel Rodriguez e ao Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos pelas sugestões e correções.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente ao Sr. João, Sr. Nivaldo (memória póstuma), Nilson, Caê, Clemente, Nadeje e Rosinha, que sempre demonstraram grande solicitude quando necessitei de ajudas.

Aos colegas da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos, Jardette, Marcão, Marquinho e Ricardo pela agradável convivência nestes anos.

Ao pessoal da biblioteca e secretaria de pós-graduação pela competência e disposição de auxílio.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana pela troca de informações constante. À Karla, Juliana, Daniela Marchi e Marta pela amizade e palavras de incentivo.

À Dona Norberta e Luciene pela ajuda e carinho.

À Raquel pela amizade e por tantas oportunidades...

À Tânia pela amizade, apoio contínuo e grande auxílio com o cromatógrafo gasoso.

Ao Edinho e Ari pela paciência e auxílio nas tentativas de resolução dos problemas cromatográficos.

Ao "Secreta" da Oficina Sacchi & Santos pelo reconhecimento e compreensão do meu trabalho.

À indústria Gessy Lever pela recepção prestativa e fornecimento das amostras de efluente.

Ao Steven Durrant pela paciência na correção dos artigos e trabalhos em inglês durante todo esse tempo.

À minha avó Maria, Dona Leude, Dr. Humberto, Gianca e Sr. Jacobucci pelos votos de sucesso e compreensão.

À tia Fia e tio Lourenço pelo apoio e carinho tão salutares.

Aos meus irmãos queridos Rafael e Isabel pela torcida e desejos de prosperidade.

Ao Giuliano “por que sem você meu amor eu não sou ninguém...”

ÍNDICE GERAL

Resumo	01
Abstract	02
1. Introdução	03
2. Revisão Bibliográfica	06
2.1. Utilização de substratos oleosos e produção de biosurfactantes por microorganismos	06
2.2. Propriedades e aplicação dos biosurfactantes.....	09
2.3. O papel da biorremediação em ambientes contaminados por óleos.....	15
2.4. Métodos utilizados para a determinação de poluentes em efluentes industriais	18
3. Material e métodos	21
3.1. Microorganismos	21
3.2. Manutenção das linhagens	22
3.3. Produção do biosurfactante	22
3.4. Isolamento do biosurfactante	23
3.5. Determinação da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos	24
3.5.1. Efluentes oleosos a serem considerados neste trabalho	24
3.5.1.1. Oficina	24
3.5.1.2. Indústria de sabões e margarinas.....	24
3.5.2. Pontos de amostragem dos efluentes	25
3.5.3. Ensaio de biorremediação	25
3.5.4. Determinação da concentração celular	26

3.5.5. Determinação dos valores de DQO dos efluentes	26
3.5.6. Atividade do biosurfactante	27
3.5.7. Alterações nos efluentes	28
3.5.8. Estudo da degradação dos hidrocarbonetos e óleos vegetais por cromatografia gasosa	29
3.5.8.1. Preparo das amostras para análise por cromatografia gasosa ...	29
3.5.8.2. Degradação dos compostos oleosos presentes nos efluentes	30
4. Resultados e Discussão.....	33
4.1. Identificação das linhagens bacterianas	33
4.2. Rendimento dos biosurfactantes produzidos	35
4.3. Atividade de emulsificação dos biosurfactantes bacterianos	38
4.4. Ensaios de biorremediação	39
4.4.1. Determinação da concentração celular das linhagens durante o crescimento nos efluentes	39
4.4.2. Determinação da DQO durante os ensaios de biorremediação	41
4.4.3. Atividade dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens adicionadas ao efluente	49
4.5. Alterações nos efluentes	54
4.5.1. Variação do pH dos efluentes estudados	57
4.6. Análise cromatográfica dos compostos oleosos presentes nos efluentes	61
4.6.1. Degradação dos ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas após os ensaios de biorremediação	61
4.6.2. Degradação dos hidrocarbonetos presentes no efluente da oficina após os ensaios de biorremediação	76

5. Considerações finais	88
6. Referências bibliográficas	90
7. Apêndices	98
Apêndice 1 - Concentração celular das linhagens durante crescimento nos efluentes.	98
Apêndice 2 - Determinação da DQO durante os ensaios de biorremediação no efluente da oficina.....	99
Apêndice 3 - Determinação da DQO durante os ensaios de biorremediação no efluente da indústria de sabões e margarinas.....	100
Apêndice 4 - Perfil cromatográfico dos ensaios 1 e 2 em 24 horas de incubação do efluente da oficina.....	101
Apêndice 5 - Perfil cromatográfico dos ensaios 1 e 2 em 48 horas de incubação do efluente da oficina.....	103
Apêndice 6 - Perfil cromatográfico dos ensaios 1 e 2 em 72 horas de incubação do efluente da oficina.....	105
Apêndice 7 - Perfil cromatográfico dos ensaios 1 e 2 em 120 horas de incubação do efluente da oficina.....	107
Apêndice 8 - Perfil cromatográfico dos ensaios 3 e 4 em 24 horas de incubação do efluente da oficina.....	110
Apêndice 9 - Perfil cromatográfico dos ensaios 3 e 4 em 48 horas de incubação do efluente da oficina.....	112
Apêndice 10 - Perfil cromatográfico dos ensaios 3 e 4 em 72 horas de incubação do efluente da oficina.....	114
Apêndice 11 - Perfil cromatográfico dos ensaios 3 e 4 em 120 horas de incubação do efluente da oficina.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Emulsões do tipo óleo em água (a) e água em óleo (b).....	21
Figura 2: Perfil de compactação das bolhas nos halos formados na fase oleosa.....	22
Figura 3: Crescimento das linhagens bacterianas e aspecto dos biosurfactantes liofilizados.....	36
Figura 4: Rendimento da produção de biosurfactantes.....	37
Figura 5: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 1a (<i>Planococcus citreus</i>) no efluente da oficina.....	42
Figura 6: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 1b (<i>Pantoea agglomerans</i>) no efluente da oficina.....	42
Figura 7: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 2 (consórcio das bactérias) no efluente da oficina.....	43
Figura 8: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 1a (<i>Planococcus citreus</i>) no efluente da indústria.....	43
Figura 9: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 1b (<i>Pantoea agglomerans</i>) no efluente da indústria.....	44
Figura 10: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 2 (consórcio de bactérias) no efluente da indústria.....	44
Figura 11: Redução da DQO (%) durante os ensaios 3a (biosurfactante produzido por <i>Planococcus citreus</i>), 3b (biosurfactante produzido por <i>Pantoea agglomerans</i>) e 4 (consórcio dos biosurfactantes) no efluente da oficina.....	45

Figura 12: Redução da DQO (%) durante os ensaios 3a (biosurfactante produzido por <i>Planococcus citreus</i>), 3b (biosurfactante produzido por <i>Pantoea agglomerans</i>) e 4 (consórcio dos biosurfactantes) no efluente da indústria.....	45
Figura 13: Atividades de emulsificação em termos de absorbância detectadas no efluente da indústria de sabões e margarinas durante ensaios de biorremediação.....	49
Figura 14: Atividades de emulsificação em termos de formação de halos detectadas no efluente da indústria de sabões e margarinas durante ensaios de biorremediação.....	50
Figura 15: Atividades de emulsificação em termos de aumento da absorbância detectadas no efluente da indústria de sabões e margarinas durante ensaios de biorremediação.....	50
Figura 16: Clarificação dos efluentes.....	56
Figura 17: Variação de pH durante ensaio 1a de biorremediação	57
Figura 18: Variação de pH durante ensaio 1b de biorremediação.....	58
Figura 19: Variação de pH durante ensaio 2 de biorremediação.....	58
Figura 20: Variação de pH durante ensaio 3a de biorremediação.....	59
Figura 21: Variação de pH durante ensaio 3b de biorremediação.....	59
Figura 22: Variação de pH durante ensaio 4 de biorremediação.....	60
Figura 23: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 1 e 2, em 24 horas de incubação.....	64
Figura 24: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 1 e 2, em 48 horas de incubação.....	65
Figura 25: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 1 e 2, em 72 horas de incubação.....	66

Figura 26: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 1 e 2, em 120 horas de incubação.....	67
Figura 27: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 3 e 4, em 24 horas de incubação.....	68
Figura 28: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 3 e 4, em 48 horas de incubação.....	69
Figura 29: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 3 e 4, em 72 horas de incubação.....	70
Figura 30: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 3 e 4, em 120 horas de incubação.....	71
Figura 31: Degradação dos ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas, durante os ensaios 1 e 2 de biorremediação.....	73
Figura 32: Degradação dos ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas, durante o ensaio 3 de biorremediação.....	74
Figura 33: Presença de hidrocarbonetos padrões nos efluentes da oficina não tratado e nos efluentes submetidos aos ensaios 1 e 2 de biorremediação.....	80
Figura 34: Presença de hidrocarbonetos padrões nos efluentes da oficina não tratado e nos efluentes submetidos aos ensaios 3 e 4 de biorremediação.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Códigos e nomenclatura usual para os ácidos graxos utilizados como padrões.....	31
Tabela II: Principais características morfológicas e bioquímicas das linhagens bacterianas estudadas.....	34
Tabela III: Ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas..	62
Tabela IV: Perfil cromatográfico dos ensaios de biorremediação.....	77

RESUMO

Dois efluentes oleosos, um oriundo de uma indústria de sabões e margarinas e outro de uma oficina de reparos em caminhões transportadores de derivados de petróleo, foram submetidos a diferentes ensaios de biorremediação onde as linhagens bacterianas *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans* e seus produtos microbianos de superfície ativa, biosurfactantes, foram utilizados. A influência das bactérias produtoras de biosurfactantes e dos biosurfactantes bacterianos no tratamento destes efluentes foi verificada principalmente através da redução da demanda química de oxigênio e degradação de ácidos graxos e hidrocarbonetos presentes nos dejetos. As bactérias estudadas apresentaram uma significativa concentração celular quando crescidas no efluente da indústria, mostrando que o mesmo tem um potencial para ser utilizado na produção de biosurfactantes. Os biosurfactantes estudados mostraram um efeito positivo na disponibilização dos compostos oleosos às células microbianas pois foi observada uma redução acentuada na matéria orgânica dos efluentes tratados, devido à utilização dos compostos oleosos como substratos metabólicos. Como tanto as células bacterianas adicionadas aos efluentes como os biosurfactantes adicionados, apresentaram resultados muito semelhantes em relação à degradação dos compostos oleosos, foi possível estimar que para uma aplicação industrial, por questões econômicas, a adição das células bacterianas aos efluentes seria mais compensadora pois não haveria a necessidade de extrair os biosurfactantes produzidos pelas linhagens estudadas.

ABSTRACT

Two oily effluents, one arising from a margarine and soap factory and another from a petrol tanker garage, were submitted to different bioremediation assays where the bacterial strains *Planococcus citreus* and *Pantoea agglomerans* and the active surface microbial products, biosurfactants, were utilized. The influence of biosurfactant producing bacteria and bacterial biosurfactants on the effluent treatment was verified principally by the reduction in chemical oxygen demand and the degradation of fatty acids and hydrocarbons present in the wastewater. The bacteria studied showed an increasing dry weight when grown on the industrial effluent, which indicates that this effluent could be used as a substrate for the production of biosurfactants. The biosurfactants showed a positive effect on the availability of oily compounds to microbial cells because a strong reduction in the organic matter of treated effluents was observed, probably due to the utilization of oily compounds as metabolic substrates. Both the bacterial cells and the biosurfactants added to the effluents showed the degradation of oil, producing such similar results that it was impossible to estimate which was more significant to industrial use. Economically speaking, the addition of bacterial cells to the oily effluents could be more interesting because the extraction of bacterial biosurfactants is unnecessary.

1) INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por derivados de petróleo, óleos e graxas é um problema de escala mundial e a cada ano, a quantidade de resíduos oleosos emitidos por indústrias de diversos ramos aumenta bruscamente.

Estima-se que para cada um milhão de toneladas de petróleo transportado por navios petroleiros, uma tonelada é derramada, resultando em um prejuízo enorme dos ecossistemas marinhos afetados (HUANG, 1995). Nos últimos anos, no Brasil, a mídia fez menção a diversos desastres ecológicos envolvendo rupturas de tubulações de óleo bruto e acidentes com navios transportadores de petróleo, causando um dano inquestionável às comunidades dependentes da pesca e ao turismo local.

Em janeiro deste ano, aproximadamente 1 milhão e 300 mil litros de óleo bruto contaminaram a Baía da Guanabara, no Rio de Janeiro, devido a um vazamento em uma tubulação da Petrobrás. Biólogos e veterinários estimam que serão necessários mais de vinte anos para que o mangue restabeleça o equilíbrio trófico.

O esgoto e o lixo doméstico contém uma grande quantidade de óleos e graxas que são lançados em águas marinhas ou continentais sem tratamento prévio, colaborando para persistência de compostos oleosos em ecossistemas aquáticos (POOLE *et al.*, 1999).

Um dos maiores problemas do mundo industrializado atual é a contaminação do solo, lençóis freáticos, sedimentos, mares, águas continentais e do ar com produtos tóxicos e recalcitrantes. A necessidade de remediar áreas contaminadas tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias que enfatizam a detoxificação dos contaminantes de uma forma não convencional, ou seja, sem a utilização de métodos somente químicos ou físicos. A biorremediação, o uso de microrganismos ou produtos

microbianos para degradar compostos poluentes, é uma destas novas tecnologias (BAKER & HERSON, 1994).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água como os hidrocarbonetos sólidos e líquidos, gorduras, óleos e graxas, usualmente produzem biosurfactantes, moléculas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que atuam como detergentes, que auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana através das emulsões formadas (GERSON, 1993).

O maior estímulo para o estudo do crescimento de microorganismos em hidrocarbonetos consiste na possível utilização destes organismos no tratamento da poluição do meio ambiente por compostos oleosos (MARÍN *et al.*, 1996).

A produção mundial anual de óleos e gorduras é de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas e deste volume, 75% são derivados de vegetais. A maioria da produção é utilizada na indústria de alimentos para a manufatura de diversos produtos ou diretamente como óleo de cozinha. Uma grande quantidade de resíduos é gerada pelas indústrias de óleos e estes substratos podem ser utilizados para a produção de biosurfactantes devido principalmente ao baixo custo (HABA *et al.*, 2000).

O interesse industrial na biotecnologia e o reconhecimento de sua importância por todos os países industrializados do mundo, possibilita modificações no tratamento de efluentes e torna emergente a necessidade de novas tecnologias (KOSARIC *et al.*, 1987).

Levando-se em consideração os problemas causados pela disposição accidental ou intencional de compostos oleosos no meio ambiente e a necessidade da implantação de técnicas seguras e pouco agressivas à fauna, flora e microbiota do local impactado,

no tratamento destas questões, este trabalho procurou determinar a influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos.

O presente estudo buscou avaliar se a introdução de bactérias produtoras de biosurfactantes ao efluente de uma oficina de tanques de caminhões transportadores de derivados de petróleo e ao efluente de uma indústria de sabões e margarinas, representa uma estratégia mais eficaz para a biorremediação dos efluentes que a adição de biosurfactantes bacterianos isolados. O efeito da incorporação de consórcios de bactérias e consórcios de biosurfactantes bacterianos isolados aos efluentes também foi avaliado.

As linhagens bacterianas investigadas produzem biosurfactantes diferentes, devido às características das emulsões formadas por estes (óleo em água ou água em óleo). Desta forma, observou-se que os mesmos exercem influências distintas na biodisponibilização dos compostos oleosos à célula bacteriana, nos efluentes estudados.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Utilização de substratos oleosos e produção de biosurfactantes por microorganismos

O crescimento de microorganismos em uma interface de água e óleo favorece o aparecimento de um biofilme, cuja formação envolve as seguintes etapas: a) os microorganismos aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células; b) as células aderidas formam uma camada delgada na interface óleo/água, extraindo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa; c) como as células revestem as gotas de óleo produzindo biosurfactantes, elas reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a água, resultando na emulsificação do óleo e aumentando a área interfacial disponível para o crescimento microbiano; d) quando o composto oleoso contido nas gotas desaparece, os microorganismos colonizam outras gotas (ÁSCON-CABRERA & LEBEAULT, 1995).

As emulsões são constituídas por uma fase aquosa e outra oleosa, dispostas de duas maneiras predominantes: óleo em água e água em óleo (KOSARIC *et al.*, 1987).

Como outros surfactantes, os agentes de superfície ativa microbianos são capazes de formar micelas convencionais, reversas, circulares ou cilíndricas quando incorporados a um sistema de líquidos imiscíveis (FIECHTER, 1992).

Biosurfactantes microbianos incluem uma grande variedade de estruturas químicas como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos de polissacarídeos ou proteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros. Desta forma, cada família de biosurfactantes apresenta propriedades e funções fisiológicas diferentes, sendo que a maioria é constituída por porções hidrofílicas e hidrofóbicas distintas. Tem sido sugerido

que a produção de biosurfactantes pode aumentar a emulsificação e a solubilização de derivados de petróleo, contribuindo para o crescimento dos microorganismos nestes substratos. Esta hipótese é suportada pelo fato de que linhagens que utilizam hidrocarbonetos produzem quantidades reduzidas de biosurfactantes quando crescidas em substratos solúveis em água. Estudos revelam que os surfactantes microbianos têm aumentado a biodisponibilidade e biodegradação de poluentes hidrofóbicos no solo (LIN, 1996).

Uma variedade de microorganismos produz potentes agentes de superfície ativa, biosurfactantes, os quais variam nas propriedades químicas e tamanho molecular. Enquanto os surfactantes microbianos de baixa massa molar são em geral glicolipídicos, os de alta massa molar são heteropolissacarídeos ou complexos glicoproteicos. O rendimento dos biosurfactantes depende do substrato utilizado para a produção, do crescimento microbiano e da linhagem utilizada. A diversidade enorme destes compostos os tornam interessantes para a aplicação em diversas áreas, principalmente no controle da poluição por compostos oleosos (KARANTH *et al.*, 1999).

Segundo FLECK e colaboradores (2000), as linhagens bacterianas produtoras de biosurfactantes *Rhodococcus ruber* AC239, *Rhodococcus erythropolis* AC272 e *Pseudomonas aeruginosa*, possuem genes que codificam para os biosurfactantes no DNA cromossomal pois nenhum DNA plasmidial foi detectado nas análises moleculares realizadas. As bactérias estudadas se mostraram eficientes na emulsificação de óleo diesel presente em locais com alta concentração de manganês, cromo e cobre, uma vez que apresentaram baixa sensibilidade a estes compostos.

Linhagens bacterianas e fúngicas capazes de degradar hidrocarbonetos foram isoladas de solos utilizados na agricultura, na França. Bactérias dos gêneros

Pseudomonas, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*; fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Beauveria*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma* foram isolados. Porções do solo estudado foram impregnadas com hidrocarbonetos e o potencial de biodegradação das linhagens utilizadas foi monitorado. As linhagens mais ativas na biodegradação dos hidrocarbonetos foram *Arthrobacter* sp., *Sphingomonas spiritivorum*, *Acinetobacter baumannii*, *Beauveria alba* e *Penicillium simplicissimum*. De uma maneira geral, as linhagens bacterianas se mostraram mais eficientes na biodegradação de hidrocarbonetos no solo (CHAIANEAU *et al.*, 1999).

Linhagens de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Enterobacter cloacae* foram isoladas de estações de tratamento de esgoto doméstico e se mostraram eficientes no aumento da recuperação de óleo, podendo ser utilizadas em processos microbianos de recuperação de óleo bruto durante a extração de petróleo (YONEBAYASHI *et al.*, 2000).

Bifenilos policlorinados obtidos de transformadores a óleo, foram degradados em condições aeróbias utilizando um consórcio de culturas isoladas de solo contaminado com hidrocarbonetos. Os microrganismos presentes no consórcio foram identificados como *Comamonas acidovorans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium devorans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus mascerans* e *Bacillus thuringiensis*. Um fungo do gênero *Paecilomyces* e uma linhagem de *Actinomyces* também foram isoladas. A mistura de microrganismos foi capaz de remover 75% dos bifenilos policlorinados presentes no transformador, resultado que evidencia o potencial de utilização de microrganismos do solo para a degradação de bifenilos policlorinados (ROJAS-AVELIZAPA *et al.*, 1999).

O interesse recente por biosurfactantes é baseado na gama de propriedades funcionais que estes compostos possuem como emulsificação, separação de fases, ação umectante e espumante, solubilização, inibição da corrosão e redução da viscosidade de óleos. Desta forma, os surfactantes sintéticos poderão ser substituídos por surfactantes microbianos em muitas áreas industriais (FIECHTER, 1992).

Recentemente, biosurfactantes naturais têm atraído muita atenção devido a baixa toxicidade, biodegradabilidade e aceitação ecológica. No entanto, devido a razões funcionais e custos da produção, estes compostos ainda não estão sendo competitivos em relação aos surfactantes químicos. O uso de substratos baratos ou sub-utilizados, pode diminuir drasticamente o custo da produção de biosurfactantes. Resíduos orgânicos e industriais estão sendo apontados como possíveis substratos para a produção de biosurfactantes (MAKKAR & CAMEOTRA, 1999).

Os biosurfactantes não são considerados alternativas fáceis para os surfactantes sintéticos devido principalmente aos custos de produção. Um dos mais estudados biosurfactantes microbianos é o Surfactin, produzido pela linhagem de *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Um estudo demonstrou a ligação entre o crescimento bacteriano, a utilização de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e o aumento na produção deste biosurfactante, sugerindo que o aumento no rendimento da produção de biosurfactantes pode ser conseguido através da modificação dos substratos para o crescimento microbiano (DAVIS *et al.*, 1999).

2.2) Propriedades e aplicação dos biosurfactantes

Surfactantes derivados de microorganismos possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos como baixa toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de

substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas e estabilidade em valores extremos de pH e temperatura (FIECHTER, 1992 e PRUTHI & CAMEOTRA, 1997).

Em um estudo realizado no mar do Norte, o surfactante comercial Finasol OSR5 e um biosurfactante foram adicionados, separadamente, a porções oleosas no ambiente marinho. O biosurfactante adicionado não mostrou efeitos tóxicos sobre diatomáceas, ciliados, nematóides, copépodos e plantas aquáticas e removeu mais eficientemente o óleo quando comparado ao surfactante comercial, o qual foi altamente maléfico aos organismos marinhos (VAN DYKE *et al.*, 1991).

A limpeza de locais marítimos e terrestres contaminados por derramamentos de petróleo, remoção da borra oleosa de tanques de estocagem, remoção de metais pesados de solos e córregos contaminados, assim como um aumento geral nos processos de recuperação de óleo de reservatórios são possíveis aplicações para os biosurfactantes (VAN DYKE *et al.*, 1991).

Um dos usos para os biosurfactantes que tem recebido constante atenção é conhecido por MEOR (Microbial-Enhanced Oil Recovery) cujo processo envolve a introdução de microorganismos ou seus produtos, em reservatórios de óleo cru para melhorar a mobilização da borra oleosa e recuperar frações de hidrocarbonetos. Este método também está sendo proposto e testado em algumas partes do mundo, incluindo a região do Golfo da Arábia, para combater a poluição ambiental gerada por derramamentos acidentais de óleo. Este processo previne a persistência de camadas de óleo no ambiente, responsáveis pela depleção do oxigênio e intoxicação da vida marinha (VAN DYKE *et al.*, 1991).

Os biosurfactantes podem ser aplicados de maneira viável na limpeza dos tanques de estocagem de óleo. Os compartimentos dos tanques são limpos através de jatos d'água de alta pressão, o que pode levar a formação de misturas explosivas de gases. Quando há um acúmulo de borra oleosa no fundo do tanque, somente a lavagem mecânica não é efetiva (VAN DYKE *et al.*, 1991). Em um estudo experimental realizado por BANAT (1995), foi possível recuperar 91% da borra oleosa de um tanque de armazenagem, em cinco dias, através da aplicação de biosurfactantes.

Através de uma seleção de linhagens produtoras de biosurfactantes, na presença de alcanos em ambiente marinho gelado, duas bactérias Gram positivas foram isoladas de uma baía no mar de Ross, Antártida. Estas linhagens se mostraram eficientes em utilizar diversos compostos orgânicos como hidrocarbonetos alifáticos, ácidos graxos voláteis e bifenilos. Durante o cultivo em meio mineral utilizando apenas alcanos como fonte de carbono e energia, as duas linhagens produziram uma mistura de compostos de superfície ativa (trealose/lipídeos), extracelularmente. Estes compostos ativos foram capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 32 mN/m. Este tipo de glicolípido foi descrito apenas para linhagens de rodococos, fato que confirma as análises quimiotaxonômicas para estas cepas (YAKIMOV *et al.*, 1999).

Da mesma forma que outras bactérias capazes de utilizar hidrocarbonetos, rodococos respondem à presença de alcanos no meio através da produção de moléculas biosurfactantes que aumentam a capacidade de utilizar estes compostos hidrofóbicos como substratos para o crescimento. Para os rodococos, estes biosurfactantes são predominantemente glicolipídicos, os quais permanecem ligados à célula durante a produção. Como reduzem a tensão superficial da água em 60%, são considerados os mais potentes compostos de superfície ativa microbianos. Devido aos

custos de produção elevados, estes biosurfactantes estão sendo empregados em tratamento de efluentes industriais, que não exigem moléculas purificadas (LANG & PHILP, 1998).

Segundo LEE e colaboradores (1999), a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80 produz biosurfactantes ramnolipídicos. Em fermentadores, utilizando-se glicose como única fonte de carbono, a concentração final de células e biosurfactante, em 25 horas de crescimento bacteriano, foi de 25 g de massa seca por litro de caldo de fermentação e 4,4 g de biosurfactante por litro de caldo.

Muitos autores têm descrito que efluentes industriais podem ser utilizados com sucesso como substratos para a produção de biosurfactantes (BABU *et al.*, 1999).

Um procedimento simples de biorremediação de efluentes oleosos foi desenvolvido utilizando-se ramnolipídeos como biosurfactantes. Os ramnolipídeos na proporção de 1g por litro de efluente foram capazes de converter o efluente em uma emulsão do tipo óleo em água. A deemulsificação foi realizada com êxito com a adição de sulfato ferroso, levando a uma separação e posterior recuperação do óleo presente no efluente. Na água resultante do processo de tratamento, óleo ou ramnolipídeos não foram detectados (NAKATA & ISHIGAMI, 1999).

Durante a produção e o processamento de óleos, significantes quantidades de efluente oleoso são geradas. Este efluente não só representa um foco de poluição ambiental como ocupa um espaço enorme em tanques de estocagem. Muito deste efluente acumulado é submetido a processos de biorremediação baseados na atividade de emulsificação de bactérias que ocorrem naturalmente. Seis bactérias foram isoladas de um tanque de estocagem, mostrando habilidades em degradar hidrocarbonetos (LAZAR *et al.*, 1999).

Duas bactérias isoladas de solo contaminado com óleo, *Serratia marcerans* e *Acinetobacter calcoaceticus*, e uma linhagem de *Candida tropicalis*, isolada de solo não poluído da Universidade de Calabar, na Nigéria, foram examinadas quanto à capacidade de degradar óleo cru. A degradação do óleo cru foi detectada por métodos gravimétricos e por técnicas de cromatografia gasosa. A linhagem de *Candida tropicalis* apresentou uma capacidade de degradação superior as outras linhagens analisadas, degradando 68,9% do óleo cru após 16 dias de incubação. As análises cromatográficas mostraram que os componentes oleosos de até 32 carbonos foram preferencialmente degradados. Testes de aderência ao óleo e de emulsificação revelaram que estes parâmetros não estão relacionados pois a linhagem *Serratia marcerans* foi incapaz de emulsificar o óleo mas mostrou uma alta aderência às gotas de óleo. A bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* apresentou um mecanismo inverso, emulsificando o óleo sem apresentar aderência às gotas (IJAH, 1998).

Um trabalho desenvolvido por TZARKOVA *et al.* (1998), mostrou que uma cepa de *Corynebacterium* sp, isolada de solo contaminado com derivados de petróleo, foi capaz de mineralizar óleo cru de frações leves em experimentos que utilizaram solo contaminado ou meio mineral acrescido de óleo cru.

A degradação de óleo de oliva foi estudada em condições aeróbias termofílicas (65°C), utilizando-se uma nova linhagem de *Bacillus thermoleovorans*. Sob operação contínua em reator de escala laboratorial, o óleo de oliva foi degradado em mais de 90%. A biomassa bacteriana obtida foi consideravelmente alta, 1,05 g de massa seca para cada grama de óleo de oliva consumido (BECKER *et al.*, 1999).

Segundo VAN HAMME & WARD (1999), a adição de um surfactante químico na proporção de 2% a uma amostra de óleo cru, auxiliou na degradação do óleo por um

consórcio de microrganismos. Os surfactantes químicos têm o potencial de aumentar a biodegradação do óleo cru mas devem ser aplicados com cautela pois outros surfactantes da mesma classe e composição química do estudado, mostraram efeitos contrários aos observados, inibindo a microbiota associada ao óleo e prejudicando a biodegradação do óleo cru.

OBERBREMER *et al.* (1990), mostraram que a taxa de biodegradação de misturas oleosas pode ser duplicada através da adição de surfactantes microbianos.

Segundo KOSARIC *et al.* (1987), os biosurfactantes têm um enorme potencial de aplicação nas indústrias em geral. Os biosurfactantes podem ser utilizados na indústria de alimentos na limpeza e sanitização das plantas de processamento de alimentos, na remoção de pesticidas e ceras de frutas e vegetais e na solubilização de óleos aromatizantes na fabricação de pães e sorvetes. Na indústria petrolífera, podem ser utilizados na emulsificação e redução da viscosidade de óleos, dispersão de sólidos e modificação das propriedades reológicas dos fluidos durante a perfuração dos poços, na recuperação do petróleo, na emulsificação e dispersão dos sedimentos e do lodo na limpeza dos poços e tanques de armazenagem e ainda como agente inibitório da corrosão de equipamentos, oleodutos e tanques de caminhões transportadores. Na indústria papelreira, os surfactantes microbianos podem ser usados como dispersantes de fluidos nos equipamentos e na depuração das resinas durante o tratamento da polpa. Na indústria têxtil, os biosurfactantes podem mostrar ação lubrificante durante a fiação dos filamentos hidrofóbicos na preparação das fibras e ação umectante e solubilizante durante a tintura do tecido. A indústria de tintas pode utilizar os surfactantes microbianos para a dispersão de sólidos e atuação umectante na preparação de pigmentos, na estabilização do látex e separação dos pigmentos e na

emulsificação das graxas e estabilização das emulsões. Na indústria de plásticos, os biosurfactantes podem ser utilizados na solubilização e emulsificação de monômeros na polimerização de plásticos e elastômeros. Na área da limpeza, a ação umectante dos biosurfactantes pode ser explorada para a inibição da corrosão na limpeza ácida de equipamentos e a ação detergente na limpeza a seco e nas lavanderias em geral. Na indústria metalúrgica como agente umectante e espumante na concentração dos minérios e na lubrificação e inibição da corrosão nos equipamentos. Na área da construção civil, os biosurfactantes podem auxiliar na ligação do asfalto à areia e cascalho durante a pavimentação. Em curtumes, a ação detergente, emulsificante e umectante dos biosurfactantes podem ser utilizadas no tratamento e tintura do couro.

