



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

LUCIANA LIMA DE BRITO

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO POR ISOLADOS DE RIZÓBIOS DA AMAZÔNIA.

MANAUS
2013

LUCIANA BRITO

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO POR ISOLADOS DE RIZÓBIOS DA AMAZÔNIA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof Dr Luiz Antonio de Oliveira

**MANAUS
2013**

LUCIANA BRITO

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO POR ISOLADOS DE RIZÓBIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Dr. Luiz Antonio de Oliveira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Dr. Aldo Rodrigues de Lima Procópio
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Dr^a. Ieda Hortêncio Batista
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

**MANAUS
2013**

Ofereço

*A Deus, por toda fidelidade,
amor e força divina nos
momentos difíceis.*

Dedico

*Ao meu filho Lucas, razão do meu viver; aos meus pais Givaldo
“in memoriam” e Lúcia, pelo exemplo de vida, ensinamentos,
apoio e amor. Ao meu marido Fábio pela compreensão
e companheirismo em todos os momentos e, aos
meus irmãos Genário e Gustavo pela
demonstração de amizade e amor.*

Considero o cérebro de um homem como sendo inicialmente um sótão vazio, que você deve mobiliar conforme tenha resolvido. Um tolo atulha-o com quanto traste vai encontrando à mão, de maneira que os conhecimentos de alguma utilidade para ele ficam soterrados, ou, na melhor das hipóteses, tão escondidos entre as demais coisas que lhe é difícil alcançá-los. Um trabalhador de talento, pelo contrário, é muito cuidadoso com o que leva para o sótão da sua cabeça. Não quererá mais nada além dos instrumentos que possam ajudar o seu trabalho; destes é que possui uma larga provisão, e todos na mais perfeita ordem. É um erro pensar que o dito quartinho tem paredes elásticas e pode ser distendido à vontade. Segundo as suas dimensões, há sempre um momento em que para cada nova entrada de conhecimento a gente esquece qualquer coisa que sabia antes. Consequentemente, é da maior importância não ter fatos inúteis ocupando o espaço dos úteis.”

Sir Arthur Conan Doye - Sherlock Holmes

Agradecimentos

A Deus, que sempre me abriu janelas quando as portas se fechavam, por mostrar-me a luz nos momentos difíceis e por colocar no meu caminho pessoas especiais.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e credibilidade de sempre, que me proporcionaram uma educação de qualidade para eu concretizar esse projeto de vida.

Ao meu amado esposo Fábio Cáuper, que soube compreender a minha ausência, devido às horas de dedicação ao estudo e a pesquisa no laboratório, amigo sempre presente, companheiro de todas as horas e lugares.

Ao meu querido filho Lucas, razão de toda a força para continuar minha jornada e amor da minha vida.

Aos meus irmãos Genário e Gustavo por toda a amizade e amor dispensados em todos os momentos da minha trajetória, pessoas especiais na minha vida.

À Universidade do Estado do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e recursos Naturais, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos ao longo do curso e ao CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, através do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos de Solos/COTI, pelo apoio através da infra-estrutura para a realização desse trabalho.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FINEP – Agência Brasileira de Inovação (via Rede CTPetro Amazônia) e Petróleo Brasileiro SA/CENPES – Petrobras S/A, pelos recursos financeiros necessários para a realização dessa pesquisa.

Ao meu querido orientador e professor Dr. Luiz Antonio de Oliveira, o meu carinho, respeito, admiração e eterna gratidão, pelo incentivo, apoio, ensinamentos, dedicação e compreensão ao longo do desenvolvimento de todo o meu trabalho.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e recursos Naturais e aos meus colegas de turma de 2011, em especial aos meus queridos amigos Francisco Neto pelo apoio e palavras amigas nos momentos difíceis e também à querida Danielle Rachel, por toda a bela amizade que estamos cultivando a cada dia e ao Diego do CBA pelo auxílio e tempo dispensado a esse projeto.

À Dra. Suely Sousa, pelo tempo dispensado a mim, no auxílio no tratamento estatístico, pela amizade, conselhos e ensinamentos que muito contribuíram para o meu melhoramento profissional e pessoal.

A todos os meus amigos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a conclusão de mais essa etapa de minha vida; em especial e de coração, aos amigos do Laboratório, Luciana Vaz, Michele, Lucinaia, Karol, Aline, Edilane, Fabiana, Ingrid, Ellen, Juliana, Francisco, Alexandre, Karen Kelly, Bianca e em especial à minha mais que querida amiga Nadionara Menezes, por toda a contribuição nas atividades do laboratório e pela amizade incondicional. A Lúcia Antônia pelo carinho e amizade nos momentos difíceis

A toda a família Emetério de Brito, em especial a Semir, pela contribuição, aconselhamentos, amizades e contribuição durante toda a minha trajetória educacional.

Aos membros da banca do Exame de Qualificação (Dra. Elena Camarão e Dr. Aldo Procópio) e aos membros da Defesa da Dissertação (Dr. Aldo Procópio e Dr. Antônia Souza) pelas sugestões e contribuições.

Enfim, às inúmeras pessoas que merecem meus agradecimentos, pois passaram na minha vida e contribuíram, enriquecendo meus conhecimentos e ficando com isso um carinho e amizade para toda uma vida.

Muitíssimo obrigada !!!

4. LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BOGPM – Base de Operações Geólogo Pedro de Moura

BTEXs – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xilenos

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DCPIP – Diclorofenol-2,6 Indofenol Dihidratado (sal sódico)

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclico Aromático

INPA – Meio mineral INPA

IE – Índice de Emulsificação

pH – Potencial hidrogeniônico

RAPD – Randomly amplified polymorphic DNA

UFC – Unidade formadora de colônia

RESUMO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais. A contaminação ambiental por esta substância e por seus derivados causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação tem recebido destaque nas últimas décadas. Para a descontaminação dos locais, a biorremediação utiliza micro-organismos autóctones ou alóctones, e o emprego destes na remediação de ambientes impactados requer mecanismos para estimular e desenvolver a atividade microbiana na degradação de compostos de petróleo. Esse projeto teve como objetivo testar isolados de rizóbios na degradação de compostos de petróleo. Foi utilizado o método de riscagem em placa, tendo o petróleo como fonte de carbono e em seguida foi verificado a capacidade dos micro-organismos em degradar hidrocarbonetos utilizada a técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol pela mudança de cor do DCPIP azul (oxidado) para o incolor (reduzido). Dos 120 isolados de rizóbios, 93 apresentaram capacidade de tolerar a presença do petróleo no meio, apresentando bom crescimento, quando submetidos por 15 dias na presença dessa substância. Desses 120 isolados, 36 apresentaram habilidade de utilizar o petróleo como fonte de carbono, pois atingiram a nota de crescimento sugerida (3,06) com seis dias de crescimento. No teste do DCPIP, 26 isolados apresentaram descoloração parcial, quase total ou total com seis dias de observação. A partir desse teste, foram selecionados 15 rizóbios, na qual foi averiguado o potencial do índice de emulsificação e verificou-se alta atividade emulsificante A/O utilizando as fontes de carbono petróleo e tolueno, usando-se os sais minerais dos meios INPA e YM com relação a todos os micro-organismos testados e com a atividade emulsificante O/A, cinco, apresentaram alta atividade emulsificante com o petróleo e cinco com o tolueno, dois apresentaram moderado com petróleo e dois com tolueno e os demais foram baixos para as duas fontes de carbono. Esses resultados demonstram que, os rizóbios podem tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados com esse produto muito utilizado na sustentabilidade econômica global.

Palavras-chave: Biodegradação, Petróleo, Rizóbios

ABSTRACT

Petroleum is a complex mixture of hydrocarbons. Environmental contamination by this substance and its derivatives causes great ecological impact and the techniques for their remediation has received attention in the recent decades. For decontamination of sites, bioremediation uses microorganisms indigenous or alien, and employment in these remediation of impacted environments requires mechanisms to stimulate and develop the microbial activity in the degradation of petroleum compounds. This project aimed to test rhizobial isolates in the degradation of petroleum compounds. We used a plate scribing method, with petroleum as a carbon source, and then it was verified the ability of microorganisms to degrade hydrocarbons by the technique of the redox indicator, 2,6-dichlorophenol indophenol by DCPIP color change of the blue (oxidised) to colorless (reduced). 120 isolados of rhizobia, 120 showed the ability to tolerate the presence of oil in the middle, showing good growth when subjected for 15 days in the presence of this substance. Of these 93 isolates, 36 had the ability to use oil as a carbon source for growth scores reached suggested (3,06) with six days of growth. The test of DCPIP, 26 isolates showed partial discoloration, almost complete or complete with six days of observation. From this test, 15 were selected rhizobia was examined in which the potential of the emulsification index and found to be high emulsifying activity / O using the carbon sources petroleum and toluene, using mineral salts media and YM INPA with respect to all the microorganisms and the emulsifying activity O / A, five had high emulsifying activity with oil and five toluene, two had moderate with oil and two with toluene and the rest were low for both sources carbon. These results demonstrate that rhizobia can become a feasible and safe alternative for bioremediation of soils contaminated with this product widely used in global economic sustainability.

Keywords: Bioremediation, Petroleum, Rhizobium

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Petróleo, caráter físico-químico e impactos causados pela deposição de seus compostos no meio ambiente.....	19
3.2 Biorremediação de ambientes impactados por petróleo.....	21
3.3 Produção de Biossurfactantes.....	27
3.4 Micro-organismos de solo.....	28
3.5 Rizóbio.....	29
4. Capítulo I.....	32
4.1 Introdução.....	34
4.2 Material e Métodos.....	35
4.3 Resultados e Discussão.....	43
4.4 Conclusões.....	61
5. Capítulo II.....	62
5.1 Introdução.....	64
5.2 Material e Métodos.....	66
5.3 Resultados e Discussão.....	69
5.4 Conclusões.....	82
6. Referências Bibliográficas.....	83
7. ANEXOS.....	97

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Principais produtos resultantes da destilação do petróleo	19
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Isolamento dos nódulos e seus respectivos locais de coleta	35
Tabela 2 – Meio mineral SYM	37
Tabela 3 – Descrição utilizada para caracterizar morfológicamente bactérias	37
Tabela 4 – Faixa de pontuação para avaliação do crescimento bacteriano utilizando o meio YMA sem manitol e com petróleo	39
Tabela 5 – Morfologia de Estirpes de Rizóbios.....	43
Tabela 6 – Crescimento de estirpes de rizóbios em meio sólido, utilizando petróleo e manitol como fontes de carbono.....	49
Tabela 7 – Valores percentuais referentes ao processo de descoloração do DCPIP, com manitol como fonte de carbono.....	58
Tabela 8 – Valores percentuais referentes ao processo de descoloração do DCPIP, com petróleo como fonte de carbono.....	58

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Rizóbios selecionados e utilizados nos testes de biodegradabilidade e produção de biossurfactantes	66
Tabela 2 – Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante	68
Tabela 3 – Espessura da camada emulsificante de estirpes de rizóbios usando duas soluções de sais diferentes e tolueno e petróleo como fontes de carbono.....	73
Tabela 4 – Densidade Óptica - Atividade emulsificante de estirpes de rizóbios usando duas soluções de sais diferentes e tolueno e petróleo como fontes de carbono.....	74
Tabela 5 – Índice de Emulsão com relação aos meios(Água em óleo).....	75
Tabela 7 – Índice de Emulsão para fontes de carbono (Água em Óleo).....	76
Tabela 8 – Índice de Emulsão para meios (Óleo em Água).....	77
Tabela 9 - Índice de Emulsão para fontes de carbono (Óleo em Água).....	78

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Esquema geral das etapas para definição e implementação de um processo de biorremediação	22
Figura 2 – Rotas de biodegradação de alcanos para micro-organismos aeróbios e anaeróbios	25
Figura 3 – Rota metabólica da biodegradação de alcanos	26

CAPÍTULO I

Figura 1 – Ilustração do método de riscagem para avaliação do crescimento de bactéria	38
Figura 2 - Valores para crescimento de bactérias	39
Figura 3 – Montagem do Teste de Indofenol em placas de Eliza.....	41
Figura 4 – Esquema ilustrativo do teste de biodegradabilidade utilizando o indicador redox DCPIP.....	41
Figura 5 – Crescimento de bactérias em meio YMA, com fontes de carbono distintas, manitol (A) e petróleo (B).....	48
Figura 6 – Percentual de rizóbios com relação a taxa de crescimento usando manitol ou petróleo como fontes de carbono.....	53
Figura 7 – Crescimento de rizóbios com manitol e petróleo.....	53
Figura 8 – Biodegradação de petróleo e manitol por rizóbios, utilizando o indicador redox DCPIP.....	55
Figura 9 – Representação do dendrograma de crescimento agrupando os rizóbios, conforme descoloração do DCPIP, utilizando manitol como fonte de carbono.....	56
Figura 10 - Representação do dendrograma de crescimento agrupando os rizóbios, conforme descoloração do DCPIP, utilizando petróleo como fonte de carbono.....	57

CAPÍTULO II

Figura 1 – Esquem ilustrativo da atividade de emulsificação.....	68
Figura 2 – Teste qualitativo do colapso da gota.....	69
Figura 3 – Produção de biossurfactantes.	72
Figura 4 – pH inicial e final das amostras submetidas ao teste de avaliação de produção de biossurfactantes.....	80

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é um composto orgânico, formado por processos biogeoquímicos, constituído em sua maior parte por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. A contaminação ambiental por esta substância e por seus derivados causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) estão entre os poluentes de maior persistência, apresentando propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos. A maior parte dos compostos de petróleo é passível de biodegradação; no entanto, trata-se de um processo lento, podendo levar décadas até a total descontaminação do ambiente (TONINI et al., 2010).

O mundo atual está cada vez mais dependente do petróleo, sendo que as técnicas para o manuseio deste (exploração, refino, transporte e operações de armazenamento) podem causar acidentalmente derramamentos e contaminações de solos, rios e outros, sendo necessário recorrer a estudos e pesquisas de técnicas relacionadas à remediação de sítios contaminados (ANDRADE et al., 2010).

A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença de uma população capaz de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação. Não existem, na biosfera atual, rotas enzimáticas catabólicas capazes de degradar todos os compostos novos que a cultura humana sintetizou durante os últimos 100 anos. Alguns xenobióticos podem ser biodegradados por micro-organismos que possuam enzimas capazes de catabolizar moléculas específicas, ou mesmo pela ação conjunta de consórcios microbianos, em que cada micro-organismo atua individualmente sobre diferentes etapas do processo de biodegradação (GAYLARDE et al., 2005).

A maior parte dos compostos de petróleo (de 60% a 90%) é biodegradável. Entretanto, o restante (de 10% a 40%), em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. Mesmo tratando-se de uma porção menor, deve-se ressaltar que isto representa toneladas de poluentes impactando ecossistemas e sendo bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O destino destes compostos, após um derrame, irá depender da interação, entre vários fatores, podendo se destacar a degradação microbiana (CRAPEZ et al., 2002).

Isso demonstra a importância de recorrer a técnicas ou estudos que ofereçam subsídios para a montagem de operações de remediação dos danos causados, com menor custo e menor dano ambiental, uma vez que estamos lidando com organismos fundamentais para o perfeito funcionamento dos ecossistemas aquáticos e terrestres, pois

alguns micro-organismos possuem características peculiares para degradar componentes do petróleo.

A utilização de técnicas moleculares também vem caracterizando a diversidade microbiana nos últimos anos, mas a avaliação das características culturais é o primeiro passo na identificação de novos grupos taxonômicos de micro-organismos.

Muitas espécies de bactérias, isoladas do solo, da água do mar, de sedimentos marinhos e de áreas contaminadas por óleos, vêm sendo estudadas para aplicações ambientais como a biorremediação, dispersão de efluentes oleosos, otimização da recuperação de óleos e transferência de óleo cru, pois são produtoras de compostos conhecidos como biossurfactantes. Estes compostos exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e consistem em produtos metabólicos de micro-organismos, podendo substituir os surfactantes sintéticos no futuro, especialmente em indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica bem como, produtos de limpeza industriais, produtos químicos agroindustriais e em processos de biorremediação, já que são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e apresentam estabilidade em valores extremos de pH, temperatura e salinidade (PINTO et al.,2009).

A produção de biossurfactantes é importante na aplicação de um processo de biorremediação, por apresentarem diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos. É imprescindível a escolha dos micro-organismos a serem utilizados nesse processo, uma vez que estamos lidando com ecossistemas de grande biodiversidade e dependentes de estratégias de descontaminação que não prejudiquem a sua dinâmica.

Estudos sobre o isolamento e caracterização morfológica de rizóbio têm importância para selecionar bactérias eficientes na fixação de N_2 , e os princípios básicos que devem orientar a seleção de estirpes de rizóbios com propósito prático de inoculação em leguminosas tem sido objeto de muitos estudos (HARA; OLIVEIRA, 2005). Torna-se fundamental também a realização de estudos desses micro-organismos para verificar se possuem capacidade de degradar compostos de petróleo existentes em áreas contaminadas por esse poluente, pois podem tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados, uma vez que não são patogênicos às plantas e/ou animais, inclusive ao homem. Portanto, a realização desse projeto objetivou testar isolados de rizóbios na degradação de petróleo ou suas frações, pois a utilização destes é fundamental no manejo agrícola sustentável na Amazônia, fixam nitrogênio e solubilizam fosfatos pouco solúveis do solo promovendo o crescimento das plantas.

2. OBJETIVO

2.1. GERAL

Avaliar a capacidade de isolados de rizóbios em degradar petróleo.

2.2. ESPECÍFICOS

Testar a capacidade de isolados de rizóbios em degradar petróleo e seus derivados, testando a eficiência destes, como forma de indicar os mais aptos para serem utilizados no processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo;

Averiguar o potencial de isolados de rizóbios quanto à produção de biossurfactantes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Petróleo, caráter físico-químico e impactos causados pela deposição de seus compostos no meio ambiente

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos formados por átomos de carbono e hidrogênio, além de pequenas quantidades de enxofre, nitrogênio e oxigênio em proporções variáveis (KOLESNIKOVAS et al., 2009). Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser agrupados em quatro classes principais, baseadas na composição molecular: aromáticos, alcanos, alcenos e cicloalcanos (API, 1999). Não sendo uma substância pura, mas antes uma mistura de diversas substâncias, o petróleo não tem fórmula, mas sim uma composição química que pode variar, dependendo da sua origem. Da sua composição, pode ser classificado como leve, médio ou pesado, onde os principais produtos da sua destilação são: gás natural, éter de petróleo, benzina, nafta, gasolina, querosene, óleo diesel e óleos lubrificantes (Tabela 1). Quanto maior a cadeia carbônica do hidrocarboneto, maior será a temperatura na qual ele irá destilar (FARIAS, 2008).

Tabela 1 – Principais produtos resultantes da destilação do petróleo (Farias, 2008)

Faixa de temperatura °C	Produto	N ^o de átomos de carbono na molécula
Abaixo da temperatura ambiente	Gás Natural	C ₁ -C ₄
20-60	Éter de Petróleo	C ₅ -C ₆
60-90	Benzina	C ₇ -C ₈
90-120	Nafta	C ₈ -C ₉
40-200	Gasolina	C ₆ -C ₁₂
150-300	Querosene	C ₁₂ -C ₁₈
250-300	Óleo Diesel (gasóleo)	Acima de C ₁₈
300-400	Óleos Lubrificantes	Não destilam à pressão ambiente.

Obs. As faixas de temperatura e composições mostradas são apenas aproximações, com as temperaturas e composições específicas para uma determinada destilação dependendo na composição do petróleo empregado, bem como da pressão utilizada.

Então, o petróleo é constituído por uma mistura complexa de substâncias inorgânicas e orgânicas, extremamente influenciadas por condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente em que ele foi formado. Dentre as substâncias mais comuns encontramos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs); São gerados naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de substâncias orgânicas,

como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica, etc. Porém, a contaminação do solo é um típico efeito da atividade antropogênica, devido à produção industrial dos HAPs (para fabricação de corantes, de fibras sintéticas, de preservantes de madeira, etc), à produção de carvão vegetal, à extração e gaseificação do carvão mineral e aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (BANFORTH; SINGLETON, 2005). São carcinogênicos e tendem a se acumular em moléculas lipofílicas, bem como interagir com constituintes hidrofóbicos da membrana celular, provocando a perda da integridade e o caráter de barreira seletiva da membrana plasmática, podendo acarretar disfunções variadas (CRAPEZ et al., 2002). Andrade et al. (2004) mostraram que os compostos que exigem maior preocupação ambiental e que, normalmente, são os principais a serem identificados e quantificados antes e durante um processo de remediação são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos. Contudo pode-se observar que a inúmera quantidade de substâncias poluentes e cancerígenas presentes no petróleo e seus derivados merecem a atenção por parte das autoridades dos órgãos ambientais e de saúde.