2.3) O papel da biorremediação em ambientes contaminados por óleos

A biorremediação pode ser definida como um processo de estimulação de situações naturais de biodegradação para a limpeza de derramamentos de óleos e tratamento de ambientes terrestres e aquáticos contaminados com compostos xenobióticos (PRINCE, 1993).

Maior segurança e menor perturbação do meio ambiente são os principais benefícios da biorremediação quando comparada às tecnologias alternativas como extração química e incineração. Os dois maiores enfoques da biorremediação são a estimulação do crescimento microbiano no local contaminado e a adição de microorganismos degradadores de hidrocarbonetos adaptados ou de biosurfactantes (MARÍN *et al.*, 1996).

A biorremediação teve um papel muito importante na limpeza do derramamento de óleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989 e há boas razões

para se acreditar que este método terá um papel importante no tratamento de futuros derramamentos de óleo em circunstâncias apropriadas (PRINCE, 1993).

A biorremediação é um método confiável e atrativo para o tratamento de solos e cursos d'água contaminados com hidrocarbonetos, sendo considerada eficiente, econômica e versátil (JAIN *et al.*, 1992).

A aplicação da microbiologia para resolver problemas de poluição por derivados de petróleo no solo e na água tem uma importância econômica e ambiental enorme (ROSENBERG, 1993).

A produção de surfactantes durante a biorremediação claramente influencia o processo, mas a maneira pela qual isto ocorre é pouco compreendida (BLACKBURN *et al.*, 1993).

Como a utilização de microrganismos geneticamente modificados em experimentos de campo vem sendo desencorajada pelos governos de países desenvolvidos, uma linhagem de *Pseudomonas putida* naturalmente adaptada, isolada de um local contaminado por óleo cru, foi utilizada para um ensaio de biorremediação em um ambiente aberto. Experimentos utilizando óleo, óleo mais bactéria, óleo mais fertilizante e óleo mais bactéria mais fertilizante foram monitorados para uma correta avaliação da degradação do óleo cru. O ensaio onde óleo, bactéria e fertilizante foram utilizados se mostrou mais eficiente na degradação do óleo cru. Verificou-se que o fertilizante auxilia o crescimento microbiano, facilitando a biorremediação (RAGHAVAN & VIVEKANANDAN, 1999).

Estudos realizados por FOGHT *et al.* (1999), utilizando um consórcio de bactérias que degradam óleo cru em ambiente marinho, sob condições de baixa temperatura

mostraram que o tipo da fonte de nitrogênio (amônia ou nitrato) incorporado ao meio sintético de água do mar afetou significativamente a taxa de biodegradação do óleo cru.

O efeito da adição de lodo de efluente doméstico na biodegradação de óleo cru foi observado por MAKI *et al.* (1999). Os experimentos foram realizados em quatro tanques simuladores de ambientes marinhos. Em cada tanque, com cascalho e água salgada, óleo cru foi adicionado à superfície. Lodo líquido, lodo desidratado e um fertilizante sintético foram adicionados aos tanques, separadamente. Os resultados indicaram que o efeito da adição de fertilizantes foi mais significativo que a adição do lodo líquido ou desidratado; este fato não exclui a possibilidade de aplicação de lodo doméstico na biodegradação de óleo cru.

Se faz necessário um maior entendimento a respeito da fisiologia, genética e bioquímica das espécies produtoras de compostos de superfície ativa, utilização de substratos baratos, aplicações específicas e um incentivo à biotecnologia para redução nos custos da produção dos biosurfactantes e aplicação em escala industrial (FIECHTER, 1992).

No cenário norte-americano, basicamente todas as grandes companhias de petróleo têm programas na área da biotecnologia, sendo os agentes de superfície ativa microbianos de grande interesse (KOSARIC *et al.*, 1987).

Como há muitas aplicações para os biosurfactantes, novos produtos com características especiais, sempre terão de ser desenvolvidos para atender à demanda comercial (GERSON, 1993).

2.4) Métodos utilizados para a determinação de poluentes em efluentes industriais

A determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é um teste empírico no qual procedimentos laboratoriais são utilizados para determinar os requerimentos relativos de oxigênio em efluentes e águas poluídas. Tem larga aplicação na medição das cargas de detritos em estações de tratamento de efluentes. O teste consiste na determinação do oxigênio molecular utilizado durante um período específico de incubação através da degradação bioquímica da matéria orgânica.

Bactérias aeróbias fazem uso do oxigênio dissolvido na água para o metabolismo e como resultado desta atividade bacteriana, a concentração de oxigênio na água é reduzida. De forma lenta, o oxigênio utilizado pelas bactérias é repostado no meio através do oxigênio atmosférico.

Antes de planejar a descarga de qualquer efluente na água, é importante conhecer a quantidade de oxigênio necessária para degradar a carga poluidora, ou seja, a demanda de oxigênio, para se evitar consequências ambientais desfavoráveis.

A demanda química de oxigênio (DQO) é usada como uma medida do oxigênio equivalente à matéria orgânica contida em uma amostra que é suscetível à oxidação através de um oxidante químico forte.

Para amostras provenientes da mesma fonte, a DQO pode ser correlacionada à DBO, carbono ou matéria orgânica (GREENBERG *et al.*, 1992).

A demanda bioquímica de oxigênio e a demanda química de oxigênio são parâmetros indiretos que determinam a carga poluidora dos efluentes industriais. A redução dos valores de DQO e DBO nas estações de tratamento de efluentes é uma preocupação constante para as indústrias em geral (VON SPERLINS, 1996).

Segundo EL-AWADY & WAHAAB (1999), o efluente bruto de uma agro-indústria estava altamente contaminado com matéria orgânica, como indicado pela DQO (3500 a 4000 mg/L) e DBO (1620 a 1800 mg/L) . A adição de uma mistura de bactérias anaeróbias ao efluente, levou a uma eliminação brusca dos poluentes. Os valores máximos de DQO e DBO, após o tratamento foram de 15 mg/L e 40 mg/L, respectivamente.

Granjas de abate de frangos, geram efluentes de difícil tratamento, com concentrações de DQO superiores a 10000 mg/L , ricos em conteúdos nitrogenados e fosfatados. Tratamentos anaeróbios mostraram efeitos negativos, com aumento da DQO em até 80%, evidenciando as limitações dos tratamentos biológicos (BABUNA *et al.*, 1999).

Bactérias isoladas de solos expostos a resíduos de indústrias farmacêuticas foram usados para o tratamento aeróbio de dois efluentes farmacêuticos. Experimentos laboratoriais seguidos de escalas piloto utilizando as bactérias isoladamente levaram a uma redução na DQO do efluente de até 75%. A suplementação da microbiota nativa do efluente com as bactérias isoladas, auxiliaram na redução do DQO (BABU *et al.*, 1999).

Tratamentos anaeróbios de efluentes usualmente não atingem os níveis de DQO necessários para a descarga sem tratamentos posteriores, devido principalmente aos resíduos solúveis elevados. No entanto, há pouca informação na literatura sobre a natureza deste material. Análises moleculares revelaram que a maioria destes resíduos são de baixa massa molar, menores que 1kDa, mas 22% dos compostos, apresenta massa molar superior a 300 kDa. A degradação aeróbia do efluente foi

significativamente mais eficiente que o tratamento anaeróbio, no entanto, os resíduos de baixa massa molar não foram removidos (POOLE *et al.*, 1999).

O tratamento anaeróbio do efluente de uma indústria de polímeros sintéticos foi analisado. A composição do efluente inclui acrilatos, estirenos, detergentes e uma quantidade mínima de silicatos. A média da DQO do efluente correspondia a 2000 mg/L. Após 140 dias de operação com uma mistura de biomassa microbiana, a DQO foi mantida estável em 500 mg/L, ou seja, uma redução de 75% (ARAYA *et al.*, 1999).

Segundo MERCADÉ *et al.* (1993), o efluente da produção de óleo de oliva pode ser utilizado como a única fonte de carbono para a produção de biosurfactantes. A bactéria produtora de surfactantes *Pseudomonas* sp. foi capaz de reduzir em 50% a DQO deste efluente, em 72 horas de crescimento.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Microorganismos

Duas linhagens de bactérias isoladas do efluente de oficinas de lavagem a vapor dos tanques de caminhões transportadores de derivados de petróleo, em trabalhos anteriores (CARVALHO *et al.*, 1997a), foram utilizadas, devido a suas características especiais de crescimento em substratos oleosos e produção de biosurfactantes. Estas linhagens foram identificadas, através da taxonomia clássica avaliando-se as características bioquímicas e morfológicas, como *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*.

As linhagens utilizadas no presente trabalho, *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*, se destacam como produtoras de biosurfactantes, cujas emulsões são do tipo óleo em água e água em óleo, respectivamente (Figura1).

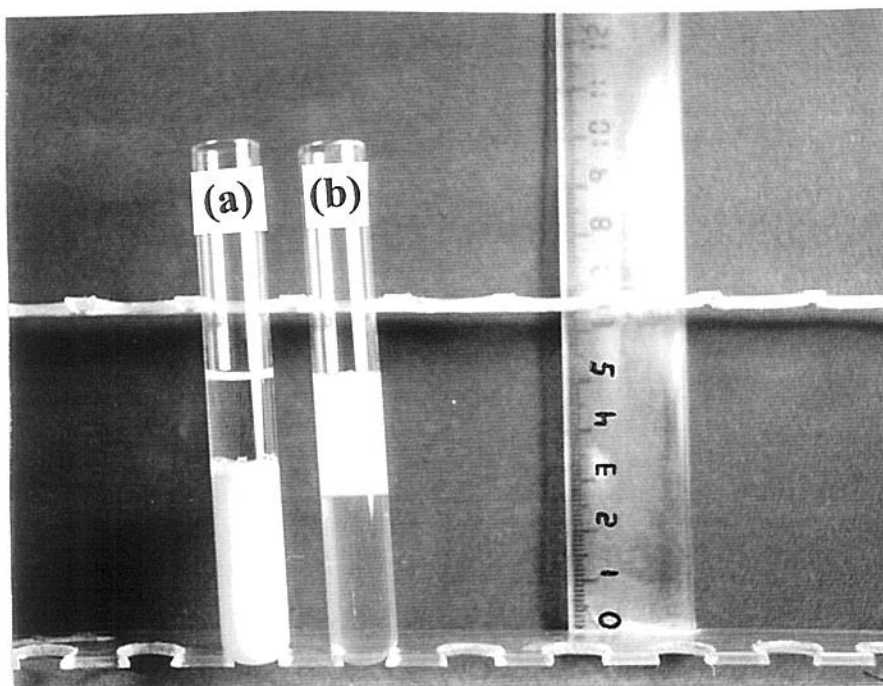


Figura 1: Emulsões do tipo óleo em água (a) e água em óleo (b), sendo a fase aquosa o caldo de cultura bacteriano e a fase oleosa, tolueno.

Devido ao fato de emulsões diferentes (água em óleo e óleo em água) serem formadas durante o crescimento de cada uma destas bactérias, provavelmente, os biosurfactantes produzidos possuem estrutura molecular e propriedades distintas.

3.2) Manutenção das linhagens

A bactéria *Planococcus citreus* foi mantida em meio YPD agar (YPD - Difco) e a linhagem *Pantoea agglomerans* foi mantida em meio nutriente agar (NA - Merck). O crescimento foi realizado a 30°C por 48 horas. A armazenagem das linhagens foi feita em geladeira a 4°C e por congelamento a -20°C em criotubos esterilizados (NUNC - 1,8 mL) contendo uma solução de caldo nutriente acrescida de 10% de glicerol.

3.3) Produção do biosurfactante

O meio de cultura líquido utilizado para a produção de biosurfactantes pelas bactérias foi constituído de 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de KH_2PO_4 , 3,0 g de NaNO_3 , 1,0 g de extrato de levedura e 0,3 g de peptona por litro de água destilada. O pH foi ajustado a 6,5 e o meio autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Como observado em experimentos anteriores (CARVALHO *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 1997a; CARVALHO *et al.*, 1997b; CARVALHO *et al.*, 1998), as melhores fontes de carbono para o crescimento das bactérias *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans* foram o óleo de oliva e o querosene, respectivamente. Desta forma, estes compostos previamente esterilizados, foram adicionados assepticamente ao meio de cultura para a produção de biosurfactantes, na proporção de 1,5% (v/v).

O inóculo das bactérias foi de uma alça de inoculação (10 µL) para cada 50 mL do meio de cultura líquido. O crescimento foi realizado em erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL do meio, à 30°C em incubadora sob agitação constante de 150 rpm, por 48 horas.

3.4) Isolamento do biosurfactante

O caldo de cultura de ambas as bactérias foi centrifugado a 9.000 rpm por 15 minutos, a 25°C. Em funis de separação de 1000 mL, com torneira de teflon, uma mistura de clorofórmio e metanol foi incorporada ao sobrenadante do caldo de cultura da linhagem *Planococcus citreus* numa proporção de 2:1:3 (clorofórmio:metanol:sobrenadante, v/v/v) (ROCHA *et al.*, 1992), enquanto que para a linhagem *Pantoea agglomerans* foi usado clorofórmio numa proporção de 2:3 (clorofórmio:sobrenadante, v/v) (modificado de ROCHA *et al.*, 1992). Os funis de separação foram agitados vigorosamente por dois minutos e mantidos em repouso por 30 segundos até a separação das fases das misturas. A espuma de coloração branca formada na fase dos solventes, a qual continha os biosurfactantes, foi separada, submetida a rotoevaporação a 65°C para recuperação dos solventes e liofilizada a – 80°C por 48 horas. Duas extrações consecutivas foram realizadas para cada 300 mL do caldo de cultura das linhagens bacterianas.

Os biosurfactantes isolados e liofilizados foram mantidos em dessecador até a utilização nos experimentos de biorremediação.

3.5) Determinação da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos

3.5.1) Efluentes oleosos a serem considerados neste trabalho

3.5.1.1) Oficina

Numa oficina situada na estrada Campinas - Paulínia, SP, km 121, são realizados reparos nos tanques de caminhões transportadores de derivados de petróleo. Devido ao risco de explosões, os compartimentos dos caminhões transportadores de óleo diesel, óleo preto e gasolina são lavados com jatos de vapor d'água anteriormente à soldagem. A água de lavagem juntamente com a parte oleosa, de todos os caminhões, é conectada a um conjunto de reservatórios de cimento ao ar livre, onde permanece para a sedimentação da borra, sem nenhum outro tratamento.

Próximo à oficina há um córrego, afluente do Rio Atibaia, que recebe constantemente este efluente oleoso. O Rio Atibaia é um dos responsáveis pelo abastecimento de água na região de Campinas.

3.5.1.2) Indústria de sabões e margarinas

O efluente gerado por uma indústria de sabões e margarinas situada no município de Valinhos, SP, é constituído basicamente de resíduos de glicerina, óleo de babaçu e cloreto de sódio, resultantes da fabricação dos sabões, e mistura de óleos vegetais (soja, palma, algodão, babaçu e girassol), resultante da fabricação das margarinas.

Todo o efluente é tratado de acordo com as normas estabelecidas pela legislação brasileira (VON SPERLINS, 1996).

3.5.2) Pontos de amostragem dos efluentes

a) Oficina - as amostras foram retiradas do primeiro tanque de decantação, cujo efluente se apresenta mais concentrado.

b) Indústria de sabões e margarinas - as amostras foram retiradas do reservatório onde os efluentes da produção de sabões e margarinas se juntam.

3.5.3) Ensaios de biorremediação

Todas as amostras de efluentes, tanto da oficina como da indústria de sabões e margarinas, foram utilizadas sem prévia esterilização ou ajuste de pH, para simular ao máximo as condições naturais.

Um volume de 50 mL dos efluentes foi transferido para erlenmeyers de 125 mL, previamente esterilizados. O experimento foi realizado a 30°C, sob agitação constante a 150 rpm. Os tempos de incubação foram de 24, 48, 72 e 120 horas. Um frasco controle de cada efluente, sem inóculo, foi mantido sob as mesmas condições.

O efeito da adição de bactérias ou biosurfactantes aos efluentes foi analisado em quatro etapas:

Ensaio 1 - Adição da linhagem bacteriana aos efluentes: (a) *Planococcus citreus* e (b) *Pantoea agglomerans*. Para ambas bactérias, três alças de inoculação (10 µL, descartáveis), foram adicionadas à 3 mL de água destilada esterilizada, sendo que 1 mL desta mistura foi utilizado como inóculo para cada 50 mL do caldo.

Ensaio 2 - Proporções iguais das linhagens *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans* foram adicionadas simultaneamente aos efluentes. Três alças de inoculação (10 µL descartáveis), de cada uma das culturas, foram adicionadas à 6 mL

de água destilada esterilizada, sendo que 1 mL desta mistura foi utilizado como inóculo para cada 50 mL do caldo.

Ensaio 3 - Os biosurfactantes isolados e liofilizados produzidos pelas bactérias (a) *Planococcus citreus* e (b) *Pantoea agglomerans* foram adicionados aos efluentes, na proporção de 0,5 g para cada 100 mL do caldo (BANAT, 1995).

Ensaio 4 - Os biosurfactantes isolados e liofilizados de cada uma das bactérias *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans* foram adicionados simultaneamente aos efluentes, na proporção de 0,25 g para cada 100 mL do caldo (BANAT, 1995).

3.5.4) Determinação da concentração celular

A massa seca foi determinada através da centrifugação de 50 mL do efluente durante 15 minutos a 9.000 rpm. A massa celular foi lavada com 2 mL de uma solução acetona: hexano (3:1, v/v), para a remoção de resíduos oleosos, e após a centrifugação, foi seca a 105°C por 24 horas e pesada (PRUTHI & CAMEOTRA, 1997).

A concentração celular durante a produção de biosurfactantes foi realizada da mesma forma, sendo que 300 mL de caldo de cultura foram utilizados para determinar o rendimento da produção de biosurfactantes.

3.5.5) Determinação dos valores de DQO dos efluentes

Alíquotas do efluente dos ensaios 1, 2, 3, 4 e dos frascos controles foram retiradas dos erlenmeyers incubados, nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 120 horas. A determinação dos valores de DQO dos efluentes foi realizada conforme metodologia descrita pelo Standard Methods (GREENBERG *et al.*, 1992), a qual utiliza dicromato de potássio como agente oxidante.

Para a determinação da DQO dos efluentes, foi adicionado a 1,0 mL de amostra 0,02 g de catalisador para DQO (Hach), 0,5 mL de dicromato de potássio 0,25N e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi mantida sob refluxo por 2 horas a 150°C. Após este período a mistura foi resfriada até 25°C e 2,9 mL de água destilada foram adicionados a mesma. O branco foi determinado substituindo-se 1,0 mL de amostra por 1,0 mL de água destilada.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro da marca Hach, DR-2000, programado para a determinação de DQO (código 440).

3.5.6) Atividade do biosurfactante

A atividade do biosurfactante foi determinada através das atividades das emulsões formadas, tipo água em óleo ou óleo em água.

A atividade do biosurfactante foi determinada após a liofilização dos biosurfactantes isolados para determinação da viabilidade dos mesmos. A determinação das atividades de emulsificação dos biosurfactantes bacterianos foi realizada com os biosurfactantes extraídos, isolados e liofilizados. Uma diluição padrão de 2,0 mg de biosurfactante por mililitro de água destilada, para cada método de extração, foi utilizada para determinação das atividades de emulsificação.

Especificamente para os ensaios 1a, 1b e 2 do item 3.5.3, determinou-se se as linhagens adicionadas ao efluente produziram biosurfactantes durante os tempos de incubação de 24, 48, 72 e 120 horas.

As atividades de emulsificação foram determinadas através da agitação vigorosa em agitador de tubos (Vortex) de 3,5 mL do caldo de cultura (centrifugado a 9.000 rpm por 15 minutos) e 2,0 mL do hidrocarboneto tolueno, acondicionados em tubo de ensaio

Pyrex de 13x100 mm e 1 cm de diâmetro. Após uma hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi medida a 610 nm e relatada como atividade de emulsificação; a unidade de emulsificação (U) é definida como a quantidade de biosurfactante capaz de elevar a absorbância do sistema em uma unidade (JOHNSON *et al.*, 1992). Após 24 horas, a altura do halo formado na fase oleosa, devido às emulsões água em óleo, foi expressa em centímetros (COOPER & GOLDENBERG, 1987). Os halos formados foram classificados de acordo com o tamanho e compactação das bolhas em +1 a +4 (Figura 2), sendo o código +4 utilizado como referência do grau máximo de compactação das bolhas e coesão à parede do tubo de ensaio.

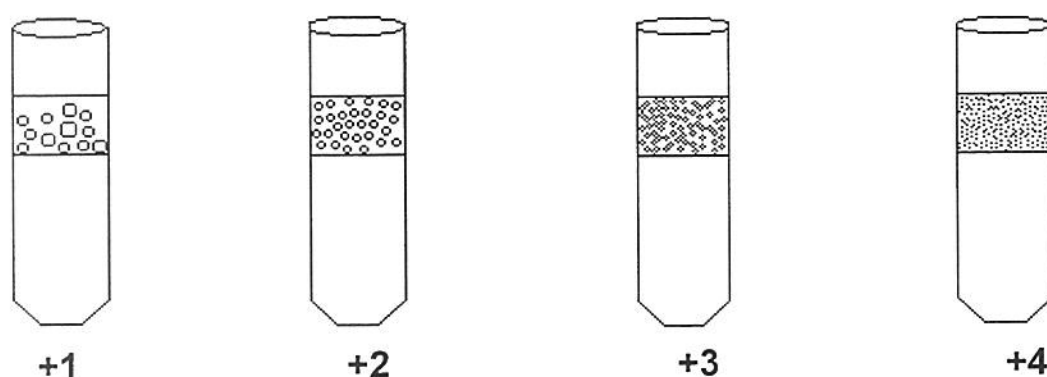


Figura 2: Perfil de compactação das bolhas nos halos formados na fase oleosa.

3.5.7) Alterações nos efluentes

Modificações identificáveis a olho nu, como mudanças na coloração, formação de espumas e crescimento microbiano nas bordas dos erlenmeyers, foram avaliadas durante todo o período de experimentação dos ensaios de biorremediação.

A variação de pH foi determinada em todos os intervalos de incubação.

3.5.8) Estudo da degradação dos hidrocarbonetos e óleos vegetais por cromatografia gasosa

3.5.8.1) Preparo das amostras para análise por cromatografia gasosa

As amostras do efluente da indústria de sabões e margarinas, cuja avaliação dos ácidos graxos presentes foi realizada por cromatografia gasosa, foram preparadas para análise através de metilação. A metilação dos ácidos graxos é fundamental para a volatilização dos mesmos, permitindo que sejam detectados pela cromatografia gasosa.

A metodologia empregada está de acordo com SASSER (1990) e SILVA (1996).

Para o preparo dos ácidos graxos para análise, quatro etapas foram realizadas: saponificação, metilação, extração dos ésteres metílicos e lavagem.

Durante a saponificação, foi adicionado 1 mL do reagente A (45 g de NaOH, 150 mL de metanol e 150 mL de água destilada) a 1 mL do efluente presente em tubo de ensaio com tampa de teflon rosqueável. Em seguida, o tubo foi agitado por 10 segundos em agitador de tubos e imediatamente colocado em água fervente (98°C) por 5 minutos. O tubo foi resfriado naturalmente, novamente agitado e recolocado em banho a 98°C, por mais 25 minutos. Após este período, o tubo foi esfriado naturalmente.

Na etapa de metilação, o tubo oriundo da saponificação foi agitado por 10 segundos após a incorporação de 2,0 mL do reagente B (325 mL de ácido clorídrico 6N e 275 mL de metanol). Após a agitação, o tubo foi colocado em banho termostatizado a 80°C, com variação máxima de temperatura de 1°C, durante 10 minutos. O tubo foi resfriado rapidamente em gelo.

Para a extração, foi adicionado ao tubo que continha os ácidos graxos metilados, 1,25 mL do reagente C (200 mL de hexano e 200 mL de éter metil t-butilíco). O tubo foi

incubado em agitador de tubos vertical a 20 rpm, por 10 minutos. Ocorreu uma visível separação de fases. A fase superior foi retirada com uma pipeta Pasteur e sofreu um procedimento de lavagem.

Foi adicionado 3,0 mL do reagente D (10,8 g de NaOH em 900 mL de água deionizada) ao tubo que continha a fase superior. Em seguida, o tubo foi colocado em agitador de tubos vertical a 20 rpm, por 5 minutos. Novamente, duas fases bem definidas foram formadas. Aproximadamente 2/3 da camada superior foram retirados com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidos para pequenos tubos acondicionadores de amostras para análise em cromatografia gasosa.

As amostras foram congeladas a -20°C e anteriormente às análises, as mesmas foram descongeladas e secas com gás nitrogênio, sendo posteriormente ressuspensas em 50 μL de hexano (grau cromatográfico), no mesmo tubo de acondicionamento com vedação em teflon (Shimadzu).

As amostras do efluente da oficina foram diluídas em hexano (grau cromatográfico), na proporção de 10 μL do efluente para 1000 μL de hexano e mantidas em tubos de acondicionamento com vedação em teflon (Shimadzu) a -20°C até a análise cromatográfica.

3.5.8.2) Degradação dos compostos oleosos presentes nos efluentes

A degradação dos compostos oleosos presentes nos efluentes foi analisada por cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-14A, integrador Shimadzu, modelo Chromatopac C-R4A, detector por ionização em chama (FID) e injetor split/splitless.

Estabeleceu-se como degradação dos compostos oleosos, a redução na área dos picos analisados por cromatografia gasosa, em relação ao efluente sem tratamento.

A degradação dos óleos vegetais do efluente da indústria de sabões e margarinas, foi analisada através dos ácidos graxos metilados presentes, por cromatografia gasosa, utilizando-se coluna CBP-1(Shimadzu), 25 m X 0,32 mm d.i. e 0,25 µm de espessura de filme, detector FID a 250° C, injetor a 250°C, razão de *split* 50:1 e hélio como gás de arraste num fluxo de 20 mL/min. A coluna foi mantida a 160°C por 20 minutos, depois foi mantida a 200°C por 15 minutos, através de rampa de temperatura a 5°C por minuto até 200°C. O volume de amostra injetado foi de 2 µL (SUPELCO, 1994).

Tabela I: Códigos e nomenclatura usual para os ácidos graxos utilizados como padrões

Acido graxo	Código	Identificação	Nomenclatura usual
1	11:0	Me. undecanoato	
2	2-OH 10:0	Me. 2-hidroxicadecanoato	
3	12:0	Me. dodecanoato	ácido láurico
4	13:0	Me. tridecanoato	
5	2-OH 12:0	Me. 2-hidroxicadecanoato	
6	3-OH 12:0	Me. 3-hidroxicadecanoato	
7	14:0	Me. tetradecanoato	ácido mirístico
8	i-15:0	Me. 13-metiltetradecanoato	
9	a-15:0	Me. 12-metiltetradecanoato	
10	15:0	Me. pentadecanoato	
11	2-OH 14:0	Me. 2-hidroxitetradecanoato	
12	3-OH 14:0	Me. 3-hidroxitetradecanoato	
13	i-16:0	Me. 14-metilpentadecanoato	
14	16:1 ⁹	Me. cis-9-hexadecenoato	
15	16:0	Me. hexadecanoato	ácido palmítico
16	i-17:0	Me. 15-metilhexadecanoato	
17	17:0Δ	Me. cis-9,10- metilenoheptadecanoato	
18	17:0	Me. heptadecanoato	
19	2-OH 16:0	Me. 2-hidroxiheptadecanoato	
20	18:2 ^{9,12}	Me. cis-9,12- octadecadienocanoato	ácido linoléico
21	18:1 ⁹	Me. cis-9-octadecenoato	ácido oléico
22	18:1 ⁹ 18:1 ¹¹	Me. trans-9-octadecenoato e cis-11-octadecenoato	
23	18:0	Me. octadecanoato	ácido esteárico
24	19:0Δ	Me. cis-9,10-metilenooctadecanoato	
25	19:0	Me. nonadecanoato	
26	20:0	Me. eicosanoato	

Sendo, Me.: éster metílico

Foi utilizada como padrão de ácidos graxos, uma mistura de 26 ésteres metílicos de ácidos graxos em metil caproato (10 mg/mL) da Matreya, INC., nº 1114. A tabela I faz menção aos códigos e identificações dos ácidos graxos (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

A degradação dos hidrocarbonetos do efluente da oficina foi analisada por cromatografia gasosa, utilizando-se coluna Supelcowax-10 (Supelco), 30 m X 0,53 mm d.i. e 1 µm de espessura de filme, detector FID a 280°C, injetor a 250°C, razão de *split* 50:1 e hélio como gás de arraste num fluxo de 15 mL/min. A coluna foi mantida a 40°C por 5 minutos, depois a 200°C por 5 minutos, através de rampa de temperatura a 5°C por minuto até 200°C. O volume de amostra injetado foi de 1µL (SUPELCO, 1996).

Foi utilizada como padrão de hidrocarbonetos, uma mistura de 10 µL de benzeno, tolueno, m-xileno, p-xileno, o-xileno e heptano, em 1000 µL de hexano (ROOSE & BRINKMAN, 1998), sendo todos os compostos de grau cromatográfico.

Anteriormente à análise das amostras dos efluentes tratados, os padrões de ácidos graxos e de hidrocarbonetos foram submetidos à cromatografia gasosa, no volume de 2µL.

4) RESULTADOS

4.1) Identificação das linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas na biorremediação dos efluentes foram submetidas a testes bioquímicos e tiveram as características morfológicas analisadas (KRIEG & HOLT, 1984; SNEATH *et al.*, 1986). A tabela II retrata as características morfológicas e bioquímicas mais significativas que permitiram a identificação das bactérias estudadas como *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*.

Devido aos avanços tecnológicos na área da taxonomia de microrganismos, muitos gêneros estão sendo rearranjados ou reclassificados de acordo com informações moleculares ou genéticas. Não é raro observar que a nomenclatura de determinadas espécies está em desuso ou tem sido considerada sinônimo de outras linhagens. Segundo informações obtidas no National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemanha (<http://www.dsmz.de>), o gênero da bactéria Gram negativa considerada no presente trabalho, *Pantoea agglomerans* (Gavini, 1989), está sendo utilizado como sinônimo do gênero *Enterobacter*.