Com o desenvolvimento das cidades, aumentaram-se os estoques de petróleo, bem como o seu transporte mundial, sendo potencial o risco de acidentes envolvendo derrames de óleo no meio ambiente (HARAYAMA et al., 1999; PEREIRA et al., 2009; BASTOS; FREITAS, 2010; SANTOS et al., 2011). A poluição causada por hidrocarbonetos constitui séria preocupação ambiental e de saúde, merecendo maior investimento em tecnologias compatíveis para sua remediação e os maiores problemas são os danos ambientais causados por derrames acidentais e descarga de petróleo ou de resíduos oleosos intencionalmente descartados (LAI et al., 2009). A crescente atividade industrial nos dias de hoje traz consigo alguns riscos para o meio ambiente. Normalmente as contaminações de solos e do ambiente hídrico por hidrocarbonetos ocorrem desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo, com a produção de gases poluentes. Tais acidentes têm um grande efeito sobre as propriedades do ambiente contaminado. Martins (2007) destaca a relevância dos efeitos e impacto ambiental das “marés negras” (acidentes ambientais que resultam em grandes quantidades de derramamento de petróleo) ocorridas no mundo, destacando-se o nome do navio, a nacionalidade, o acidente e o derrame:

- 1967 - navio liberiano “TORREY CÂNION”, encalhe na costa da Grã-Bretanha - derramamento de 123 mil toneladas de petróleo.
- 1989 – Navio “EXXON VALDEZ”, acidente: colisão e derrame de 41 mil toneladas. no Alasca (EUA).

- 1978 - petroleiro liberiano “AMOCO CADIZ” – colisão, encalhe e naufrágio próximo das costas da Bretanha, derramando 230 mil toneladas de crude.
- 1992 - petroleiro cipriota “HAVEN” - explosão no Mediterrâneo e derrame de 144 mil toneladas de petróleo.
- 1996 - petroleiro liberiano “SEA EMPRESS” – encalhe – derrame de cerca de 70 mil toneladas de petróleo nas costas do País de Gales.
- 1999 - petroleiro “ERIKKA”, de bandeira maltesa, partiu-se em dois quando navegava a 40 milhas das costas da Bretanha, a noroeste da França, derramando mais de 20 000 toneladas de petróleo bruto, poluindo mais de 400 quilômetros da costa.
- 2002 - petroleiro “PRESTIGE”, de bandeira liberiana, partiu-se em dois vazando aproximadamente 20 mil toneladas de petróleo na Espanha.

Em 2013, uma balsa que transportava 4 tanques com CAPCM20 (produto derivado do petróleo usado para a produção de massa asfáltica) virou porque houve um desequilíbrio de massa no convés com a retirada do produto de um dos tanques para carregamento de um caminhão. A balsa virou ao ficar leve com o descarregamento e um dos tanques caiu no rio Negro, em Manaus – AM, derramando o produto. O vazamento foi calculado em 15 mil litros. A responsável foi a empresa Chehuan (AMAZÔNIA NA REDE, 2013).

Em busca de soluções para estes problemas, inúmeras técnicas vêm sendo desenvolvidas para sanar esses danos causados por esse poluente, que tem sido um dos principais problemas ao meio, principalmente os tóxicos e o processo biológico de biorremediação é uma importante ferramenta biotecnológica aplicável na descontaminação ou atenuação dos impactos causados por compostos xenobióticos nos diferentes ecossistemas, tornando-se assim, uma alternativa adequada e eficaz no tratamento de ambientes contaminados.

3.2. Biorremediação de Ambientes impactados por petróleo

A biorremediação é definida como a transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-los inofensivos: Pode envolver o emprego de micro-organismos inerentes ao produto contaminante e ao meio ambiente, ou ainda pode lançar mão de micro-organismos exógenos (BENNET; FAISON, 1997). É um processo ou estratégia

versátil que consiste no uso de enzimas e/ou de micro-organismos naturais (bactérias, fungos e leveduras), capazes de degradar substâncias em solos ou outros ambientes contaminados. Estes micro-organismos, muitas vezes, são considerados nocivos para os seres humanos. Para que seja implantada a biorremediação em determinada área afetada por contaminantes, tem que haver definições para que seja implantado todo o processo (Figura 1). A biorremediação utiliza, para a descontaminação dos locais, micro-organismos autóctones ou alóctones, podendo ser realizada através de bioaumentação, bioestimulação ou atenuação natural monitorada (ANDRADE et al., 2010). O emprego de micro-organismos na remediação de ambientes impactados requer mecanismos para estimular e desenvolver a atividade microbiana na degradação de compostos de petróleo.

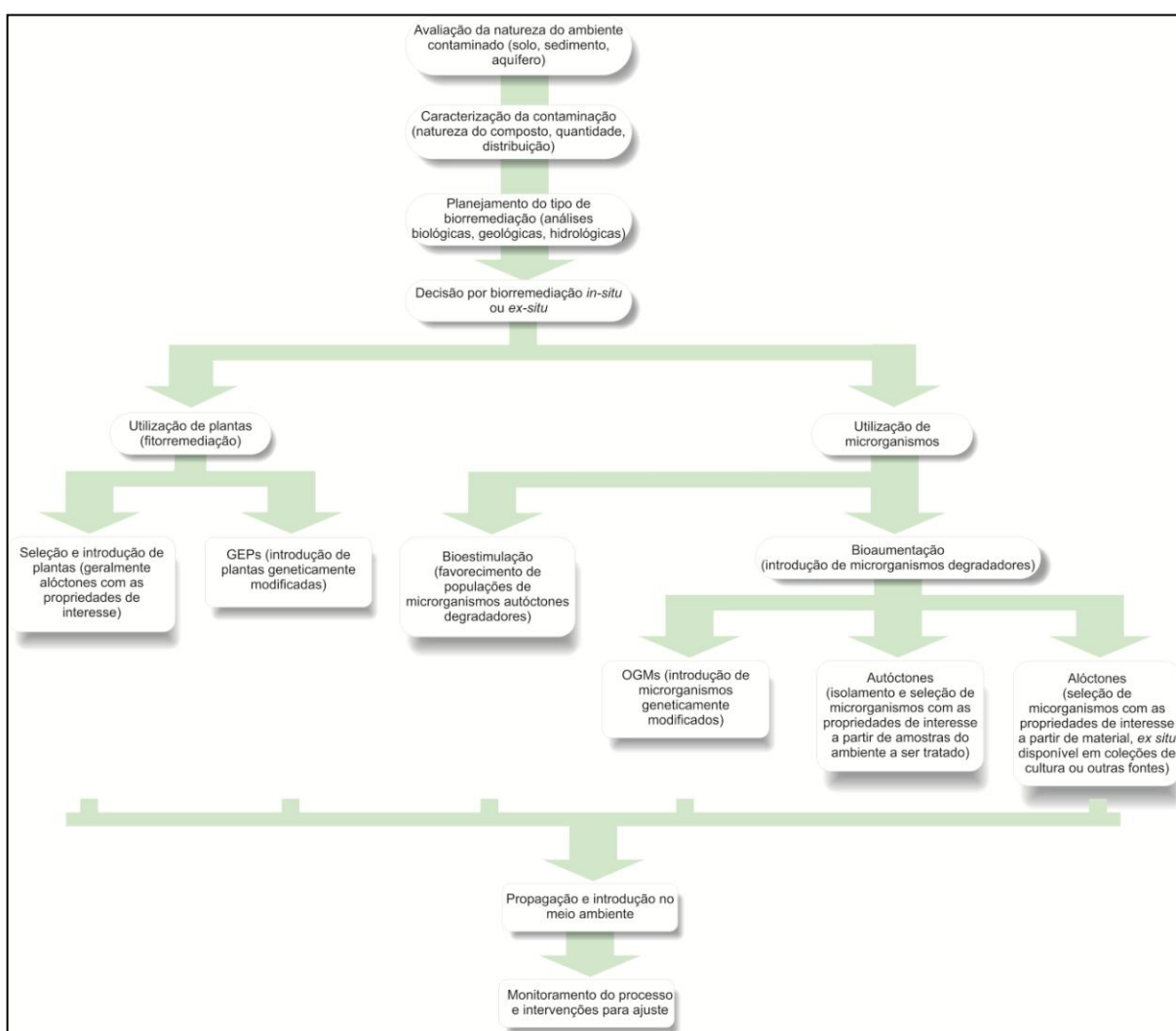


Figura 1 – Esquema geral das etapas para definição e implementação de um processo de biorremediação (Adaptado de Gaylarde, 2005)

Gaylarde et al. (2005) citaram que a implementação de um processo de remediação em um ambiente contaminado requer a condução de um estudo detalhado, com uma visão

interdisciplinar, envolvendo profissionais de diferentes áreas de conhecimento, como microbiologia, bioquímica, biologia molecular, química orgânica e analítica e engenharia, sendo necessário um conhecimento aprofundado das características químicas da molécula xenobiótica que se pretende eliminar, uma vez que a estrutura química influencia vários aspectos do metabolismo biológico. Afirmaram ainda que a extraordinária diversidade metabólica se deve à combinação do potencial genético individual das diferentes espécies microbiana em um sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos, e a capacidade de metabolismo integrado apresentada pela comunidade microbiana em conjunto: produtos do metabolismo de um micro-organismo pode ser substrato para outros.

Portanto, a biorremediação é uma técnica de despoluição que acelera o processo natural de biodegradação de determinadas substâncias no meio ambiente (ADAMASSU; KORUS, 1996). Observa-se com muita preocupação, os casos de contaminação do solo e água por hidrocarbonetos derivados de petróleo, que mesmo em pequenas concentrações, podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente (SOUZA et al., 2010).

O petróleo pode ser utilizado por diversos micro-organismos como fonte de carbono e energia, onde uma grande quantidade de substratos e metabólitos presentes em solos impactados por hidrocarbonetos fornece condições para o desenvolvimento de uma complexa comunidade microbiana. Ecologicamente, micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos são amplamente distribuídos e as dificuldades encontradas para caracterizar comunidades microbianas de ambientes impactados por hidrocarbonetos do petróleo são agravadas pela grande quantidade de substratos específicos e interações metabólicas possíveis (WETLER-TONINI et al., 2011). Tais micro-organismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes e são capazes de degradar a maioria desses compostos para suprir as suas necessidades energéticas e de crescimento. Isso acontece devido ao fato do petróleo bruto ou derivado consistir de diferentes classes de hidrocarbonetos, propiciando o crescimento de vários grupos bacterianos, especializados em diferentes compostos e algumas populações bacterianas ao entrar em contato com o petróleo derramado sofrem um processo de adaptação, reconhecendo seus componentes como fonte de carbono e energia iniciando assim o processo de degradação. Desse modo, a biorremediação baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de micro-organismos presentes ou adicionados no local de contaminação

(BERNOTH et al., 2000). Neste caso, os tratamentos são basicamente de dois tipos: 1) *ex-situ* (ou *off-site*), realizado fora do local onde ocorreu a contaminação e, por isso, é um tratamento que requer a escavação e a remoção do solo contaminado para outro local. A adoção deste procedimento pode resultar em um aumento considerável do custo do processo, porém, não obstante a essa desvantagem, é possível controlar, com maior facilidade, as condicionantes do meio (vide o item "Fatores que influenciam a biodegradabilidade dos contaminantes"), que são consideradas os fatores-chave utilizados no tratamento dos solos; 2) *in-situ* (ou *on-site*), tratamento feito no próprio local da contaminação. Normalmente, essa opção de biorremediação torna o processo mais atrativo e economicamente viável, quando comparado ao tratamento citado anteriormente. Além disso, o tratamento *in-situ*, normalmente, acarreta em menores impactos ambientais advindos da remediação da área contaminada (NANO et al., 2003).

A grande motivação de todas as pesquisas em estudos de biodegradação é, sem dúvida, a busca de microorganismos versáteis capazes de degradarem, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes, a baixo custo operacional, utilizando microorganismos que não prejudiquem a vida existente nas áreas contaminadas.

Genericamente, os micro-organismos nativos da subsuperfície podem desenvolver a capacidade de degradar contaminantes após longo período de exposição. Normalmente, estes seres microscópicos se adaptam em baixas concentrações de contaminantes e se localizam nas regiões externas à pluma de contaminação e, muito dificilmente, estarão presentes na fase livre (fase orgânica concentrada). Os compostos orgânicos são metabolizados por fermentação, respiração ou co-metabolismo (CETESB, 2004). Um dos fatores primordiais para ocorrer biodegradação é a presença de aceptores de elétrons e nutrientes adequados para manter ativos micro-organismos de diferentes espécies. Portanto, o processo de biorremediação pode ser aeróbico ou anaeróbico, requerendo oxigênio ou hidrogênio, respectivamente. Na maioria dos locais, a subsuperfície é carente dessas espécies (oxigênio ou hidrogênio), o que impede os microorganismos de se reproduzirem e degradarem completamente o contaminante alvo. Além desses dois processos, a biorremediação também pode ocorrer de forma co-metabólica (VIDALI, 2001). A "biorremediação co-metabólica" é aquela na qual a degradação ocorre pela ação de enzimas produzidas por micro-organismos para outros fins. É uma técnica praticamente idêntica às anteriores, sendo que, do ponto de vista bioquímico, rege o princípio das reações de óxido-redução. No caso específico do co-metabolismo, caso não haja o substrato principal, ou seja, fontes preferenciais de carbono, a degradação mediada pelos

micro-organismos não ocorre para um dado componente, definido como "contaminante co-metabolizado". Por outro lado, neste caso específico, na presença de uma fonte de carbono, a metabolização do substrato primário poderá gerar enzimas capazes de atuar na degradação do contaminante de interesse (GARNIER et al., 2000).

Os micro-organismos aeróbios necessitam da presença de oxigênio molecular para seu crescimento e para converter os hidrocarbonetos em CO₂, H₂O e biomassa. Já os micro-organismos facultativos podem crescer na presença (aerobiose) ou ausência (anaeróbios, fermentação) de oxigênio (BERTHE-CORTI; FERZNER, 2002; PETERS et al., 2005). A habilidade de utilização dos hidrocarbonetos saturados derivados do petróleo por micro-organismos aeróbios e anaeróbios é descrita por vários autores (HANSON; HANSON, 1996; VAN HAMME et al., 2003; WANG et al., 2006; SAVAGE et al., 2010; CRUZ; MARSAIOLI, 2012;), onde um dos fatores primordiais para ocorrer biodegradação é a presença de aceptores de elétrons e nutrientes adequados para manter ativos micro-organismos de diferentes espécies. Os micro-organismos aeróbios necessitam da presença de oxigênio molecular para seu crescimento e para converter os hidrocarbonetos em CO₂, H₂O e biomassa (Figura 2).

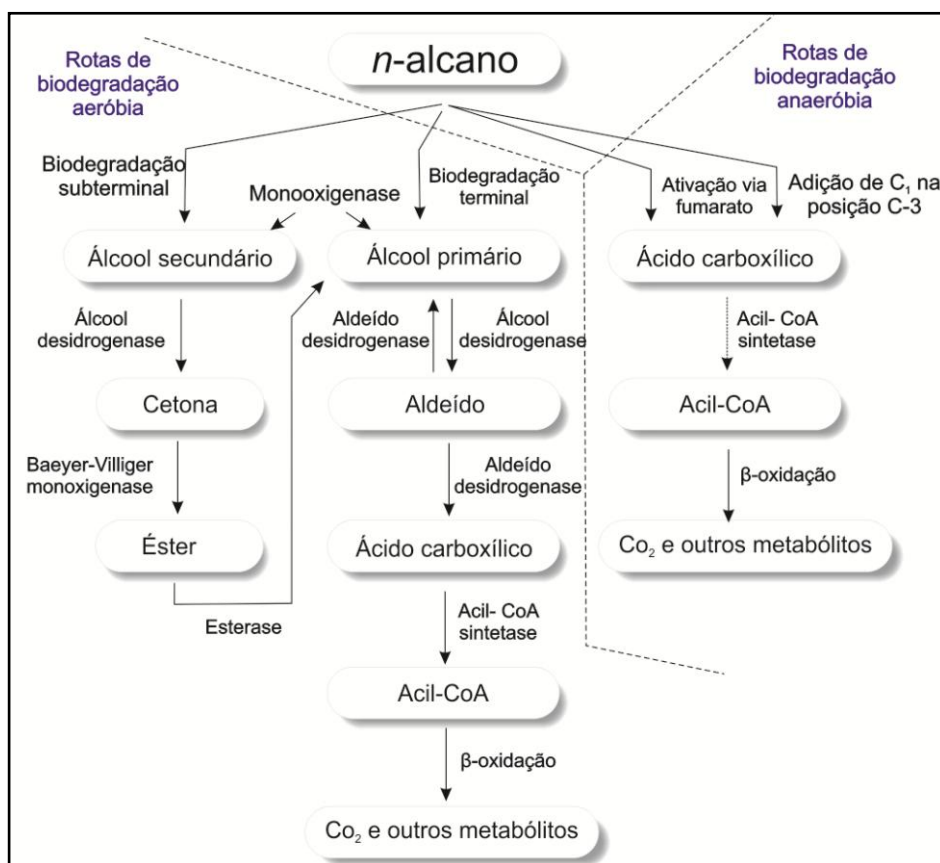


Figura 2 - Rotas de biodegradação de alcanos para micro-organismos aeróbios e anaeróbios (adaptado de WENTZEL et al., 2007).

A principal via metabólica de degradação pode ocorrer na porção terminal e/ou subterminal da cadeia carbônica (Figura 3). Inicia-se com a oxidação do substrato por enzimas oxigenases com a utilização de oxigênio molecular como aceptor de elétrons. A oxidação terminal de um alcano tem início com a formação de um álcool primário. Após a etapa inicial, o álcool é oxidado, por ação das enzimas álcool e aldeído desidrogenases, aos correspondentes aldeído e ácido carboxílico, respectivamente. O ácido carboxílico, por sua vez, é utilizado como substrato para acil-CoA sintetase e é posteriormente biodegradado pelo processo de β -oxidação. A biodegradação subterminal (1° carbono secundário da cadeia do *n*-alcano) gera álcool secundário, cetona e éster. O éster pode ser biotransformado a álcool primário ou diretamente a ácido carboxílico por ação de esterases completando o ciclo até o processo de β -oxidação (KESTER; FOSTER, 1962; RABUS et al., 2001).