As linhagens bacterianas estudadas pertencem a gêneros que habitam preferencialmente o solo. A bactéria *Planococcus citreus* pode suportar concentrações de cloreto de sódio superiores a 5% e tem sido isolada de ambientes marinhos (KRIEG & HOLT, 1984; SNEATH *et al.*, 1986). No entanto, na revisão da literatura apresentada no presente trabalho, nenhuma referência foi encontrada a respeito da utilização dos gêneros *Planococcus* e *Pantoea* em trabalhos de biorremediação.

Devido à característica halofílica da linhagem *Planococcus citreus*, uma atenção maior deveria ser depositada a este gênero pois a potencialidade de aplicação desta

bactéria em experimentos em ambientes marinhos contaminados por compostos oleosos é elevada.

Como as bactérias *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans* não são cepas patogênicas, uma maior segurança é confiada à manipulação das linhagens para estudos em campo e aplicações em locais contaminados.

Tabela II: Principais características morfológicas e bioquímicas das linhagens bacterianas estudadas

CARACTERÍSTICAS	<i>Planococcus citreus</i> Linhagem tipo: <i>Planococcus citreus</i> (Migula, 1894)	<i>Pantoea agglomerans</i> Linhagem tipo: <i>Pantoea agglomerans</i> (Gavini, 1989)
Reação de Gram	positivo	negativo
Forma celular	cocos	bastonetes curtos
Arranjo	isolados ou em pares	isolados
Esporos	ausentes	ausentes
Pigmentação	laranja	amarela
Requerimento de oxigênio	aeróbio estrito	anaeróbio facultativo
Catalase	positivo	positivo
Oxidase	negativo	negativo
Motilidade	positivo	positivo
Citrato (Simmons')	negativo	positivo
Voges-Proskauer	negativo	positivo
Vermelho de metila	negativo	positivo
Gelatinase	positivo	positivo (fraco)
Urease	negativo	negativo
Hidrólise da esculina	negativo	negativo
Lipase	negativo	negativo
β -galactosidase (ONPG)	negativo	positivo
Indol	negativo	negativo
H ₂ S	negativo	negativo

4.2) Rendimento dos biosurfactantes produzidos

Após 12 horas de crescimento da linhagem *Planococcus citreus* no meio de produção de biosurfactantes, com óleo de oliva como fonte de carbono, as células bacterianas envolveram as gotas de óleo formando uma camada de cor alaranjada na superfície do meio. Com 48 horas de incubação, o óleo de oliva adicionado ao meio de cultura ficou visualmente não perceptível e um grande aglomerado celular foi observado.

Após 8 horas de crescimento da linhagem *Pantoea agglomerans* no meio de produção de biosurfactantes, com querosene como fonte de carbono, foi possível observar a formação de espumas na superfície do meio e um filme microbiano aderido ao frasco erlenmeyer.

A figura 3 mostra (1) o crescimento da linhagem *Planococcus citreus* no meio de produção de biosurfactantes, com óleo de oliva como fonte de carbono em 48 horas de incubação; (2) o crescimento da linhagem *Pantoea agglomerans* no meio de produção de biosurfactantes, com querosene como fonte de carbono em 12 horas de incubação; (3) a aparência dos biosurfactantes bacterianos após a liofilização.

Como pode ser notado na figura 3, um pó fino e claro caracteriza os biosurfactantes produzidos pelas linhagens *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*.

Como mostrado na figura 4, o rendimento do biosurfactante produzido pela bactéria *Planococcus citreus* foi superior ao da linhagem *Pantoea agglomerans*; fato que pode ser relacionado à concentração celular das culturas no meio líquido de produção estudado.

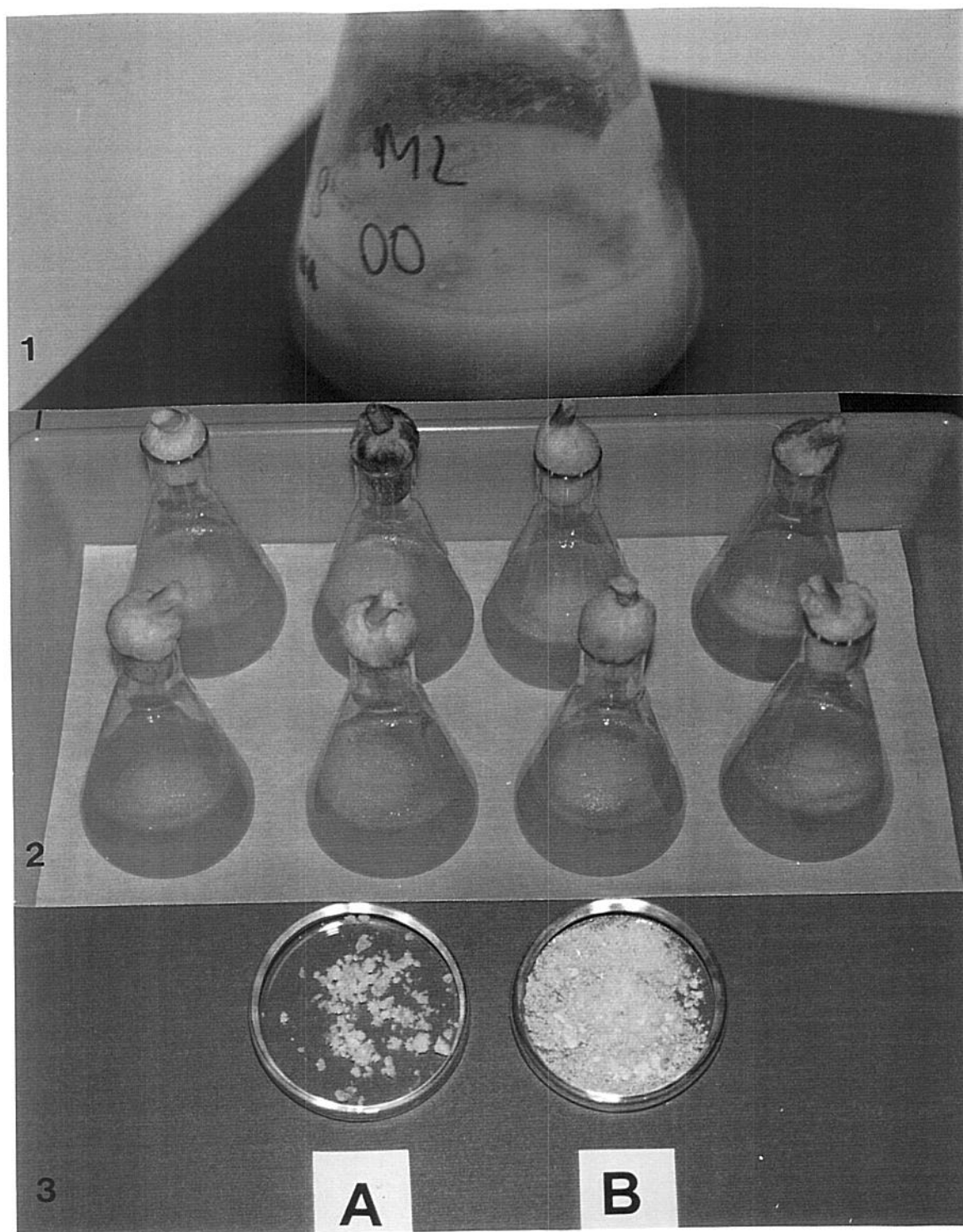


Figura 3: (1) - crescimento da linhagem *Planococcus citreus* no meio de produção de biosurfactantes, com óleo de oliva como fonte de carbono em 48 horas de incubação; (2) - crescimento da linhagem *Pantoea agglomerans* no meio de produção de biosurfactantes, com querosene como fonte de carbono em 12 horas de incubação; (3) - a aparência dos biosurfactantes bacterianos após a liofilização (a: biosurfactante de *Planococcus citreus*; b: biosurfactante de *Pantoea agglomerans*).

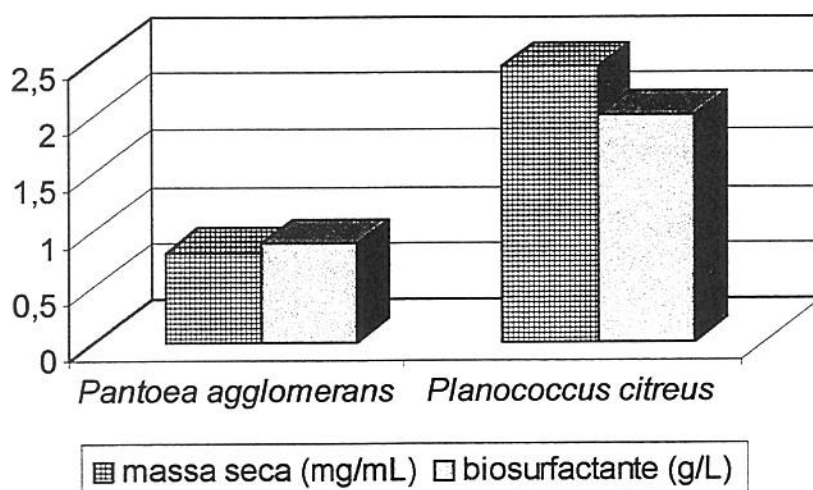


Figura 3: Rendimento da produção de biosurfactantes bacterianos.

O apêndice 4 mostra o aspecto dos biosurfactantes bacterianos obtidos após a liofilização. Como pode ser notado, um pó fino e claro caracteriza os biosurfactantes produzidos pelas linhagens *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*.

A utilização da fonte de carbono oleosa pelas bactérias estudadas é rápida no meio de cultura para a produção de biosurfactantes, pois em 48 horas do crescimento bacteriano, o óleo incorporado ao meio passa a não ser detectado a olho nu. Este dado tem importância para uma possível produção destes biosurfactantes em escala piloto ou industrial.

O rendimento do biosurfactante produzido pela linhagem *Planococcus citreus* (2,014 g/L) pode ser considerado significativo pois, segundo NAVON-VENEZIA e colaboradores (1995), o biosurfactante Alasan tem um rendimento de 2,35 g/L, em fermentador de 2,5 litros.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Possivelmente, a utilização de um estudo estatístico para a simulação de um meio de cultura ideal para a produção de biosurfactantes fosse interessante para aumentar o rendimento dos compostos de superfície ativa produzidos.

4.3) Atividade de emulsificação dos biosurfactantes bacterianos

Em relação ao biosurfactante produzido pela bactéria *Pantoea agglomerans*, a extração apenas com clorofórmio se mostrou mais eficiente pois a emulsão água em óleo formada, evidenciada por um halo de 2,5 cm de altura com grau máximo de compactação das bolhas (+4), se manteve estável por 24 horas. A extração com clorofórmio e metanol, não mostrou a mesma performance, uma vez que o halo formado de apenas 1,5 cm (+3) não se manteve por 24 horas.

A linhagem *Planococcus citreus* produziu um biosurfactante que foi melhor extraído com clorofórmio e metanol, mostrando atividade de emulsificação do tipo óleo em água. Para a avaliação da atividade de emulsificação do biosurfactante isolado, uma concentração de 0,625 mg de biosurfactante por mililitro de água destilada foi utilizada em virtude da alta turbidez da diluição padrão (2 mg/mL). A atividade de emulsificação obtida foi muito significativa para a concentração utilizada (1,079 U).

A detecção da atividade de emulsificação nas soluções de biosurfactantes retrata a viabilidade e integridade dos compostos de superfície ativa mesmo após a extração e liofilização, o que indica que estas etapas metodológicas não afetaram a estrutura química ou a funcionalidade dos surfactantes bacterianos estudados.

Em muitos trabalhos (COOPER & GOLDENBERG, 1987; ROCHA *et al.*, 1992; PRUTHI & CAMEOTRA, 1997; DAVIS *et al.*, 1999; KARANTH *et al.*, 1999; MAKKAR & CAMEOTRA, 1999; HABA *et al.*, 2000) a avaliação da viabilidade dos biosurfactantes

após a extração e o isolamento é realizada através da redução da tensão superficial da água destilada.

Neste trabalho, a avaliação do potencial surfactante do agente de superfície ativa produzido pelas linhagens bacterianas foi realizada através das atividades de emulsificação em função do aumento da absorbância (emulsões do tipo óleo em água) e/ou em relação ao halo formado na fase oleosa (emulsões do tipo água em óleo).

Optou-se pela atividade de emulsificação devido à facilidade de reprodução das análises e pela disponibilidade de se avaliar o tipo de emulsão formada entre o biosurfactante estudado e a fonte oleosa utilizada nos experimentos de emulsificação.

4.4) Ensaios de biorremediação

Para todos os ensaios, as modificações ocorridas nos efluentes, passíveis de análises, foram observadas em 24, 48, 72 e 120 horas de incubação, em triplicatas.

4.4.1) Determinação da concentração celular das linhagens durante o crescimento nos efluentes

Os resultados apresentados no apêndice 1, retratam a concentração celular das linhagens subtraídas da massa determinada nos controles. A massa celular encontrada nos controles (tempo zero) foi representada por sólidos presentes nos efluentes, uma vez que os mesmos foram utilizados sem prévia filtração ou esterilização.

As figuras 5 a 10 mostram os resultados obtidos em relação à concentração celular presente nos ensaios de biorremediação 1a (adição de *Planococcus citreus*), 1b (adição de *Pantoea agglomerans*) e 2 (consórcio de bactérias).

Através da concentração celular das linhagens nos efluentes durante o período de incubação, pode-se observar que quando as linhagens bacterianas foram adicionadas na forma de consórcio ao efluente da oficina, um aumento do crescimento bacteriano pode ser observado. O aumento da concentração celular no efluente, quando o consórcio foi utilizado, não permitiu reconhecer qual linhagem apresentou um crescimento maior, aumentando o valor da concentração celular total do efluente. Portanto, a adição conjunta das bactérias ao efluente da oficina, possivelmente possibilitou uma utilização dos compostos resultantes do metabolismo de uma linhagem como substrato para o desenvolvimento da outra. Também pode ter ocorrido a utilização, por uma das linhagens, de componentes celulares da outra cepa bacteriana em fase de morte celular. Estas possibilidades apenas poderão ser comprovadas com estudos específicos do comportamento celular das linhagens no efluente oleoso da oficina.

O efluente da indústria se mostrou muito favorável ao crescimento bacteriano, pois a concentração celular das linhagens foi alta durante todos os períodos de incubação. Devido à elevada massa celular produzida durante o crescimento da linhagem *Planococcus citreus* no efluente da indústria, até 130 mg por mililitro do efluente, o efluente da indústria pode ser considerado um substrato em potencial para a produção de biosurfactantes ou massa celular desta linhagem. Valores superiores aos determinados, são relatados por BECKER *et al.* (1999), onde uma linhagem aeróbia de *Bacillus thermoleovorans* produziu uma biomassa seca de 1,05 g por grama de óleo de oliva consumido.

De forma contrária ao ocorrido com o efluente da oficina, a adição das bactérias simultaneamente ao efluente interferiu no crescimento das linhagens, uma vez que o

crecimento das bactérias isoladamente no efluente foi mais significativo que em consórcio. As diferenças de massa celular da adição separada das linhagens e em consórcio, podem ser justificadas pela rápida utilização dos compostos oleosos como substrato metabólico pelas linhagens em consórcio; portanto, com uma redução do substrato disponível, as bactérias entrariam em fase estacionária ou de morte, condição que pode ser confirmada pelos valores reduzidos de massa celular do consórcio de bactérias em comparação à adição isolada das linhagens ao efluente da indústria.

É evidente que a otimização do crescimento das linhagens bacterianas pode ser conseguido com a utilização de fermentadores, ajuste do pH inicial do efluente e com o enriquecimento do efluente com fontes de nitrato e fosfato.

Como observado anteriormente, o rendimento da produção de biosurfactantes está relacionado à concentração celular da linhagem no meio de produção, portanto, um aumento no número de células viáveis no efluente possivelmente acarretará em uma maior produção de biosurfactantes no meio, contanto que o substrato seja repostado continuamente.

4.4.2) Determinação da DQO durante os ensaios de biorremediação

Os apêndices 2 e 3 mostram os resultados obtidos nos ensaios de biorremediação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os valores da DQO iniciais dos efluentes referentes ao tempo zero de crescimento microbiano, foram determinados da mesma maneira que os efluentes que sofreram adição de microrganismos ou produtos microbianos. O valor da DQO inicial do efluente da oficina foi de 5500 mg/L e do efluente da indústria, 4400 mg/L.

As figuras 5 a 12 mostram os resultados obtidos em relação à porcentagem de redução da DQO durante os vários ensaios de biorremediação.

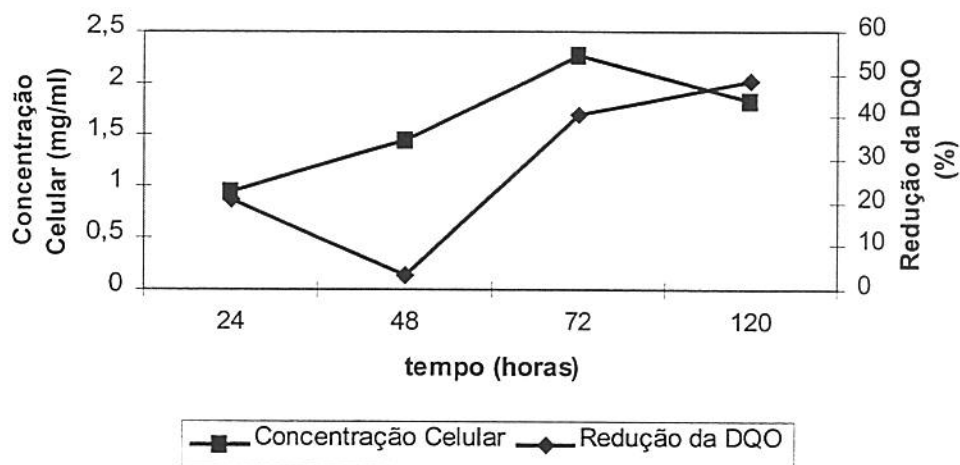


Figura 5: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 1a (*Planococcus citreus*) no efluente da oficina.

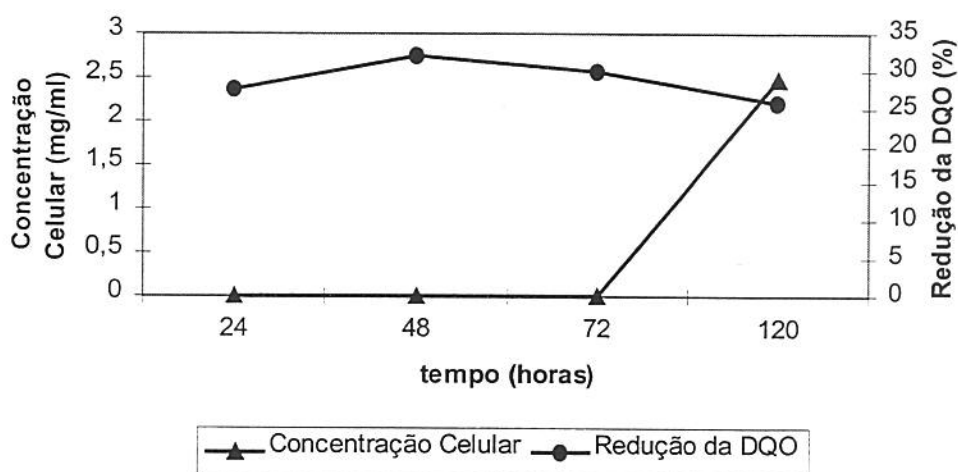


Figura 6: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 1b (*Pantoea agglomerans*) no efluente da oficina.

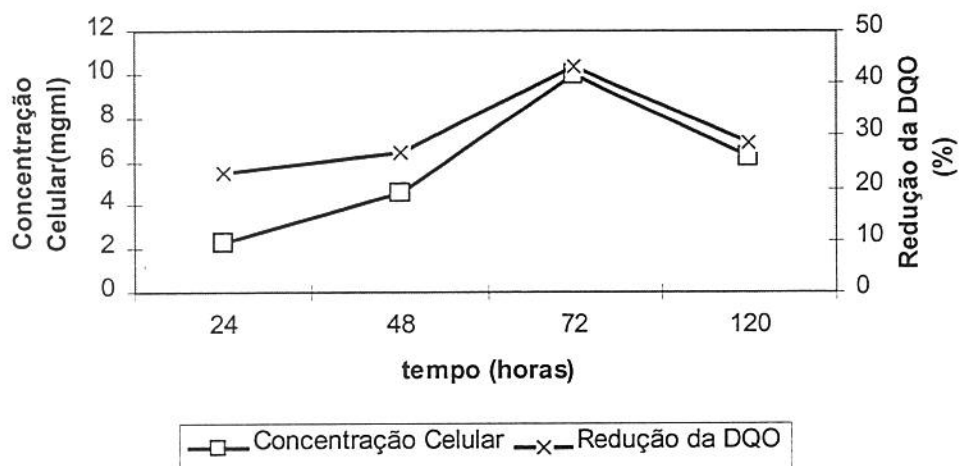


Figura 7: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 2 (consórcio das bactérias) no efluente da oficina.

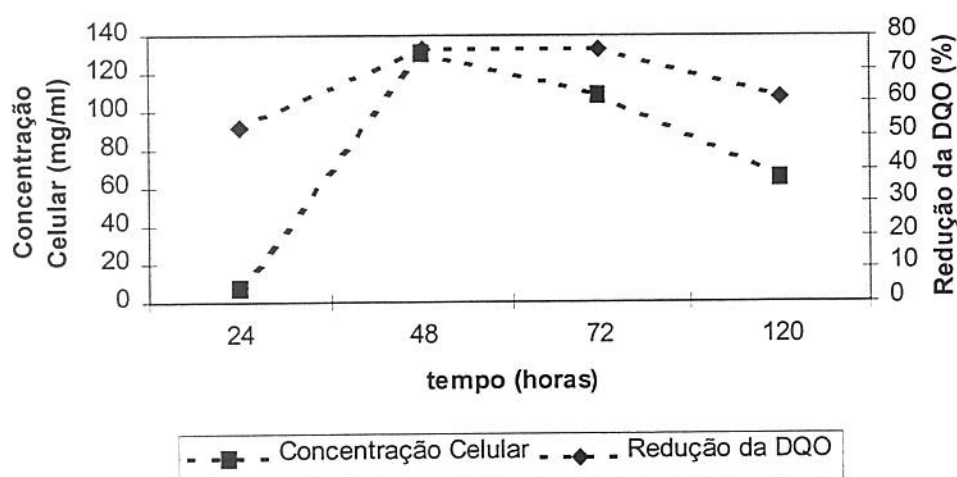


Figura 8: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 1a (*Planococcus citreus*) no efluente da indústria.

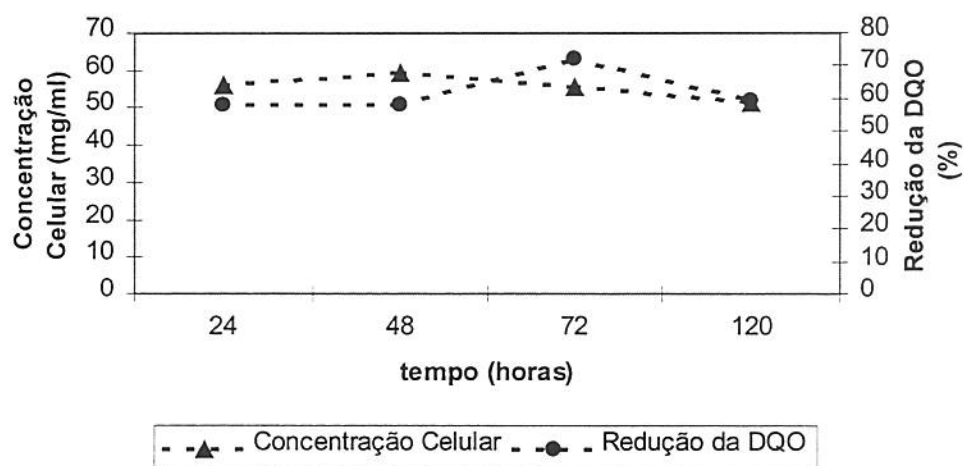


Figura 9: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 1b (*Pantoea agglomerans*) no efluente da indústria.

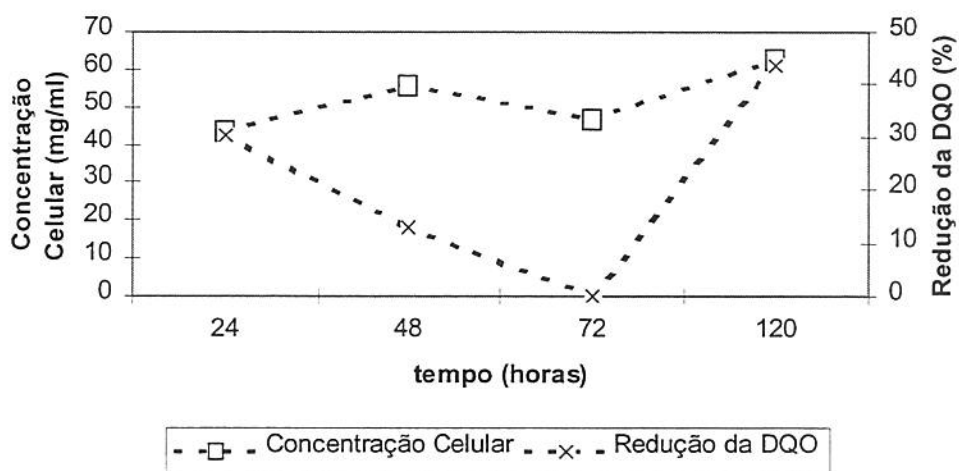


Figura 10: Concentração celular e porcentagem de redução da DQO durante o ensaio 2 (consórcio de bactérias) no efluente da indústria.

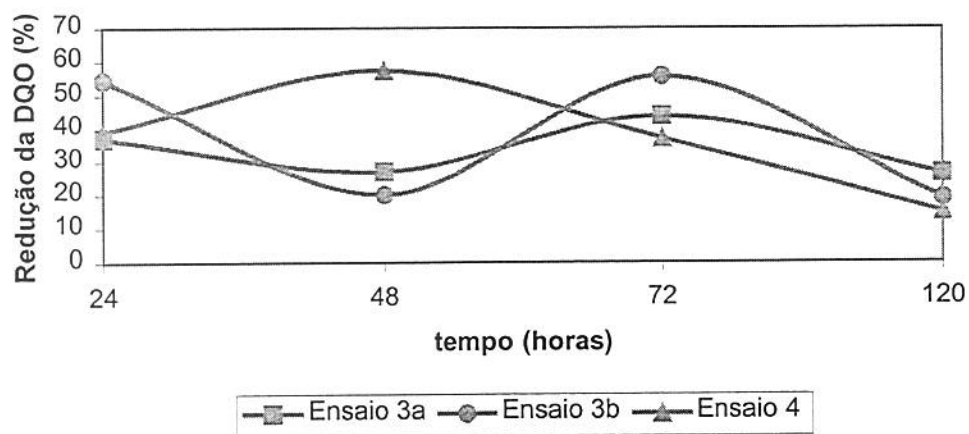


Figura 11: Redução da DQO (%) durante os ensaios 3a (biosurfactante produzido por *Planococcus citreus*), 3b (biosurfactante produzido por *Pantoea agglomerans*) e 4 (consórcio dos biosurfactantes) no efluente da oficina.

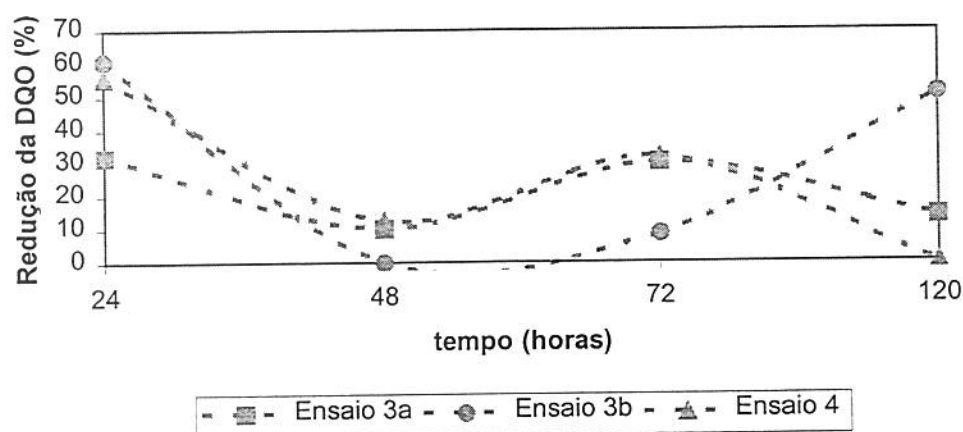


Figura 12: Redução da DQO (%) durante os ensaios 3a (biosurfactante produzido por *Planococcus citreus*), 3b (biosurfactante produzido por *Pantoea agglomerans*) e 4 (consórcio dos biosurfactantes) no efluente da indústria.

De forma geral, os ensaios de biorremediação levaram a uma queda significativa nos valores da DQO iniciais dos efluentes oleosos utilizados. O efluente da oficina sofreu uma redução na demanda química de oxigênio em todos os tempos e ensaios de biorremediação a que foi submetido. Como a detecção da DQO é realizada através da oxidação química das estruturas presentes na amostra por um oxidante forte, a redução na demanda química de oxigênio pode estar relacionada ou à redução na quantidade de matéria orgânica presente na amostra ou à indisponibilidade de oxidação dos compostos presentes.

Como os biosurfactantes disponibilizam os compostos oleosos à célula microbiana, emulsificando-os, fica evidente a correlação entre crescimento celular, produção e liberação de biosurfactantes e redução da demanda química de oxigênio em função da utilização da matéria orgânica. Esta correlação pode ser verificada nos ensaios 1a e no ensaio 2 de biorremediação. A elevada redução da DQO nestes experimentos pode ser associada à concentração celular das linhagens no efluente.

O ensaio 1b de biorremediação levou a uma redução significativa da DQO (exemplo: 32,18 % em 48 horas de incubação), sem uma relação com a massa celular da bactéria no efluente, uma vez que a concentração celular se mostrou nula nas primeiras 72 horas de incubação. Estes resultados podem ser justificados no fato de que o inóculo inicial bacteriano poderia ter apresentado células com compostos ativos (biosurfactantes) já ligados à superfície celular para disponibilizar os compostos oleosos presentes no meio à bactéria. Possivelmente, a bactéria estaria utilizando os compostos oleosos, durante o metabolismo, numa fase de adaptação ao meio (efluente da oficina). Durante esta fase, os compostos oleosos poderiam estar sendo

Os ensaios de biorremediação 3 e 4, onde os biosurfactantes liofilizados foram adicionados separadamente ou em consórcio aos efluentes oleosos, se mostraram eficientes na redução da DQO dos efluentes da oficina e da indústria. A maior redução na DQO do efluente da oficina (57,45 %) foi conseguida em 48 horas de incubação do consórcio de biosurfactantes bacterianos. Para o efluente da indústria, o resultado mais significativo foi de 60,90 % de redução da DQO em 24 horas de incubação do biosurfactante isolado produzido pela linhagem *Pantoea agglomerans*.