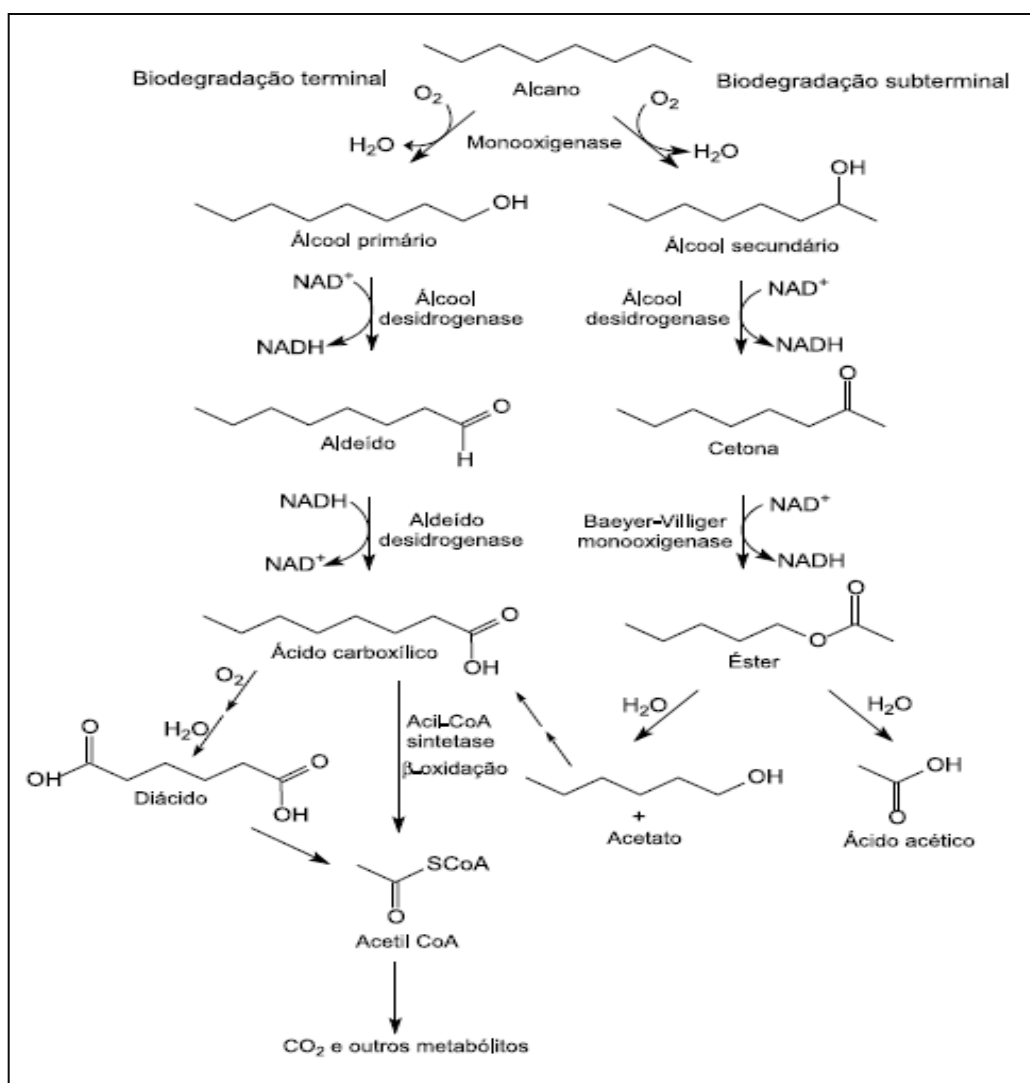


Figura 3 - Rota metabólica de biodegradação de alcanos (adaptado de CRUZ et al., 2012).

Sabe-se que uma variedade alta de micro-organismos tem a capacidade de degradar constituintes do petróleo. Estes podem degradar compostos desde o metano (C1) até compostos mais pesados (C40). Porém nenhum micro-organismo é capaz de degradar completamente todos os componentes do petróleo. Assim sendo, é necessário uma mistura de diferentes espécies em uma cultura para obter uma mineralização eficiente (LEE; LEVY, 1988).

A busca de tecnologias limpas e altamente eficientes, com alto poder de destruição de poluentes e com menor custo possível, vêm se tornando constante, devido, entre outras causas, a existência cada vez mais rigorosas e imposições legais de qualidade de descarte de resíduos (ROCHA, 2010).

Qualquer prática de biorremediação que se baseia em processos de degradação de contaminantes orgânicos, deve ser iniciada com um extenso e cauteloso levantamento hidrogeológico, geoquímico e microbiológico da área contaminada. Dependendo das condições da região, a cinética de biodegradação dos compostos será mais rápida ou mais lenta. As condicionantes do meio, devidamente estudadas, vão nortear não apenas a melhor técnica de extração ou eliminação de contaminantes, como também a possibilidade de biodegradação dos poluentes.

3.3. Produção de Biossurfactantes

Os biossurfactantes constituem uma classe de surfactantes naturais produzidos por micro-organismos, sendo classificados de acordo com sua composição química ou origem microbiológica. As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (TAMBOURGI et al., 2008). Apresentam a capacidade de emulsificar misturas de hidrocarbonetos em água. Isto pode ser demonstrado através do aumento significativo da degradação dos hidrocarbonetos presentes no meio, o que torna sua utilização em processos de biorremediação de solos e mananciais contaminados muito freqüente. Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes reduzirem a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo de compostos insolúveis em superfícies, influenciando as ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas-hidrofóbicas. Isto faz com que a área superficial aumente, proporcionando uma maior biodisponibilidade e conseqüente aumento da biodegradabilidade (CASTIGLIONI et al., 2009). Os biossurfactantes são mais eficazes e eficientes do que os surfactantes sintéticos existentes, e apresentam propriedades que estes não possuem, tais como a maior seletividade e atividade específica sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade. A sua utilização em uma variedade de aplicações devido a suas propriedades e grande

versatilidade somada à crescente importância da aceitabilidade ambiental devido a sua biodegradabilidade e ausência de toxicidade tem aumentado a sua demanda. No entanto, sua entrada no mercado em larga escala ainda está limitada, devido ao seu alto custo de produção quando comparados aos sintéticos (MARQUEZ et al., 2009). Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos podem ser obtidos utilizando-se procedimentos relativamente simples e substratos baratos, através de processos de fermentação. Açúcares e óleos são fontes de carbono adequadas para a obtenção de tensoativos ecologicamente seguros (BUENO et al., 2010)

Selecionar bactérias com potencial para produção de biossurfactante, baseando-se na redução da tensão superficial e aumento da atividade emulsificante, contribui com o processo de biorremediação e demonstra habilidades desses micro-organismos para remover e degradar petróleo, por meio da produção de agente surfactante, sugerindo uma possibilidade futura de aplicação nos processos de contaminantes hidrofóbicos como o petróleo, indicando com isso uma alternativa promissora em processos de biorremediação auxiliando na redução da concentração e toxicidade dos vários componentes do petróleo derramado.

3.4. Micro-organismos de Solo

O solo pode ser considerado um material mineral e orgânico não consolidado na superfície imediata da Terra. Sendo assim, ele serve como meio natural para o crescimento das plantas terrestres. O solo representa não somente um agregado de água, ar, matérias orgânicas e minerais, mas também um conjunto de fenômenos naturais organizados que proporcionam um equilíbrio dinâmico (CALVET, 2003).

Os solos possuem, naturalmente, diversos micro-organismos com atividades metabólicas variadas e que são capazes de degradar eficientemente diferentes contaminantes, como o petróleo e seus derivados. Contudo, em alguns casos, a contaminação de solos por estas substâncias tem se tornado uma problemática mundial, principalmente, devido à dificuldade de reabilitar a área contaminada. Estes problemas têm ocorrido, pois uma das principais dificuldades envolvendo a descontaminação dessas matrizes está relacionada, entre outros fatores, à presença de materiais argilominerais. Estes argilominerais, quando presentes em quantidades elevadas no solo contaminado, podem reduzir consideravelmente a eficiência do processo de biorremediação. Os solos argilosos, de modo geral, apresentam baixa permeabilidade, o que pode comprometer significativamente tanto a difusão de oxigênio, que é elemento fundamental para o

processo aeróbico de degradação, bem como a incorporação de nutrientes. É evidente que a estrutura dos solos também exerce influências significativas sobre as características físico-químicas. Dependendo da estrutura, mesmo que os solos sejam argilosos, eles podem ter permeabilidades elevadas. Os latossolos argilosos, por exemplo, que ocupam extensas áreas no Brasil, apresentam, comumente estrutura granular e, desta forma, elevada permeabilidade (ANDRADE et al., 2010).

Os micro-organismos são os mais numerosos da fração biológica do solo e estão sujeitos a alterações em sua abundância e nas relações metabólicas em função de mudanças ambientais, como o aporte de poluentes ao solo (BARROS et al., 2010).

A Resolução Conama 420/2009 dispõe sobre os critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disciplina, ainda, que se comprovada a ocorrência de concentrações naturais de substâncias químicas que possam causar risco à saúde humana, os órgãos competentes deverão desenvolver ações específicas para a proteção da população exposta. Define princípios básicos de gerenciamento de áreas contaminadas, e estabelece que o órgão ambiental competente deverá instituir procedimentos e ações de investigação e de gestão, que contemplem as etapas de identificação, diagnóstico e intervenção da área contaminada.

Isso mostra claramente a importância de se verificar os prejuízos causados em caso de acidentes envolvendo substâncias químicas ou qualquer poluente, fazendo um planejamento da forma mais eficaz para remediar os danos ou parte destes causados ao meio ambiente, levando em consideração a biodegradabilidade do poluente e se a microbiota existente no próprio solo contaminado será suficiente para reparar ou amenizar os danos causados.

3.5. Rizóbio

Nos últimos tempos, a demanda por micro-organismos degradadores de compostos de petróleo tem aumentado, levando com isso a um crescente aumento nos estudos de micro-organismos capazes ou com potencial para serem utilizados na degradação desses poluentes. É importante o reconhecimento da diversidade de micro-organismos existente em diferentes ecossistemas e sua ação metabólica para cada composto específico, uma vez que um só micro-organismo isolado pode não ter a capacidade de degradar todos os componentes do petróleo.

Apesar de vários trabalhos com diversas espécies de micro-organismos degradadores, existe a necessidade de maior conhecimento dos potenciais existentes de bactérias indutoras de nódulos, genericamente chamadas de rizóbios. Estes micro-organismos são bactérias Gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao filo alpha-Proteobactéria, os quais são genericamente identificados como rizóbio (ZAKHIA; LAUJUDIE, 2001). Estas bactérias apresentam grande capacidade simbiótica e fixadora de nitrogênio e são eficientes na produção de biopolímeros que apresentam aplicação na agricultura como inoculante. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo bioquímico natural e essencial, realizado por bactérias que possuem a enzima nitrogenase. Estes organismos são encontrados em vários ambientes, vivendo livremente, associados ou em simbiose com outros seres vivos. As bactérias fixadoras de nitrogênio possuem um papel ecológico importante, atuando na conversão do nitrogênio atmosférico (N_2), não utilizável pelas plantas e por outros grupos de organismos, em amônia (NH_4^+), forma utilizável por estes (SOUZA; MOREIRA, 2011).

Segundo Kuykendall e Dazzo (2005), Chen et al. (2005), Kuykendall et al. (2005), a ordem Rhizobiales é classificada em dez famílias: Aurantimonadaceae, Bartonellaceae, Beijerinckiaceae, Bradirhizobiaceae, Brucellaceae, Hypomicrobiaceae, Methylobacteriaceae, Methylocystaceae, Phyllobacteraceae, Rhizobiaceae. Nesta última, encontram os seguintes gêneros: *Agrobacterium* (SETUBAL, 2009), *Allorhizobium* (SESSITSCH et al., 2002), *Carbophilus* (EUZÉBY e KUDO, 2001), *Chelatobacter* (KAMPFER et al., 2002), *Kaistia* (WEON et al., 2008), *Rhizobium* (SAWADA et al., 2003), *Sinorhizobium/Ensifer* (MARTENS et al., 2008), *Candidatus* (DE VOS et al., 2005).

Estudos aliando métodos clássicos e moleculares de taxonomia bacteriana podem auxiliar na compreensão da diversidade de rizóbios associados às leguminosas tropicais, além de revelar o potencial biotecnológico desses isolados (FERNANDES JÚNIOR et al., 2010, 2011). Chagas Junior et al., 2010 realizaram a caracterização fenotípica de rizóbio nativos de solos da Amazônia, e, descreveram que tais micro-organismos contribuíram de forma significativa para o aumento da biomassa, nodulação e eficiência de feijão caupi. Desta maneira, inúmeros trabalhos tem sido feitos estudando a capacidade simbiótica entre rizóbios e leguminosas (CHAGAS JUNIOR et al., 2010; SOUZA et al., 1994; HARA; OLIVEIRA., 2004; HAWERROTH et al., 2011).

A avaliação das populações de rizóbio é facilitada com a utilização de plantas iscas e isolamento dos nódulos formados. Além disso, as características morfológicas de

rizóbios fornecem informações importantes para a identificação e agrupamento de estirpes. Assim, avaliar o tempo de crescimento, reação de pH, consistência do muco produzido, características das colônias formadas, são características importantes no agrupamento destes isolados (CHAGAS JUNIOR, 2007).

Rizóbios fazem parte da população microbiana do solo, tornando-se necessário um estudo mais aprofundado e testes para detectar ou selecionar estirpes ou um consórcio de micro-organismos (do gênero *Rhizobium*) de grande valor econômico para serem utilizados como inoculantes, visto que são adaptados ao ambiente local, bem como podem mostrar maiores eficiências, habilidade competitiva e tolerância às condições de estresses e capacidade de degradar compostos de petróleo em laboratório ou em cada ambiente, ou que possam utilizar os intermediários obtidos na degradação incompleta, visando assim, reduzir o tempo de degradação desses resíduos.

Alguns trabalhos foram realizados utilizando isolados de rizóbios na degradação de compostos de petróleo (LINDSTRÖM et al., 2003; POONTHRIGPUN et al., 2006; COELHO et al., 2010; WEN et al., 2011).

Wey et al. (2008) realizaram uma caracterização da degradação de fenol e verificou que o isolado CCNWTB701, que pertencia ao gênero *Rhizobium* degradou cerca de 99,5 e 78,3%, com uma concentração inicial de 900 e 1000 mg / l de fenol em 62 e 66 h. A grande motivação de pesquisas e estudos de biodegradação é, sem dúvida, a busca de micro-organismos versáteis capazes de degradar, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional, utilizando micro-organismos que não prejudiquem a vida existente nas áreas contaminadas. O Gênero *Rhizobium* apresenta características adequadas para ser utilizado num processo de biorremediação, pois além de apresentar todas as características citadas, é um gênero de micro-organismo que não possui patogenicidade, não prejudicando assim o homem, a fauna e a flora existentes no meio ambiente.

CAPÍTULO I

Análise da biodegradabilidade de petróleo por isolados de rizóbios.

Análise da biodegradabilidade de petróleo por isolados de rizóbios.

Palavras-chave: Rizóbios, Biodegradação, Petróleo

Resumo

A Biorremediação é definida como o processo que emprega micro-organismos ou suas enzimas para destoxificar contaminantes no solo ou em outros ambientes. Estirpes de rizóbio fazem parte da população microbiana do solo e seu estudo poderá conduzir à descoberta de estirpes de grande valor econômico para uso em biorremediação de ambientes contaminados com compostos de petróleo. Isto ocorre pelo fato de serem adaptadas ao ambiente local, bem como por mostrar maior eficiência, habilidade competitiva e tolerância às condições de estresse. Este trabalho teve como objetivo testar a capacidade de isolados de rizóbios em degradar petróleo e seus derivados, testando a eficiência destes e indicando os mais aptos para serem utilizados no processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo. Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios, uma vez que dos 120 isolados testados, 36 mostraram capacidade de utilizar o petróleo como fonte de carbono, obtendo um elevado crescimento com a degradação desse composto. Com estes micro-organismos foi realizado o teste do DCPIP, no qual 26 apresentaram descoloração parcial, quase total ou total com seis dias de observação. Esses resultados demonstram que, os rizóbios podem tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos, uma vez que, além de limpar o ambiente contaminado com compostos de petróleo, não são patogênicos, portanto, não causam doenças e danos a flora, fauna e ao homem.

1. INTRODUÇÃO

A Biorremediação é definida como processo que emprega micro-organismos ou suas enzimas para destoxificar contaminantes no solo ou em outros ambientes. Consiste, basicamente, na transformação do contaminante a formas que não oferecem riscos ambientais. A Biorremediação é de simples manutenção, é aplicável em grandes áreas e tem baixo custo (DUARTE, 2012).

Os inúmeros acidentes e vazamentos envolvendo produtos oleosos, principalmente os contendo derivados de petróleo, acabam afetando vários meios naturais, sendo o solo um dos grandes receptores dessa contaminação. Para remediação destas áreas, vários são os processos que podem ser utilizados, mas os processos biológicos se destacam entre os tratamentos mais utilizados, principalmente em relação ao custo e a eficiência, quando comparados a processos físico-químicos (REGINATTO et al., 2011).

A legislação brasileira exige que áreas contaminadas devam ser remediadas, para minimizar a interferência ambiental e restaurar os ecossistemas. Para isto, são necessários o diagnóstico, a análise e o monitoramento do impacto e medidas remediadoras (CETESB, 2010). Os micro-organismos são considerados biodegradadores eficientes devido a abundância, a diversidade de espécies, versatilidade catabólica e anabólica, bem como a sua capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (MORAES; TORNISIELO, 2009).

Para que seja efetivamente alcançada, a degradação biológico de compostos orgânicos, como os derivados do petróleo precisam ser estabelecidas condições ambientais favoráveis (concentração de nutrientes, umidade, pH, temperatura e aeração), além do conhecimento sobre a concentração e o tipo óleo contaminante juntamente com a densidade populacional e o potencial de degradação dos micro-organismos. Esses dados são fundamentais para a otimização do processo de biorremediação. Estirpes de rizóbio fazem parte da população microbiana do solo e seu estudo pode conduzir à descoberta de estirpes de grande valor econômico para serem usadas na biorremediação de ambientes contaminados com compostos de petróleo, visto que são adaptadas ao ambiente local, bem como podem mostrar maior eficiência, habilidade competitiva e tolerância às condições de estresse. Portanto, este trabalho tem como objetivo testar a capacidade de isolados de rizóbios em degradar petróleo e seus derivados, testando a eficiência enzimática destes, como forma de indicar os mais aptos para serem utilizados no processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de nódulos para obtenção de rizóbios

Para iniciar as atividades práticas desse trabalho foram realizadas coletas de nódulos presentes nas raízes de plantas leguminosas, para a obtenção de rizóbios, conforme locais descritos (Tabela 1).

Após a obtenção dos nódulos, o trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Solos do INPA, Manaus, AM onde foram isoladas as estirpes de rizóbios usando a metodologia descrita por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985). Os nódulos foram lavados com etanol (92% por 3 minutos), seguindo uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (4 minutos) e dez lavagens com água estéril.

Em seguida os nódulos foram pressionados com uma pinça e feita as riscagens em placas de Petri contendo meio YMA (yeast manitol agar) (VINCENT, 1970). Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28°C até o crescimento de colônias de bactérias e então foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio e novamente incubadas até o novo crescimento bacteriano. Os isolados obtidos por último foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio YMA (Tabela 2), inclinado, segundo descrito por Vincent (1970) e Somasegaran; Hoben (1985), sendo esse mesmo procedimento utilizado para os isolados adquiridos da coleção do Laboratório de Microbiologia de solo do INPA.

No total foram isolados 120 rizóbios que foram utilizados para a realização dos testes metodológicos propostos por esse trabalho.

Tabela 1 – Isolamento dos nódulos e seus respectivos locais de coleta.