É sabido que os biosurfactantes não degradam compostos oleosos mas os disponibilizam à célula microbiana, na forma de gotículas menores de óleo (ÁSCON-CABRERA & LEBEAULT, 1995; BAKER & HERSON, 1994). Desta forma, a redução da demanda química de oxigênio nos efluentes submetidos aos ensaios 3 e 4 de biorremediação somente pode ser explicada de duas maneiras. A primeira justificativa pode ser relacionada à emulsificação dos compostos oleosos pelos biosurfactantes adicionados ao efluente, de tal forma que a oxidação dos mesmos pelo agente oxidante forte utilizado no teste da DQO, ficasse impossibilitada. Uma outra explicação cabível seria a utilização dos compostos oleosos, emulsificados pelos biosurfactantes, por microrganismos presentes naturalmente no efluente da oficina e da indústria, uma vez que os efluentes foram utilizados nos ensaios de biorremediação sem prévia esterilização ou filtração. Caso esta última justificativa fosse passível de análise, provavelmente os microrganismos presentes no efluente não estariam produzindo biosurfactantes uma vez que as amostras controles (sem a adição de biosurfactantes) se mostraram inalteradas.

armazenados na parede celular ou sob a forma de glicogênio (TRABULSI *et al.*, 1999), sem resultar no crescimento celular.

Provavelmente após 120 horas de incubação, a bactéria *Pantoea agglomerans* se encontrava na fase exponencial do crescimento celular, fato evidenciado pelo aumento da massa celular no efluente (2,478 mg/mL).

Em relação ao efluente da indústria, a adição das células bacterianas ao efluente se mostrou um processo eficiente na redução dos valores iniciais da DQO. Neste caso, ficou bem evidente a relação entre a concentração celular das linhagens no efluente e a redução da demanda química de oxigênio. A redução da DQO em até 75,90 %, para o ensaio 1 de biorremediação utilizando-se a linhagem *Planococcus citreus* em 72 horas de incubação, é comparável a resultados considerados muito significativos na literatura para experimentos de biorremediação (MERCADÉ *et al.*, 1993; ARAYA *et al.*, 1999; BABU *et al.*, 1999; EL-AWADY & WAHAAB, 1999).

O consórcio de bactérias apresentou uma redução significativa da DQO do efluente da indústria, 43,63 % em 120 horas de incubação, mas não ocorreu uma redução gradativa e relacionada ao tempo de incubação, o que pode ser verificado pelo índice zero de redução da DQO em 72 horas de incubação. Algum produto da degradação da matéria orgânica presente no efluente, oriundo do metabolismo celular deve ter influenciado neste resultado quando disperso no meio.

A adição das linhagens isoladas ao efluente da indústria foi mais interessante para a redução da demanda química de oxigênio que o consórcio de bactérias, portanto, o tipo de biosurfactante produzido por *Planococcus citreus* e pela *Pantoea agglomerans*, não atuam em complementaridade para aumentar o potencial de biodisponibilização dos compostos oleosos às células bacterianas.

4.4.3) Atividade dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens adicionadas ao efluente

A produção de biosurfactantes pelas linhagens adicionadas ao efluente foi determinada especificamente para os ensaios 1a, 1b e 2 de biorremediação, onde as linhagens bacterianas foram adicionadas aos efluentes. Os tempos de incubação avaliados foram de 24, 48, 72 e 120 horas.

As figuras 12, 13 e 14 mostram as atividades de emulsificação detectadas durante o crescimento bacteriano nos efluentes.

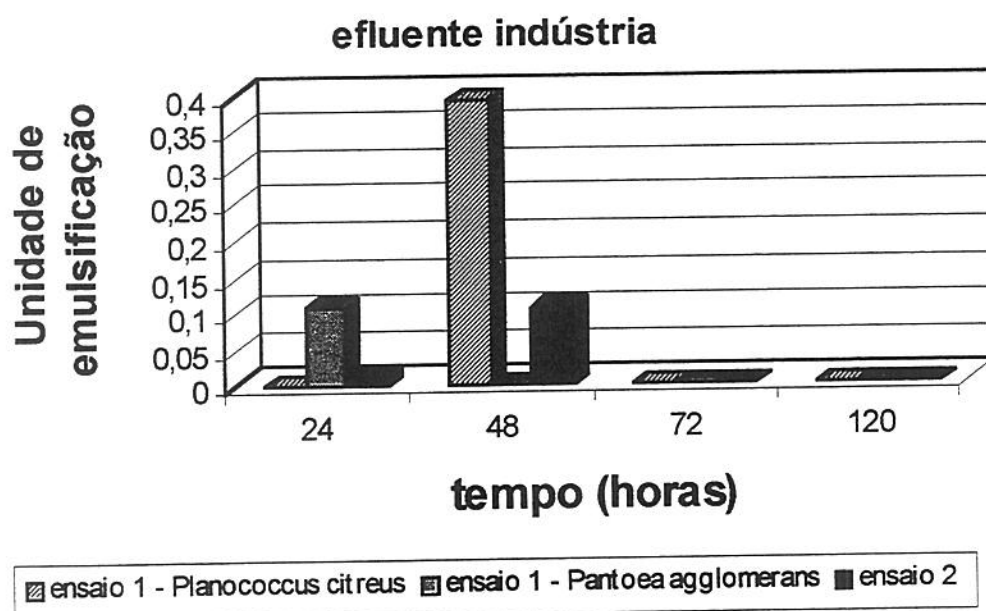


Figura 12: Atividades de emulsificação em termos de absorbância detectadas no efluente da indústria de sabões e margarinas durante ensaios de biorremediação.

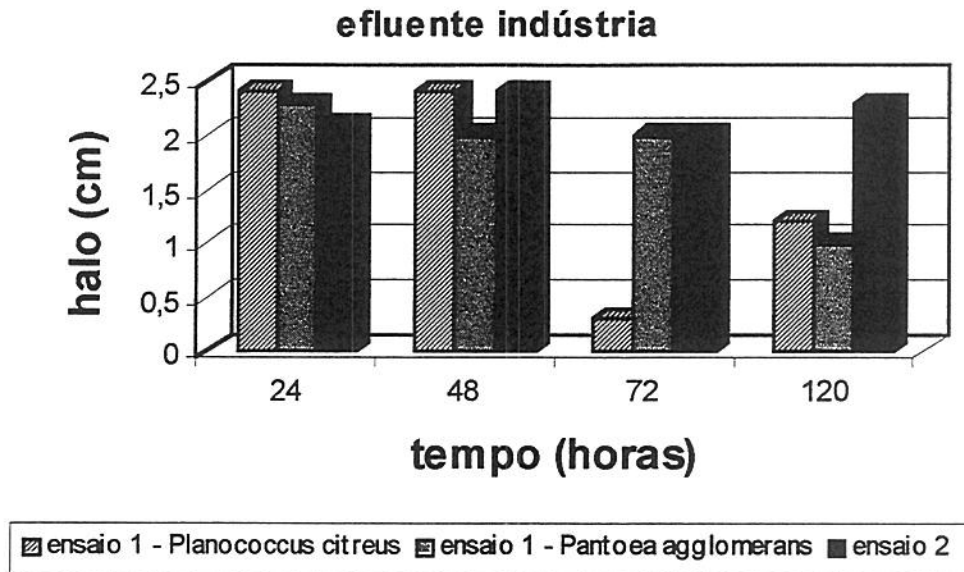


Figura 13: Atividades de emulsificação em termos de formação de halos detectadas no efluente da indústria de sabões e margarinas durante ensaios de biorremediação.

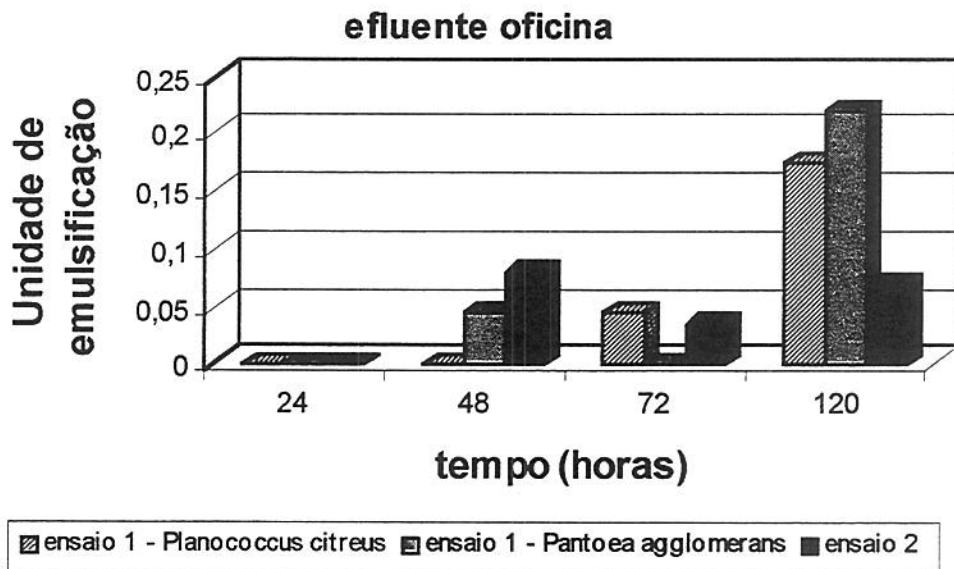


Figura 14: Atividades de emulsificação em termos de aumento da absorbância detectadas no efluente da indústria de sabões e margarinas durante ensaios de biorremediação.

Quando as atividades de emulsificação em termos da formação de halos foram analisadas no efluente da oficina, nenhuma atividade em termos de emulsões do tipo água em óleo foi determinada, independentemente da linhagem adicionada ou tempo de incubação.

Como ambos os efluentes da oficina e da indústria de sabões e margarinas são oleosos mas com características completamente distintas, esperava-se que o comportamento de cada uma das linhagens bacterianas adicionadas separadamente aos efluentes, durante as fases do crescimento celular, fosse diferenciado para cada uma das bactérias, uma vez que as mesmas produzem biosurfactantes com características opostas, cujas emulsões são do tipo óleo em água (*Planococcus citreus*) e água em óleo (*Pantoea agglomerans*). Os resultados obtidos para as atividades de emulsificação das linhagens comprovaram a atuação diferenciada das bactérias nos efluentes estudados.

A atividade de emulsificação detectada pela formação de emulsões do tipo óleo em água (aumento da absorbância), no efluente da indústria, mais significativa, foi em 48 horas de crescimento da linhagem *Planococcus citreus* (0,389 U). Conforme o esperado, a bactéria *Pantoea agglomerans* apresentou baixa atividade de emulsificação, provavelmente devido à característica química do biosurfactante produzido, que promove preferencialmente a formação de emulsões do tipo água em óleo, não detectadas pelo aumento da absorbância. Comparações entre as atividades apresentadas pela bactéria *Planococcus citreus* adicionada isoladamente ao efluente (0,389 U) e as atividades obtidas pelo consórcio de bactérias (0,106 U), evidenciaram que a presença das duas bactérias conjuntamente no efluente, interfere na atividade de emulsificação da *Planococcus citreus*.

Quando as atividades de emulsificação em termos da formação de halos foram analisadas para o efluente da indústria, valores elevados de atividade de emulsificação (halos superiores a 2,0 cm com grau máximo de compactação das bolhas - +4) puderam ser observados. A bactéria *Pantoea agglomerans* mostrou significativa atividade de emulsificação durante todos os períodos analisados, sendo mais intensa a atividade até 72 horas de incubação. Inesperadamente, a linhagem *Planococcus citreus* foi capaz de emulsificar o conteúdo oleoso do efluente através da produção de compostos de superfície ativa que possibilitam a formação de emulsões do tipo água em óleo. Halos de 2,4 cm (+4) foram observados para 24 e 48 horas de incubação. Uma redução na atividade de emulsificação foi apresentada após 72 horas de incubação. Este fato é novo pois em trabalhos anteriores (Carvalho *et al.*, 1997a) as atividades de emulsificação em termos de halos formados, para esta linhagem, sempre se apresentaram insignificantes, independentemente das fontes de carbono introduzidas nos meios de cultura na proporção de 1,5%.

Ainda sobre o efluente da indústria, o consórcio de bactérias se mostrou eficiente em termos de atividade de emulsificação por formação de emulsões do tipo água em óleo, pois, valores elevados foram obtidos em todos os intervalos de incubação.

Observando-se os dados da atividade de emulsificação obtidos e relacionando-os com a redução da demanda química de oxigênio, no efluente da indústria, pode-se destacar que a atividade de emulsificação, tanto em termos de absorbância quanto em formação de halos, foi importante na redução da DQO.

Especificamente para o ensaio 1a, a maior redução na DQO (75,90 %), foi obtida em 72 horas de incubação e observando-se os resultados das atividades de emulsificação para esta linhagem, nenhum valor significativo ocorreu neste período de

tempo. Uma justificativa seria as altas atividades de emulsificação detectadas para 48 horas de incubação (0,389 U e 2,4 cm - +4), fato que poderia ter levado a um acúmulo de biosurfactantes no meio, o qual estaria sendo utilizado mesmo nos intervalos de incubação posteriores a 48 horas, evitando que a célula produzisse mais biosurfactantes.

As atividades de emulsificação não foram determinadas com êxito no efluente da oficina, provavelmente devido a compostos inibidores do crescimento microbiano ou mesmo uma concentração muito elevada de hidrocarbonetos. Mesmo assim, as linhagens adicionadas separadamente ao efluente mostraram uma discreta atividade de emulsificação, em termos do aumento da absorbância, em 120 horas de incubação.

Um dado interessante foi a produção de biosurfactantes, detectados através do aumento da absorbância, em 120 horas de incubação da linhagem *Pantoea agglomerans* adicionada isoladamente ao efluente (0,22 U). Neste mesmo intervalo de tempo, pôde ser detectado um aumento na concentração celular desta linhagem no efluente da oficina.

Talvez, análises das atividades de emulsificação em intervalos de tempo posteriores a 120 horas conseguissem detectar atividades superiores às relatadas.

A detecção de atividade de emulsificação, no efluente da oficina, apenas pela formação de emulsões do tipo óleo em água, pode estar relacionada ao grande volume de óleo presente no efluente, o qual não apresenta uma fase aquosa definida. Desta forma, as micelas formadas pelas emulsões provavelmente são invertidas, caracterizando a disponibilização do substrato oleoso à bactéria.

Ao contrário do que se esperava no início do presente trabalho, a produção de biosurfactantes pelas linhagens *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*,

detectáveis pela formação de emulsões do tipo água em óleo ou óleo em água, provavelmente depende da natureza do meio oleoso na qual se encontram e da quantidade de lipídeos presentes. Em trabalhos anteriores (CARVALHO *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 1997a; CARVALHO *et al.*, 1997b; CARVALHO *et al.*, 1998), o perfil de produção de biosurfactantes por estas linhagens se mostrou bem definido provavelmente em função da baixa quantidade de óleo no meio de cultura (1,5 %). Certamente com um volume maior de lipídeos no meio, próximo ao volume de óleo nos efluentes estudados, seria possível a detecção de atividades de emulsificação distintas para as linhagens estudadas.

Trabalhos que possam garantir que cada uma das linhagens estudadas produza um único tipo de biosurfactante, com atividades de emulsificação distintas, ou biosurfactantes diferentes que levam à emulsões água em óleo ou óleo em água, serão muito compensadores para o esclarecimento do perfil e atuação dos compostos de superfície ativa bacterianos produzidos.

4.5) Alterações nos efluentes

O efluente da oficina, fluido oleoso de coloração preta, sofreu uma descoloração quando o consórcio de bactérias foi adicionado ao mesmo, passando a marrom. Espumas e crescimento microbiano na borda dos frascos não foram detectados.

O efluente da indústria de sabões e margarinas apresenta coloração creme com espessa borra amarela oleosa. Quando a bactéria *Planococcus citreus* foi adicionada separadamente ao efluente, ensaio 1 de biorremediação, o crescimento bacteriano foi evidenciado sobre a borra oleosa, já nas primeiras horas de incubação. No intervalo de 120 horas de crescimento, foi possível observar a clarificação do efluente, redução do

volume da borra oleosa e formação de um aglomerado celular de coloração alaranjada (Figura 16 -1).

Em relação à adição da linhagem *Pantoea agglomerans* e do consórcio de bactérias ao efluente da indústria, uma clarificação do efluente foi observada após 72 horas de crescimento bacteriano. Devido à coloração amarela da linhagem *Pantoea agglomerans*, a detecção visual do crescimento no efluente foi prejudicada. Espumas não foram observadas durante os períodos de incubação.

Quando os biosurfactantes isolados foram adicionados ao efluente da indústria, uma clarificação foi notada a partir de 24 horas, sendo que a borra oleosa na superfície do frasco permaneceu detectável embora tenha reduzido de volume, por percepção a olho nu (Figura 16 -2). Foi possível notar que a adição do consórcio de biosurfactantes ao efluente da indústria, além de clarificar a fase aquosa do efluente, emulsificou uma grande parte da borra oleosa. Aglomerados espumosos de coloração branca foram observados na superfície dos frascos, juntamente com a borra oleosa, durante todo o período de incubação.

A adição dos biosurfactantes ao efluente da oficina não resultou em nenhuma alteração detectável a olho nu. O fluido oleoso de coloração preta se manteve inalterado, sendo que apenas um depósito de coloração creme pôde ser observado durante os ensaios de biorremediação envolvendo a adição de biosurfactantes.

O efluente da oficina sofreu uma descoloração para marrom, somente quando o consórcio de bactérias foi adicionado ao efluente, sendo que esta informação se correlaciona ao maior aumento na concentração celular total do efluente da oficina.

A nítida clarificação do efluente da indústria pode ser relacionada à maior redução da demanda química de oxigênio ocorrida para este efluente.

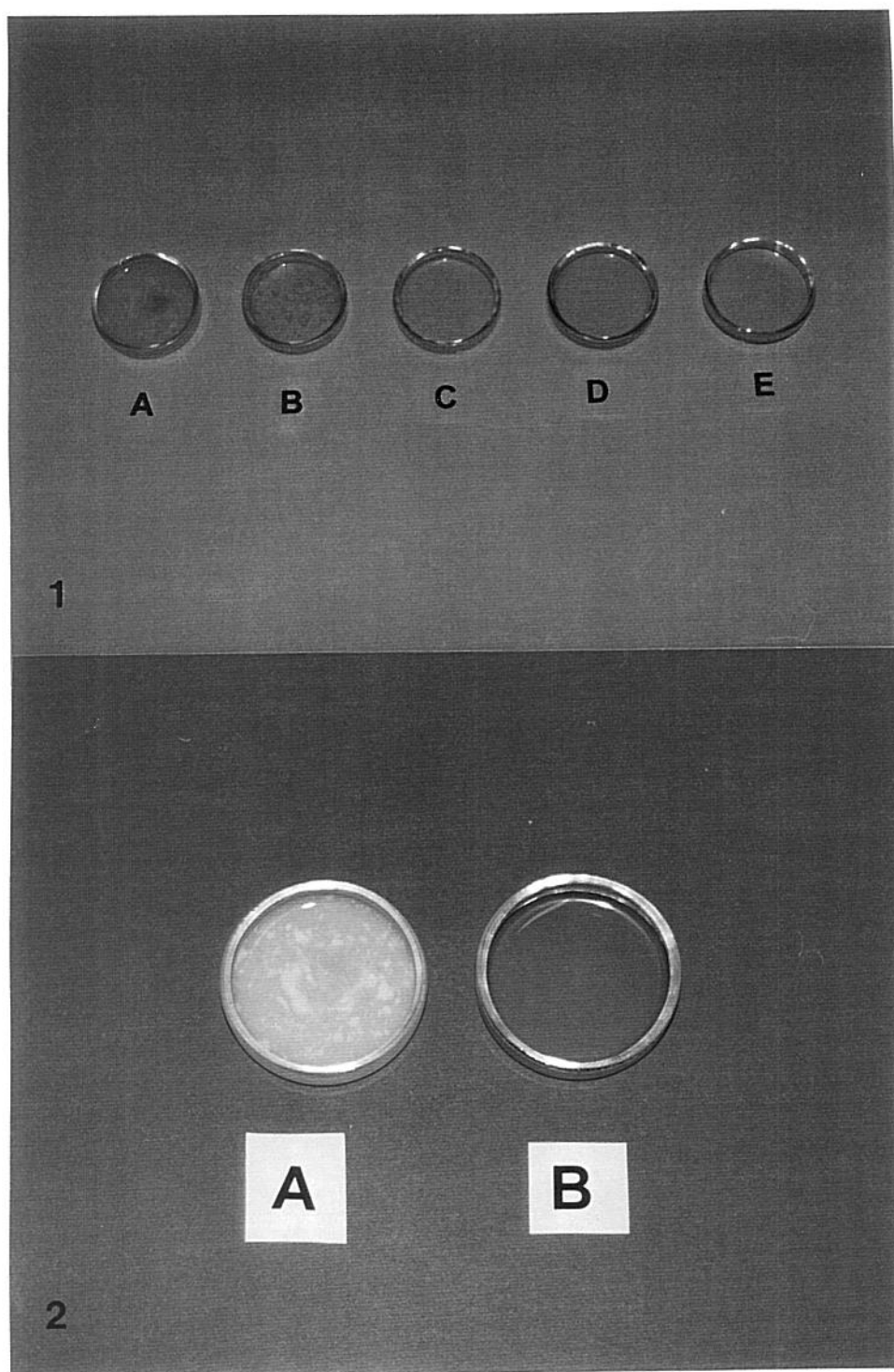


Figura 16: (1) - Clarificação do efluente da indústria pela adição da linhagem *Planococcus citreus*, durante os intervalos de incubação (A:tempo zero; B:24 horas; C: 48 horas; D: 72 horas e E: 120 horas); (2) - Clarificação do efluente da indústria pela adição do consórcio de biosurfactantes em 24 horas de incubação (A: controle e B: consórcio de biosurfactantes).

As alterações nos efluentes que revelam a clarificação dos mesmos é muito interessante para o tratamento dos efluentes em escala industrial, uma vez que a redução da cor dos dejetos industriais através da remoção de sólidos em suspensão e sólidos solúveis são fundamentais para a liberação do efluente da estação de tratamento (VON SPERLINS, 1996).

4.5.1) Variação do pH dos efluentes estudados

As figuras 17 a 22 fazem referência à variação de pH entre os tempos de incubação inicial (0 h) e final (120 h), durante os ensaios de biorremediação.

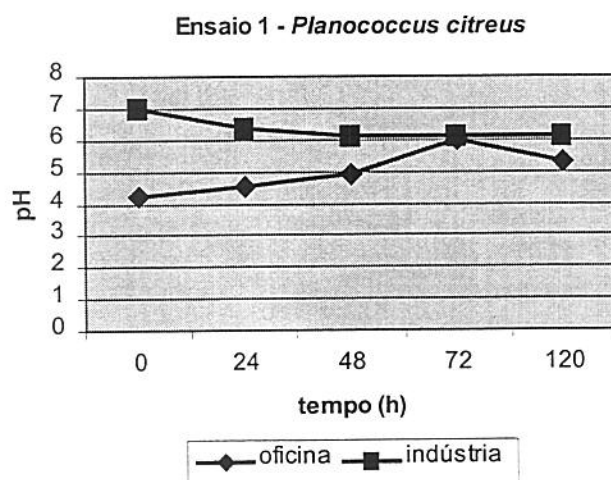


Figura 17: Variação de pH durante ensaio 1a de biorremediação.

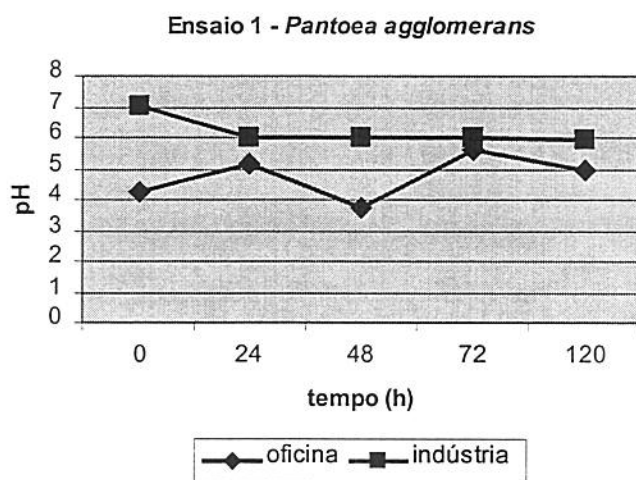


Figura 18: Variação de pH durante ensaio 1b de biorremediação.

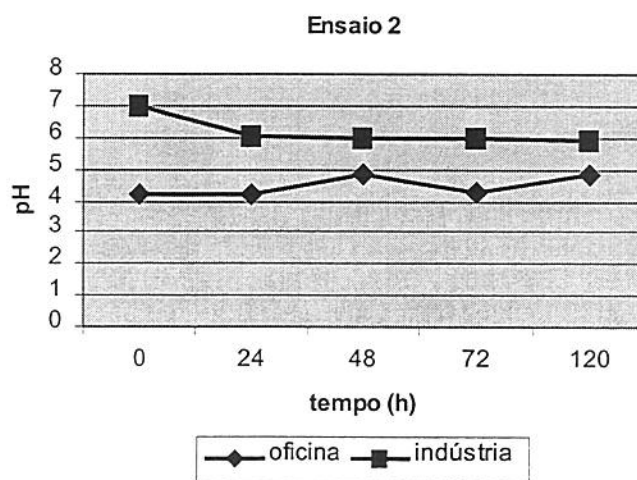


Figura 19: Variação de pH durante ensaio 2 de biorremediação.

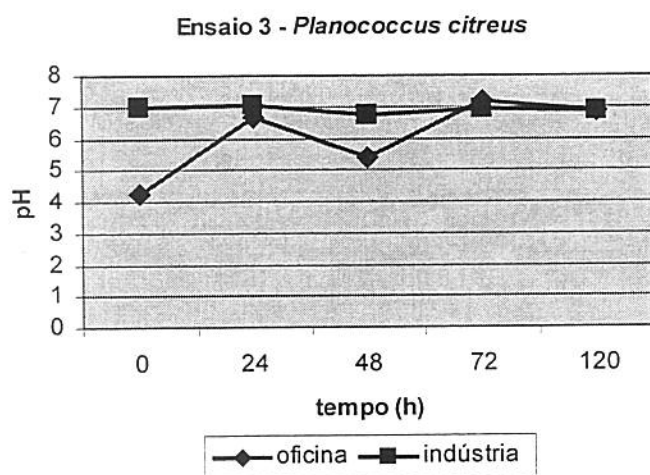


Figura 20: Variação de pH durante ensaio 3a de biorremediação.

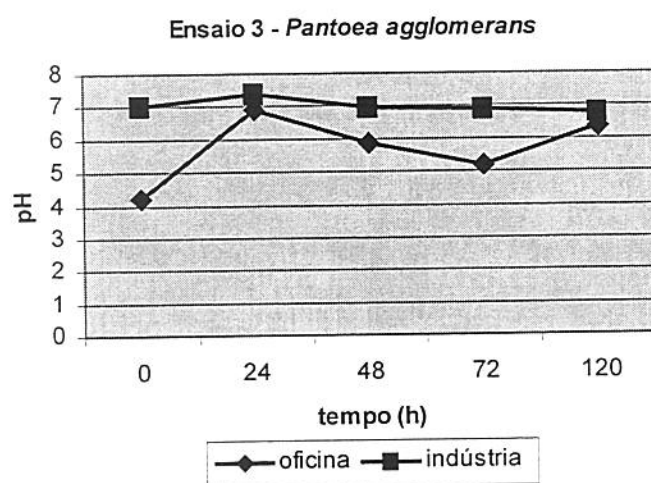


Figura 21: Variação de pH durante ensaio 3b de biorremediação.

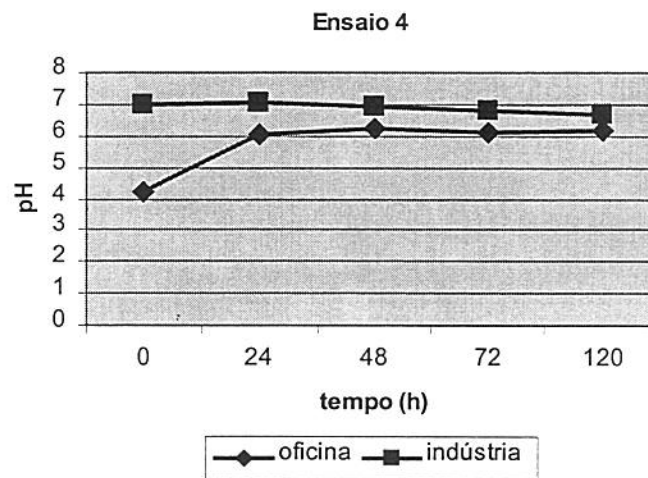


Figura 22: Variação de pH durante ensaio 4 de biorremediação.

O efluente da oficina apresentou um valor de pH inicial de 4,23 enquanto que o pH inicial da indústria de sabões e margarinas foi 7,01.

Os experimentos em relação à variação de pH nos efluentes, mostraram que a tendência do efluente da oficina, quando os ensaios 1 e 2 foram realizados, foi de elevação dos valores de pH ao longo dos intervalos de incubação, reduzindo-se a característica ácida do efluente.

No efluente da indústria, o contrário foi observado, com o passar do tempo, após 24 horas de incubação, um declínio até a estabilidade em pH 6,0 foi detectado, em todos os ensaios de biorremediação que envolveram a adição de células bacterianas ao efluente. Este fato pode estar relacionado à liberação de produtos oriundos do catabolismo dos compostos oleosos utilizados pelas bactérias durante o crescimento.

O ensaio 3 de biorremediação, mostrou um perfil de manutenção do pH dos efluentes, oficina e indústria, em valores próximos à neutralidade. No caso específico do efluente da indústria, praticamente não ocorreram variações significativas do pH inicial do efluente (7,01) quando os biosurfactantes foram adicionados. O ensaio 4

promoveu a estabilização do pH da indústria em 7,00 e a manutenção do pH da oficina em 6,00 já nas primeiras 24 horas de incubação.