Rizóbio	Local (L)	Planta
INPA R546, INPA R547, INPA R548, INPA R549, INPA R550, INPA R551, INPA R552, INPA R553, INPA R554, INPA R555, INPA R556, INPA R557, INPA R558, INPA R559	Ramal do Caldeirão, Terra firme, km 3 S 3 ^o 12' 26" W 60 ^o 12' 2,5"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R560, INPA R561, INPA R562, INPA R563, INPA R564, INPA R565, INPA R566, INPA R567, INPA R568, INPA R569, INPA R588, INPA R571, INPA R572, INPA R573,	Ramal do Caldeirão km3 S 3 ^o 13' 41,9" W 60 ^o 13' 27,8"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)

Rizóbio	Local (L)	Planta
INPA R574, INPA R575, INPA R576, INPA R577, INPA R578, INPA R579, INPA R580, INPA R581, INPA R582, INPA R583, INPA R584, INPA R585, INPA R586, INPA R587, INPA R588, INPA R589		
INPA R590, INPA R591, INPA R592, INPA R593, INPA R594, INPA R595, INPA R596, INPA R598, INPA R600, INPA R602, INPA R603, INPA R604, INPA R605, INPA R606 INPA R607, INPA R610, INPA R611, INPA R612, INPA R613, INPA R614, INPA R615, INPA R616, INPA R617, INPA R618, INPA R619	Estrada de terra para Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea S 03 ⁰ 15' 21,3" W 060 ⁰ 15' 17,2"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R620, INPA R621, INPA R622, INPA R623, INPA R624, INPA R625, INPA R626, INPA R627, INPA R628, INPA R629, INPA R630, INPA R631, INPA R632, INPA R633, INPA R634, INPA R635, INPA R636	Jandira, propriedade São João S 03 ⁰ 15' 20,0" W 060 ⁰ 15' 33,1"	<i>Vigna unguiculata</i> (Feijão Caupi)
INPA R637, INPA-R639, INPA R640, INPA R642, INPA R643, INPA R644, INPA R645, INPA R646, INPA R647, INPA R648, INPA R649, INPA R650, INPA R651, INPA R652, INPA R653, INPA R654, INPA R655, INPA R656, INPA R657, INPA R659, INPA R660, INPA R661, INPA R662, INPA R663, INPA R664	Ramal do Caldeirão S 03 ⁰ 14' 37" W 60 ⁰ 14' 37,6"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R665, INPA R666	INPA, campus v8 S 03 ⁰ 05' 28,6" W 059 ⁰ 59' 36,7"	<i>Swartzia polyphylla</i> (Arabá)
INPA R667, INPA R668, INPA R669, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R676, INPA R677	Viveiro de Urucu S 04 ⁰ 53' 15,1" W 065 ⁰ 13' 31,5"	<i>Cedrelinga catenaeformis</i> (Cedrorana)

Tabela 2 - Meio Mineral YMA

Componentes	Quantidade
Mannitol	10,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Ext. Levedura	0,5 g
Ágar	15,0 g
H ₂ O Destilada	1000 mL

2.2 Morfologia das Bactérias

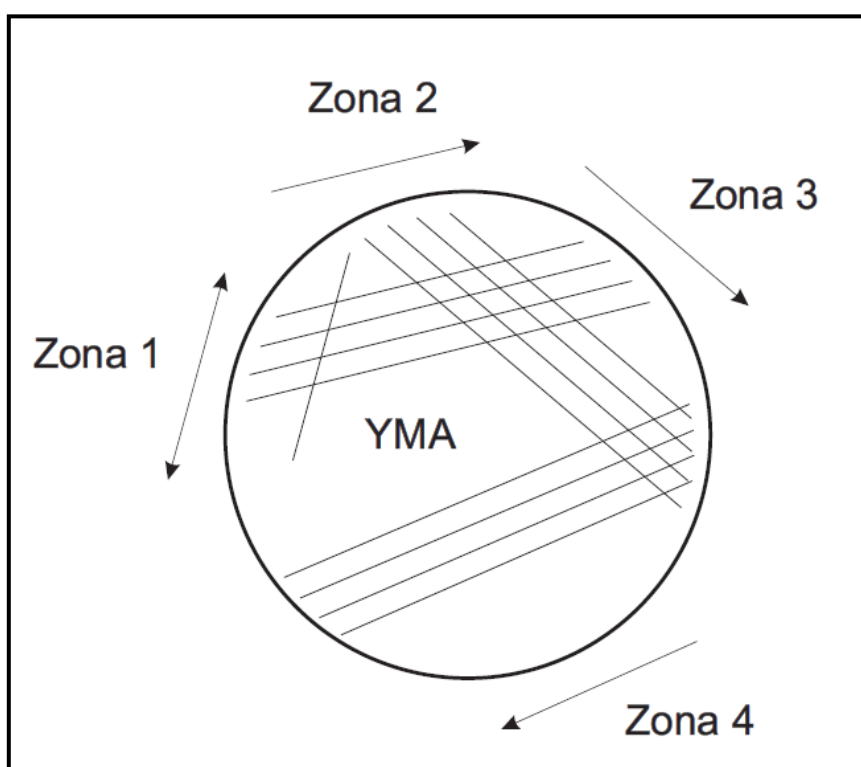
A caracterização morfológica das bactérias foi realizada observando-se as seguintes características, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 – Descrição utilizada para caracterizar morfológicamente bactérias conforme Vincent (1979) e Martins et al. (1997).

Morfologia das Bactérias	Característica
Forma da Colônia	Circular
	Irregular
Borda	Regular
	Irregular
Tranparência	Sim
	Não
Aparência da Colônia	Homogênea
	Heterogênea
Cor da colônia	Branca
	Amarela
Aparência do muco	Homogêneo
	Heterogêneo
Elasticidade do muco	Com
	Sem

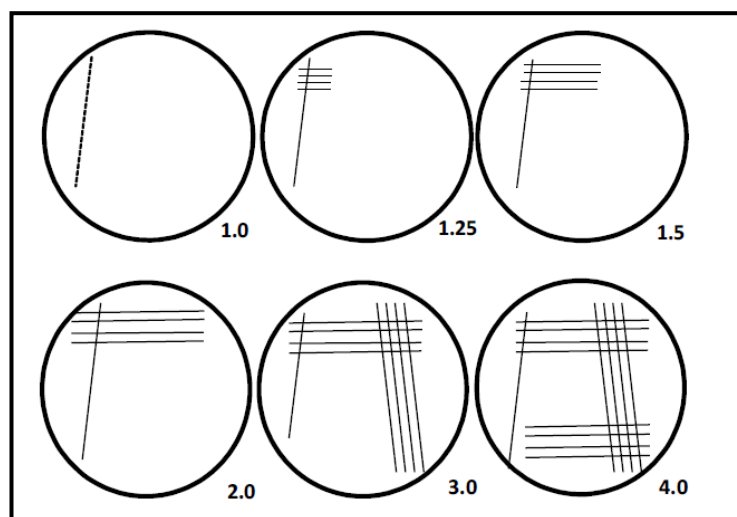
2.3 Teste de degradação de petróleo por isolados de rizóbios, utilizando fontes de carbono distintas

Para avaliar a capacidade de degradação de petróleo e seus derivados e o crescimento bacteriano, foram testados 120 isolados de rizóbios, através do método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999) modificado, realizado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA, onde foi utilizado 0,1 mL de petróleo como fonte de carbono ao invés de manitol. Como controle usou-se o manitol ao invés do petróleo. Esse teste foi realizado em quadriplicata. As avaliações foram feitas a cada três dias, no período de 15 dias, no qual as bactérias foram mantidas em laboratório a uma temperatura de 23 – 28 °C. De acordo com o desenvolvimento das colônias nas quatro zonas da placa (Figura 1), foram dados valores para o crescimento para cada isolado variando de 1 (sem crescimento visível na placa) a 4 (máximo crescimento em todas as zonas), segundo escala em faixa apresentada na Figura 2. Com base no crescimento em placas de Petri, os isolados foram classificados como pouco, moderado ou elevado (Tabela 4). Para fins de seleção, foram escolhidos os isolados que apresentaram nota mínima de 3,06 ao sexto dia de teste.



Fonte: Oliveira e Magalhães (1999)

Figura 1: Ilustração do Método de riscagem para avaliação do crescimento de bactérias.



Fonte: Oliveira e Magalhães (1999)

Figura 2: Valores para crescimento de bactérias.

Tabela 4 – Faixa de pontuação para avaliação do crescimento bacteriano utilizando o meio YMA com manitol e YMA s/ manitol e com petróleo.

Crescimento	Pontuação
Pouco	1,00 - 2,00
Moderado	2,06 – 3,00
Elevado	3,06 – 4,00

Fonte: Oliveira e Magalhães (1999)

2.4 Biodegradação de petróleo em placas de Eliza utilizando meios nutricionais distintos - Teste de indofenol

A avaliação do potencial de degradação de petróleo pelos isolados foi realizada através da técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), segundo Hanson et al. (1993), modificado. O princípio deste teste é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores (como oxigênio e nitrato) e ao incorporar um acceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido) Mariano et al. (2007).

2.4.1 Preparo de micro-organismos para a realização do teste

Esse teste foi realizado através da transferência de 2 mL de suspensão bacteriana contida em placa de petri (Figura 4) para erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio YM líquido, onde ficou em mesa agitadora a 75 rpm a 30 °C por 48 horas e após o

crescimento, houve a contagem de célula em câmara de Newbauer para padronização das bactérias a 10^5 .

2.4.2 Montagem e avaliação do teste

Após a padronização, o ensaio foi realizado em placas de acrílico (Tipo ELISA) com 96 poços, previamente, tratados sob luz ultravioleta (UV) por 30 minutos, contendo 125 μL de meio Mineral INPA (sem fonte de carbono), 100 μL do DCPIP, 5 μL de petróleo (retirado da Base de Operações Geólogo Pedro de Moura BOPM, localizada às margens do rio Urucu, no Município de Coari, Amazonas), 5 μL de manitol e 15 μL de inóculo padronizado.

O experimento teve quatro tratamentos testes e quatro controles:

- A, B, C e D - Quadruplicata contendo Meio Mineral INPA (125 μL), indicador DCPIP (100 μL), petróleo de (5 μL) e 15 μL de inóculo padronizado a 10^5 UFC de isolados de rizóbio/mL;
- E - Controle negativo (abiótico) contendo 125 μL meio mineral INPA, segundo Moura (2012), indicador DCPIP (100 μL) e petróleo (5 μL);
- F - Controle negativo (abiótico) contendo meio mineral INPA (125 μL) e petróleo (5 μL);
- G e H - Controle biótico (sem petróleo) contendo meio mineral INPA (125 μL), indicador DCPIP (100 μL), manitol (5 μL) e 15 μL de inóculo padronizado a 10^5 UFC de isolados de rizóbio/mL;

As placas de acrílico foram incubadas a 30°C e a cada 24 horas por um período de seis dias foi observado o desaparecimento da coloração azul do indicador DCPIP (forma oxidada) para a incolor (forma reduzida). A leitura positiva foi dada com a atribuição de notas após estes tempos, pela descoloração do DCPIP, onde:

Nota 1 – Coloração Total

Nota 2 – Início da Descoloração

Nota 3 – Descoloração Parcial

Nota4 – Descoloração Quase Total

Nota 5 – Descoloração Total.

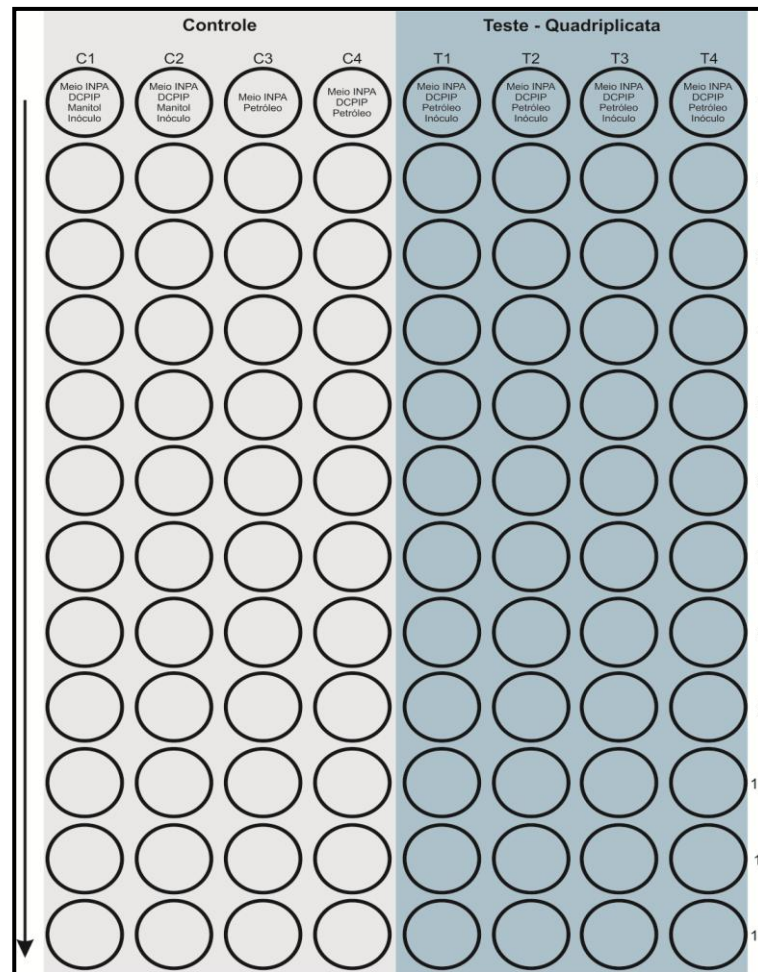


Figura 3 – Montagem do teste de indofenol em placa de Eliza

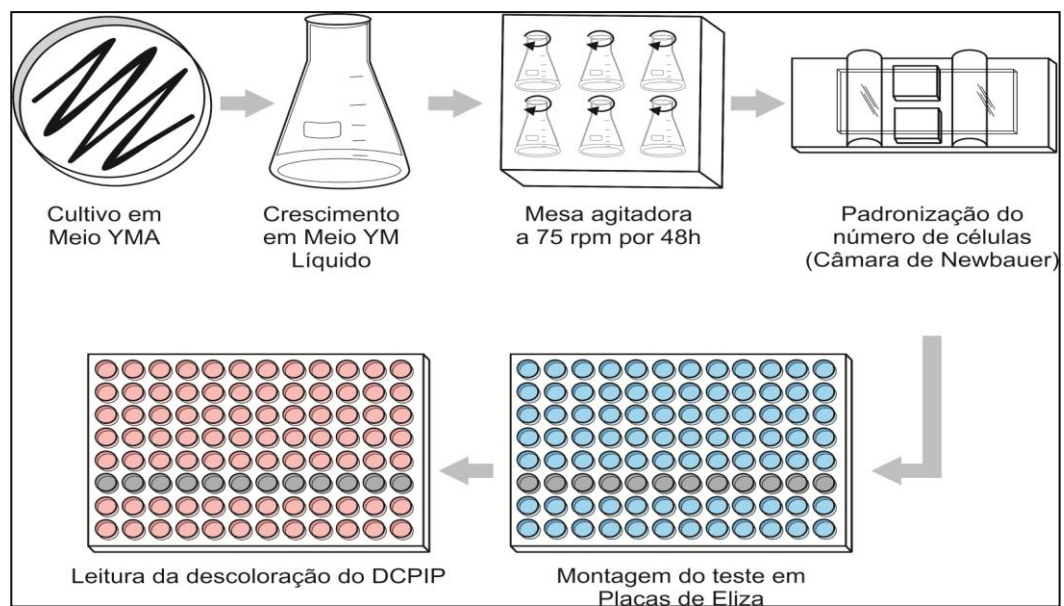


Figura 4 – Esquema ilustrativo do teste de biodegradabilidade utilizando o Indicador redox DCPIP

2.5 Análise estatística

Para as análises feitas para o teste de degradação de petróleo em meio sólido foi utilizado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As notas atribuídas foram mensuradas (variáveis qualitativas), de acordo com a descoloração do DCPIP, sendo realizada por meio da análise da correspondência múltipla e análise de agrupamento, classificação hierárquica direta, onde foram agrupados os rizóbios conforme as classificações morfológicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Morfologias dos Rizóbios

A simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de N₂ atmosférico é amplamente aceita como alternativa à fertilização química. Bactérias do grupo dos rizóbios têm a capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas e possui papel importante na agricultura sustentável. Devido à importância ecológica e econômica dos rizóbios, a diversidade dessas bactérias tem sido investigada extensivamente e a taxonomia rizobiana vem sofrendo mudanças significativas nas últimas três décadas (LIU et al., 2005).

Os 120 rizóbios após serem purificados, foram submetidos à análise morfológica (tabela 5), na qual exibiram as seguintes características: Forma da colônia (20 circulares e 100 irregulares), Borda (75 regulares e 44 irregulares), Transparência (24 sim e 96 não), Aparência da Colônia (20 heterogêneas e 100 homogêneas), Cor da Colônia (7 amarelas e 113 brancas), Aparência do muco (20 heterogêneas e 90 homogêneas) e Elasticidade do Muco (39 com e 81 sem).

Tabela 5 – Morfologia de Estirpes de Rizóbios

<i>Isolados</i>	<i>Forma da colônia</i>	<i>Borda</i>	<i>Transp.⁽¹⁾</i>	<i>Aparência da colônia</i>	<i>Cor da colônia</i>	<i>Aparência do muco</i>	<i>Elasticidade do muco</i>
INPA R546	Circular	Regular	Não	Homog ⁽²⁾	Branca	Homog	Sem
INPA R547	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R548	Irregular	Regular	Não	Heterog ⁽³⁾	Branca	Heterog	Sem
INPA R549	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R550	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R551	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R552	Circular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R553	Circular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R554	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R555	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R556	Irregular	Irregular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R557	Circular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R558	Irregular	Regular	Não	Homog	Amarela	Homog	Sem
INPA R559	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R560	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R561	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R562	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R563	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R564	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem

<i>Isolados</i>	<i>Forma da colônia</i>	<i>Borda</i>	<i>Transp.⁽¹⁾</i>	<i>Aparência da colônia</i>	<i>Cor da colônia</i>	<i>Aparência do muco</i>	<i>Elasticidade do muco</i>
INPA R565	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R566	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R567	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R568	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R569	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R588	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R571	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R572	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R573	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R574	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R575	Irregular	Irregular	Sim	Heterog	Amarela	Heterog	Sem
INPA R576	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R577	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R578	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R579	Irregular	Irregular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R580	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R581	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R582	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R583	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R584	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R585	Irregular	Irregular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R586	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R587	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R588	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R589	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R590	Irregular	Regular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R591	Circular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R592	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R593	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R594	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R596	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R598	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R600	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R602	Irregular	Irregular	Sim	Homog	Amarela	Homog	Sem
INPA R603	Irregular	Regular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R604	Irregular	Regular	Não	Homog	Amarela	Homog	Com
INPA R605	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R606	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R607	Irregular	Irregular	Sim	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R610	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R611	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R612	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R613	Irregular	Irregular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Sem

<i>Isolados</i>	<i>Forma da colônia</i>	<i>Borda</i>	<i>Transp.⁽¹⁾</i>	<i>Aparência da colônia</i>	<i>Cor da colônia</i>	<i>Aparência do muco</i>	<i>Elasticidade do muco</i>
INPA R614	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R615	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R616	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R617	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R618	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R619	Irregular	Irregular	Sim	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R620	Irregular	Irregular	Sim	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R621	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R622	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R623	Circular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R624	Irregular	Irregular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R625	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R626	Irregular	Irregular	Sim	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R627	Circular	Irregular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R628	Irregular	Irregular	Não	Homog	Amarela	Homog	Sem
INPA R629	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R630	Irregular	Irregular	Sim	Heterog	Branca	Heterog	Sem
INPA R631	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R632	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R633	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R634	Irregular	Irregular	Sim	Heterog	Branca	Heterog	Sem
INPA R635	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R636	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R637	Irregular	Irregular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R639	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R640	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R642	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R643	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R644	Irregular	Irregular	Sim	Heterog	Branca	Heterog	Sem
INPA R645	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R646	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R647	Irregular	Regular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R648	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R649	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R650	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R651	Irregular	Regular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Sem
INPA R652	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R653	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R654	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Com
INPA R655	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R656	Irregular	Irregular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Com
INPA R657	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R659	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem

<i>Isolados</i>	<i>Forma da colônia</i>	<i>Borda</i>	<i>Transp.⁽¹⁾</i>	<i>Aparência da colônia</i>	<i>Cor da colônia</i>	<i>Aparência do muco</i>	<i>Elasticidade do muco</i>
INPA R660	Irregular	Irregular	Não	Homog	Amarela	Homog	Sem
INPA R661	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R662	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R663	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R664	Irregular	Regular	Não	Heterog	Amarela	Heterog	Sem
INPA R665	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R666	Irregular	Regular	Sim	Heterog	Branca	Heterog	Sem
INPA R667	Irregular	Irregular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R668	Irregular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R669	Circular	Regular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R672	Circular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R674	Irregular	Irregular	Sim	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R675	Irregular	Irregular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Sem
INPA R676	Irregular	Regular	Não	Homog	Branca	Homog	Sem
INPA R677	Irregular	Irregular	Não	Heterog	Branca	Heterog	Sem

Esses dados corroboram com os resultados de Medeiros et al. (2009) que obtiveram um total de 304 isolados de rizóbio, por meio de nódulos de espécies de *Vigna unguiculata* (Feijão Caupi), em que cerca de 80% dos isolados formaram colônias em até dois dias de crescimento. Estes autores também descreveram a morfologia das colônias e observaram maior variação entre os isolados para as características de quantidade e elasticidade do muco produzido, bem como para tamanho, embora a maior parte tenha apresentado colônias de tamanho classificado como puntiforme. Santos et al. (2007), ao isolarem um total de 433 de rizóbios, de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, também obtiveram resultados satisfatórios quando observaram que 90% dos isolados cresceram em dois dias. Em relação à morfologia, estes concluíram que existe elevada diversidade morfológica da população nativa de rizóbio no semiárido do Rio Grande do Norte.

A avaliação das características culturais e morfológicas é o primeiro passo para a identificação de novos grupos taxonômicos de micro-organismos e é muito útil em laboratórios que não têm acesso a tecnologias mais caras, pois essas avaliações são de baixo custo (JESUS et al., 2005).

3.2 Biodegradação de petróleo em meio sólido

Em ambientes naturais, o carbono é o elemento que normalmente limita o crescimento microbiano, sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em

quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (ALEXANDER, 1999).

A figura 5 e a tabela 6 mostram o crescimento de estirpes de rizóbios com as fontes de carbono manitol (M) e petróleo (P), nos cinco períodos avaliados (3, 6, 9, 12 e 15 dias), testados com os 120 isolados. Alguns micro-organismos já apresentavam notas 3,06 ou acima desta após 24 horas de incubação com a fonte de carbono petróleo (INPA R629, INPA R634, INPA R656, INPA R664, INPA R667, INPA R672 e INPA R674). Outras foram adquirindo essa nota (3,06) de crescimento após alguns dias. A figura 5 comprova esses dados, pois ao terceiro dia de crescimento o INPA R667 apresentou com a fonte de carbono petróleo nota 3,87 e com manitol 3,43. Com isso, foram selecionadas 36 bactérias (INPA R546, INPA R547, INPA R548, INPA R549, INPA R552, INPA R555, INPA R557, INPA R560, INPA R564, INPA R565, INPA R566, INPA R568, INPA R569, INPA R571, INPA R572, INPA R573, INPA R574, INPA R577, INPA R583, INPA R591, INPA R598, INPA R614, INPA R618, INPA R629, INPA R631, INPA R634, INPA R656, INPA R657, INPA R664, INPA R666, INPA R667, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R676, INPA R677), que atingiram notas elevadas (3,06 a 4,00), no sexto dia de crescimento e foram utilizados em testes posteriores, demonstrando com isso, que essas bactérias são potenciais degradadores de hidrocarbonetos. As demais, que não foram selecionadas, mas que apresentaram notas de crescimentos elevados e moderados após o sexto dia, podem ser utilizadas formando consórcios em futuros testes de biodegradação de petróleo ou de suas frações, pois até o 15^o dia apresentaram crescimento significativo tanto com a fonte de carbono manitol, quanto com o petróleo. Comparando as médias gerais nas linhas com relação à fonte de carbono, só não houve diferença no período 9, pois apresentaram resultados similares (M – 2,72 e P – 2,71) e nos outros períodos apresentaram diferença, com o petróleo mostrando médias melhores que o manitol (Período 3 com M – 0,95 e P – 1,44/ Período 6 com M – 2,22 e P – 2,28/ Período 12 com M – 2,95 e P – 3,19/ Período 15 com M – 3,10 e P – 3,31). Isso mostra que os isolados utilizados se adaptaram à fonte de carbono petróleo, tornando-se necessário novos testes para verificar o potencial de degradação de cada rizóbio utilizado.

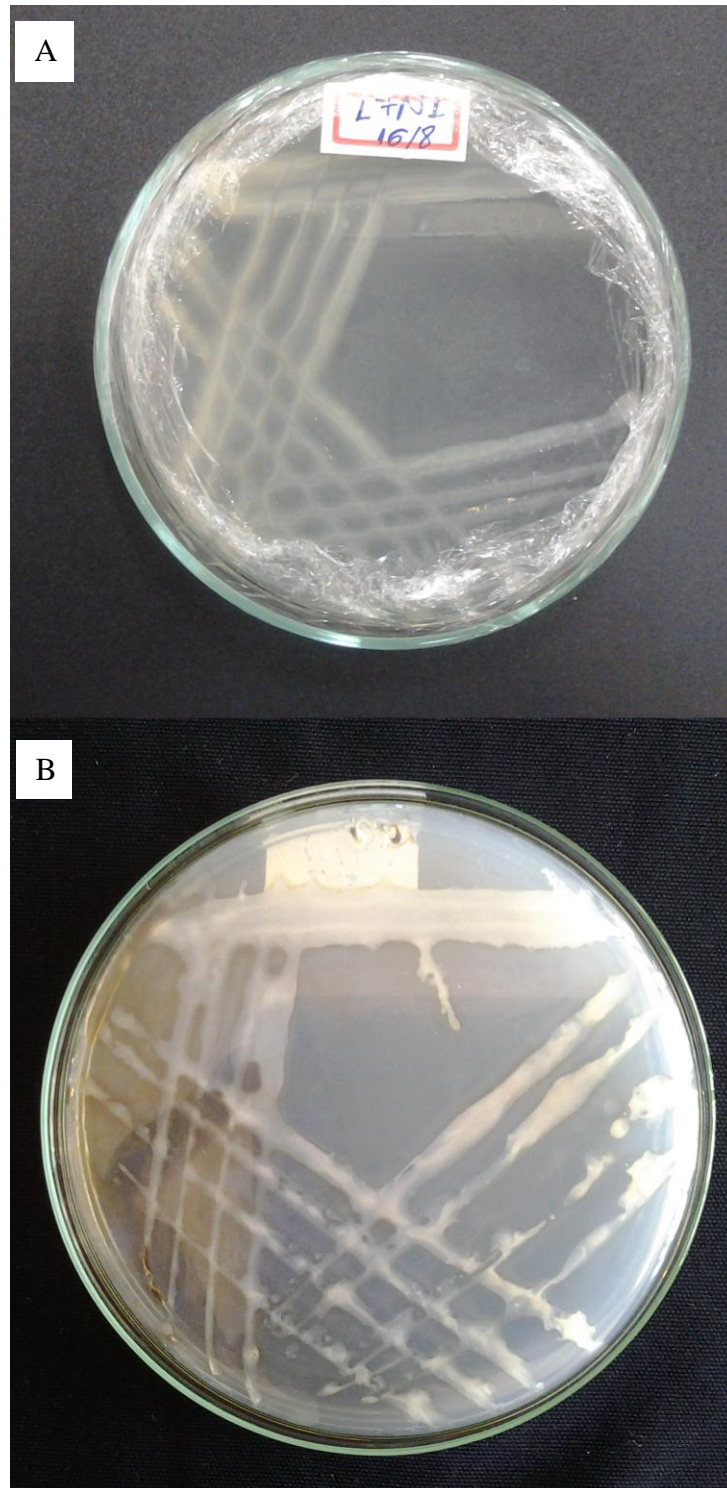


Figura 5 – Crescimento de bactérias em meio YMA com fontes de carbono distintas, manitol (A) e petróleo (B).

Tabela 6 - Crescimento de Estirpes de Rizóbios em meio sólido utilizando petróleo e manitol como fontes de carbono.

RIZÓBIO	3 ^o Dia		6 ^o Dia		9 ^o Dia		12 ^o Dia		15 ^o Dia											
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P										
INPA R546	1,06	e	1,37	e	3,25	b	3,06	b	3,43	b	3,68	a	3,68	a	3,68	a	3,81	a		
INPA R547	1,00	e	0,75	f	3,18	b	3,18	b	3,25	c	3,62	a	3,43	b	3,75	a	3,56	b	3,75	a
INPA R548	1,06	e	0,68	f	3,43	b	3,56	a	3,50	b	3,62	a	3,68	a	3,68	a	3,87	a	3,81	a
INPA R549	1,25	d	1,31	e	3,81	a	3,18	b	3,87	a	3,87	a	3,93	a	3,87	a	3,93	a	3,87	a
INPA R550	1,12	e	1,18	e	3,68	a	1,87	d	3,87	a	3,68	a	3,87	a	3,68	a	3,87	a	3,68	a
INPA R551	0,93	e	1,12	e	2,50	d	2,50	c	3,12	c	3,18	b	3,31	b	3,18	b	3,31	b	3,31	b
INPA R552	0,62	f	0,25	g	3,12	c	3,31	b	3,56	b	3,43	a	3,62	a	3,62	a	3,75	a	3,62	a
INPA R553	1,25	d	1,31	e	3,93	a	2,93	c	3,93	a	3,62	a	3,93	a	3,62	a	3,93	a	3,62	a
INPA R554	1,25	d	0,87	f	3,93	a	2,87	c	4,00	a	3,75	a	4,00	a	3,75	a	4,00	a	3,75	a
INPA R555	1,06	e	1,06	f	3,81	a	3,18	b	3,81	a	3,56	a	3,93	a	3,56	a	3,93	a	3,62	a
INPA R556	0,18	g	1,06	f	1,00	g	1,06	e	1,00	f	1,18	d	1,00	f	1,18	e	1,00	e	1,62	d
INPA R557	1,93	c	2,62	c	2,25	d	3,37	b	2,18	e	3,37	a	2,25	d	3,50	a	2,43	c	3,50	b
INPA R558	0,18	g	1,93	d	1,00	g	2,81	c	1,00	f	2,87	b	1,50	e	3,00	b	1,87	d	3,68	a
INPA R559	0,31	g	0,43	g	2,06	e	1,37	d	3,87	a	2,25	c	3,93	a	3,37	b	3,93	a	3,37	b
INPA R560	1,18	d	0,93	f	3,68	a	3,18	b	3,93	a	3,12	b	3,93	a	3,37	b	4,00	a	3,37	b
INPA R561	0,81	e	1,00	f	1,18	g	1,87	d	2,68	d	2,25	c	3,62	a	3,18	b	3,68	a	3,43	b
INPA R562	0,62	f	0,25	g	1,18	g	1,18	e	2,06	e	2,37	c	3,56	a	3,06	b	3,56	b	3,06	b
INPA R563	1,00	e	0,56	g	3,75	a	2,81	c	3,81	a	3,81	a	3,87	a	3,93	a	3,93	a	3,93	a
INPA R564	1,18	d	0,81	f	3,56	a	3,68	a	3,81	a	3,56	a	3,87	a	3,87	a	3,87	a	3,87	a
INPA R565	1,43	d	1,12	e	4,00	a	3,31	b	4,00	a	3,43	a	4,00	a	3,75	a	4,00	a	3,81	a
INPA R566	1,25	d	1,00	f	4,00	a	3,25	b	4,00	a	3,87	a	4,00	a	4,00	a	4,00	a	4,00	a
INPA R567	0,25	g	0,81	f	3,31	b	3,00	b	3,50	b	3,43	a	3,75	a	3,50	a	3,75	a	3,56	b
INPA R568	1,06	e	1,12	e	3,56	a	3,06	b	3,93	a	3,43	a	3,93	a	3,75	a	3,93	a	3,75	a
INPA R569	1,12	e	1,31	e	3,81	a	3,31	b	4,00	a	3,50	a	4,00	a	3,93	a	4,00	a	3,93	a
INPA R588	0,62	f	1,50	d	1,75	f	2,68	c	2,31	e	3,18	b	3,25	b	3,50	a	3,25	b	3,87	a
INPA R571	1,06	e	1,18	e	2,87	c	3,37	b	3,37	c	3,56	a	3,56	a	3,81	a	3,68	a	3,87	a
INPA R572	0,87	e	1,06	f	2,31	d	3,43	b	3,12	c	3,68	a	3,68	a	3,81	a	3,68	a	3,87	a
INPA R573	1,06	e	1,12	e	2,31	d	3,37	b	3,31	c	3,87	a	3,87	a	3,87	a	3,87	a	3,93	a
INPA R574	0,68	f	1,56	d	2,18	e	3,56	a	3,00	c	3,68	a	3,75	a	3,81	a	3,75	a	3,87	a
INPA R575	0,12	g	0,68	f	2,12	e	2,68	c	3,18	c	3,68	a	3,31	b	3,75	a	3,43	b	3,81	a
INPA R576	0,81	e	1,31	e	3,00	c	2,25	c	3,93	a	3,62	a	3,93	a	3,75	a	4,00	a	3,75	a
INPA R577	2,62	b	2,87	c	2,87	c	3,12	b	3,37	c	3,12	b	3,56	a	3,37	b	3,62	a	3,68	a
INPA R578	0,43	f	2,31	c	2,50	d	2,56	c	3,62	b	2,81	b	3,81	a	3,87	a	3,87	a	3,87	a
INPA R579	0,93	e	1,25	e	1,06	g	1,50	d	1,31	f	2,00	c	1,50	e	3,31	b	1,81	d	3,37	b
INPA R580	0,87	e	1,43	d	1,00	g	1,62	d	1,12	f	2,00	c	1,31	f	3,00	b	1,43	e	3,06	b
INPA R581	0,56	f	1,43	d	1,00	g	1,87	d	1,06	f	2,37	c	1,18	f	2,68	c	1,81	d	3,12	b
INPA R582	0,68	f	1,25	e	1,00	g	1,25	e	1,43	f	1,75	d	2,00	d	3,12	b	2,68	b	3,56	b
INPA R583	0,43	f	1,50	d	0,81	g	3,62	a	1,06	f	3,62	a	1,06	f	3,62	a	1,31	e	3,62	a
INPA R584	0,18	g	1,50	d	0,68	g	2,18	c	0,81	g	2,37	c	1,00	f	3,06	b	1,00	e	3,75	a
INPA R585	1,62	d	1,62	d	2,00	e	1,75	d	2,25	e	2,31	c	2,75	c	3,00	b	3,12	b	3,31	b
INPA R586	0,50	f	1,18	e	1,93	e	2,18	c	3,56	b	3,50	a	3,56	a	3,62	a	3,56	b	3,81	a

RIZÓBIO	3 ^o Dia		6 ^o Dia		9 ^o Dia		12 ^o Dia		15 ^o Dia											
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P										
INPA R587	1,00	e	0,87	F	1,00	g	2,25	c	1,25	f	3,06	b	1,68	e	3,43	b	1,75	d	3,62	a
INPA R588	0,50	f	1,18	E	1,12	g	2,25	c	2,06	e	2,50	c	3,00	c	3,18	b	3,25	b	3,43	b
INPA R589	1,00	e	1,87	d	1,06	g	2,31	c	1,12	f	2,50	c	1,25	f	3,50	a	1,56	d	3,50	b
INPA R590	1,37	d	1,12	e	2,56	d	1,43	d	3,37	c	2,18	c	3,43	b	2,43	c	3,87	a	2,43	c
INPA R591	3,37	a	2,62	d	3,31	b	3,12	b	3,31	c	3,56	a	3,31	b	3,62	a	3,31	b	3,75	a
INPA R592	0,81	e	1,12	e	1,06	g	1,25	e	1,06	f	1,43	d	1,06	f	2,62	c	1,25	e	2,75	c
INPA R593	1,25	d	1,18	e	1,50	f	1,56	d	2,12	e	1,31	d	3,50	b	2,25	c	3,56	b	2,25	d
INPA R594	0,87	e	1,31	e	1,75	f	1,37	d	2,56	d	1,50	d	2,81	c	1,87	d	3,06	b	2,12	d
INPA R596	1,43	d	1,12	e	2,43	d	2,18	c	3,00	c	2,93	b	2,93	c	3,06	b	3,12	b	3,25	b
INPA R598	1,18	d	1,62	d	1,56	f	3,62	a	3,31	c	3,62	a	3,37	b	4,00	a	3,50	b	4,00	a
INPA R600	0,62	f	1,75	d	1,43	f	2,37	c	1,93	e	2,50	c	2,25	d	3,06	b	2,43	c	3,06	b
INPA R602	0,93	e	1,12	e	1,87	e	2,25	c	2,75	d	3,56	a	2,87	c	3,68	a	3,37	b	3,87	a
INPA R603	0,75	e	1,06	f	1,50	f	1,31	d	2,00	e	1,31	d	3,06	c	1,31	e	3,43	b	1,37	d
INPA R604	0,37	g	1,00	f	1,25	g	1,18	e	2,43	d	1,43	d	3,18	b	2,06	d	3,25	b	3,00	b
INPA R605	1,12	e	1,12	e	1,81	e	1,25	e	2,68	d	1,50	d	3,31	b	3,06	b	3,56	b	3,31	b
INPA R606	0,62	f	1,06	f	1,62	f	1,37	d	3,12	c	1,68	d	3,37	b	2,68	c	3,87	a	2,75	c
INPA R607	0,81	e	1,00	f	2,12	e	1,25	e	2,81	d	1,87	c	3,43	b	3,06	b	3,43	b	3,43	b
INPA R610	1,00	e	0,81	f	1,37	f	1,18	e	2,00	e	1,25	d	2,75	c	1,87	d	3,50	b	1,81	d
INPA R611	1,00	e	1,00	f	2,00	e	1,18	e	3,50	b	1,75	d	3,81	a	2,93	b	3,87	a	3,06	b
INPA R612	1,06	e	0,87	f	2,68	d	1,31	d	3,31	c	1,31	d	3,31	b	2,06	d	3,50	b	2,18	d
INPA R613	1,25	d	1,00	f	2,62	d	1,62	d	2,93	d	2,50	c	3,43	b	2,62	c	3,43	b	2,68	c
INPA R614	0,56	f	1,00	f	1,81	e	1,87	d	2,06	e	1,87	c	3,25	b	3,37	b	3,31	b	3,37	b
INPA R615	1,00	e	1,18	e	1,56	f	1,18	e	2,87	d	1,18	d	3,43	b	2,12	c	3,56	b	2,75	c
INPA R616	1,31	d	1,00	f	3,62	a	1,37	d	3,87	a	1,43	d	3,87	a	2,37	c	4,00	a	2,68	c
INPA R617	0,81	e	1,12	e	2,87	c	2,18	C	3,50	b	3,62	a	3,50	b	3,25	b	3,62	a	3,31	b
INPA R618	3,75	a	3,06	b	3,75	a	3,56	a	4,00	a	3,68	a	4,00	a	4,00	a	4,00	a	4,00	a
INPA R619	1,00	e	1,50	d	1,25	g	1,93	d	1,87	e	1,93	c	2,81	c	1,93	d	3,62	a	1,93	d
INPA R620	0,81	e	1,00	f	3,06	c	2,56	c	3,81	a	2,68	b	3,87	a	3,50	a	3,87	a	3,50	b
INPA R621	0,25	g	1,00	f	3,06	c	2,68	c	3,81	a	2,68	b	3,93	a	3,43	b	4,00	a	3,50	b
INPA R622	0,25	g	1,37	e	2,50	d	2,37	c	3,93	a	3,18	b	3,93	a	3,87	a	3,93	a	3,87	a
INPA R623	2,12	c	2,25	c	2,56	d	2,43	c	2,81	d	2,93	b	3,06	c	3,56	a	3,31	b	3,68	a
INPA R624	0,93	e	1,43	d	1,75	f	2,62	c	2,62	d	2,75	b	3,06	c	3,56	a	3,06	b	3,56	b
INPA R625	2,43	b	2,31	c	3,00	c	2,56	c	3,12	c	3,00	b	3,31	b	3,50	a	3,43	b	3,68	a
INPA R626	1,87	c	2,37	c	2,43	d	2,93	c	4,00	a	3,81	a	4,00	a	3,87	a	4,00	a	3,87	a
INPA R627	0,25	g	1,00	f	1,75	f	2,50	c	3,12	c	3,37	a	3,25	b	3,68	a	3,37	b	3,68	a
INPA R628	0,18	g	1,18	e	2,62	d	2,31	c	3,93	a	3,18	b	4,00	a	4,00	a	4,00	a	4,00	a
INPA R629	2,81	b	3,93	a	3,31	b	4,00	a	3,93	a	4,00	a	4,00	a	4,00	a	4,00	a	4,00	a
INPA R630	0,37	g	0,81	f	2,62	d	2,31	c	3,50	b	3,75	a	3,56	a	3,87	a	3,56	b	3,93	a
INPA R631	0,37	g	1,75	d	2,25	d	3,06	b	3,50	b	3,50	a	3,62	a	3,68	a	4,00	a	3,75	a
INPA R632	0,43	f	1,06	f	3,25	b	2,68	c	3,50	b	2,68	b	3,87	a	3,37	b	3,93	a	3,37	b
INPA R633	0,18	g	1,00	f	2,12	e	2,62	c	3,87	a	3,25	b	3,87	a	3,50	a	3,93	a	3,62	a

RZÓBIO	3 ^o Dia		6 ^o Dia		9 ^o Dia		12 ^o Dia		15 ^o Dia											
	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P										
INPA R634	0,00	g	3,50	b	3,25	b	4,00	a	3,87	a	4,00	a	3,93	a	4,00	a	3,93	a	4,00	a
INPA R635	2,25	c	1,12	e	2,93	c	1,50	d	3,93	a	1,56	d	3,93	a	3,25	b	3,93	a	3,43	b
INPA R636	0,12	g	1,00	f	2,68	d	2,50	c	3,68	b	3,75	a	3,68	a	3,81	a	3,81	a	3,87	a
INPA R637	2,62	b	2,56	c	2,81	c	2,68	c	2,93	d	2,81	b	3,12	c	2,93	b	3,25	b	3,00	b
INPA R639	0,06	g	0,81	f	0,06	h	1,00	e	0,50	h	1,25	d	0,62	f	1,87	d	1,18	e	2,87	c
INPA R640	0,18	g	0,12	g	0,87	g	0,31	f	0,87	g	0,75	d	1,00	f	1,87	d	1,00	e	2,62	c
INPA R642	0,75	e	0,81	f	0,81	g	1,31	d	0,87	g	1,31	d	1,06	f	3,75	a	1,18	e	3,75	a
INPA R643	1,81	c	1,00	f	2,93	c	1,18	e	3,37	c	1,18	d	3,50	b	1,31	e	3,62	a	2,00	d
INPA R644	0,62	f	0,50	g	0,81	g	0,50	f	1,06	f	2,25	c	1,06	f	3,00	b	1,12	e	3,12	b
INPA R645	0,25	g	0,81	f	0,81	g	0,87	e	1,00	f	1,43	d	1,06	f	3,06	b	1,06	e	3,31	b
INPA R646	0,25	g	1,00	f	0,93	g	1,43	d	0,93	f	2,00	c	1,00	f	2,37	c	1,00	e	3,06	b
INPA R647	0,62	f	1,12	e	1,43	f	0,93	e	2,06	e	3,37	a	2,81	c	3,75	a	3,25	b	3,75	a
INPA R648	0,37	g	1,31	e	0,75	g	1,37	d	0,75	g	1,37	d	0,81	f	2,50	c	0,81	e	2,81	c
INPA R649	0,25	g	1,00	f	0,25	h	1,00	e	1,00	f	1,00	d	1,00	f	1,93	d	1,00	e	2,18	d
INPA R650	0,12	g	1,06	f	0,68	g	1,06	e	0,68	g	1,06	d	1,00	f	1,37	e	1,00	e	2,25	d
INPA R651	1,00	e	0,12	g	1,50	f	0,25	f	2,06	e	1,93	c	2,18	d	2,68	c	3,06	b	2,93	c
INPA R652	0,50	f	1,25	e	1,00	g	1,50	d	1,00	f	2,37	c	1,00	f	2,87	b	1,93	d	3,06	b
INPA R653	0,68	f	2,18	c	1,00	g	2,31	c	1,06	f	3,00	b	1,06	f	3,31	b	1,18	e	3,62	a
INPA R654	0,31	g	1,00	f	0,31	h	1,00	e	1,00	f	1,06	d	1,00	f	1,81	d	1,00	e	2,06	d
INPA R655	0,68	f	1,06	f	2,12	e	1,12	e	3,18	c	1,56	d	3,37	b	2,75	c	3,37	b	2,93	c
INPA R656	1,00	e	3,31	b	3,62	a	3,93	a	3,68	b	4,00	a	3,87	a	4,00	a	3,93	a	4,00	a
INPA R657	2,68	b	2,56	c	3,25	b	3,18	b	3,50	b	3,18	b	3,75	a	3,31	b	3,87	a	3,31	b
INPA R659	0,18	g	0,81	f	1,06	g	0,87	e	1,12	f	1,31	d	1,31	f	2,25	c	1,50	d	2,50	c
INPA R660	0,62	f	1,06	f	1,37	f	1,06	e	1,50	f	2,18	c	1,50	e	2,93	b	1,93	d	3,87	a
INPA R661	0,31	g	0,87	f	0,43	h	1,75	d	0,75	g	2,12	c	0,75	f	3,31	b	1,06	e	3,50	b
INPA R662	0,50	f	0,93	f	1,93	e	1,25	e	2,75	d	1,81	c	3,43	b	3,25	b	3,75	a	3,50	b
INPA R663	0,50	f	0,81	f	1,18	g	1,06	e	1,37	f	1,37	d	1,75	e	3,06	b	1,75	d	3,37	b
INPA R664	1,12	e	3,87	a	3,31	b	4,00	a	3,75	a	4,00	a	3,75	a	4,00	a	3,75	a	4,00	a
INPA R665	0,31	g	1,25	e	1,56	f	1,62	d	1,56	e	1,75	d	1,62	e	1,75	d	3,06	b	1,87	d
INPA R666	1,50	d	2,25	c	3,06	c	3,37	b	3,06	c	3,56	a	3,06	c	3,62	a	3,06	b	3,68	a
INPA R667	3,43	a	4,00	a	3,68	a	4,00	a	3,75	a	4,00	a	3,87	a	4,00	a	3,87	a	4,00	a
INPA R668	1,00	e	2,50	c	3,81	a	2,93	c	3,81	a	3,31	b	3,87	a	3,43	b	3,87	a	3,56	b
INPA R669	1,00	e	1,00	f	0,06	h	1,31	d	0,12	h	1,50	d	0,43	f	1,68	d	0,62	e	2,00	d
INPA R672	1,00	e	3,56	b	3,81	a	3,87	a	3,81	a	3,93	a	4,00	a	3,93	a	4,00	a	3,93	a
INPA R674	1,00	e	3,43	b	3,31	b	3,50	b	3,37	c	3,56	a	3,50	b	3,75	a	3,50	b	3,75	a
INPA R675	1,00	e	3,31	b	3,18	b	3,50	b	3,43	b	3,62	a	3,50	b	3,62	a	3,56	b	3,56	b
INPA R676	1,00	e	3,31	b	3,12	c	3,68	a	3,12	c	3,87	a	3,12	c	3,93	a	3,18	b	3,93	a
INPA R677	1,00	e	3,12	b	3,68	a	3,37	b	3,68	b	3,50	a	3,75	a	3,50	a	3,87	a	3,50	b
MÉDIAS	0,95	B	1,44	A	2,22	B	2,28	A	2,72	A	2,71	A	2,95	B	3,19	A	3,10	B	3,35	A

OBS: Crescimento em meio YMA com as seguintes fontes de carbono: **M** – Manitol (Controle); **P** – Petróleo.

Médias de tratamentos (isolados) seguidas da mesma letra (minúscula entre os tratamentos na coluna) e (maiúscula nas médias gerais no final da tabela, entre as fontes de carbono em cada período), não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Com o intuito de demonstrar o potencial dos Rizóbios na biorremediação, varios trabalhos vem sendo realizados utilizando diferentes frações do petróleo. Excelentes resultados com o gênero *Rhizobium* na degradação de compostos fenólicos, utilizados como fonte de carbono, foram descritos por Wei et al. (2008). Estes verificaram que a estirpe analisada (CCNWTB701) tinha uma excelente capacidade para degradar fenol; no entanto, o crescimento da biomassa foi significativamente inibida em concentrações elevadas deste composto. Outras estirpes de rizóbio isoladas de solos contaminados com petróleo, na Tailândia, demosntraram potencial para degradação de acenaftileno, 600 mg / litro dentro de três dias (POONTHRIGPUN et al. 2006). Yang; Lee (2008) testaram consórcios de várias linhagens de rizóbios na tentativa de degradar 4-clorofenol. Após realizarem vários testes com diferentes concentrações do composto, que variou entre 50 mg/ litro a 270 mg/ litro, entretanto estes afirmaram que quanto maior for a concentração do 4-clorofenol menor será a biomassa das colônias de consórcios. Xiong et al. (2011) realizaram vários testes para mensurar os efeitos da temperatura sobre a degradação de petróleo por comunidades microbianas. Eles descreveram que, apesar da capacidade de degradação dos rizóbios em diferentes temperaturas, a composição da comunidade foi mais diversificada sob as condições de 10 °C do que de 25 °C (concentração total de bactérias em 10 °C foi de $6,2 \times 10^5$ UFC / mL e que, sob as condições de 25 °C foi de 4×10^8 UFC / mL.), sugerindo que a temperatura tinha um forte impacto na composição das comunidades microbianas do solo.

Ahmad et al. (1997), por meio de análises com marcadores moleculares RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), isolaram e caracterizaram várias linhagens de *Rhizobium meliloti* em áreas contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos e cloroaromaticos. Esta contaminação foi devido à atividade industrial e ao derramamento por um período de aproximadamente 15 anos. Estes realizaram os primeiros registros de isolados de *Rhizobium meliloti* com potencial para degradação de hidrocarbonetos.

A figura 6 mostra o crescimento de rizóbios, após 15 dias de incubação com duas fontes de carbono distintas. Em 6A, as bactérias utilizaram a fonte de carbono manitol para crescimento e em 6B, a fonte de carbono petróleo. Uma vez que o manitol é a fonte de carbono utilizada normalmente para o crescimento de rizóbios em laboratório e o petróleo foi uma fonte teste utilizada, nota-se que apesar de não haver diferença com relação ao crescimento elevado (68% A, correspondendo a 81 isolados de rizóbios e 69% B, a 83 isolados), no moderado (11% A, correspondendo a 13 isolados e 23% B a 27 isolados) e crescimento pouco (21% A, correspondendo a 26 isolados e 8% B, a 10 isolados). Esses

valores apontam uma boa adaptação e crescimento satisfatório dos rizóbios quando utilizado a fonte de carbono petróleo.

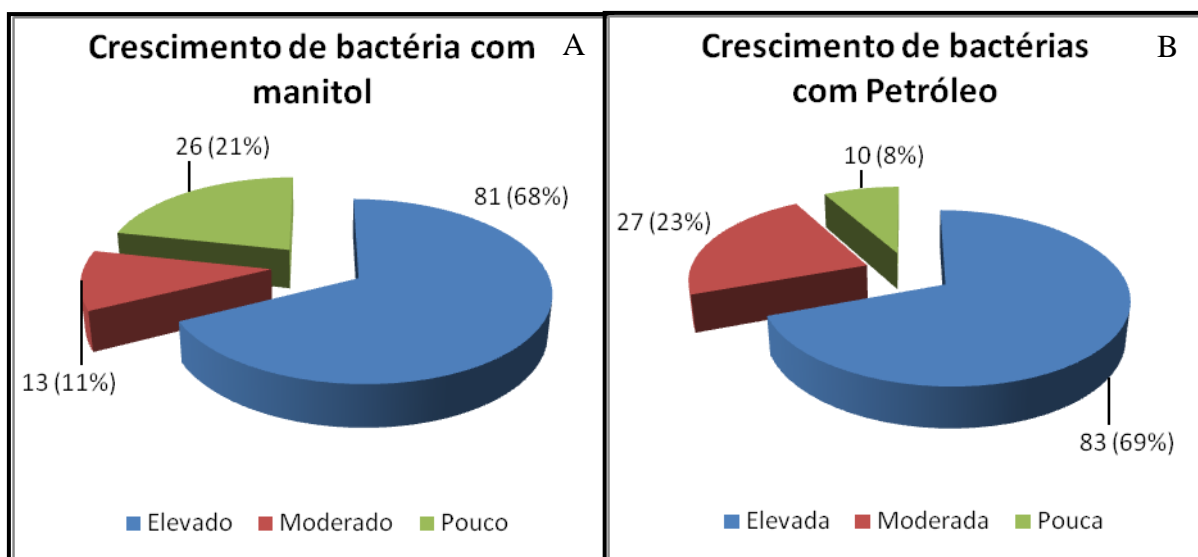
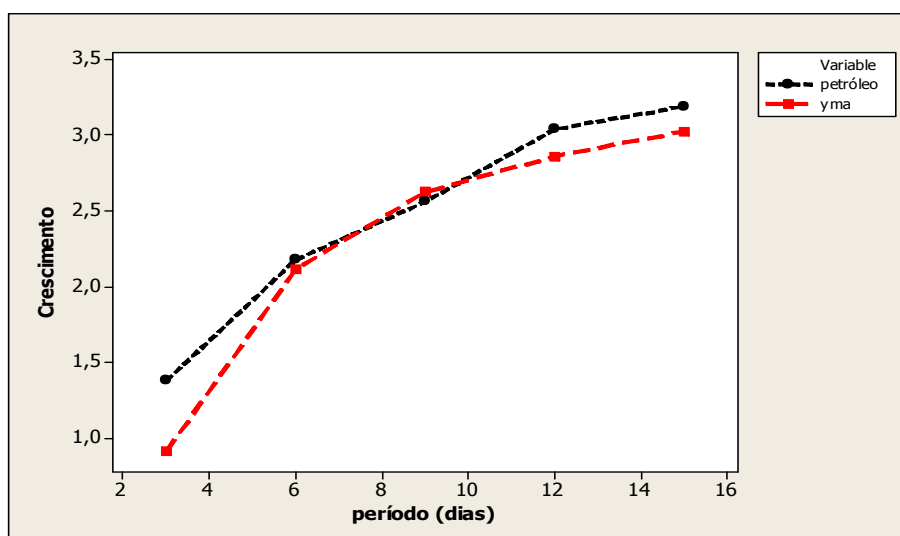


Figura 6 – Percentual de rizóbios com relação a taxa de crescimento usando manitol ou petróleo como fontes de carbono.

A tendência de crescimento dos dados da Figura 7, obtidos segundo metodologia de Oliveira e Magalhães (1999), confirmam os resultados exibidos na Figura 6, onde o crescimento de rizóbios utilizando as duas fontes de carbono (petróleo e manitol), mostraram diferenças com relação aos tempos de crescimento e isso sugere que cada um possui um tempo de adaptação às condições impostas como fonte de carbono no meio. Nota-se que os micro-organismos tratados com petróleo apresentaram um crescimento melhor e maior do que aqueles tratados com manitol.



Obs.: Notas do crescimento dos rizóbios segundo Oliveira e Magalhães (1999).

Figura 7 – Crescimento de rizóbios com manitol e petróleo.

3.3 Avaliação da capacidade de biodegradação utilizando o Indicador Redox DCPIP.

A Figura 8 mostra dados utilizando bactérias (rizóbios) padronizadas para UFC x $10^5/\mu\text{L}$ e expõe a capacidade de rizóbios em utilizar hidrocarbonetos como substrato utilizando o indicador redox diclorofenol indofenol (DCPIP), observando a mudança de cor do azul (oxidado) para incolor (reduzido). As placas de Eliza com as letras de A a E significam diferentes isolados utilizados, como A1(INPA R546, INPA R547, INPA R548, INPA R549, INPA R552, INPA R555, INPA R560, INPA R564, INPA R565, INPA R566, INPA R568 e INPA R569), B1(INPA R571, INPA R572, INPA R573 e INPA R574), C1(INPA R583, INPA R629, INPA R667, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R676 e INPA R677), D1(INPA R557, INPA R577, INPA R598, INPA R614, INPA R631 e INPA R666) e E1(INPA R591, INPA R614, INPA R618, INPA R634, INPA R656, INPA R657 e INPA R664). As placas A1, B1, C1, D1 e E1 estão dispostas com 24 horas de teste e as placas A2, B2, C2, D2 e E2 com 144 horas. Ocorreu uma descoloração quase total na placa A2, nas frações A3, B3,C3, D3, A4,B4,C4, D4, A5,B5,C5, D5 e descoloração parcial nas frações A9,B9,C9, D9, A10,B10,C10, D10, A11,B11,C11, D11, com a fonte de carbono petróleo. Com a fonte de carbono manitol da mesma placa, houve descoloração total nas frações G2 e H2, descoloração quase total nas frações G3,H3,G4, H4, G5, H5, G7 e H7. Na placa B2 com 144 horas de observação só houve o início da descoloração. Com relação a placa C2 com a fonte de carbono petróleo, atingiram descoloração total as frações A4, B4, C4 e D4, A7, B7, C7 e D7, A8, B8, C8 e D8. Com descoloração quase total A2, B2, C2 e D2, A3, B3, C3 e D3, A5, B5, C5 e D5, A6, B6, C6 e D6 e com descoloração parcial A1, B1, C1 e D1. Com o manitol com descoloração total as frações G3e H3, G5 e H5, G7 e H7 e G8 e H8, com descoloração quase total o G2 e H2, G4 e H4. Com a fonte de carbono petróleo da placa D2 houve descoloração total ocorreu nas frações A1, B1, C1 e D1, A3, B3, C3 e D3, A4, B4, C4 e D4 e A5, B5, C5 e D5, com descoloração quase total a A2, B2, C2 e D2 e A6, B6, C6 e D6. Com a fonte de carbono manitol ocorreu descoloração total G3 e H3, G4 e H4, G5 e H5 e G6 e H6, com descoloração quase total a G1 e H1 e com descoloração parcial a G2 e H2. Na placa E2 ocorreu descoloração total nas frações A2, B2, C2 e D2, A6, B6, C6 e D6 e A7, B7, C7 e D7, descoloração quase total nas A3, B3, C3 e D3, A4, B4, C4 e D4 e A5, B5, C5 e D5 e com descoloração parcial A1, B1, C1 e D1 e com a fonte de carbono manitol temos o G1 e H1, G2 e H2, G7 e H7, com descoloração parcial o G6 e H6. Estes resultados indicam que os isolados que apresentaram descoloração total, quase total e parcial do DCPIP, degradam

hidrocarbonetos do petróleo, com potencial de aplicabilidade em biorremediação de áreas contaminadas, pois ao comparar a descoloração das duas fontes de carbono (petróleo e manitol), no sexto dia os micro-organismos com a fonte de carbono petróleo alcançaram índice maior de descoloração com relação ao manitol (confirmados nas tabelas 6 e 7). Os demais micro-organismos que não foram citados continuaram com a coloração total ou inicial, indicando baixos índices para degradar os compostos de petróleo.

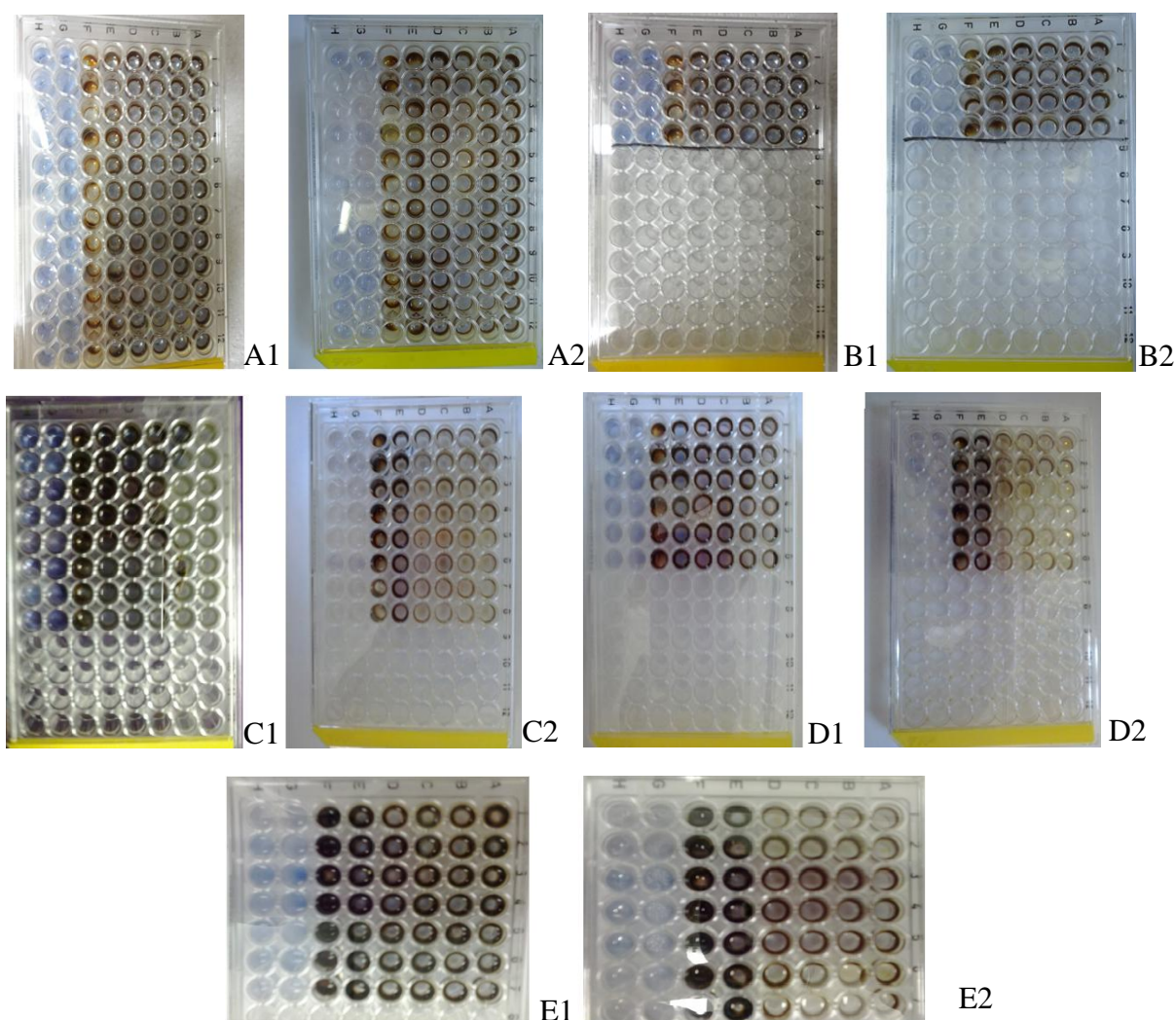


Figura 8 – Biodegradação de petróleo e manitol por rizóbios padronizados utilizando o indicador redox DCPIP.