Como o pH de um meio é fundamental para o crescimento microbiano, em função da atividade enzimática ótima dependente do pH, muitos fertilizantes são utilizados para ajustar o balanço de carbono, nitrogênio e fósforo do meio e neutralizar o pH de um efluente ou local a ser tratado biologicamente e estimular o crescimento da microbiota autóctone ou adicionada intencionalmente (RAGHAVAN & VIVEKANANDAN, 1999; FOGHT *et al.*, 1999; MAKI *et al.*, 1999). Neste sentido, a incorporação dos biosurfactantes liofilizados estudados aos efluentes da oficina ou indústria, poderia ser útil para estabilizar o pH do meio e favorecer o desenvolvimento de microorganismos presentes no próprio efluente para a utilização dos compostos oleosos uma vez que, segundo ROSATO (1997), a maioria dos microrganismos apresenta um melhor desenvolvimento em pH neutro, podendo ocorrer o dobro da taxa de biodegradação de petróleo com correção do pH do solo.

4.6) Análise cromatográfica dos compostos oleosos presentes nos efluentes

4.6.1) Degradação dos ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas após os ensaios de biorremediação

A tabela III mostra os ácidos graxos identificados na amostra controle do efluente da indústria de sabões e margarinas, utilizando-se o padrão de ácidos graxos metilados como referência.

Tabela III: Ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas

Padrão de ácidos graxos			Tempo de retenção (minutos)	Área dos picos correspondentes aos ácidos graxos presente no efluente ($\mu\text{V.s}$)
1	11:0	Me. undecanoato	5.03	300
2	2-OH 10:0	Me. 2-hidroxidecanoato	5.17	ND
3	12:0	Me. dodecanoato	7.06	652
4	13:0	Me. tridecanoato	10.26	ND
5	2-OH 12:0	Me. 2-hidroxidecanoato	10.63	ND
6	3-OH 12:0	Me. 3-hidroxidecanoato	11.74	ND
7	14:0	Me. tetradecanoato	15.30	ND
8	i-15:0	Me. 13-metiltetradecanoato	19.95	ND
9	a-15:0	Me. 12-metiltetradecanoato	20.55	ND
10	15:0	Me. pentadecanoato	22.49	ND
11	2-OH 14:0	Me. 2-hidroxitetradecanoato	23.07	1424
12	3-OH 14:0	Me. 3-hidroxitetradecanoato	24.46	404
13	i-16:0	Me. 14-metilpentadecanoato	25.81	486
14	16:1 ⁹	Me. cis-9-hexadecenoato	26.26	409
15	16:0	Me. hexadecanoato	27.30	1119
16	i-17:0	Me. 15-metilhexadecanoato	29.81	932
17	17:0 Δ	Me. cis-9,10- metileno hexadecanoato	30.30	917
18	17:0	Me. heptadecanoato	31.38	1377
19	2-OH 16:0	Me. 2-hidroxihexadecanoato	31.97	516
20	18:2 ^{9,12}	Me. cis-9,12- octadecadienocanoato	34.30	628
21	18:1 ⁹	Me. cis-9-octadecenoato	34.84	1086
22	18:1 ⁹ 18:1 ¹¹	Me. trans-9-octadecenoato e cis-11-octadecenoato	35.23	613
23	18:0	Me. octadecanoato	36.61	441
24	19:0 Δ	Me. cis-9,10-metilenooctadecanoato	42.28	ND
25	19:0	Me. nonadecanoato	43.74	420
26	20:0	Me. eicosanoato	53.55	ND

Me.: éster metílico; ND: não detectado.

O efluente da indústria de sabões e margarinas apresentou um total de 78 picos com área superior a 250 $\mu\text{V.s}$, sendo que apenas 16 puderam ser comparados aos ácidos graxos utilizados como padrão.

As figuras 23 a 30 revelam o perfil cromatográfico das amostras dos ensaios de biorremediação após os tempos de incubação, em comparação ao controle dos

efluentes. A sobreposição dos cromatogramas foi realizada em integrador Shimadzu modelo Chromatopac C-R4A, função "mult-chromat overlay", para uma melhor visualização da degradação dos picos referentes aos ácidos graxos analisados.

Os cromatogramas foram ordenados nas figuras de acordo com o tempo de incubação das linhagens ou dos biosurfactantes adicionados ao efluente. Desta forma, os ensaios de biorremediação 1 e 2 aparecem na mesma figura em função do tempo de incubação, sendo que o mesmo ocorre para os ensaios 3 e 4.

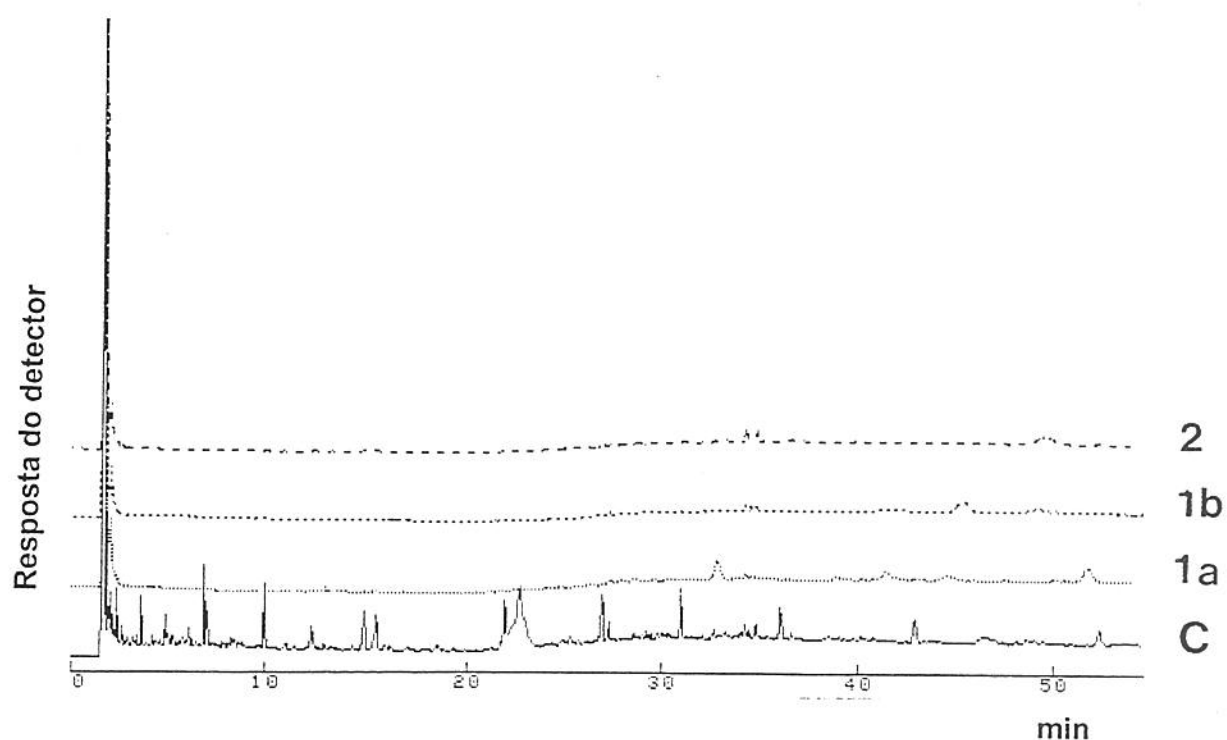


Figura 23: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 1 e 2, em 24 horas de incubação, sendo (C) efluente controle não submetido aos ensaios de biorremediação, (1a) ensaio 1 de biorremediação com *Planococcus citreus*, (1b) ensaio 1 de biorremediação com *Pantoea agglomerans* e (2) ensaio 2 de biorremediação. Coluna: capilar, CBP-1 (Shimadzu), 25 m x 0,32 d.i., espessura de filme: 0,25 μm . Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 20 mL/min, temperatura inicial da coluna: 160°C, tempo inicial: 20 min, taxa de programação: 5°C/min, temperatura final da coluna: 200°C, tempo final: 15 min, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 250°C, detector: FID, razão de *split*: 50:1, volume de amostra injetado: 2 μL .

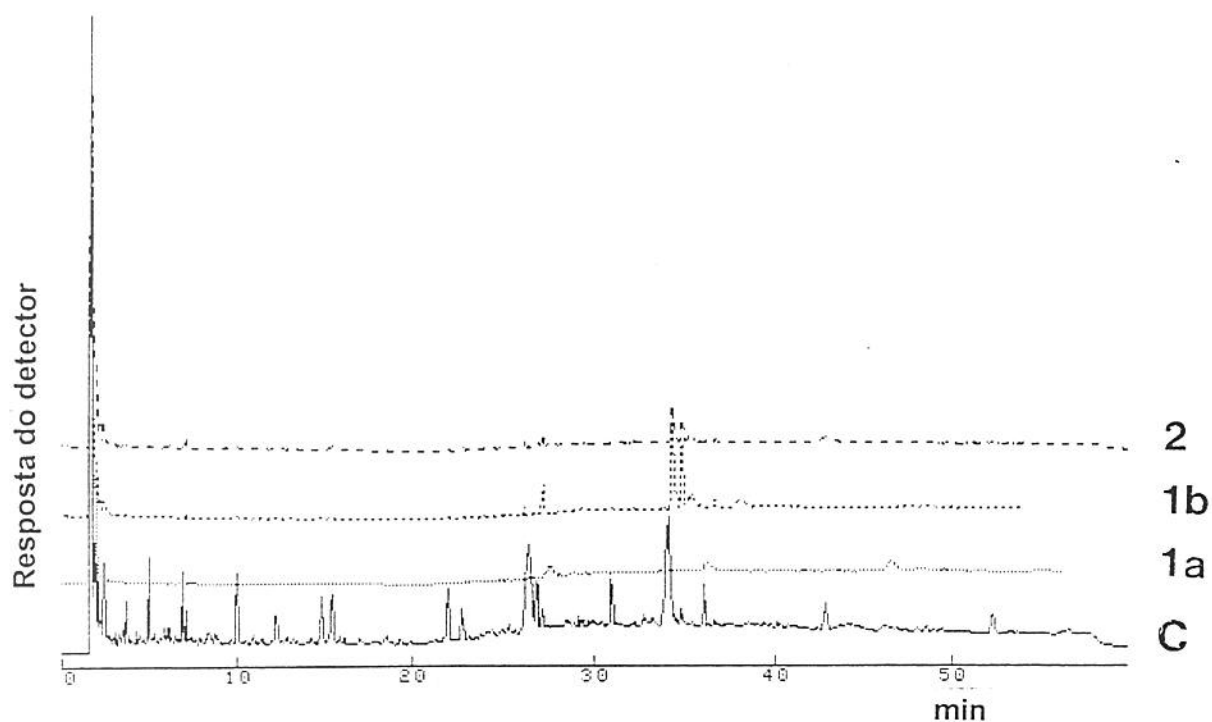


Figura 24: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 1 e 2, em 48 horas de incubação, sendo (C) efluente controle não submetido aos ensaios de biorremediação, (1a) ensaio 1 de biorremediação com *Planococcus citreus*, (1b) ensaio 1 de biorremediação com *Pantoea agglomerans* e (2) ensaio 2 de biorremediação. Coluna: capilar, CBP-1 (Shimadzu), 25 m x 0,32 d.i., espessura de filme: 0,25 μm . Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 20 mL/min, temperatura inicial da coluna: 160°C, tempo inicial: 20 min, taxa de programação: 5°C/min, temperatura final da coluna: 200°C, tempo final: 15 min, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 250°C, detector: FID, razão de *split*: 50:1, volume de amostra injetado: 2 μL .

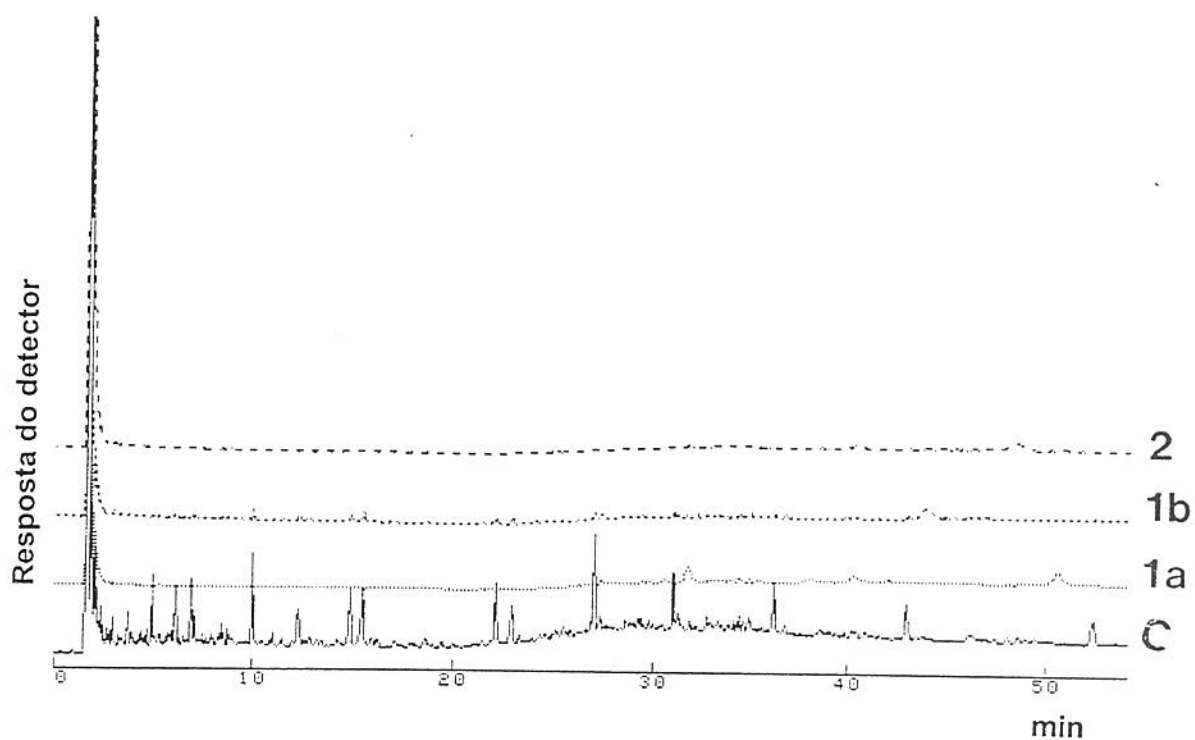


Figura 25: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 1 e 2, em 72 horas de incubação, sendo (C) efluente controle não submetido aos ensaios de biorremediação, (1a) ensaio 1 de biorremediação com *Planococcus citreus*, (1b) ensaio 1 de biorremediação com *Pantoea agglomerans* e (2) ensaio 2 de biorremediação. Coluna: capilar, CBP-1 (Shimadzu), 25 m x 0,32 d.i., espessura de filme: 0,25 μ m. Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 20 mL/min, temperatura inicial da coluna: 160°C, tempo inicial: 20 min, taxa de programação: 5°C/min, temperatura final da coluna: 200°C, tempo final: 15 min, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 250°C, detector: FID, razão de *split*: 50:1, volume de amostra injetado: 2 μ L.

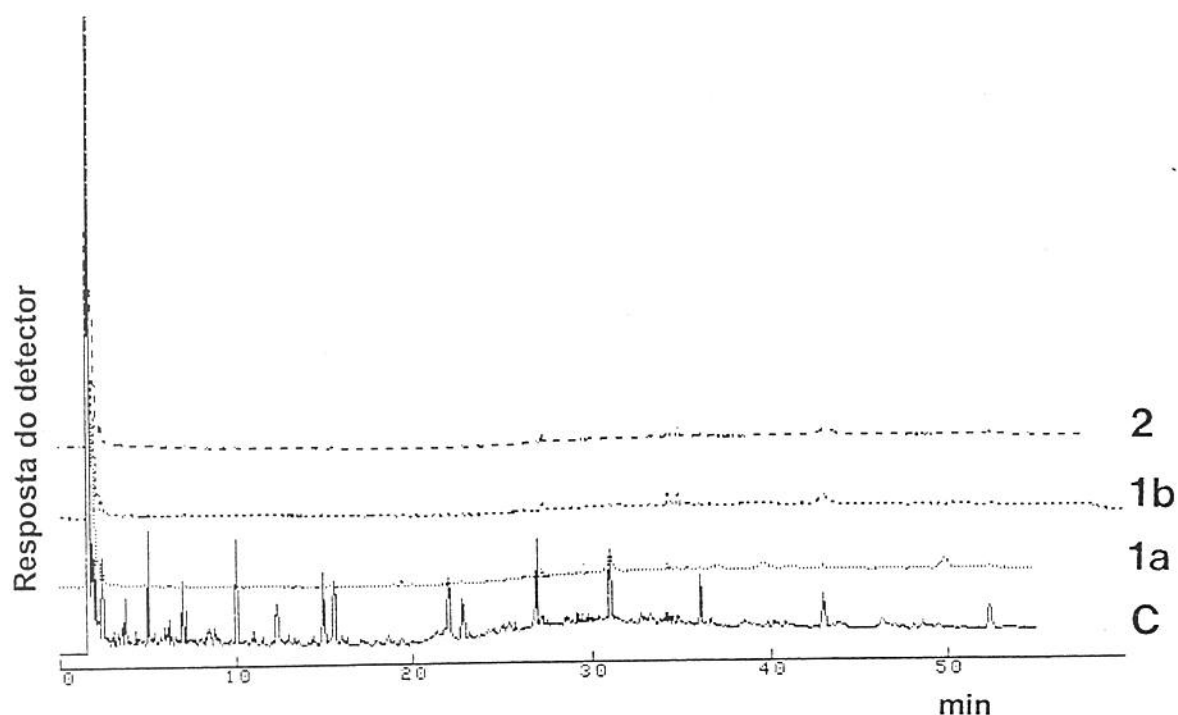


Figura 26: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 1 e 2, em 120 horas de incubação, sendo (C) efluente controle não submetido aos ensaios de biorremediação, (1a) ensaio 1 de biorremediação com *Planococcus citreus*, (1b) ensaio 1 de biorremediação com *Pantoea agglomerans* e (2) ensaio 2 de biorremediação. Coluna: capilar, CBP-1 (Shimadzu), 25 m x 0,32 d.i., espessura de filme: 0,25 μ m. Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 20 mL/min, temperatura inicial da coluna: 160°C, tempo inicial: 20 min, taxa de programação: 5°C/min, temperatura final da coluna: 200°C, tempo final: 15 min, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 250°C, detector: FID, razão de *split*: 50:1, volume de amostra injetado: 2 μ L.

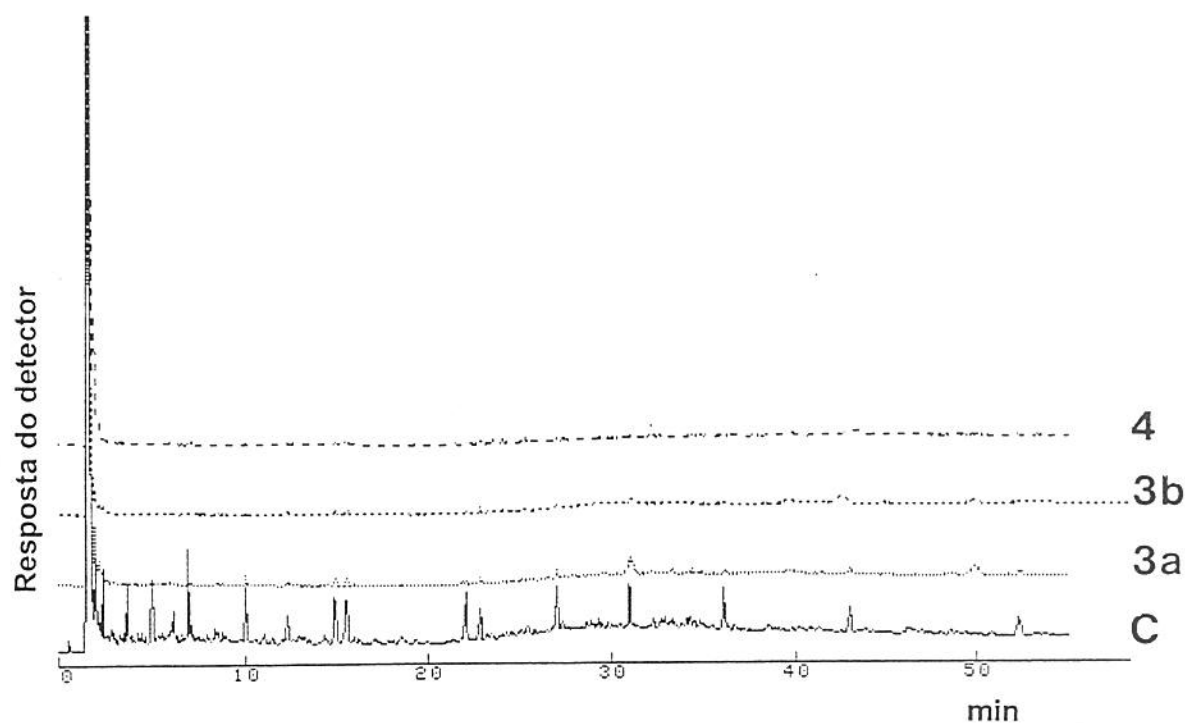


Figura 27: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 3 e 4, em 24 horas de incubação, sendo (C) efluente controle não submetido aos ensaios de biorremediação, (3a) ensaio 3 de biorremediação com *Planococcus citreus*, (3b) ensaio 3 de biorremediação com *Pantoea agglomerans* e (4) ensaio 4 de biorremediação. Coluna: capilar, CBP-1 (Shimadzu), 25 m x 0,32 d.i., espessura de filme: 0,25 μ m. Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 20 mL/min, temperatura inicial da coluna: 160°C, tempo inicial: 20 min, taxa de programação: 5°C/min, temperatura final da coluna: 200°C, tempo final: 15 min, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 250°C, detector: FID, razão de *split*: 50:1, volume de amostra injetado: 2 μ L.

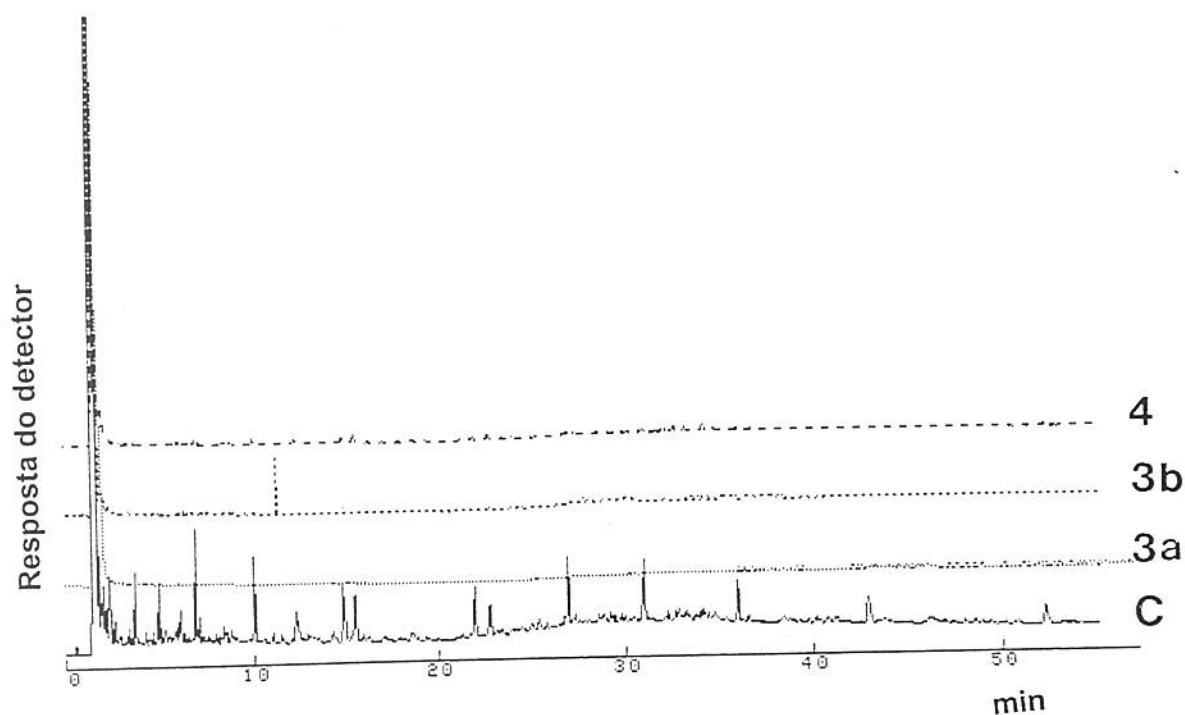


Figura 28: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 3 e 4, em 48 horas de incubação, sendo (C) efluente controle não submetido aos ensaios de biorremediação, (3a) ensaio 3 de biorremediação com *Planococcus citreus*, (3b) ensaio 3 de biorremediação com *Pantoea agglomerans* e (4) ensaio 4 de biorremediação. Coluna: capilar, CBP-1 (Shimadzu), 25 m x 0,32 d.i., espessura de filme: 0,25 μm . Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 20 mL/min, temperatura inicial da coluna: 160°C, tempo inicial: 20 min, taxa de programação: 5°C/min, temperatura final da coluna: 200°C, tempo final: 15 min, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 250°C, detector: FID, razão de *split*: 50:1, volume de amostra injetado: 2 μL .

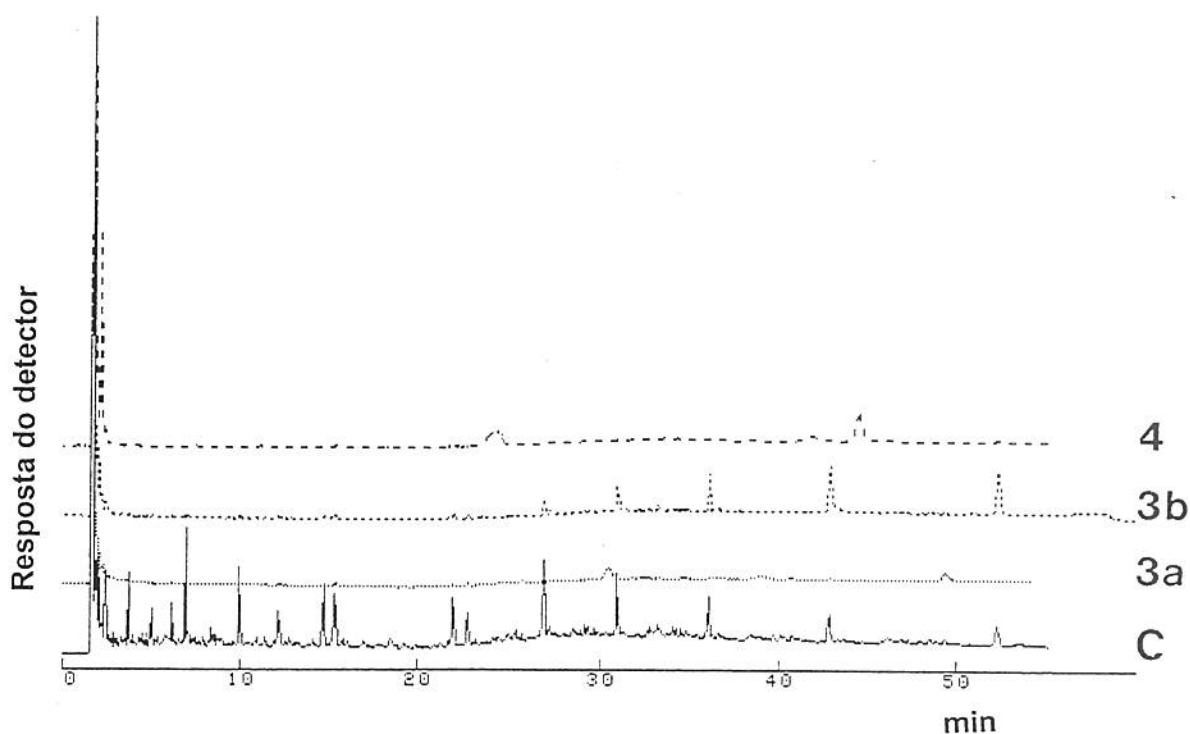


Figura 29: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 3 e 4, em 72 horas de incubação, sendo (C) efluente controle não submetido aos ensaios de biorremediação, (3a) ensaio 3 de biorremediação com *Planococcus citreus*, (3b) ensaio 3 de biorremediação com *Pantoea agglomerans* e (4) ensaio 4 de biorremediação. Coluna: capilar, CBP-1 (Shimadzu), 25 m x 0,32 d.i., espessura de filme: 0,25 μ m. Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 20 mL/min, temperatura inicial da coluna: 160°C, tempo inicial: 20 min, taxa de programação: 5°C/min, temperatura final da coluna: 200°C, tempo final: 15 min, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 250°C, detector: FID, razão de *split*: 50:1, volume de amostra injetado: 2 μ L.

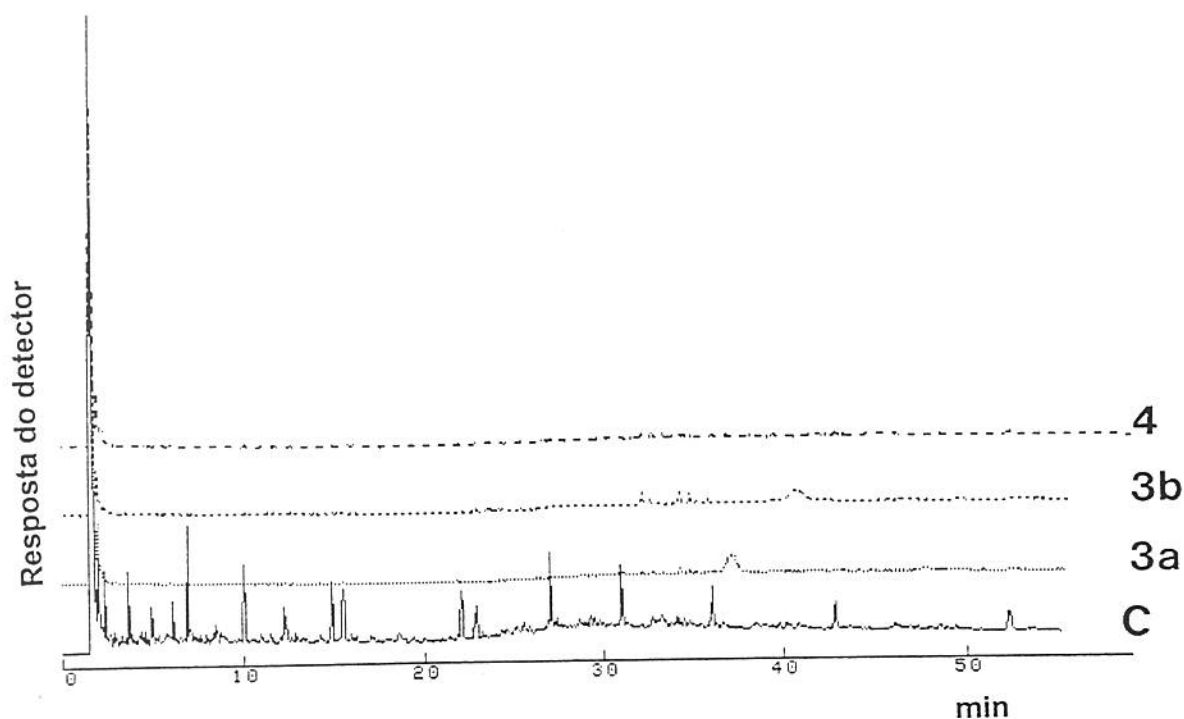


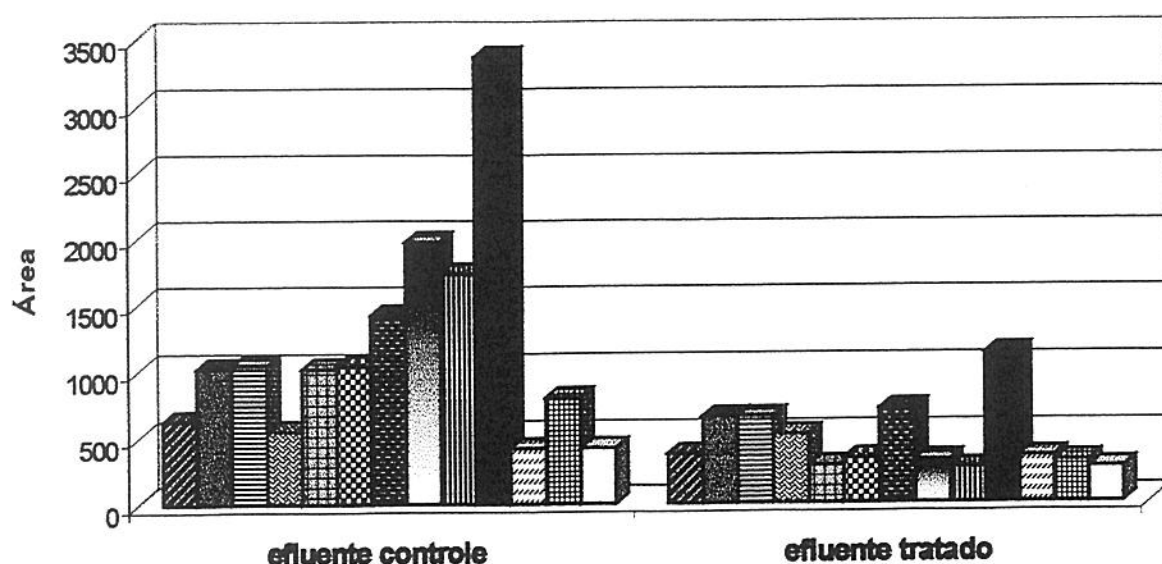
Figura 30: Cromatograma dos ácidos graxos dos ensaios 3 e 4, em 120 horas de incubação, sendo (C) efluente controle não submetido aos ensaios de biorremediação, (3a) ensaio 3 de biorremediação com *Planococcus citreus*, (3b) ensaio 3 de biorremediação com *Pantoea agglomerans* e (4) ensaio 4 de biorremediação. Coluna: capilar, CBP-1 (Shimadzu), 25 m x 0,32 d.i., espessura de filme: 0,25 μm . Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 20 mL/min, temperatura inicial da coluna: 160°C, tempo inicial: 20 min, taxa de programação: 5°C/min, temperatura final da coluna: 200°C, tempo final: 15 min, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 250°C, detector: FID, razão de *split*: 50:1, volume de amostra injetado: 2 μL .

A metodologia utilizada para o preparo das amostras do efluente da indústria, metilação dos ácidos graxos presentes, foi adequada uma vez que muitos picos correspondentes aos ácidos graxos puderam ser detectados durante as análises cromatográficas.

Apenas 16 ácidos graxos presentes no efluente puderam ser comparados aos ácidos graxos presentes no padrão de ácidos graxos metilados utilizado. Fica evidente o caráter oleoso do efluente da indústria, pois mais de 70 picos correspondentes a ácidos graxos puderam ser analisados na cromatografia gasosa.

Através dos resultados obtidos, fica evidente a influência dos ensaios de biorremediação na degradação ou transformação dos ácidos graxos presentes no efluente da indústria. De acordo com BAKER & HERSON (1994), a degradação de um composto orgânico nem sempre resulta em mineralização (gás carbônico e água); a degradação incompleta, conhecida por transformação pode ocorrer como resultado da atividade microbiana. Vários estudos tem comprovado que, em ambientes naturais, quando uma linhagem microbiana não é capaz de mineralizar um composto, este pode ser parcialmente transformado em outros compostos que servem como substrato metabólico para grupos de microorganismos autóctones.

As figuras 31 e 32 fazem referência aos ácidos graxos presentes no efluente após os ensaios de biorremediação. Somente os picos dos ácidos graxos que permaneceram após os ensaios de biorremediação estão representados.



- | | |
|---|--|
| ■ pico 18:2/ensaio 2 (24 horas) | ■ pico 18:0/ensaio 1-Pc (48 horas) |
| ▨ pico 16:0/ensaio 1-Pa (48 horas) | ▨ pico 18:1(9,11)/ensaio 1-Pa (48 horas) |
| ▩ pico 18:0/ensaio 1-Pa (48 horas) | ▩ pico 16:0/ensaio 2 (48 horas) |
| ▧ pico 18:1(9)/ensaio 2 (48 horas) | ▧ pico NI1/ensaio 1-Pa (72 horas) |
| ▦ pico 2-OH 14:0/ensaio 1-Pa (72 horas) | ▦ pico NI2/ensaio 1-Pc (120 horas) |
| ▤ pico 18:2/ensaio 1-Pa (120 horas) | ▤ pico 18:1(9)/ensaio 1-Pa (120 horas) |
| □ pico 18:2/ensaio 2 (120 horas) | |

Figura 31: Degradação dos ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas, durante os ensaios 1 e 2 de biorremediação, sendo Pc: *Planococcus citreus*; Pa: *Pantoea agglomerans*; NI1: ácido graxo não identificado com tempo de retenção de 15,52 minutos; NI2: ácido graxo não identificado com tempo de retenção de 30,98 minutos; Área em $\mu V.s$

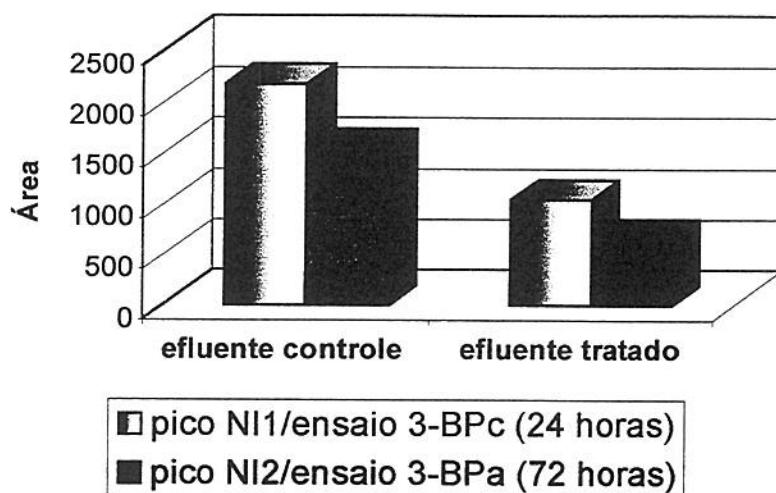


Figura 30: Degradação dos ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas, durante o ensaio 3 de biorremediação, sendo BPc: biosurfactante produzido por *Planococcus citreus*; BPa: biosurfactante produzido por *Pantoea agglomerans*; NI1: ácido graxo não identificado com tempo de retenção de 30,96 minutos; NI2: ácido graxo não identificado com tempo de retenção de 30,94 minutos; Área em $\mu V.s$

Nenhum pico referente aos ácidos graxos foi detectado após o ensaio 4 de biorremediação, onde os biosurfactantes foram adicionados em consórcio ao efluente.

Conforme pode ser observado nos cromatogramas das análises cromatográficas do efluente da indústria, alguns picos foram detectados nos efluentes submetidos aos ensaios de biorremediação e se mostraram ausentes no efluente controle não tratado. Nenhum destes picos pôde ser identificado de acordo com o padrão de ácidos graxos utilizados.

controle, sem exceção, sofreram degradação, independentemente do ensaio de biorremediação executado.

A detecção de ácidos graxos nos efluentes mesmo após o tratamento microbiano, embora com picos de área reduzida, foi mais acentuada nos ensaios 1 e 2 de biorremediação. O ensaio 3 de biorremediação levou à permanência de apenas dois picos de ácidos graxos, também com áreas reduzidas quando comparados ao efluente controle, no efluente tratado. No efluente ao qual foi adicionado o consórcio de biosurfactantes liofilizados, nenhum pico de ácido graxo foi detectado no efluente tratado. Desta forma, os ensaios de biorremediação 3 e 4, onde os produtos bacterianos foram adicionados ao efluente, se mostraram mais eficientes na remoção dos compostos oleosos do efluente. Conforme descrito anteriormente, os biosurfactantes não possibilitam a degradação de um composto oleoso mas permitem a biodisponibilização e mobilização dos mesmos para a utilização pelos microrganismos. Através desta afirmação, outra justificativa que não a degradação dos ácidos graxos pelos biosurfactantes deve ser apresentada, uma vez que isto não ocorre. Possivelmente dois fenômenos podem ter ocorrido no efluente quando da adição dos biosurfactantes: 1) os biosurfactantes mobilizaram os compostos oleosos para a fase aquosa do efluente e durante o preparo das amostras para a análise cromatográfica (metilação), os ácidos graxos complexados aos biosurfactantes não ficaram disponíveis para a saponificação e posterior metilação, sendo portanto descartados na fase de extração e não detectados pela cromatografia gasosa; 2) os biosurfactantes adicionados ao efluente bruto, não esterilizado, poderiam ter favorecido a biodisponibilização dos compostos oleosos aos microrganismos autóctones do

efluente, que teriam utilizado os ácidos graxos para o metabolismo celular, degradando-os.

Caso a segunda hipótese tenha ocorrido, presença de microorganismos potencialmente degradadores de ácidos graxos mas dependentes de biosurfactantes, no efluente bruto, os ensaios de biorremediação 1 e 2 também poderiam ter sofrido a interferência destes na degradação dos compostos oleosos.

Através das análises cromatográficas, pode-se estimar em alta a aplicabilidade das linhagens bacterianas ou seus produtos de superfície ativa na degradação ou transformação de ácidos graxos presentes no efluente da indústria de sabões e margarinas, favorecendo desta maneira, o tratamento inicial do efluente.

Nenhum pico referente aos ácidos graxos foi detectado após o ensaio 4 de biorremediação, onde os biosurfactantes foram adicionados em consórcio ao efluente.

Conforme pode ser observado nos cromatogramas das análises cromatográficas do efluente da indústria, alguns picos foram detectados nos efluentes submetidos aos ensaios de biorremediação e se mostraram ausentes no efluente controle não tratado. Nenhum destes picos pôde ser identificado de acordo com o padrão de ácidos graxos utilizados.

4.6.2) Degradação dos hidrocarbonetos presentes no efluente da oficina após os ensaios de biorremediação

A tabela IV mostra a porcentagem de degradação dos picos correspondentes aos hidrocarbonetos analisados, durante os ensaios de biorremediação. O número de picos correspondentes aos hidrocarbonetos, presentes nos controles dos ensaios 1 e 2 e 3 e 4, respectivamente, foram os seguintes: 58 e 67 em 24 horas, 60 em 48 horas, 69 e 70

em 72 horas e 105 e 63 em 120 horas. Nos apêndices 4 a 11 encontram-se os resultados obtidos com as análises cromatográficas, sendo que a porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos presentes no efluente foi determinada em função das áreas do picos analisados, indicados pelos tempos de retenção, comparando-se a área registrada para o pico no efluente controle com o mesmo pico no efluente tratado. Os valores sombreados correspondem à degradação dos hidrocarbonetos superior a 10 %.

Tabela IV – Perfil cromatográfico dos ensaios de biorremediação

Ensaio 1a – <i>Planococcus citreus</i>				
Porcentagem de redução das áreas dos picos	Número de picos que sofreram redução de área			
	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
100,00 %	18	16	15	3
90 – 99,99 %	2	3	3	0
70 – 89,99 %	1	4	14	0
50 – 69,99 %	3	9	20	0
20 – 49,99 %	5	18	9	43
0 – 19,99 %	29	10	8	59
Ensaio 1b – <i>Pantoea agglomerans</i>				
Porcentagem de redução das áreas dos picos	Número de picos que sofreram redução de área			
	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
100,00 %	10	16	15	3
90 – 99,99 %	2	3	4	0
70 – 89,99 %	8	4	23	0
50 – 69,99 %	20	9	16	1
20 – 49,99 %	11	18	3	19
0 – 19,99 %	7	10	8	82
Ensaio 2				
Porcentagem de redução das áreas dos picos	Número de picos que sofreram redução de área			
	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
100,00 %	6	11	16	3
90 – 99,99 %	3	4	2	0
70 – 89,99 %	17	6	15	0
50 – 69,99 %	20	15	21	0
20 – 49,99 %	5	16	9	86
0 – 19,99 %	7	10	6	16

Tabela IV - continuação

Ensaio 3a – <i>Planococcus citreus</i>				
Porcentagem de redução das áreas dos picos	Número de picos que sofreram redução de área			
	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
100,00 %	12	9	9	20
90 – 99,99 %	2	3	5	7
70 – 89,99 %	5	6	12	20
50 – 69,99 %	7	12	16	9
20 – 49,99 %	9	20	13	2
0 – 19,99 %	32	10	14	6
Ensaio 3b – <i>Pantoea agglomerans</i>				
Porcentagem de redução das áreas dos picos	Número de picos que sofreram redução de área			
	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
100,00 %	12	10	7	18
90 – 99,99 %	4	4	5	13
70 – 89,99 %	6	10	18	22
50 – 69,99 %	2	13	18	5
20 – 49,99 %	6	17	8	3
0 – 19,99 %	37	6	13	2
Ensaio 4				
Porcentagem de redução das áreas dos picos	Número de picos que sofreram redução de área			
	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
100,00 %	12	10	5	17
90 – 99,99 %	2	5	5	9
70 – 89,99 %	5	13	18	23
50 – 69,99 %	3	21	18	8
20 – 49,99 %	3	5	10	0
0 – 19,99 %	42	6	13	6

A análise dos resultados apresentados na tabela IV revela uma tendência de aumento do número de picos, correspondentes aos hidrocarbonetos passíveis de sofrerem redução de área pelos ensaios de biorremediação, proporcional ao tempo de incubação. Fica evidente que nos intervalos superiores a 24 horas, uma quantidade maior de picos tiveram a área original reduzida em 20 a 49,99%.

Os intervalos intermediários de redução de área dos picos (20 a 69,99%) predominaram em todos os ensaios de biorremediação, o que torna explícita a

potencialidade de degradação ou transformação dos hidrocarbonetos presentes no efluente da oficina através da biorremediação.

As figuras 33 e 34 mostram os hidrocarbonetos correspondentes aos analisados como padrões de referência, benzeno, tolueno, p-xileno, m-xileno, o-xileno e heptano, presentes no efluente controle não tratado e/ou no efluente submetido aos ensaios de biorremediação. Os tempos de retenção para os hidrocarbonetos padrões foram os seguintes: 0,914 minutos para benzeno, 1,508 minutos para heptano, 1,517 minutos para tolueno, 2,515 minutos para p-xileno, 2,729 minutos para m-xileno e 3,645 minutos para o-xileno. O primeiro pico detectado nos cromatogramas, a 0,450 minutos, correspondeu ao hexano utilizado na diluição das amostras.

Somente as amostras que apresentaram picos correspondentes aos hidrocarbonetos padrões durante as análises cromatográficas estão sendo representadas nas figuras 33 e 34.

Da mesma forma que para os ácidos graxos analisados no efluente da indústria de sabões e margarinas, muitos picos foram detectados nas amostras submetidas aos ensaios de biorremediação que não estavam presentes na amostra referente ao efluente controle não tratado.

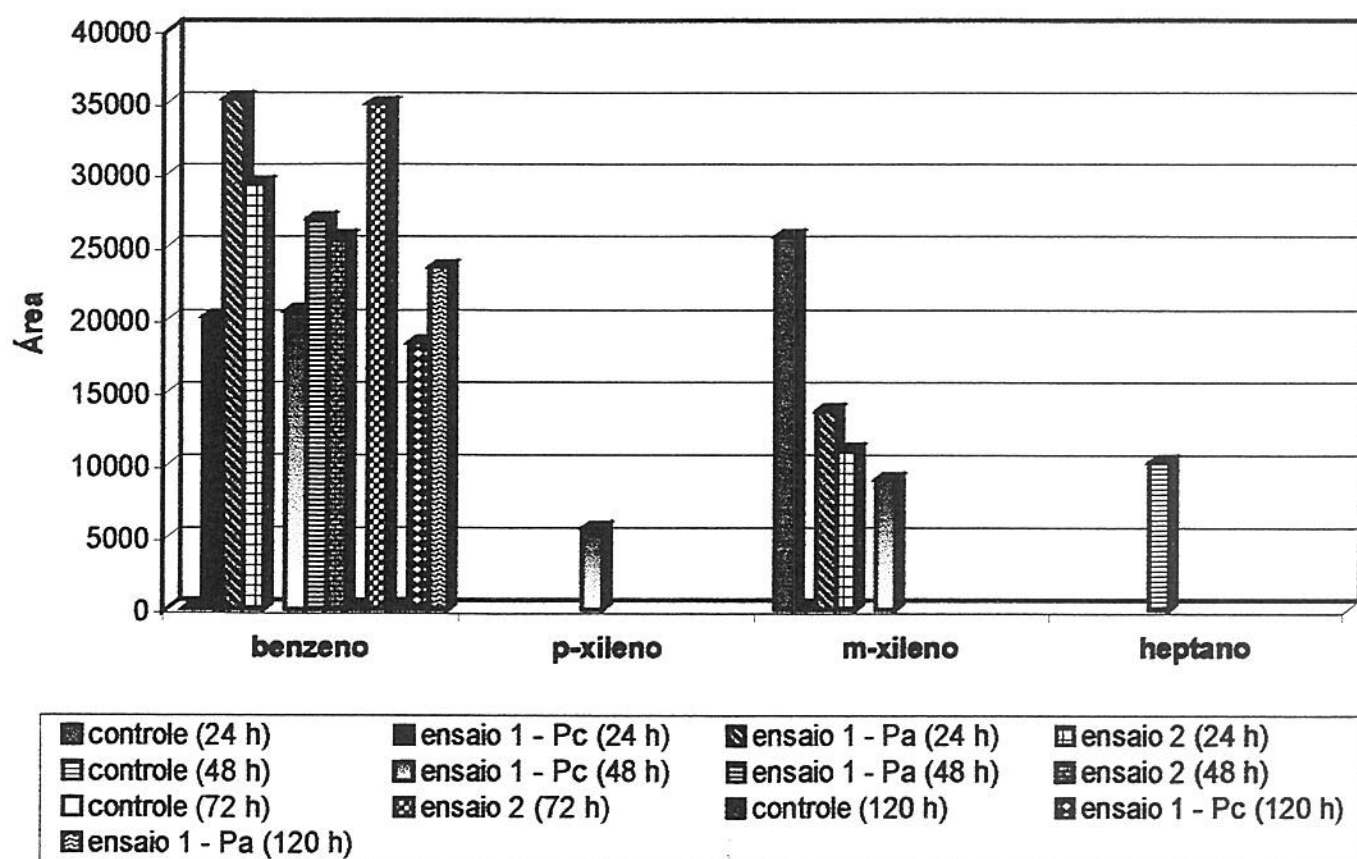


Figura 33: Presença de hidrocarbonetos padrões nos efluentes da oficina não tratado e nos efluentes submetidos aos ensaios 1 e 2 de biorremediação, sendo Pc: *Planococcus citreus*; Pa: *Pantoea agglomerans*; Área em $\mu\text{V.s}$.

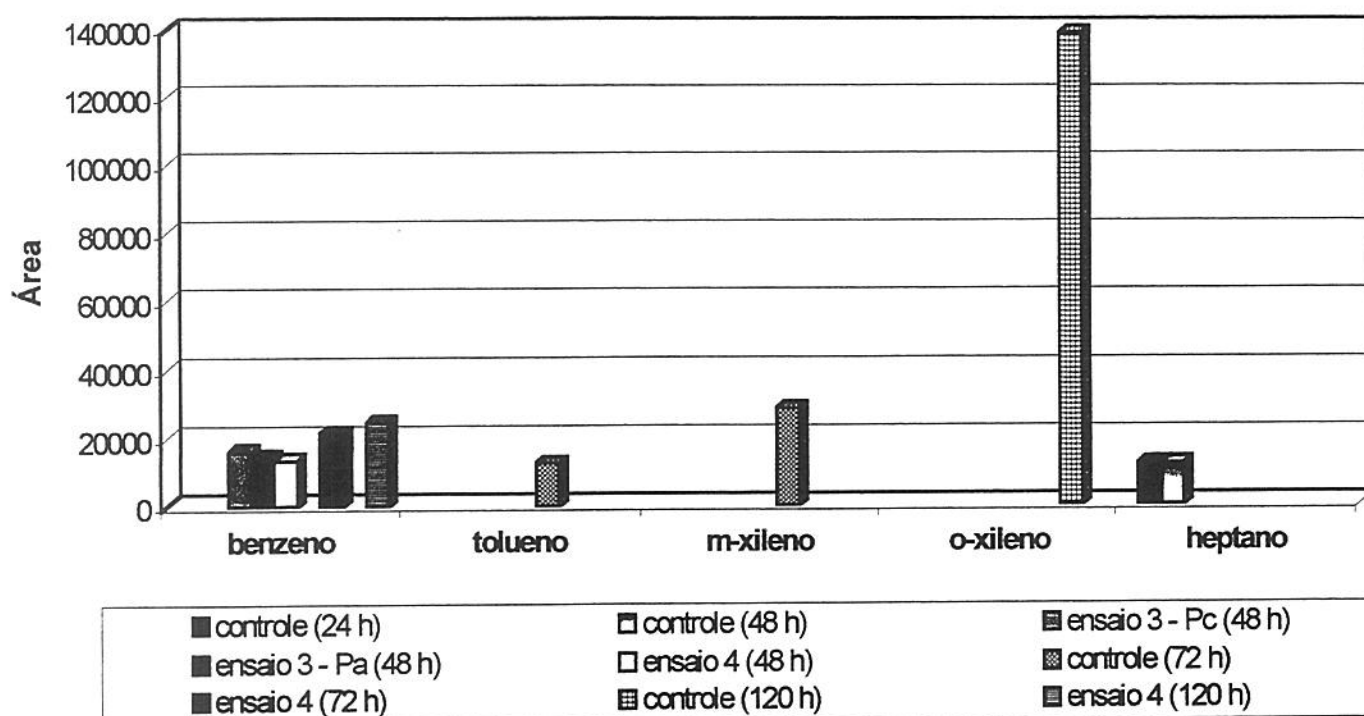


Figura 32: Presença de hidrocarbonetos padrões nos efluentes da oficina não tratado e nos efluentes submetidos aos ensaios 3 e 4 de biorremediação, sendo Pc: *Planococcus citreus*; Pa: *Pantoea agglomerans*; Área em $\mu V.s$.

No caso dos hidrocarbonetos padrões, é evidente que principalmente benzeno e p-xileno são formados durante o crescimento microbiano ou sob influência da ação detergente do biosurfactante no efluente.

Vários trabalhos (ISIGIGÜR *et al.*, 1996; BREEDVELD *et al.*, 1997; OGDEN *et al.*, 1998) tem mostrado um perfil cromatográfico para as análises de hidrocarbonetos onde compostos com um número baixo de carbonos são retidos num tempo menor que compostos com um número mais elevado de carbonos, independentemente da coluna utilizada. O mesmo pode ser confirmado através do boletim 868A da Supelco (SPELCO, 1994).

Observando-se os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2 em 24 horas de incubação, fica evidente que as bactérias *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans* se mostraram mais eficientes na degradação dos hidrocarbonetos detectados com tempo de retenção superior a 30 minutos, quando comparadas aos valores de degradação obtidos pelo ensaio 2. Desta forma, pode-se afirmar que em 24 horas de incubação, o ensaio 1a se mostrou mais interessante para a biorremediação do efluente, quando da análise de hidrocarbonetos mais pesados. Ainda para 24 horas de incubação, cabe ressaltar que, com exceção dos hidrocarbonetos retidos em tempo superior a 30 minutos, os compostos degradados através do ensaio 1 também se mostraram passíveis de transformação pelo ensaio 2, ainda que na maioria das vezes, numa porcentagem de degradação menor. Somente os compostos retidos em 15,34, 18,21, 18,70 e 23,14 minutos foram apenas degradados pelo ensaio 2.

Para os intervalos de incubação de 48, 72 e 120 horas, ficou muito aparente a influência dos ensaios de biorremediação na degradação dos compostos oleosos. Todos os picos analisados após 16 minutos de corrida cromatográfica foram degradados por pelo menos um dos ensaios de biorremediação ao qual o efluente foi submetido. Ao contrário do observado para as primeiras 24 horas de incubação, os hidrocarbonetos mais pesados foram degradados totalmente ou parcialmente pelas linhagens bacterianas adicionadas isoladamente ou em consórcio.

Para todos os intervalos de tempo foi possível observar um perfil de degradação dos compostos. Um dado composto degradado por um determinado ensaio, salvo raras exceções, se mostrou passível de degradação pelos outros ensaios onde bactérias foram adicionadas ao efluente. O mais interessante consiste que a porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos presentes no efluente, através dos ensaios de

biorremediação se mostrou muito próxima entre os três ensaios analisados (ensaio 1a, 1b e ensaio 2). Um exemplo foi o ocorrido com o pico retido em 10,20 minutos, uma porcentagem de degradação de aproximadamente 95,00 % foi observada para todos os ensaios de biorremediação, em todos os tempos de incubação (24, 48, 72 e 120 horas).

Os resultados de degradação obtidos em 120 horas de incubação se mostraram mais significativos pois apenas um pico, retido em 2,25 minutos, não sofreu degradação por nenhum tipo de ensaio de biorremediação. Todos os outros picos detectados no efluente tratado e que estavam presentes no efluente controle sofreram degradação após os ensaios.

Apesar da influência positiva de todos os ensaios que fizeram uso das células bacterianas, o consórcio de bactérias se mostrou mais interessante na redução da área dos picos analisados em 72 horas de incubação e o mesmo pode ser comentado em relação à linhagem *Pantoea agglomerans*, que se destacou na degradação ou transformação dos hidrocarbonetos presentes no efluente, nos intervalos de 72 e 120 horas.

O efluente controle não apresentou picos correspondentes ao composto benzeno, detectado em 0,91 minutos, em nenhum intervalo de incubação. Mas, durante a degradação ou transformação dos compostos oleosos presentes no efluente através da ação das linhagens bacterianas adicionadas, benzeno pôde ser detectado quando os ensaios 1 e 2 foram realizados, em 24 e 48 horas de incubação; em 72 horas de incubação do consórcio de bactérias (ensaio 2) e em 120 horas de incubação das linhagens *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans* isoladas. Desta forma, benzeno foi formado em todos os tempos de tratamento do efluente. Como não foi oportuno a este trabalho a identificação química de todos os compostos presentes no efluente, fica

difícil qualquer afirmação em relação ao aparecimento deste composto no efluente, uma vez que não se sabe se os compostos que o originaram tinham um grau de toxicidade mais elevado ou menos elevado que o benzeno.

Os compostos m-xileno e heptano, presentes no efluente controle em 24 e 48 horas, respectivamente, sofreram degradação. No caso do m-xileno pode-se afirmar que os ensaios de biorremediação levaram a uma degradação do composto pois em 24 horas de incubação, uma redução na área dos picos foi observada com os ensaios 1 e 2. O ensaio 1a levou à formação de m-xileno no efluente, uma vez que este composto não ocorreu no controle.

A não observação de m-xileno e heptano em amostras do efluente controle nos intervalos de 24 e 48 horas, respectivamente, pode significar a atenuação natural destes compostos, através de evaporação, hidrólise ou oxidação fotoquímica, durante a incubação do efluente (FAY *et al.*, 1997).

O composto p-xileno somente foi observado durante o ensaio 1a em 48 horas de incubação. Novamente, este fato pode ser relacionado à transformação de outros compostos presentes no efluente controle, cujo produto ou um dos produtos da transformação destes compostos, foi o p-xileno. Nos demais intervalos de incubação, p-xileno não foi detectado, portanto sofreu degradação biótica ou abiótica.

Assim como os compostos benzeno e p-xileno, presentes no efluente somente após os ensaios de biorremediação, muitos outros picos foram detectados apenas no efluente tratado, se mostrando ausentes no efluente controle. Este fato pode ser facilmente relacionado à transformação dos compostos oleosos presentes no efluente (BAKER & HERSON, 1994). Estes compostos poderiam sofrer biodegradação em intervalos de incubação superiores a 120 horas ou servir de substrato para o

metabolismo de organismos autóctones ao efluente ou sofrer degradação abiótica. Estas suposições somente poderão ser comprovadas através de experimentos que possibilitem a marcação destes compostos e a observação do comportamento dos mesmos frente a diversos fatores que promovam a degradação química.

Em síntese, os ensaios 1 e 2 de biorremediação colaboraram para a degradação ou transformação dos compostos oleosos presentes no efluente da oficina, de uma forma rápida pois em 120 horas de incubação, a grande maioria dos compostos detectados haviam sofrido biodegradação.

Em relação aos ensaios 3 e 4, onde os biosurfactantes bacterianos foram adicionados isoladamente ou em consórcio ao efluente, pode-se notar que um perfil de degradação dos componentes oleosos semelhante aos ensaios 1 e 2 foi estabelecido. Em 24 horas de incubação, os hidrocarbonetos detectados após 16 minutos de corrida cromatográfica se mostraram mais facilmente removidos do efluente, com auxílio do biosurfactante produzido pela linhagem *Planococcus citreus*, adicionado isoladamente ao efluente. Em 48 horas de incubação, uma redução na área dos picos correspondentes à maioria dos compostos oleosos foi observada de uma forma mais intensa (porcentagem maior de redução de área dos picos analisados), quando o consórcio de biosurfactantes foi utilizado. Em 72 horas de incubação, uma porcentagem superior às obtidas com o biosurfactante da *Planococcus citreus* e o consórcio de biosurfactantes, foi obtida pela adição do biosurfactante produzido pela bactéria *Pantoea agglomerans*. No intervalo de 120 horas, o biosurfactante de *Pantoea agglomerans* se mostrou mais eficiente na redução da área dos picos detectados até 30 minutos de corrida cromatográfica; para os compostos com tempo de retenção

superiores a 30 minutos, a adição do consórcio de biosurfactantes e o biosurfactante da linhagem *Planococcus citreus* foi mais significativa.