As figuras 9 e 10 confirmam os dados da Figura 8, onde foi realizada uma classificação hierárquica direta e estão agrupados os rizóbios conforme atribuição de notas com relação à descoloração do DCPIP, que ficou da seguinte forma: 1 (Coloração total), 2 (Início da descoloração), 3 (Descoloração parcial), 4 (Descoloração quase total) e 5 (Descoloração total) e foram classificados em grupos, onde no grupo 1 estão agrupados os rizóbios que obtiveram nota 5 com relação a descoloração do indicador, no grupo 2 aqueles

com nota 4, no grupo 3 com nota 3, no grupo 4, os rizóbios com notas 2 e no grupo 5, aqueles com nota 1.

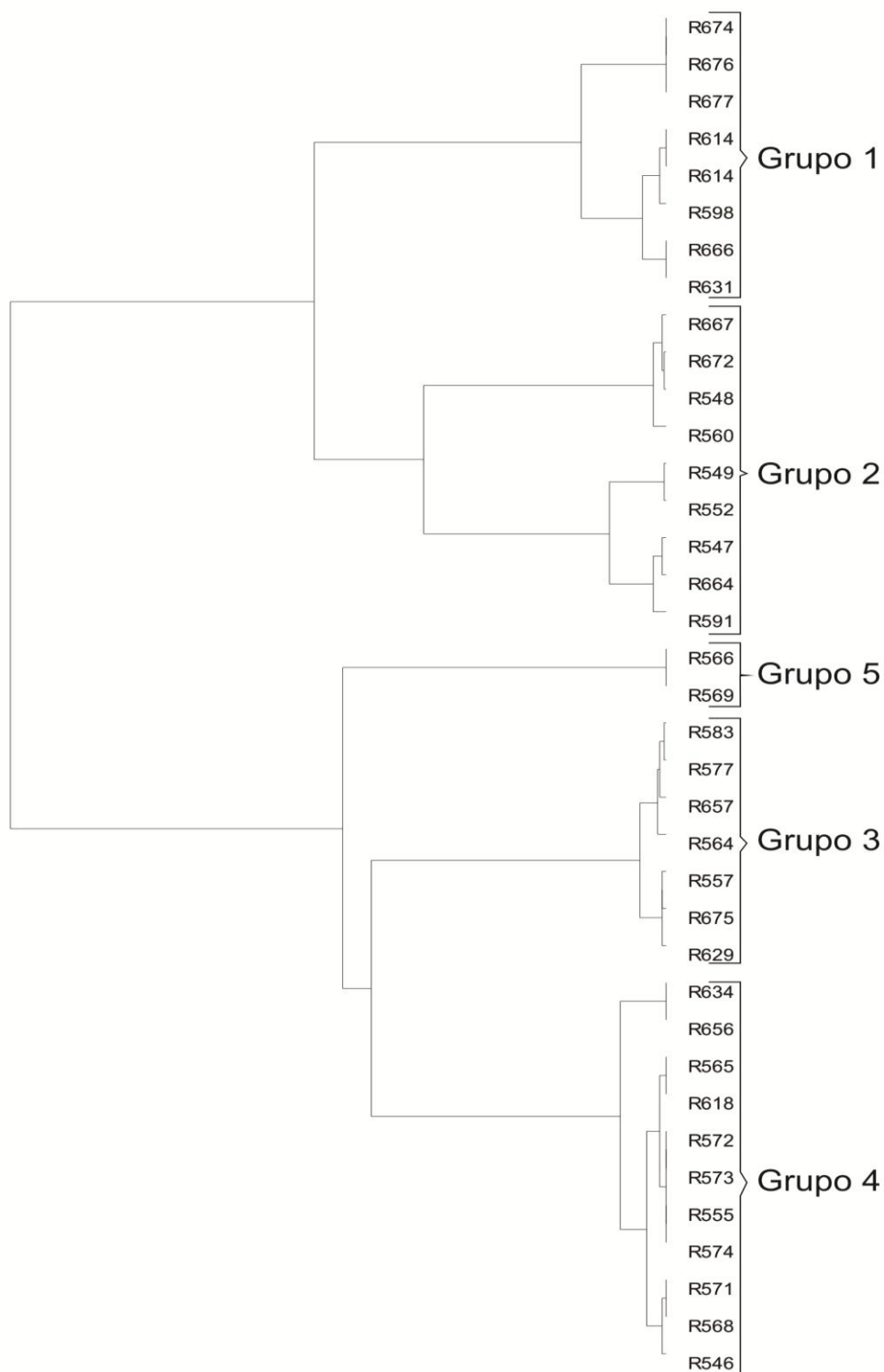


Figura 9 – Representação do dendrograma de crescimento agrupando os rizóbios, conforme descoloração do DCPIP, utilizando o manitol como fonte de carbono.

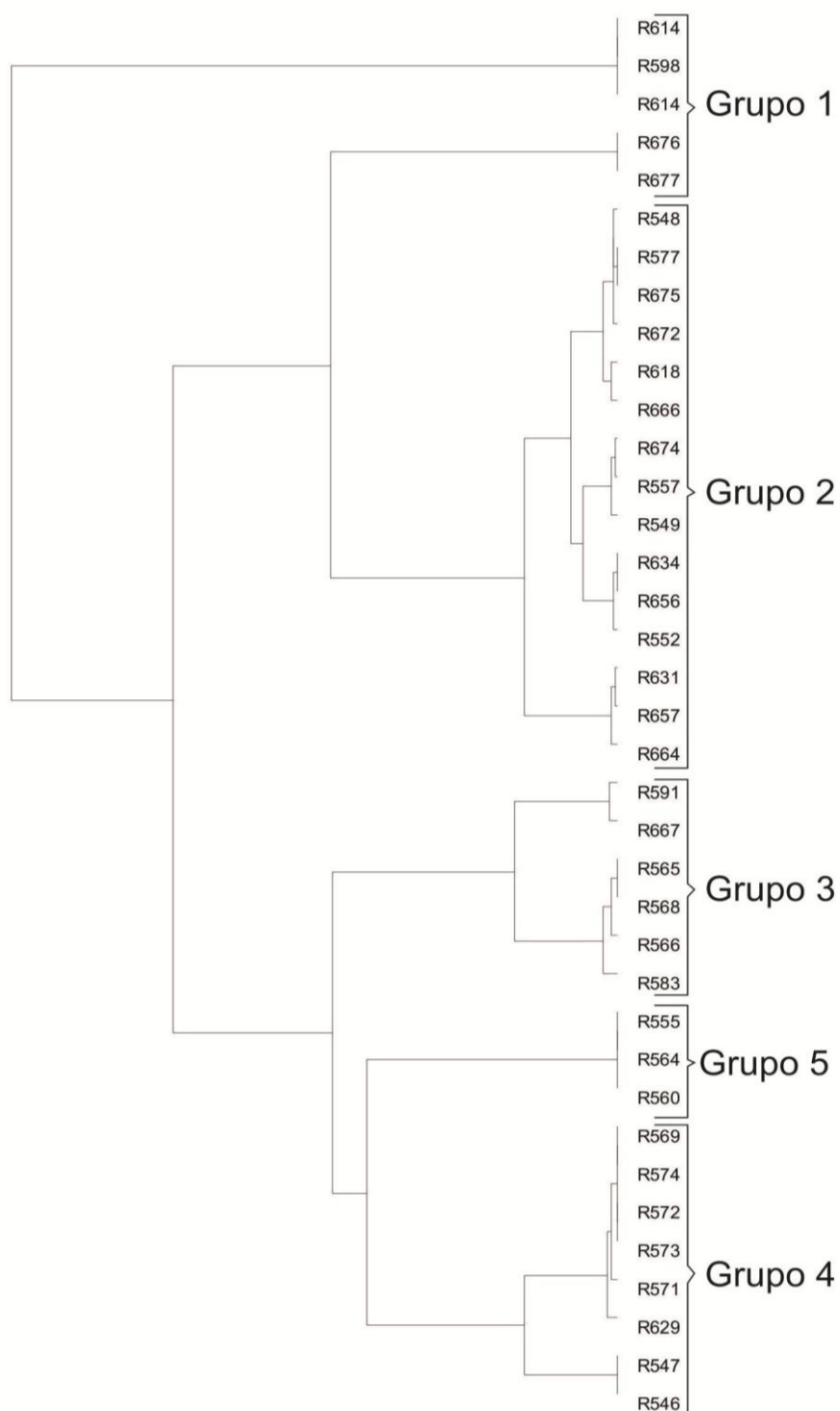


Figura 10 – Dendrograma de crescimento agrupando os rizóbios, conforme descoloração do DCPIP, utilizando o petróleo como fonte de carbono.

As Tabelas 7 e 8 apresentam a porcentagem da evolução do processo de descoloração do indicador redox DCPIP, com o manitol ou petróleo como fontes de carbono. Com 24 horas observou-se que somente 35,13% (manitol) e 56,76% (petróleo) dos isolados mantiveram a coloração total, ou seja, não houve degradação das fontes de carbono, enquanto que com os demais ocorreu degradação e alguns conseguiram atingir notas 5 (manitol) e 4 (manitol e petróleo). Com 48 horas, o índice de descoloração dos valores 4 e 5 se apresentaram maior com o manitol, mas com 96 horas esses índices aumentaram com a fonte de carbono petróleo, demonstrando com isso o tempo que esses micro-organismos levam para se adaptarem a fonte de carbono e degradar os hidrocarbonetos do petróleo.

Tabela 7 – Valores percentuais referentes ao processo de descoloração do DCPIP com manitol como fonte de carbono de acordo com os tempos de avaliações.

Valores Atribuídos	Porcentagem nos períodos avaliados					
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
1	35,13	21,62	24,32	13,51	8,11	8,11
2	29,73	35,13	37,84	29,73	29,73	29,73
3	16,22	18,92	10,81	16,22	16,22	10,81
4	10,81	16,22	8,11	16,22	16,22	18,92
5	8,11	8,11	18,92	24,32	29,73	32,43
Porcentagem das notas 4 e 5	18,92	24,33	27,03	40,54	45,95	51,35

Tabela 8 – Valores percentuais referentes ao processo de descoloração do DCPIP com petróleo como fonte de carbono de acordo com os tempos de avaliações.

Valores Atribuídos	Porcentagem nos períodos avaliados					
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
1	56,76	51,35	43,24	27,03	8,11	8,11
2	24,32	24,32	13,51	16,22	24,32	18,92
3	10,81	10,81	24,32	5,40	10,81	13,51
4	8,11	5,40	10,81	40,54	32,43	32,43
5	0,00	8,11	8,11	10,81	21,62	27,03
Porcentagem das notas 4 e 5	8,11	13,51	18,92	51,35	54,05	59,46

A biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxi-redução, onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um acceptor de elétrons é reduzido (REGINATTO et al., 2011). O indicador 2,6 diclorofenol-indofenol –DCPIP (age como acceptor de elétrons atuando no sentido de indicar o potencial das cepas bacterianas em utilizar os hidrocarbonetos de petróleo como substrato por meio da alteração do meio da forma oxidada (azul) para reduzida (incolor). Souza et al. (2010) avaliaram a potencialidade de degradação da gasolina por bactérias, fungos filamentosos e leveduras por meio do indicador DCPIP e de acordo com os resultados obtidos, 90% dos isolados apresentaram potencial para degradar a gasolina. Da mesma maneira, Mariano et al. (2007) utilizaram o Indicador redox (DCPIP), para verificar nos poços de monitoramento SB3, localizado no município de Santa Bárbara do Oeste, Guarulhos – São Paulo, se os micro-organismos presentes na água subterrânea eram capazes de degradar óleo diesel comercial e intemperizado e com três dias houve a descoloração total do DCPIP para ambos os óleos diesel testados.

Os resultados obtidos neste trabalho, por meio do indicador DCPIP, demonstraram que após 144 h, houve significativos percentuais de degradação do petróleo pelos micro-organismos (Tabela 8). Tais valores corroboram com os resultados descritos por Fioravanti et al., (2012) quando isolaram, selecionaram e identificaram micro-organismos em sedimentos de manguezais contaminados. Estes, após o cultivo em diferentes fontes de carbono, isolaram um total de 306 micro-organismos dos quais o maior número dos isolados foram dos meios que tiveram petróleo como única fonte de carbono (62%). Resultados relevantes para degradação de petróleo e seus derivados também vem sendo demonstrados em outras espécies de micro-organismos, como os descritos por Miranda et al. (2007) quando estudaram a biodegradação de óleo diesel por leveduras isoladas no estado de Pernambuco. Estes concluíram que os resultados obtidos para as leveduras podem ser usados para elaborar um protocolo de biorremediação que envolve a otimização dos parâmetros, tais como a bioestimulação e bioaugmentação para a recuperação de áreas contaminadas por óleo diesel, bem como por outras fontes de hidrocarbonetos do petróleo.

Lima (2010) obteve bons resultados com o teste de biodegradabilidade usando o indicador DCPIP e mostrou que dos 106 micro-organismos isolados dos solos rizosféricos de *Vismia guianensis*, *Mucuna pruriens*, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* coletados na Província Petrolífera de Urucu, 65 (61,32%) apresentaram potencial de degradação do petróleo após 5 dias (120 horas), sendo 25 bactérias, 27 fungos filamentosos e 13 leveduras.

A presença de micro-organismos em áreas contaminadas é um indicativo positivo de estudos promissores sobre biorremediação, pois estes possivelmente são capazes de metabolizar as espécies químicas existentes, fazendo com que aconteça uma diminuição dos agentes contaminantes do meio.

4. CONCLUSÕES

Dos 120 isolados de rizóbios, 93 apresentaram capacidade de tolerar a presença do petróleo no meio, apresentando bom crescimento, quando submetidos por 15 dias na presença dessa substância.

Desses 93 isolados, 36 apresentaram habilidade em utilizar o petróleo como fonte de carbono, pois atingiram a nota de crescimento sugerida (3,06) com seis dias de crescimento.

Os 36 rizóbios foram submetidos ao teste do diclorofenol indofenol (DCPIP), indicando que 59,46% apresentaram descoloração quase total ou total, utilizando petróleo como fonte de carbono, aos seis dias de avaliação do teste.

CAPÍTULO II

Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por isolados de rizóbios.

Avaliação do Potencial de Produção de Biossurfactantes por Isolados de Rizóbios.

Palavras-chave: Biodegradação, Rizóbio, Biossurfactantes

Resumo

A biorremediação é um processo de tratamento que utiliza micro-organismos que degradam e transformam compostos orgânicos, como o petróleo. É importante testar micro-organismos com capacidade para degradar ou que auxiliem na solubilização do petróleo como forma de minimizar os danos causados por derrames desse poluente. Rizóbios são bactérias que possuem potencial uso como supridoras de nitrogênio às plantas e não são patogênicas, podendo possuir aplicabilidade para serem utilizadas na limpeza de áreas contaminadas com compostos de petróleo, uma vez que não são prejudiciais ao meio ambiente e ao homem. Esse trabalho teve como objetivo testar a capacidade de isolados de rizóbios em degradar petróleo e tolueno, avaliando sua capacidade quanto à produção de biossurfactantes. Foram selecionados e testados 15 rizóbios que apresentaram habilidade de biodegradar petróleo e tolueno quando usados como fontes de carbono. Na avaliação da atividade de produção de biossurfactantes, os valores do índice de emulsificação água em óleo foram altos, demonstrando o potencial dos micro-organismos em produzir biossurfactantes, apesar dos valores de baixo a médio adquiridos no índice de emulsificação de óleo em água. Esses resultados demonstram que os rizóbios podem tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados com esse produto muito utilizado na sustentabilidade econômica global.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma enorme preocupação quanto ao uso sustentável dos recursos naturais. A enorme demanda pelo petróleo poderá acarretar em sua escassez e a extração e produção deste composto são atividades de alto risco ambiental.

A poluição causada por hidrocarbonetos constitui séria preocupação ambiental e de saúde, merecendo maior investimento em tecnologias compatíveis para sua remediação. Os maiores problemas são os danos ambientais causados por derrames acidentais e descarga de petróleo ou de resíduos oleosos intencionalmente descartados (LAI et al., 2009).

A biorremediação é um processo de tratamento que utiliza micro-organismos que degradam e transformam compostos orgânicos, como o petróleo, existentes nos solos contaminados, aquíferos, lodos e resíduos sólidos, em compostos menos complexos e geralmente mais facilmente degradáveis (WETLER-TONINI et al., 2010). A capacidade dos micro-organismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico. Neste contexto, bactérias aeróbicas e anaeróbicas vem sendo utilizadas com sucesso em diversas técnicas, como atenuação natural, bioaugmentação, bioestimulação, produção de biosurfactantes, entre outras.

Biosurfactantes são metabólitos produzidos por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e pode aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) a estes micro-organismos degradadores, auxiliando na solubilização do poluente, além de apresentarem vantagens, como baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficácia em amplas variações de temperatura, pH e salinidade (TABATABAEE et al., 2005; MANIASSO et al., 2001).

Rizóbios são bactérias que possuem potencial uso como supridoras de nitrogênio às plantas (SPRENT, 2001). Além da capacidade de fixar nitrogênio, algumas estirpes são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis do solo, e disponibilizam o fósforo tanto para si como para a planta hospedeira, promovendo o crescimento das mesmas (HARA; OLIVEIRA, 2005).

Além dessas características apresentadas, essas bactérias não são patogênicas, podendo possuir aplicabilidade para serem utilizadas na limpeza de áreas contaminadas com compostos de petróleo, uma vez que não são prejudiciais ao meio ambiente e ao homem.

Diante disso, torna-se fundamental testar micro-organismos com capacidade para degradar ou que auxiliem na solubilização do petróleo como forma de minimizar os danos

causados por derrames desse poluente. Portanto, esse trabalho teve como objetivo testar a capacidade de isolados de rizóbios quanto à produção de biossurfactantes, baseando-se na redução da tensão superficial e aumento da atividade emulsificante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção de rizóbios

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Para a realização dos testes inseridos nesse trabalho, foram selecionados 36 rizóbios (Tabela 1), de um total de 120 isolados apresentados e testados no capítulo 1, onde se avaliou o crescimento dessas bactérias utilizando petróleo como fonte de carbono em meio líquido (YM).

Tabela 1 – Rizóbios selecionados e utilizados nos testes de biodegradabilidade e produção de biossurfactantes.

Rizóbio	Local (L) da coleta	Planta
INPA R546, INPA R548, INPA R555, INPA R557.	Ramal do Caldeirão, Terra firme, km 3	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R560, INPA R568, INPA R571, INPA-R573, INPA-R574,	Ramal do Caldeirão km3	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA-R598	Estrada de terra para Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA-R631	Jandira, propriedade São João	<i>Vigna unguiculata</i> (Feijão Caupi)
INPA-R667, INPA-R672, INPA-R674, INPA-R677.	Viveiro de Urucu	<i>Cedrelinga catenaeformis</i> (Cedrorana)

2.2. Teste qualitativo do colapso da gota de óleo

Neste teste, foram utilizados quinze isolados de rizóbios selecionados em testes anteriores, onde foram avaliados o potencial das cepas identificadas para produzir biossurfactantes mediante o teste qualitativo do colapso da gota segundo Bodour e Miller-Maier (1998), que consistiu da adição de 1 μL de suspensão microbiana padronizada a 10^5 UFC.mL^{-1} , dispostas separadamente em placas de multipoços previamente preenchidos com 2,0 mL de meio nutricional YMA líquido e 1 (uma) gota de petróleo. Após 1 minuto de reação, o resultado foi determinado visualmente. Quando houve o colapso da gota de

petróleo, formação de microemulsões, o resultado foi considerado positivo, avaliadas pela comparação com os poços em que foi inoculado 1 µL de água destilada estéril utilizada como controle negativo. O mesmo teste foi repetido substituindo o meio YMA pelo meio mineral INPA.