Especificamente para os ensaios onde os biosurfactantes liofilizados foram introduzidos ao efluente, a justificativa plausível para o fato dos compostos oleosos terem sido removidos ou degradados no efluente, seria a de que os microrganismos autóctones do efluente da oficina poderiam estar fazendo uso dos biosurfactantes dispersos no meio para a utilização dos hidrocarbonetos como substrato metabólico. Como no presente trabalho não foi realizada nenhuma amostragem da concentração celular nos efluentes que sofreram a adição dos produtos bacterianos, devido à centralização dos estudos de biorremediação na influência da adição de biosurfactantes no meio, fica uma lacuna em relação a justificativa apresentada, uma vez que não é possível mensurar ou afirmar que houve crescimento microbiano durante os ensaios de biorremediação 3 e 4.

Da mesma forma que o ocorrido para os ensaios 1 e 2, o efluente controle não apresentou picos correspondentes ao composto benzeno, em nenhum intervalo de incubação. Os picos que puderam ser comparados aos hidrocarbonetos padrões foram heptano (presente em 24 e 48 horas), tolueno e m-xileno (presentes em 72 horas) e o-xileno (presente em 120 horas). Todos os picos presentes no efluente controle não foram detectados no efluente tratado, determinando uma degradação ou transformação dos compostos oleosos.

Em relação ao benzeno, o ensaio 3 em 48 horas levou à sua formação e o mesmo ocorreu com o ensaio 4 em 48, 72 e 120 horas de incubação. Como o benzeno não foi detectado após 48 horas par o ensaio 3, fica evidente que pôde ser utilizado como

substrato metabólico por microrganismos presentes no efluente ou transformado quimicamente através de oxidação ou hidrólise.

Em relação à influência das linhagens bacterianas e biosurfactantes nos efluentes estudados, tanto a adição das linhagens bacterianas como a adição dos biosurfactantes liofilizados foram interessantes do ponto de vista da biorremediação. Resultados otimistas foram conseguidos com os dois tipos de ensaios, aqueles que utilizaram células bacterianas e os que utilizaram os biosurfactantes. Diferenças muito sutis foram observadas entre a incorporação das células bacterianas ou biosurfactantes liofilizados aos efluentes. De uma forma geral, a taxa de degradação dos compostos foi praticamente uniforme entre cada um dos ensaios utilizados e linhagem bacteriana incorporada ao efluente.

Em se tratando de uma possível utilização no tratamento industrial destes efluentes, a opção menos onerosa seria a adição das bactérias aos efluentes, possivelmente na forma desidratada ou liofilizada, uma vez que o perfil de degradação dos ácidos graxos e hidrocarbonetos foi muito similar à utilização dos biosurfactantes liofilizados, os quais teriam um custo de produção mais elevado.

5) Considerações finais

O efluente da indústria foi melhor biorremediado quando os biosurfactantes bacterianos liofilizados foram incorporados ao efluente na forma de consórcio, pois nenhum pico correspondente a ácidos graxos foi detectado no efluente após o ensaio 4. Este dado não descarta a utilização dos biosurfactantes isolados nem das linhagens bacterianas no tratamento do efluente da indústria, uma vez que resultados muito promissores também foram obtidos para os ensaios 1, 2 e 3 de biorremediação.

Quando a linhagem *Planococcus citreus* ou o biosurfactante produzido por esta bactéria foram incorporados ao efluente da oficina, uma nítida redução na área dos picos correspondentes a hidrocarbonetos com elevado número de carbonos pôde ser observada em 24 horas de incubação. Em 120 horas de incubação, todos os ensaios se mostraram eficientes na biorremediação do efluente.

A degradação dos compostos oleosos, o aumento na concentração celular das linhagens e a redução da demanda química de oxigênio não podem ser observados como fatos isolados. Certamente estão relacionados entre si de uma forma muito mais coesa do que este trabalho pôde demonstrar, uma vez que os processos e vias metabólicas para a degradação dos compostos oleosos estudados, pelas linhagens utilizadas, são completamente obscuros.

O tipo de emulsão formada, oriunda da ação dos biosurfactantes produzidos pelas bactérias analisadas, influenciou na degradação dos compostos oleosos e redução da demanda química de oxigênio dos efluentes estudados. A degradação dos hidrocarbonetos pelas linhagens bacterianas certamente envolveu emulsões do tipo óleo em água pois foram as únicas passíveis de análise nas atividades de emulsificação. No efluente da indústria, tanto as emulsões óleo em água como as água

em óleo foram detectadas durante a ação bacteriana e muito possivelmente, contribuíram para a degradação dos ácidos graxos presentes no efluente.

No caso dos biosurfactantes isolados, o biosurfactante produzido pela linhagem *Planococcus citreus* levou à emulsões do tipo óleo em água e o produzido pela *Pantoea agglomerans*, emulsões do tipo água em óleo. Certamente, o tipo de emulsão formada pelos biosurfactantes no efluente, possibilitou a disponibilização dos compostos oleosos para uma significativa biorremediação do efluente.

Concluindo, pode-se considerar que as bactérias *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans* e seus produtos, os biosurfactantes, têm alto potencial de aplicação na biorremediação de efluentes oleosos, levando a uma redução significativa da demanda química de oxigênio e à degradação de compostos oleosos.

Estudos futuros que possam elucidar quais microorganismos estariam presentes naturalmente nos efluentes da indústria e oficina e qual o papel desempenhado por estes na biorremediação dos efluentes na presença de um composto de superfície ativa bacteriano, certamente colaborarão para um melhor entendimento da influência de biosurfactantes em efluentes oleosos e viabilidade de aplicação de microrganismos e seus produtos no tratamento industrial destes efluentes.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araya, P., Aroca, G. e Chamy, R. Anaerobic treatment of effluents from an industrial polymers synthesis plant. Oxford: Waste management. 19(2), 141-146, 1999.
- Ascón-Cabrera, M. A. e Lebeault, J. M. Interfacial area effects of a biphasic aqueous-organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms. New York: Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 1136-1141, 1995.
- Babu, P.A., Kumar, M.S., Reddy, D.G., Kumar, P.M. e Sadhukhan, A.K. Biodegradation of bulk drug industrial effluents microbial isolates from soil. New Delhi: Journal of Scientific & Industrial Research. 58(6), 431-435, 1999.
- Babuna, F. G., Cekyay, E., Eremektar, G. e Orhon, D. Pollution loads and inert COD in the laying chicken industry. Oxford: Water Science and Technology. 40(1), 207-213, 1999.
- Baker, K. H. e Herson, D. S. Bioremediation. New York: McGraw-Hill, Inc. 1994.
- Banat, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal state of art. Berlin: Acta Biotechnol. 15 (3), 251-267, 1995
- Barker, D. J., Mannucchi, G. A., Salvi, S. M. L. e Stuckey, D.C. Characterization of soluble residual chemical oxygen demand (COD) in anaerobic wastewater treatment effluents. Oxford: Water Research. 33(11), 2499-2510, 1999.
- Becker, P., Koster, D., Popov, M. N., Markossian, S., Antranikian, G. e Markl, H. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. Oxford: Water Research. 33(3), 653-660, 1999.

- Blackburn, J. W., Harner, E. J., Robbins, W. K., Prince, R. C., Clarck, J. R., Atlas, R. M. e Wilkinson, J. B. Experimental comparison in petroleum site bioremediation. Whashington: Abstr. Pap. Am. Chem. S. 205: 75 – parte 2. 1993
- Bobbio, F. O. e Bobbio, P. A. Introdução à química de alimentos. 2ª. edição. São Paulo: Livraria Varela. 1995.
- Breedveld, D. G., Olstad, G. e Aagaard, P. Treatment of jet fuel-contaminated Runoff water by subsurface infiltration. Boca Raton: Bioremediation Journal. 1(1), 77-88, 1997.
- Carvalho, D. F., Marchi, D. D. e Durrant, L. R. Biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. São Carlos: *Anais do XI SINAFERM*. 2, 686-691, 1996.
- Carvalho, D. F., Marchi, D. D. e Durrant, L. R. Prodution of extracellular surface-active compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. New Orleans: *In situ* and on-site bioremediation - microbial considerations. 4, 91-96, 1997a.
- Carvalho, D. F., Marchi, D. D. e Durrant, L. R. Isolamento e estudo de microorganismos produtores de biosurfactantes. Campinas: *Anais da 1ª Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente*. 246-251, 1997b.
- Carvalho, D. F., Marchi, D. D. e Durrant, L. R. Surface activitie emulsifying agents produced by microorganisms isolated from oil-contaminated soil. Singapura: *Anais do Environmental Strategies for the 21st century*. 564-569, 1998.
- Chaineau, C. H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E. e Oudot, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. Amsterdam: J.Scieceof the total environment. 227(2-3), 237-247, 1999.

- Cooper, D.G. e Goldenberg, B. G. Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. Washington: Appl. Environ. Microbiol. 53, 224-229, 1987.
- Davis, D.A., Lynch, H.C. e Varley, J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. New York: Enzyme and Microbial Technology. 25(3-5), 322-329, 1999.
- El-Awady, M. H. e Wahaab, R. A. Agro-industry wastewater treatment. London: Environmental Technology. 20(9), 1001-1004, 1999.
- Fay, E. F., Silva, C. M. M. S. e Melo, I. S. Degradação abiótica de xenobióticos. *In*: Microbiologia ambiental. Jaguariúna: Embrapa, 1997.
- Fiechter, A. Biosurfactants – moving towards industrial application. Oxford: Trends in Food Science & Technology. 10(6), 208-217, 1992.
- Fleck, L. C., Bicca, F. C. e Ayub, M. A. Z. Physiological aspects of hydrocarbon emulsification, metal resistance and DNA profile of biodegrading bacteria isolated from oil polluted sites. Dordrecht: Biotechnology Letters. 22(4), 285-289, 2000.
- Foght, J., Semple, K., Gauthier, C., Westlake, D. W. S., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Wang, Z. e Fingas, M. Effect of nitrogens sources on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions. London: Environmental Technology. 20(8), 839-849, 1999.
- Gerson, D. F. Biosurfactants: production - properties - applications / editado por Naim Kosaric. 269-286, 1993
- Greenberg, A. E., Clesceri, L. S. e Eaton, A. D. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18 ed. Washington: American Public Health Association. 1992.

- Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M. e Manresa, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. Oxford: Journal of Applied Microbiology. 88(3), 379-387, 2000.
- Huang, J. Y. C. Microsoft Encarta'95. 1995
- Ijah, U. J. J. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. Oxford: Waste Management. 18(5), 293-299, 1998.
- Isigigür, A., Heras, H. e Ackman, R. G. An improved method for the recovery of petroleum hydrocarbons from fish muscle tissue. London: Food chemistry. 57(3), 457-462, 1996.
- Jain, D. K., Lee, H. e Trevors, J. T. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbon in soil. Basingstoke: Journal of Industrial Microbiology. 10(2), 87-93, 1992.
- Johnson, V., Singh, M., Saini, V. S., Adhikari, D. K., Sita, V. e Yadav, N. K. Bioemulsifier production by na oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. London: Biotechnol. Letters. 6, 487-490, 1992.
- Karanth, N. G. K., Deo, P. G. e Veenanadig, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. Bangalore: Current Science. 77(1), 116-126, 1999.
- Kosaric, N., Cairns, W.L. e Gray, N. C. C. Biosurfactantes and Biotechnology. New York: M. Dekker. 1987.
- Krieg, N. R. e Holt, J. G. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Volume 1. Baltimore: Williams & Wilkins. 1984.
- Lang, S. e Philp, J. C. Surface-active lipids in rhodococci. Dordrecht: Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 74(1-3), 59-70, 1998.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- Lazar, I., Dobrota, S., Voicu, A., Stefanescu, M., Sandulescu, L. e Petrisor, I. G. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. Amsterdam: Journal of Petroleum Science and Engineering. 22(1-3), 151-160, 1999.
- Lee, Y., Lee, S. Y. e Yang, J. W. Production of rhamnolipid biosurfactant by fed-batch culture of *Pseudomonas aeruginosa* using glucose as a sole carbon source. Tokyo: Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 63(5), 946-947, 1999.
- Lin, S. Particle-bound PAH in ambient air. London: J. Chem. Tech. Biotechnol. 66, 109-120, 1996.
- Marín, M., Pedregosa, A., Ríos, S. e Laborda, F. Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. Oxford: International Biodeterioration & Biodegradation. 69-75, 1996.
- Maki, H., Sasaki, T., Saaki, E., Ishihara, M., Goto, M. e Harayama, S. Use of wastewater sludge for the amendment of crude oil bioremediation in meso-scale beach simulating tanks. London: Environmental Technology. 20(6), 625-632, 1999.
- Makkar, R. S. e Cameotra, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. Champaign: Journal of surfactants and Detergents. 2(2), 237-241, 1999.
- Mercadé, M.E., Manresa, M.A., Robert, M., Espuny, M.J., Andrés, C. e Guinea, J. Olive oil mill effluent (OOME) – new substrate for biosurfactant production. Oxford: Bioresource Technology. 43, 1-6, 1993.
- Nakata, K. e Ishigami, Y. A facile procedure of remediation for oily waste with rhamnolipid biosurfactant. New York: Journal of Environmental Science and Health

Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineerig. 34(5), 1129-1142,1999.

Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z. e Rosenberg, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Washington: Appl. Environ. Microbiol. 61(9), 3240-3244, 1995.

Oberbremer, A., Muller-Hurting, R. e Wagner, F. Effect of addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. New York: Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 485-489, 1990.

Ogden, J., Pardo, C. e Tchaplá, A. Method development for the analysis of bee cuticular hydrocarbons and esters by capillary gas chromatography. New York: Journal of chromatography Science. 36, 287-292, 1998.

Poole, A. J., Cord-Ruwish, R. e Jones, F. W. Biological treatment of chemically flocculated agro-idustrial waste from the wools courig idustry by an aerobic process without sludge recycle. Oxford: Water research. 33(9), 1981-1988, 1999.

Prince, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. Boca Raton: Critical Reviews in Microbiology. 19 (4), 217-242, 1993.

Pruthi, V. e Cameotra, S. S. Short communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcerans*. London: Wourld Journal of Microbiology & Biotechnology. 13, 133-135, 1997.

Raghavan, P. U. M. e Vivekanadan, M. Bioremediation of oil-spilled sites through seeding of naturally adapted *Pseudomonas putida*. Oxford: International Biodeterioration & Biodegradation. 44(1), 29-32, 1999.

- Rocha, C., San-Blas, F., San-Blas, G. e Vierma, L. Biosurfactant production by 2 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. London: Wourld Journal of Microbiology and Biotechnology. 8, 125-128, 1992.
- Rojas-Avelizapa, N. G., Rodriguez-Vazquez, R., Enriquez-Villanueva, F., Martinez-Cruz, J. e Poggi-Varaldo, H. M. Transformer oil degradation by na indigenous microflora isolated from a contaminated soil. Amsterdam: Resources Conservatio and Recyclig. 27(1-2), 15-26, 1999.
- Roose, P. e Brinkman, U. A. Th. Determination of volatile organic compounds in marine biota. London: Journal of Chromatography A. 799, 233-248, 1998.
- Rosato, Y. B. Biodegradação do petróleo. *In*: Microbiologia ambiental. Jaguariúna: Embrapa, 1997.
- Rosenberg, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbons – new markets. Oxford: Tibtech. 11, 419-423, 1993.
- Sasser, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Nota técnica nº101. Microbial ID Inc., Newark, Del., 1990.
- Silva, M. Caracterização de *Mucorales* (Zigomicetos) através de análise de ácidos graxos. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1996.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. e Holt, J. G. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Volume 2. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986.
- Supelco, Inc. High resolution detailed hydrocarbon analyses by capillary column gas chromatography. Boletim 868A. Bellefonte: Sigma-Aldrich Co. 1994.
- Supelco, Inc. Supelco Chromatography Products. Bellefonte: Sigma-Aldrich Co. 1996.

- Trabulsi, L. R., Alterthum, F., Gompertz, O. F. e Candeias, J. A. N. Microbiologia. 3ª edição. São Paulo: Editora Atheneu. 1999.
- Tzarkova, E., Stojaova, N. e Groudeva, V. Possibilities for use of *Corynebacterium* sp RB96 in biotechnologies for purification of soils and waters polluted with petroleum. Sofia: Biotechnology & Biotechnological Equipment. 12(2), 97-99, 1998.
- Van Dyke, M. I., Lee, H. e Trevors, J. T. Applicationsof microbial surfactants. Oxford: Biotech. Adv. 9, 241-252, 1991.
- Van Hamme, J. D. e Ward, O. P. Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. Ottawa: Canadian Journal of Microbiology. 45(2), 130-137, 1999.
- Von Sperlins, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 2ªed. Belo Horizonte: UFMG, 1996.
- Yakimov, M. M., Giuliano, L., Bruni, V., Scarfi, S. e Golyshin, P. N. Characterization of Antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers. Paia: Microbiologica. 22(3), 249-256, 1999.
- Yonebayashi, H., Yoshida, S., Ono, K. e Enomoto, H. Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery processes. Tokyo: Journal of the Japan Petroleum Institute. 43(1), 59-69, 2000.
-

7) APÊNDICES

Apêndice 1: Concentração celular das linhagens durante crescimento nos efluentes

Ensaio de biorremediação (nº)	Efluente da oficina			Efluente da indústria de sabões e margarinas		
	tempo de incubação em horas	média da concentração celular em mg/mL (n=3)	desvio padrão	tempo de incubação em horas	média da concentração celular em mg/mL (n=3)	desvio padrão
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	24	0,944	0,001	24	7,714	0,001
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	48	1,434	0,001	48	130,774	0,003
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	72	2,266	0,001	72	108,564	0,001
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	120	1,826	0,001	120	65,378	0,001
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	24	0	0	24	56,352	0,002
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	48	0	0	48	59,114	0,001
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	72	0	0	72	55,648	0,001
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	120	2,478	0,001	120	51,048	0,001
consórcio de bactérias (2)	24	2,33	0	24	43,506	0,001
consórcio de bactérias (2)	48	4,56	0,005	48	55,53	0,011
consórcio de bactérias (2)	72	10,016	0,004	72	46,63	0,005
consórcio de bactérias (2)	120	6,252	0,001	120	62,362	0,001

Apêndice 2: Determinação da DQO durante os ensaios de biorremediação no efluente da oficina

Efluente da oficina				
Ensaio de biorremediação (nº)	tempo de incubação em horas	média da demanda química de oxigênio em mg/L (n=3)	desvio padrão	redução da DQO (%)
controle ensaio (1 e 2)	24	5500	0	-
controle ensaio (1 e 2)	48	5500	0	-
controle ensaio (1 e 2)	72	5500	0	-
controle ensaio (1 e 2)	120	5500	0	-
controle ensaio (3 e 4)	24	5500	0	-
controle ensaio (3 e 4)	48	5500	0	-
controle ensaio (3 e 4)	72	5500	0	-
controle ensaio (3 e 4)	120	5500	0	-
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	24	4370	1	20,54
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	48	5320	2	3,27
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	72	3270	0	40,54
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	120	2830	2	48,54
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	24	3980	7	27,63
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	48	3730	2	32,18
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	72	3850	2	30
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	120	4080	0	25,81
consórcio de bactérias (2)	24	4230	2	23,09
consórcio de bactérias (2)	48	4030	9	26,72
consórcio de bactérias (2)	72	3120	2	43,27
consórcio de bactérias (2)	120	3930	0	28,54
biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i> (3a)	24	3470	2	36,90
biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i> (3a)	48	4010	1	27,09
biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i> (3a)	72	3090	4	43,81
biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i> (3a)	120	4050	2	26,33
biosurfactante de <i>Pantoea agglomerans</i> (3b)	24	2500	1	54,54
biosurfactante de <i>Pantoea agglomerans</i> (3b)	48	4380	2	20,36
biosurfactante de <i>Pantoea agglomerans</i> (3b)	72	2440	3	55,63
biosurfactante de <i>Pantoea agglomerans</i> (3b)	120	4450	4	19,09
consórcio de biosurfactantes (4)	24	3350	1	39,09
consórcio de biosurfactantes (4)	48	2340	0	57,45
consórcio de biosurfactantes (4)	72	3460	3	37,09
consórcio de biosurfactantes (4)	120	4680	3	14,90

⁻: não se aplica por ser controle

Apêndice 3: Determinação da DQO durante os ensaios de biorremediação no efluente da indústria de sabões e margarinas

Efluente da indústria de sabões e margarinas				
Ensaio de biorremediação (nº)	tempo de incubação em horas	média da demanda química de oxigênio em mg/L (n=3)	desvio padrão	redução da DQO (%)
controle ensaio (1 e 2)	24	4400	0	-
controle ensaio (1 e 2)	48	4400	0	-
controle ensaio (1 e 2)	72	4400	0	-
controle ensaio (1 e 2)	120	4400	0	-
controle ensaio (3 e 4)	24	4400	0	-
controle ensaio (3 e 4)	48	4400	0	-
controle ensaio (3 e 4)	72	4400	0	-
controle ensaio (3 e 4)	120	4400	0	-
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	24	2100	2	52,27
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	48	1070	2	75,68
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	72	1060	3	75,90
<i>Planococcus citreus</i> (1a)	120	1700	4	61,36
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	24	1860	1	57,72
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	48	1850	3	57,95
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	72	1240	4	71,81
<i>Pantoea agglomerans</i> (1b)	120	1800	2	59,09
consórcio de bactérias (2)	24	3060	3	30,45
consórcio de bactérias (2)	48	3830	1	12,95
consórcio de bactérias (2)	72	4960	2	0
consórcio de bactérias (2)	120	2480	1	43,63
biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i> (3a)	24	2990	0	32,04
biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i> (3a)	48	3950	3	10,22
biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i> (3a)	72	3070	4	30,22
biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i> (3a)	120	3800	4	13,63
biosurfactante de <i>Pantoea agglomerans</i> (3b)	24	1720	3	60,90
biosurfactante de <i>Pantoea agglomerans</i> (3b)	48	5240	3	0
biosurfactante de <i>Pantoea agglomerans</i> (3b)	72	4020	4	8,63
biosurfactante de <i>Pantoea agglomerans</i> (3b)	120	2160	3	50,90
consórcio de biosurfactantes (4)	24	1950	5	55,68
consórcio de biosurfactantes (4)	48	3850	2	12,5
consórcio de biosurfactantes (4)	72	3000	2	31,81
consórcio de biosurfactantes (4)	120	5150	3	0

“-”: não se aplica por ser controle

Apêndice 4: Perfil cromatográfico dos ensaios 1 e 2 em 24 horas de incubação do efluente da oficina

TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	AREA CONTROLE ($\mu\text{V.s}$)	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 1 <i>Planococcus citreus</i> 24 h	% degradação ENSAIO 1 <i>Planococcus citreus</i>	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 1 <i>Pantoea agglomerans</i> 24 h	% degradação ENSAIO 1 <i>Pantoea agglomerans</i>	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 2 24 h	% degradação ENSAIO 2
1,696	13807	ND	100,00	ND	100,00	13174	4,58
1,07	36807	ND	100,00	15345	58,30	12995	64,69
1,875	48121	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
2,631	25638	ND	100,00	13679	46,64	11040	56,93
3,663	103334	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
4,026	16006	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
4,524	46488	12878	72,29	17577	62,19	14074	69,72
5,125	131982	12192	90,76	ND	100,00	ND	100,00
5,749	26743	ND	100,00	21992	17,76	17576	34,27
6,404	47272	35770	24,33	ND	100,00	31515	33,33
7,451	151856	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
8,154	17197	30156	0	21861	0	17080	0,68
9,004	58355	ND	100,00	82171	0	65052	0
10,112	197490	18160	90,80	16432	91,67	12763	93,53
11,087	54465	ND	100,00	ND	100,00	19602	64,00
11,841	240514	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
12,478	76451	ND	100,00	45555	40,41	33400	56,31
13,249	182412	78405	57,01	57163	68,66	42742	76,56
13,808	97965	ND	100,00	138041	0	104012	0
14,147	66173	ND	100,00	29932	54,76	19953	69,84
14,525	93608	80768	13,71	42801	54,27	33582	64,12
14,931	124056	ND	100,00	59459	52,07	45763	63,11
15,269	194693	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
15,591	60410	305245	0	313864	0	235335	0
16,096	91703	64206	29,98	42035	54,16	29792	67,51
16,632	222735	96118	56,84	62456	71,95	43294	80,56
17,321	110035	106796	2,94	55101	49,92	38346	65,15
18,173	340481	311018	8,65	261313	23,25	187743	44,85
18,697	317529	230322	27,46	163360	48,55	118335	62,73
19,128	104982	101839	2,99	59457	43,36	40095	61,80
19,560	117005	ND	100,00	75283	35,65	50649	56,71
19,863	229643	364470	0	225060	1,99	163177	28,94
20,226	63413	ND	100,00	23915	62,28	15636	75,34
20,744	306467	355646	0	249775	18,49	176619	42,36
21,082	61538	63621	0	21570	64,94	13413	78,20
21,396	154829	137431	11,23	82125	46,95	52761	65,92
22,043	197661	173424	12,26	61961	68,65	40536	79,49
22,399	353869	204342	42,25	148533	58,02	107373	69,65

Apêndice 4 - continuação

23,127	310738	296171	4,68	209394	32,61	129818	58,22
23,993	438106	420278	4,06	155795	64,43	109195	75,07
24,764	129129	115011	10,93	57002	55,85	37557	70,91
25,028	94457	85154	9,84	30840	67,35	18419	80,50
25,381	411654	235762	42,72	169636	58,79	118083	71,31
26,141	156590	135805	13,27	76036	51,44	47704	69,53
26,412	286500	285525	0,34	108450	62,14	80433	71,92
27,193	204159	188152	7,84	101578	50,24	71457	64,99
27,524	189630	182284	3,87	122292	35,51	84570	55,40
27,986	191662	174864	8,76	69000	63,99	45251	76,39
28,608	518352	258985	50,03	47077	90,91	35655	93,12
29,564	302476	272570	9,88	157216	48,02	116201	61,58
30,160	242426	218502	9,86	44159	81,78	29894	87,66
30,641	250754	229636	8,42	28536	88,61	19181	92,35
31,107	116246	116291	0	23560	79,73	32879	71,71
31,521	344169	278595	19,05	129536	62,36	102681	70,16
32,061	142111	117133	17,57	22325	84,29	17898	87,40
32,471	181823	172699	5,01	36926	79,69	30203	83,38
32,827	113336	105745	6,69	13939	87,70	10668	90,58
33,425	377613	333538	11,67	82301	78,20	57324	84,81

ND: não detectado

Apêndice 5: Perfil cromatográfico dos ensaios 1 e 2 em 48 horas de incubação do efluente da oficina

TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	ÁREA CONTROLE (μV.s)	ÁREA (μV.s) ENSAIO 1 Planococcus citreus 48 h	% degradação ENSAIO 1 Planococcus citreus	ÁREA (μV.s) ENSAIO 1 Pantoea agglomerans 48 h	% degradação ENSAIO 1 Pantoea agglomerans	ÁREA (μV.s) ENSAIO 2 48 h	% degradação ENSAIO 2
0,707	10039	9621	4,16	19322	0	ND	100,00
0,885	7738	15539	0	26878	0	25617	0
1,098	36077	10422	71,11	12080	66,51	11352	68,53
1,476	10216	ND	100,00	4298	57,92	4050	60,35
1,939	49974	ND	100,00	5132	89,73	4891	90,21
2,719	31896	9023	71,71	100,0096	68,34	9626	69,82
3,802	110245	9454	91,42	10110	90,82	9671	91,22
4,175	15183	20483	0	22809	0	21443	0
4,693	44397	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
5,312	135156	9868	92,69	10697	92,08	10272	92,39
5,929	24344	97308	0	99785	0	96149	0
6,674	41102	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
7,688	168164	125510	25,36	149492	11,10	159803	4,97
9,162	40375	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
10,217	156830	7436	95,25	7705	95,08	7392	95,28
11,197	31394	103709	0	103792	0	101606	0
11,919	212607	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
12,528	45404	166816	0	ND	100,00	ND	100,00
13,308	147289	39329	73,29	40202	72,70	38963	73,54
13,861	42615	99670	0	98600	0	97475	0
14,579	104708	32913	68,56	30783	70,60	29087	72,22
15,314	280246	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
15,642	29867	223620	0	223635	0	219021	0
16,138	60440	22061	63,49	ND	100,00	ND	100,00
16,652	86509	42383	51,00	41865	51,60	41868	51,60
16,925	47606	48926	0	51087	0	49153	0
17,277	53098	34902	34,26	34158	35,66	35911	32,36
18,199	264717	183415	30,71	184728	30,21	178182	32,68
18,689	187755	122659	34,67	117225	37,56	111487	40,62
19,165	59682	40118	32,78	40166	32,69	39671	33,52
19,576	94378	60864	35,51	57943	38,60	54959	41,76
19,883	196062	152719	22,10	154827	21,03	150475	23,25
20,757	277460	179946	35,14	179355	35,35	172008	38,00
21,397	160377	47739	70,23	57186	64,34	54771	65,84
22,047	76301	47110	38,25	44658	41,47	43664	42,77
22,446	219444	111666	49,11	106947	51,26	101993	53,52
23,137	213202	128216	39,86	128486	39,73	141808	33,48
23,988	283185	114389	59,60	119423	57,82	104881	62,96

Apêndice 5 - continuação

24,761	71568	39934	44,20	41450	42,08	37456	47,66
25,028	55575	27081	51,27	26500	52,31	23024	58,57
25,389	166669	123028	26,18	120756	27,54	116537	30,07
25,684	69227	34764	49,78	30343	56,16	27507	60,26
26,143	94246	58992	37,40	54374	42,30	49910	47,04
26,406	174099	84167	51,65	80540	53,73	77175	55,67
27,185	127543	85383	33,05	79014	38,04	72526	43,13
27,532	128672	94080	26,88	93266	27,51	84038	34,68
27,929	95251	53613	43,71	54564	42,71	47256	50,38
28,428	101905	34130	66,50	32517	68,09	32449	68,15
28,685	110677	39015	64,74	39194	64,58	34575	68,76
29,107	43865	19582	55,35	18571	57,66	17314	60,52
29,578	185649	121804	34,39	118043	36,41	111786	39,78
30,157	111828	ND	100,00	31649	71,69	31363	71,95
30,616	121478	ND	100,00	23717	80,47	ND	100,00
31,094	53655	ND	100,00	17864	66,70	17249	67,85
31,542	173279	ND	100,00	101105	41,65	94466	45,48
32,059	52561	ND	100,00	15144	71,18	14443	72,52
32,495	84140	ND	100,00	28050	66,66	23836	71,67
32,834	44796	ND	100,00	9097	79,69	8203	81,68
33,090	33278	ND	100,00	7465	77,56	ND	100,00
33,432	127314	ND	100,00	58554	54,00	ND	100,00