2.3. Produção de biosurfactantes

Biosurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

Para a realização desse teste foram cultivados quinze isolados bacterianos em 100 mL de meio mineral YMA líquido e meio mineral INPA, acrescido de 0,1 mL de petróleo de Urucu em erlenmeyers de 250 mL. Foram utilizados como controles, frascos contendo os mesmos meios com o petróleo, porém sem bactérias. Os frascos ficaram incubados a 30° C em agitador rotatório a 65 rpm para conferir aeração adequada, por um período de nove dias. Foi medido o pH inicial e final de cada amostra para verificar se houve interferência neste parâmetro químico.

2.4. Avaliação da atividade de emulsificação

Para a realização desse experimento foi utilizada a suspensão de rizóbios nos meio mineral SYM (sais do meio YMA – VINCENT, 1970; SOMASEGARAN; HOBEN, 1985) e INPA, acrescidos de petróleo ou tolueno. Para cada 3,5 mL da suspensão de bactérias, foram adicionados 3,5 mL de tolueno (experimento 1) e petróleo de urucu (experimento 2) em tubos de ensaio que foram agitado durante 2 minutos em vortex e deixados por 48 horas em repouso. Após esse tempo, foram efetuadas medidas da altura da camada de emulsão (CE), água em óleo e da Altura Total (AT) dos líquidos no tubo (Figura 1) e foi expressa em cm. O índice de emulsificação foi obtido através da fórmula: $IE(\%) = (CE/AT) * 100$, descrita por Cooper; Goldenberg (1987). A atividade de emulsificação óleo em água foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro com medida de 610 nm de absorvância, que foi medida em unidade (JOHNSON et al.,1992). A qualificação da atividade emulsificante foi feita de acordo com a convenção adotada por MATSUURA (2004, apud MOURA, 2012), Tabela 2.

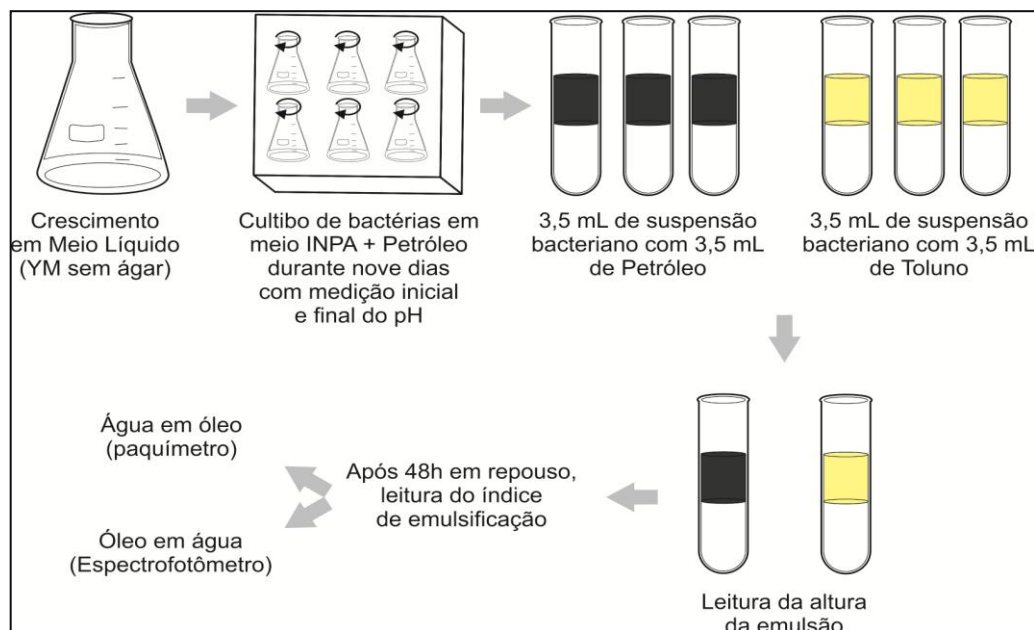


Figura 1 - Esquema ilustrativo da atividade de emulsificação.

Tabela 2 - Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante

Atividade emulsificante	Altura da emulsão (tipo água em óleo)	Densidade óptica 610 nm (tipo óleo em água)
Alta	≥ 2 cm	$\geq 1,2$ U
Moderada	de 1 a 1,9 cm	de 0,7 a 1,1 U
Baixa	< 1 cm	de 0,1 a 0,6 U

Fonte: Matsuura (2004, apud Moura, 2012).

2.5 Análise Estatística

Os ensaios foram realizados com análise de variância (ANOVA), pelo teste F, quando significativo, as comparações de médias foram realizadas pelos testes Tukey, todos os testes realizados ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste qualitativo do colapso da gota

Neste teste, as suspensões de rizóbios nas soluções salinas INPA e SYM, foram aplicadas ao petróleo com função de formar microemulsões, fazendo com que as moléculas polares da água repelida pela superfície hidrofóbica do petróleo interajam entre si. Foi adicionada água destilada estéril como controle no lugar dos micro-organismos.

A figura 2 representa as placas de multipoços onde foram realizados os testes, na qual na figura A foi utilizado o meio mineral INPA e na figura B, o meio mineral SYM e na horizontal de cada placa, enumerada de um a seis, cada número significa um rizóbio e na vertical, a quadruplicata do teste. Na placa 1 estão os rizóbios (INPA R546, INPA R548, INPA R555, INPA R557, INPA R560 e INPA R568), na placa 2 (INPA R571, INPA R573, INPA R574, INPA R631, INPA R598 e INPA R667), na placa 3 (INPA R672, INPA R674 e INPA R677) e na placa 4 o controle.

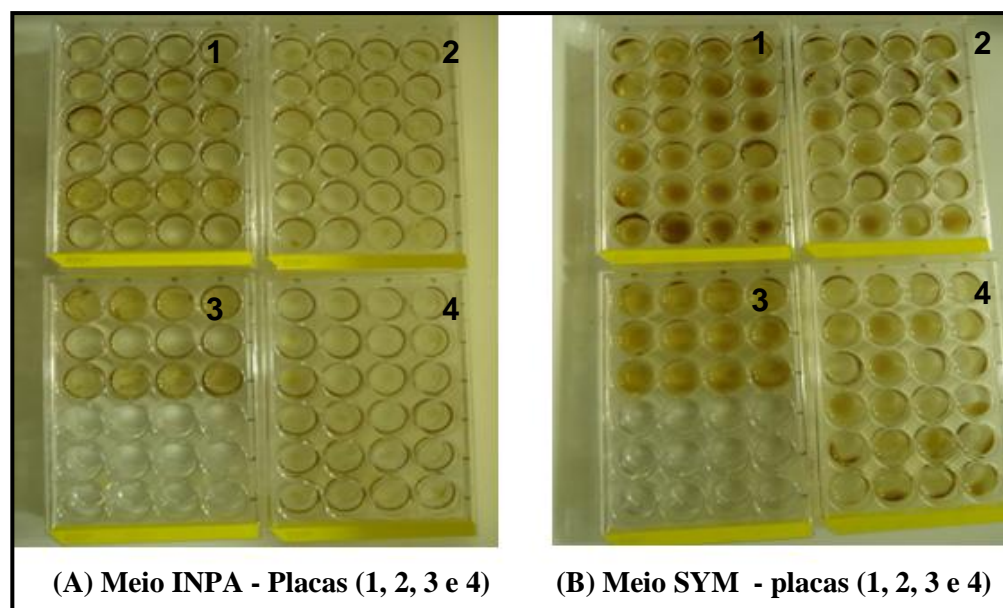


Figura 2 – Teste qualitativo do colapso da gota.

Foi verificado que após um minuto de observação, só houve formação de microemulsões na placa 1, com meio INPA, com exceção dos rizóbios INPA R548 e INPA R555; na placa 2 não houve formação de colapso da gota e na 3, formou com o INPA R674. Com relação ao meio salino SYM não se observou a formação de colapsos. Durante seis dias de avaliação houve formação de microemulsões em todas as placas do meio INPA e dispersão na placa controle. Com relação ao meio salino SYM, não houve formação de

microemulsões, mas houve dispersão do petróleo em todas as placas. Esses dados se mostraram positivos quanto ao potencial de produção de biossurfactantes com relação aos rizóbios inoculados no meio INPA (A), demonstrando que o meio de cultura influenciou nesse resultado, pois as placas B receberam o mesmo tratamento com diferencial do meio, não havendo com isso a formação das microemulsões.

A influência da fonte de carbono na produção de biossurfactante por diferentes micro-organismos tem sido bastante estudada. A literatura aponta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono (FONTES et al., 2008).

Silva et al. (2010) isolaram 112 colônias de bactérias a partir de sedimento de um manguezal do estado do Rio de Janeiro, e verificaram que 59 produziram biossurfactante (aproximadamente 53%). Percentuais de degradação ainda maiores foram descritos por Catter et al. (2007) quando descreveram que 13 cepas identificadas (12 espécies do gênero bacteriano *Acinetobacter*) e avaliadas pelo método qualitativo do colapso da gota. Todas (100%) mostraram capacidade de produzir surfactantes, sendo que sete (53,8%) excretaram-no para o meio de cultura.

Valores semelhantes já tinham sido descritos por Tugrul; Cansunar (2005), que utilizaram a mesma metodologia para demonstrar a capacidade de produção de biossurfactantes por micro-organismos coletados na Universidade de Hacettepe na Turquia. Safary et al. (2010) demonstram a capacidade de produção de biossurfactantes por 10 colônias de bactérias isoladas do Mar Cáspio no Irã. De acordo com Bodour et al. (2003), estudos sugerem que a produção destes metabólitos aumentam a disponibilidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), constituindo uma importante ferramenta para a sobrevivência destes organismos em ambientes contaminados.

3.2. Avaliação do potencial de produção de biossurfactante

3.2.1. Avaliação da atividade de emulsificação

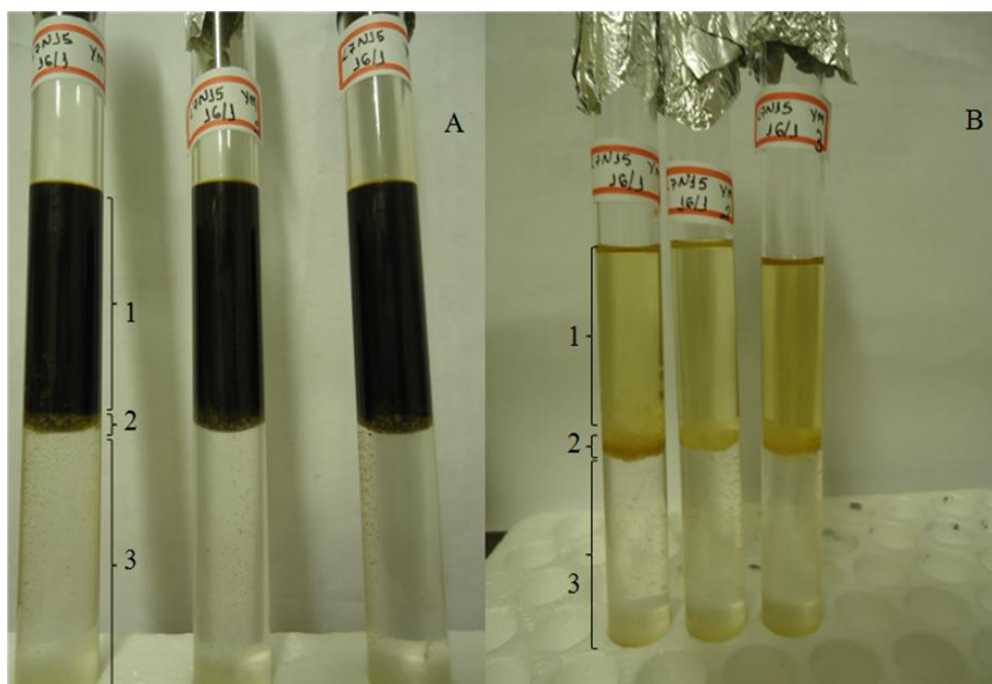
A partir de uma seleção prévia de rizóbios capazes de crescerem em meio líquido contendo petróleo, foi realizada uma investigação da capacidade desses isolados em produzir biossurfactantes e estes por poderem ser produzidos em substratos solúveis em água, foram cultivados em meios líquidos (SYM e INPA), contendo petróleo ou tolueno como fontes de carbono.

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto

a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica¹. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Muitos micro-organismos possuem capacidade enzimática para degradar hidrocarbonetos existentes no petróleo (ATLAS, 1995). Diante disso, o petróleo e o tolueno foram escolhidos para a realização desse teste, devido à predominância de hidrocarbonetos existentes no petróleo, pois estes são utilizados como indicadores de poluição e o tolueno é um dos compostos de petróleo mais tóxicos para os organismos podendo levá-los a morte e também é um contaminante comum em aquíferos.

O índice de emulsificação (IE) e a estabilidade da emulsão são importantes para avaliação do poder emulsificante (COSTA, 2005). A figura 3 mostra o potencial de produção de biosurfactantes e os tubos de ensaio são enumerados de acordo com as substâncias presentes, onde em A o número 1 é o petróleo, o 2 a camada emulsificada e 3 o meio com inoculo e em B, o 1 é o tolueno, 2 a camada emulsificada e 3 inóculo e meio. Após 48 horas de repouso tornou-se visível o índice de emulsificação ocorrido, pois entre a fonte de carbono e o sobrenadante formou-se uma espuma com aparência de bolhas. Em algumas amostras nas primeiras 8 horas já era possível a visualização da formação dessa espuma, demonstrando assim que os micro-organismos utilizados se adaptaram ao meio de cultura com as fontes de carbono utilizadas.



Obs.: (A) Meio SYM com petróleo e inóculo. 1 – Petróleo (óleo); 2 – Camada emulsificada; 3 – Meio mais inóculo (água). (B) Meio SYM com tolueno e inóculo. 1 – Tolueno (óleo); 2 – Camada emulsificada; 3 – Meio mais inóculo (água).

Figura 3 – Produção de Biossurfactantes.

A tabela 3 mostra a espessura da camada emulsificante formada pelos isolados de rizóbios. Essa camada representa a água dispersa dentro do óleo, onde se encontram os emulsificantes lipossolúveis (não iônicos, hidrofóbicos) (SANTOS, 2008). Quanto mais espessa for a camada emulsificante, maior será a quantidade de biossurfactantes hidrofóbicos produzidos. Todos os isolados de rizóbio testados produziram camadas significativas desses emulsificantes, conforme pode se observar pela comparação com a camada formada pelo tratamento controle. Segundo Matsuura (2004), as camadas emulsificantes formadas por todos esses isolados são classificadas como altas (bem espessas).

Ao se usar a solução salina SYM e petróleo como fonte de carbono, observou-se que os isolados INPA R674, R574 e R672 foram os que apresentaram as camadas mais espessas, com a menor sendo formada pelos isolado INPA R548. Com essa solução salina, mas colocando tolueno como fonte de carbono, o isolado INPA R674 e R672 se mantiveram como os melhores, mas agora, aparecendo o isolado INPA R571 para completar os três produtores das maiores camadas emulsificantes.

Ao se usar a solução salina INPA com petróleo, houve uma mudança, com as camadas emulsificantes mais espessas sendo formadas pelos isolados INPA R677, R667 e R674. Com o tolueno como fonte de carbono, o que formou a camada emulsificante mais espessa foi o isolado INPA R674, seguido pelas formadas pelos isolados INPA R546 e R677.

Tabela 3 – Espessura da camada emulsificante, de estirpes de rizóbios usando duas soluções de sais diferentes e tolueno e petróleo como fontes de carbono.

Bactéria	Solução salina SYM				Solução Salina INPA			
	Petróleo		Tolueno		Petróleo		Tolueno	
	Água em Óleo							
----- cm -----								
Controle	0,32	B	0,42	B	0,41	B	0,46	B
INPA R546	7,72	A	7,77	A	9,72	A	13,37	A
INPA R548	6,61	A	8,76	A	9,31	A	10,56	A
INPA R555	7,51	A	8,43	A	7,03	A	9,53	A
INPA R557	8,38	A	4,56	A	9,58	A	9,09	A
INPA R560	7,57	A	6,56	A	8,23	A	10,65	A
INPA R568	7,38	A	8,61	A	6,62	A	3,91	A
INPA R571	9,11	A	15,15	A	8,12	A	9,62	A
INPA R573	8,49	A	6,20	A	7,13	A	10,90	A
INPA R574	10,88	A	8,75	A	6,55	A	7,97	A
INPA R598	8,62	A	3,34	A	5,77	A	4,60	A
INPA R631	9,42	A	12,78	A	5,61	A	7,58	A
INPA R667	7,15	A	6,87	A	11,29	A	10,63	A
INPA R672	10,53	A	13,66	A	8,58	A	8,64	A
INPA R674	11,08	A	15,52	A	10,98	A	17,90	A
INPA_R677	8,64	A	12,90	A	13,36	A	12,18	A

Nota de Avaliação - Atividade Emulsificante: A (Alta), M (Moderada) e B (Baixa), segundo Matsuura (2004, apud Moura 2012).

Para avaliação da atividade emulsificante (densidade óptica, Tabela 4), foram medidos os valores de absorbância do óleo em água (O/A), que é referente ao sobrenadante, ou seja, a camada A3 e B3 (Figura 3), e essa atividade foi definida como a quantidade de biossurfactantes necessária para aumentar a absorbância em 1,0 unidade a 610 nm. Os biossurfactantes encontrados nessa camada são considerados como hidrossolúveis (iônicos, hidrofílicos) (SANTOS, 2008). Dos isolados tratados com solução salina YM e o petróleo como fonte de carbono, cinco apresentaram alto valor de absorbância (INPA R555, R571, R631, R672 e R674), variando entre 1,39 U a 2,18 U. Ao se colocar o tolueno como fonte de carbono, com a mesma solução, se apresentaram com

melhores valores o INPA R571, R631, 672 e 674, com valores de 1,46 U a 2,31 U. Quando se usou a solução salina INPA com petróleo, não houve quantidades elevadas de emulsificantes. Com relação ao mesmo meio com tolueno, o INPA R672 produziu uma quantidade elevada (1,26 U), conforme Matsuura (2004).

Tabela 4 – Densidade Óptica - Atividade emulsificante de estirpes de rizóbios usando duas soluções de sais diferentes e tolueno e petróleo como fontes de carbono.

Rizóbios	Sais do Meio YM				Solução Salina INPA			
	Óleo em água							
	Petróleo		Tolueno		Petróleo		Tolueno	
-----U-----								
Controle	0,42	B	0,14	B	0,42	B	0,77	B
INPA_R546	0,12	B	0,28	B	0,53	B	0,17	B
INPA R548	0,08	B	0,19	B	0,72	M	0,28	B
INPA R555	1,51	A	0,32	B	0,55	B	0,18	B
INPA R557	0,14	B	0,32	B	0,57	B	0,90	M
INPA R560	0,28	B	0,78	M	0,68	B	0,28	B
INPA R568	0,07	B	0,12	B	0,38	B	0,64	B
INPA R571	2,07	A	1,90	A	0,45	B	0,16	B
INPA R573	0,15	B	0,52	B	0,33	B	0,17	B
INPA R574	0,05	B	0,39	B	0,43	B	0,55	B
INPA R598	0,10	B	0,47	B	0,14	B	0,26	B
INPA R631	2,18	A	2,31	A	0,34	B	0,47	B
INPA R667	0,35	B	0,21	B	0,11	B	0,55	B
INPA R672	2,07	A	2,23	A	0,16	B	1,26	A
INPA R674	1,39	A	1,46	A	0,50	B	0,19	B
INPA R677	1,06	M	0,23	B	0,42	B	0,95	M

Nota de Avaliação - A (Alta), M (Moderada) e B (Baixa), segundo Matsuura (2004, apud Moura 2012)

Obs. o índice de emulsão foi significativa com relação à fonte de carbono utilizada por meio da avaliação dos tratamentos (isolados) e dos tempos.

Ao se colocar os dados de forma a comparar a camada de emulsificantes hidrofóbicos considerando-se as soluções salinas (Tabela 5), observou-se que no geral, não houve influência das soluções na produção dessas substâncias pelos rizóbios, mas uma análise mais detalhada indica que houve uma variação entre os isolados testados, com a maioria deles mostrando camadas mais delgadas quando se usou a solução salina INPA. As poucas exceções se referem aos isolados INPA R571, R672, R574, R631 e R568, cujas camadas usando a solução salina SYM foram mais delgadas do que as formadas usando-se a solução INPA.

Tabela 5 – Índice de Emulsão (Água em Óleo).

Rizóbios	Soluções Salinas			
	INPA		SYM	
-----cm-----				
INPA R674	14,44	a A	13,306	AA
INPA R677	12,77	aAB	10,770	aABCD
INPA R