ND: não detectado

Apêndice 6: Perfil cromatográfico dos ensaios 1 e 2 em 72 horas de incubação do efluente da oficina

TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	AREA CONTROLE ($\mu\text{V.s}$)	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 1 Planococcus citreus 72 h	% degradação ENSAIO 1 Planococcus citreus	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 1 Pantoea agglomerans 72 h	% degradação ENSAIO 1 Pantoea agglomerans	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 2 72 h	% degradação ENSAIO 2
0,622	4295	8364	0	11648	0	ND	100,00
0,706	13826	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
0,884	9001	19292	0	27032	0	34910	0
1,092	40093	9514	76,27	12383	69,11	15658	60,94
1,467	11309	3414	69,81	4330	61,71	5583	50,63
1,714	1905	3825	0	4295	0	5605	0
1,927	55210	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
2,408	1675	5857	0	6409	0	ND	100,00
2,697	29394	9536	67,55	10072	65,73	13244	54,94
2,980	3731	55066	0	54335	0	69736	0
3,250	5524	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
3,776	120567	10013	91,69	10132	91,59	13319	88,95
4,132	16761	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
4,642	47443	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
5,224	147061	10431	92,90	ND	100,00	ND	100,00
5,867	25988	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
6,597	45494	ND	100,00	ND	100,00	38236	15,95
7,661	194348	123120	36,64	153758	20,88	ND	100,00
9,109	57472	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
10,240	206227	8823	95,72	8466	95,89	10224	95,04
11,190	52327	115550	0	109570	0	ND	100,00
11,940	261597	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
12,467	66889	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
13,337	214217	45242	78,88	39723	81,45	51944	75,75
13,895	66933	ND	100,00	ND	100,00	130279	0
14,247	54444	47408	12,92	34151	37,27	46262	15,02
14,570	86420	33173	61,61	26755	69,04	35019	59,47
15,044	155784	43437	72,11	40423	74,05	51190	67,14
15,341	251120	ND	100,00	ND	100,00	50546	79,87
16,165	111134	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
16,657	126966	48608	61,71	39276	69,06	51946	59,08
16,950	91788	56868	38,04	151724	0	63484	30,83
17,327	75852	25042	66,98	17713	76,64	27128	64,23
18,224	379118	210757	44,40	178707	52,86	222688	41,26
18,725	242365	142882	41,04	106760	55,95	133270	45,01
19,207	97620	47581	51,25	33449	65,73	44829	54,07
19,592	150787	66665	55,78	49880	66,92	58649	61,10
19,912	249986	180606	27,75	151724	39,30	191787	23,28

Apêndice 6 - continuação

20,783	409924	208594	49,11	170774	58,34	208536	49,12
21,117	53332	15559	70,82	6887	87,08	12687	76,21
21,404	103332	60938	41,02	45816	55,66	62031	39,96
21,700	123854	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
22,072	139142	53894	61,26	38042	72,65	46110	66,86
22,455	220477	133532	39,43	95684	56,60	119687	45,71
22,699	105089	ND	100,00	7517	92,84	25806	75,44
23,159	323448	174904	45,92	133691	58,66	165911	48,70
23,995	293162	127725	56,43	96822	66,97	128853	56,04
24,287	180630	75620	58,13	51870	71,28	66429	63,22
24,768	135225	43831	67,58	27747	79,48	40954	69,71
25,038	99597	29576	70,30	14252	85,69	19521	80,40
25,412	251841	142310	43,49	109231	56,62	135382	46,24
25,671	141725	42599	69,94	18419	87,00	25198	82,22
26,155	157735	62306	60,49	43322	72,53	53130	66,31
26,411	278471	95868	65,57	70882	74,54	95613	65,66
27,193	265411	88152	66,78	61247	76,92	86012	67,59
27,554	217427	107191	50,70	79471	63,44	102428	52,89
27,933	191885	59202	69,14	34875	81,82	64689	66,28
28,431	177553	37555	78,84	26845	84,88	48285	72,80
28,676	140506	49680	64,64	30164	78,53	45616	67,53
28,907	190078	23487	87,64	15238	91,98	20835	89,03
29,601	332400	141485	57,43	137963	58,49	132604	60,10
30,165	246706	38212	84,51	33252	86,52	42957	82,58
30,745	329507	38001	88,46	43162	86,90	61215	81,42
31,110	145621	20973	85,59	16641	88,57	18887	87,03
31,551	332690	117358	64,72	89535	73,08	104662	68,54
32,081	144159	20366	85,87	23376	83,78	17773	87,67
32,520	215448	40684	81,11	30972	85,62	44153	79,50
32,850	130445	18188	86,05	13137	89,92	11517	91,17
33,450	402487	77200	80,81	60023	85,08	65553	83,71

ND: não detectado

Apêndice 7: Perfil cromatográfico dos ensaios 1 e 2 em 120 horas de incubação do efluente da oficina

TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	ÁREA CONTROLE (μV.s)	ÁREA (μV.s) ENSAIO 1 <i>Planococcus citreus</i> 120 h	% degradação ENSAIO 1 <i>Planococcus citreus</i>	ÁREA (μV.s) ENSAIO 1 <i>Pantoea agglomerans</i> 120 h	% degradação ENSAIO 1 <i>Pantoea agglomerans</i>	ÁREA (μV.s) ENSAIO 2 120 h	% degradação ENSAIO 2
0,637	11455	8775	23,39	11462	0	9918	13,41
0,817	18633	13768	26,10	17835	4,28	15644	16,04
0,929	25052	18429	26,43	23540	6,03	20919	16,49
1,026	7550	5865	22,31	7189	4,78	5864	22,33
1,105	12702	9544	24,86	10892	14,24	9961	21,57
1,230	15882	12251	22,86	14080	11,34	12668	20,23
1,308	5527	4334	21,58	5075	8,17	4407	20,26
1,437	4389	3444	21,53	4092	6,76	3640	17,06
1,586	51326	41329	19,47	45591	11,17	41181	19,76
1,752	4666	3786	18,85	4111	11,89	3720	20,27
1,814	4671	4206	9,95	4448	4,77	4030	13,72
1,896	3849	2927	23,95	3026	21,38	2756	28,39
2,047	5396	4652	13,78	4937	8,50	4208	22,01
2,245	18493	15273	17,41	8325	54,98	14501	21,58
2,418	7200	6220	13,61	6090	15,41	5596	22,27
2,666	11017	8678	21,23	9648	12,42	8503	22,81
2,865	3865	4015	0	3176	17,82	3179	17,74
3,038	61969	53059	14,37	51588	16,75	46098	25,61
3,397	13508	11798	12,65	11099	17,83	9837	27,17
3,841	11337	9468	16,48	9509	16,12	8509	24,94
4,060	2989	2503	16,25	2732	8,59	2536	15,15
4,248	24608	19855	19,31	21053	14,44	18564	24,56
4,486	15478	13900	10,19	12991	16,06	11733	24,19
4,874	11395	9592	15,82	9736	14,55	8795	22,81
5,332	11834	9471	19,96	10346	12,57	9219	22,09
5,646	16460	12909	21,57	15396	6,46	13582	17,48
6,091	119338	103991	12,86	99137	16,92	87761	26,46
6,509	31566	21684	31,30	28076	11,05	22133	29,88
7,098	68948	47248	31,47	67867	1,56	59673	13,45
7,725	156605	116708	25,47	147030	6,11	127091	18,84
8,046	20235	17994	11,07	15443	23,68	15719	22,31
8,303	23451	17669	24,65	21253	9,37	19075	18,66
8,610	4110	3139	23,62	4435	0	3823	6,98
8,927	64909	51501	20,65	57868	10,84	51159	21,18
9,578	185039	157971	14,62	156544	15,39	137064	25,92
10,008	12844	10711	16,60	11036	14,07	9718	24,33
10,229	9771	9094	6,928	7663	21,57	7192	26,39
10,416	11633	8755	24,73	10114	13,05	8891	23,57

Apêndice 7 - continuação

10,650	37670	30396	19,30	33227	11,79	29157	22,59
11,011	19442	20178	0	18711	3,75	16150	16,93
11,314	108999	89351	18,02	89097	18,25	76519	29,79
11,617	61743	45243	26,72	58819	4,73	52793	14,49
12,055	2870	2170	24,39	2621	8,67	2348	18,18
12,300	40324	36064	10,56	30900	23,37	31146	22,76
12,742	201501	171539	14,86	171758	14,76	145114	27,98
12,988	18186	14091	22,51	15492	14,81	13699	24,67
13,341	47387	40539	14,45	39409	16,83	34693	26,78
13,826	120069	103758	13,58	100,00477	16,31	87242	27,34
14,085	22954	17764	22,61	18926	17,54	16489	28,16
14,346	42839	37284	12,96	35883	16,23	31705	25,99
14,675	30495	26723	12,36	25834	15,28	23919	21,56
15,111	45491	36191	20,44	39127	13,98	33932	25,40
15,406	50427	ND	100,00	ND	100,00	31348	37,83
15,640	222873	232586	0	229605	0	168060	24,59
15,875	6643	5445	18,03	ND	100,00	4871	26,67
16,064	34011	28232	16,99	32748	3,71	24137	29,03
16,400	25358	20980	17,26	20919	17,50	19236	24,14
16,801	49805	42085	15,50	41869	15,93	35799	28,12
17,078	59711	49027	17,89	49305	17,42	43348	27,40
17,432	24959	21464	14,00	19639	21,31	17374	30,38
17,631	16763	100,0098	39,76	14328	14,52	13189	21,32
18,330	216379	180476	16,59	182305	15,74	156051	27,88
18,817	128102	107255	16,27	107180	16,33	93367	27,11
19,232	42863	34712	19,01	36816	14,10	31873	25,63
19,700	63016	47172	25,14	48836	22,50	40491	35,74
19,985	185338	157182	15,19	158858	14,28	136569	26,31
20,341	15562	12111	22,17	12248	21,29	10999	29,32
20,856	209733	171870	18,05	175132	16,49	148477	29,20
21,196	11549	8382	27,42	100,0017	13,26	8344	27,75
21,495	58738	46186	21,36	49276	16,10	41443	29,44
21,864	20563	17425	15,26	16462	19,94	15061	26,75
22,144	47842	37890	20,80	38732	19,04	32143	32,81
22,521	117065	97154	17,00	101329	13,44	85975	26,55
22,744	26556	19912	25,01	20784	21,73	17616	33,66
23,225	166047	136332	17,89	142102	14,42	107830	35,06
23,677	4203	2118	49,60	3490	16,96	2998	28,66
24,053	122949	98992	19,48	103002	16,22	88362	28,13
24,360	66889	53549	19,94	59285	11,36	45543	31,91
24,823	38765	29861	22,96	33738	12,96	28067	27,59
25,097	21500	13687	36,33	20434	4,95	13933	35,19
25,476	134322	110894	17,44	116885	12,98	96776	27,95
25,732	25590	18059	29,42	21818	14,74	20188	21,10
26,217	53078	40191	24,27	43568	17,91	37893	28,60
26,466	85904	71272	17,03	76156	11,34	62878	26,80
26,747	23594	15769	33,16	17973	23,82	15027	36,31
27,247	80204	61927	22,78	66330	17,29	57269	28,59

Apêndice 7 - continuação

27,615	100710	81344	19,22	85676	14,92	73560	26,95
27,987	34393	36052	0	25619	25,51	23950	30,36
28,169	17247	ND	100,00	14515	15,84	13141	23,80
28,329	24051	18982	21,07	17646	26,63	15736	34,57
28,475	40081	28893	27,91	28979	27,69	26720	33,33
28,726	40286	35040	13,02	31139	22,70	31034	22,96
28,957	19933	16044	19,51	14557	26,97	13406	32,74
29,140	21891	21650	1,10	15519	29,10	14990	31,52
29,664	140433	120185	14,41	116220	17,24	101901	27,43
30,035	14881	12375	16,84	14829	0,34	11505	22,68
30,217	40681	30603	24,77	43179	0	29191	28,24
30,790	67700	38152	43,64	53515	20,95	41341	38,93
31,165	21462	14556	32,17	13701	36,16	11148	48,05
31,616	110166	93787	14,86	84950	22,88	82456	25,15
32,143	12077	10432	13,62	100,00	17,19	9079	24,82
32,581	33561	23349	30,42	23135	31,06	23515	29,93
32,903	7269	7999	0	8433	0	ND	100,00
33,201	1859	1599	13,98	2278	0	ND	100,00
33,450	402487	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00

ND: não detectado

Apêndice 8: Perfil cromatográfico dos ensaios 3 e 4 em 24 horas de incubação do efluente da oficina

TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	ÁREA CONTROLE (μ V.s)	ÁREA (μ V.s) ENSAIO 3 <i>Planococcus citreus</i> 24 h	% degradação ENSAIO 3 <i>Planococcus citreus</i>	ÁREA (μ V.s) ENSAIO 3 <i>Pantoea agglomerans</i> 24 h	% degradação ENSAIO 3 <i>Pantoea agglomerans</i>	ÁREA (μ V.s) ENSAIO 4 24 h	% degradação ENSAIO 4
0,637	5869	ND	100,00	8425	0	11232	0
0,721	12788	20084	0	13482	0	17687	0
0,812	3658	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
0,907	8481	27487	0	19072	0	24871	0
1,122	36559	12032	67,08	9400	74,28	11860	67,55
1,510	12057	4417	63,36	ND	100,00	4190	65,24
1,772	2836	4504	0	3941	0	4497	0
1,988	49752	5079	89,79	ND	100,00	5555	88,83
2,195	3260	8879	0	16678	0	18424	0
2,467	1869	6556	0	6492	0	7162	0
2,789	25754	10572	58,95	3553	86,20	4073	84,18
3,082	3075	56472	0	57922	0	62729	0
3,371	4597	11960	0	12863	0	13785	0
3,913	112328	ND	100,00	100,0059	91,04	11355	89,89
4,289	16265	23455	0	20924	0	23645	0
4,820	39924	10688	73,22	10239	74,35	11043	72,33
5,458	130742	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
6,041	13361	107779	0	113778	0	122230	0
6,865	37911	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
7,851	175279	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
9,231	33345	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
10,269	150326	9060	93,97	9158	93,90	9931	93,39
11,255	22870	93744	0	97543	0	129950	0
11,965	198397	2871	98,55	2221	98,88	2965	98,50
12,518	34620	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
12,867	18389	15742	14,39	14816	19,43	17986	2,19
13,352	104787	43018	58,94	43373	58,60	47711	54,46
13,913	47046	19615	58,30	20736	55,92	23644	49,74
14,595	30981	32187	0	28921	6,64	31076	0
15,347	266741	39732	85,10	42934	83,90	ND	100,00
15,908	8112	ND	100,00	35152	0	39538	0
16,171	25056	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
16,671	54582	42576	21,99	44002	19,38	48941	10,33
16,955	30206	52772	0	53248	0	58371	0
17,322	21455	19937	7,07	21080	1,74	22729	0
18,215	186512	185755	0,40	191076	0	ND	100,00
18,700	117287	115957	1,13	116675	0,52	ND	100,00
19,181	31288	39765	0	38108	0	41104	0

Apêndice 8 - continuação

19,587	60580	46426	23,36	49387	18,47	65102	0
19,899	161487	162939	0	168303	0	183325	0
20,225	14516	13564	6,55	13979	3,69	15363	0
20,769	181530	176704	2,65	182634	0	208810	0
21,104	8111	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
21,386	31486	ND	100,00	ND	100,00	36477	0
22,058	77574	39360	49,26	40384	47,94	49202	36,57
22,440	130036	104288	19,80	108270	16,73	121623	6,46
23,144	145379	144914	0,31	149137	0	ND	100,00
23,973	173933	104080	40,16	111927	35,64	123523	28,98
24,740	35469	34217	3,52	36338	0	41963	0
25,021	18148	17097	5,79	18336	0	24418	0
25,395	122005	116860	4,21	127641	0	138421	0
25,666	13513	24714	0	30409	0	30445	0
26,137	47936	45864	4,32	51165	0	57438	0
26,389	104980	77164	26,49	87907	16,26	93365	11,06
27,169	73394	68776	6,29	74822	0	83293	0
27,538	93281	83195	10,81	93841	0	101227	0
27,916	33979	43356	0	30458	10,36	31537	7,18
28,660	191818	36719	80,85	38542	79,90	43147	77,50
29,586	127200	121302	4,63	128055	0	145056	0
30,144	53583	32680	39,01	37089	30,78	44352	17,22
30,716	64490	46440	27,98	48712	24,46	105747	0
31,099	26894	19104	28,96	16913	37,11	37486	0
31,542	111344	98027	11,96	98938	11,14	121580	0
32,065	38693	9737	74,83	9688	74,96	36618	5,36
32,498	47336	23026	51,35	29080	38,56	47647	0
32,822	18966	6791	64,19	1022	94,61	20115	0
33,434	98914	77797	21,34	ND	100,00	95543	3,40

ND: não detectado

Apêndice 9: Perfil cromatográfico dos ensaios 3 e 4 em 48 horas de incubação do efluente da oficina

TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	ÁREA CONTROLE ($\mu\text{V.s}$)	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 3 <i>Planococcus citreus</i> 48 h	% degradação ENSAIO 3 <i>Planococcus citreus</i>	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 3 <i>Pantoea agglomerans</i> 48 h	% degradação ENSAIO 3 <i>Pantoea agglomerans</i>	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 4 48 h	% degradação ENSAIO 4
0,707	100,0039	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
0,885	7738	16049	0	14551	0	13394	0
1,098	36077	4563	87,35	3408	90,55	3682	89,79
1,476	10216	2874	71,86	2575	74,79	2317	77,31
1,939	49974	ND	100,00	ND	100,00	2109	95,77
2,719	31896	9208	71,13	7591	76,20	6402	79,92
3,802	110245	9355	91,51	7814	92,91	6770	93,85
4,175	15183	22213	0	18060	0	14359	5,42
4,693	44397	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
5,312	135156	9630	92,87	7845	94,19	6948	94,85
5,929	24344	109041	0	88658	0	72978	0
6,674	41102	ND	100,00	ND	100,00	2305	94,39
7,688	168164	106010	36,96	87486	47,97	81574	51,49
9,162	40375	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
10,217	156830	8787	94,39	7532	95,19	5973	96,19
11,197	31394	117367	0	94679	0	78758	0
11,919	212607	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
12,528	45404	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
13,308	147289	45236	69,28	35701	75,76	29061	80,26
13,861	42615	115010	0	89740	0	75162	0
14,579	104708	34081	67,45	26768	74,43	22283	78,71
15,314	280246	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
15,642	29867	256841	0	203693	0	171010	0
16,138	60440	42217	30,15	32147	46,81	20418	66,21
16,652	86509	51612	40,33	39268	54,60	30762	64,44
16,925	47606	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
17,277	53098	41349	22,12	31077	41,47	ND	100,00
18,199	264717	216469	18,22	167593	36,68	139319	47,37
18,686	187755	133596	28,84	105703	43,70	87000	53,66
19,165	59682	49376	17,26	36119	39,48	18905	68,32
19,576	94378	66965	29,04	55474	41,22	42882	54,56
19,883	196062	178720	8,84	135946	30,66	118832	39,39
20,757	277460	206157	25,69	161324	41,85	136678	50,73
21,397	160377	64634	59,69	46573	70,96	34901	78,23
22,047	76301	55541	27,20	43453	43,05	33584	55,98
22,446	219444	119370	45,60	92580	57,81	81938	62,66
23,137	213202	166815	21,75	110902	47,98	100008	52,71
23,988	283185	127246	55,06	106461	62,40	84729	70,07

Apêndice 9 - continuação

24,761	71568	44931	37,21	34212	52,19	27786	61,17
25,028	55575	28927	47,94	23495	57,72	19141	65,55
25,389	166669	136713	17,97	104127	37,52	93448	43,93
25,684	69227	42557	38,52	26733	61,38	22458	67,55
26,143	94246	60908	35,37	45792	51,41	41436	56,03
26,406	174099	91614	47,37	70384	59,57	60655	65,16
27,185	127543	85523	32,94	69274	45,68	59487	53,35
27,532	128672	98855	23,17	76846	40,27	71102	44,74
27,929	95251	56013	41,19	49303	48,23	38072	60,02
28,428	101905	35943	64,72	32517	68,09	26621	73,87
28,685	110677	42557	61,54	38814	64,93	31626	71,42
29,107	43865	19099	56,45	20855	52,45	14373	67,23
29,578	185649	23305	87,44	107117	42,30	94688	48,99
30,157	111828	36858	67,04	26929	75,91	33768	69,80
30,616	121478	23305	80,81	ND	100,00	ND	100,00
31,094	53655	23230	56,70	16436	69,36	15536	71,04
31,542	173279	114826	33,73	86875	49,86	78166	54,89
32,059	52561	18645	64,52	10784	79,48	13465	74,38
32,495	84140	35031	58,36	24728	70,61	23374	72,22
32,834	44796	12846	71,32	7530	83,19	8451	81,13
33,090	33278	11096	66,65	4745	85,74	ND	100,00
33,432	127314	69098	45,72	49636	61,01	57206	55,06

ND: não detectado

Apêndice 10: Perfil cromatográfico dos ensaios 3 e 4 em 72 horas de incubação do efluente da oficina

TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	ÁREA CONTROLE (μ V.s)	ÁREA (μ V.s) ENSAIO 3 <i>Planococcus citreus</i> 72 h	% degradação ENSAIO 3 <i>Planococcus citreus</i>	ÁREA (μ V.s) ENSAIO 3 <i>Pantoea agglomerans</i> 72 h	% degradação ENSAIO 3 <i>Pantoea agglomerans</i>	ÁREA (μ V.s) ENSAIO 4 72 h	% degradação ENSAIO 4
0,629	8261	15161	0	11547	0	10270	0
0,713	17171	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
0,801	4781	ND	100,00	19442	0	16108	0
0,895	9817	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
1,104	39867	15412	61,34	12257	69,25	10052	74,78
1,485	12419	5719	53,94	4417	64,43	3748	69,82
1,740	3538	5643	0	4380	0	4174	0
1,950	48298	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
2,150	3679	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
2,444	2804	7929	0	6505	0	6605	0
2,734	28346	3853	86,40	3356	88,16	3759	86,73
3,032	4125	69792	0	55508	0	59207	0
3,313	6151	14841	0	11693	0	12115	0
3,831	110262	12909	88,29	10279	90,67	10075	90,86
4,211	20997	28955	0	23194	0	22737	0
4,720	62616	12954	79,31	10207	83,69	10912	82,57
5,327	156131	14013	91,02	10901	93,01	14462	90,73
5,958	21644	132619	0	105601	0	115192	0
6,741	43928	ND	100,00	ND	100,00	3834	91,27
7,746	184209	218102	0	155720	15,46	129288	29,81
9,143	56946	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
10,208	208033	10334	95,03	8931	95,70	8701	95,81
11,184	48469	140434	0	92902	0	98804	0
11,912	236693	3555	98,49	3012	98,72	2710	98,85
12,362	61355	38629	37,04	31675	48,37	40311	34,29
12,814	36653	224949	0	178409	0	184178	0
13,313	152011	53090	65,07	42172	72,25	44900	70,46
13,872	96526	ND	100,00	104722	0	111705	0
14,552	65641	38337	41,59	29710	54,73	29839	54,54
15,326	312212	59701	80,87	ND	100,00	39785	87,25
15,630	44456	236301	0	233658	0	210040	0
16,150	92742	ND	100,00	30225	67,40	31158	66,40
16,659	104860	55654	46,92	42478	59,49	46142	55,99
16,942	69017	66041	4,31	51753	25,01	55550	19,51
17,306	75884	27050	64,35	21743	71,34	24464	67,76
18,207	282890	234889	16,96	182281	35,56	194312	31,31
18,694	197400	147672	25,19	112549	42,98	119628	39,39
19,167	81150	50766	37,44	38663	52,35	41916	48,34

Apêndice 10 - continuação

19,582	114537	69065	39,70	47346	58,66	47746	58,31
19,896	219131	197840	9,71	158796	27,53	174431	20,39
20,220	51632	19129	62,95	13519	73,81	15766	69,46
20,767	330260	224483	32,02	173378	47,50	185760	43,75
21,386	19100,006	66549	65,15	47368	75,20	55126	71,13
22,061	103209	53413	48,24	39674	61,55	42811	58,52
22,441	266741	131156	50,83	100,00828	62,20	108811	59,20
23,144	269380	180543	32,97	141134	47,60	155152	42,40
23,978	258819	135504	47,64	104519	59,61	113140	56,28
24,276	154969	77832	49,77	57179	63,10	64562	58,33
24,743	107265	47196	56,00	35204	67,18	37158	65,35
25,025	92443	27724	70,00	17938	80,59	18743	79,72
25,398	219469	146165	33,40	114868	47,66	126871	42,19
25,677	109403	33340	69,52	24130	77,94	25877	76,34
26,140	136247	63011	53,75	45955	66,27	49551	63,63
26,395	280012	99746	64,37	77232	72,41	86157	69,23
27,176	201704	95318	52,74	70789	64,90	74643	62,99
27,540	185128	109281	40,97	87318	52,83	96221	48,02
27,922	181719	58867	67,60	44897	75,29	48619	73,24
28,421	162270	42135	74,03	32623	79,89	35568	78,08
28,670	106708	45436	57,42	34456	67,71	37282	65,06
28,891	80046	21483	73,16	16465	79,43	18402	77,01
29,076	93077	25,411	72,69	16,014	82,79	19,012	79,57
29,589	313726	149742	52,26	119248	61,98	129913	58,59
30,146	259692	42553	83,61	34545	86,69	35081	86,49
30,734	452736	64815	85,68	55450	87,75	55680	87,70
31,548	343735	121401	64,68	104269	69,66	112739	67,20
32,062	150827	15066	90,01	17947	88,10	20013	86,73
32,510	223153	33425	85,02	33038	85,19	39218	82,42
32,843	127395	10120	92,05	12009	90,57	14967	88,25
33,439	479781	72072	84,97	63542	86,75	76132	84,13

ND: não detectado

Apêndice 11: Perfil cromatográfico dos ensaios 3 e 4 em 120 horas de incubação do efluente da oficina

TEMPO DE RETENÇÃO (minutos)	ÁREA CONTROLE ($\mu\text{V.s}$)	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 3 <i>Planococcus citreus</i> 120 h	% degradação ENSAIO 3 <i>Planococcus citreus</i>	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 3 <i>Pantoea agglomerans</i> 120 h	% degradação ENSAIO 3 <i>Pantoea agglomerans</i>	ÁREA ($\mu\text{V.s}$) ENSAIO 4 120 h	% degradação ENSAIO 4
0,615	5027	15428	0	ND	100,00	11369	0
0,693	15278	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
0,862	8795	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
1,058	41150	8081	80,36	11814	71,29	8060	80,41
1,414	12505	5715	54,29	4164	66,70	4513	63,91
1,642	2006	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
1,854	52436	4552	91,31	3100,00	94,08	3774	92,80
2,048	7060	6544	7,30	4924	30,25	5724	18,92
2,256	4398	12026	0	8530	0	19883	0
2,325	4782	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
2,580	62169	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
3,049	161579	73306	54,63	51328	68,23	66439	58,88
3,636	138885	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
3,933	36781	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
4,400	138822	ND	100,00	13105	90,55	17456	87,42
4,960	99831	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
5,323	98431	14743	85,02	10541	89,29	12283	87,52
6,258	55771	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
7,472	165843	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
8,885	161544	87097	46,08	59470	63,18	66833	58,62
9,667	126712	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
10,197	202434	13471	93,34	7985	96,05	11450	94,34
10,699	107015	49581	53,66	33970	68,25	40052	62,57
11,273	92273	124771	0	82519	10,57	112168	0
11,929	296585	4357	98,53	2337	99,21	3422	98,84
12,411	57878	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
13,053	318554	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
13,341	277862	55623	79,98	35584	87,19	51384	81,50
13,989	166903	24327	85,42	16359	90,19	27051	83,79
14,482	111107	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
15,009	217907	55942	74,32	34450	84,19	48148	77,90
15,415	400691	57541	85,63	35569	91,12	49387	87,67
16,715	145882	54226	62,82	33619	76,95	51085	64,98
17,378	596603	25677	95,69	15660	97,37	25142	95,78
18,282	561610	236527	57,88	154942	72,41	218238	61,14
18,781	277278	143160	48,36	93538	66,26	137692	50,34
19,661	674589	61438	90,89	35646	94,71	56042	91,69
19,966	230320	202993	11,86	137916	40,11	191901	16,68

Apêndice 11 - continuação

20,581	504389	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
20,823	253169	222345	12,17	145666	42,46	207665	17,97
21,394	298084	62462	79,04	39114	86,87	60275	79,77
22,410	735209	128091	82,57	87349	88,11	126930	82,73
23,122	652908	177927	72,74	106659	83,66	169821	73,99
23,966	467050	133281	71,46	84829	81,83	125461	73,13
24,281	480774	71890	85,04	45890	90,45	71105	85,21
25,000	140130	22123	84,21	10879	92,23	20710	85,22
25,402	568197	144701	74,53	98917	82,59	137913	75,72
26,214	654235	58460	91,06	37005	94,34	54628	91,65
27,027	379534	ND	100,00	ND	100,00	ND	100,00
27,560	366535	110502	69,85	73570	79,92	106693	70,89
27,876	135289	ND	100,00	23960	82,28	34186	74,73
28,236	350866	27237	92,23	16207	95,38	28256	91,94
28,627	136320	43554	68,05	38471	71,77	46754	65,70
28,988	176124	19151	89,12	ND	100,00	22120	87,44
29,610	514031	158633	69,13	116725	77,29	144810	71,82
30,119	263820	43374	83,55	31682	87,99	15565	94,10
30,664	279977	64234	77,05	48890	82,53	55292	80,25
31,117	121688	20680	83,00	22670	81,37	15565	87,20
31,570	408427	117996	71,10	94242	76,92	110426	72,96
32,075	94986	11986	87,38	17814	81,24	16716	82,40
32,512	189625	24960	86,83	34411	81,85	28581	84,92
32,822	89596	ND	100,00	8155	90,89	8645	90,35
33,460	366703	ND	100,00	67907	81,48	ND	100,00

ND: não detectado

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE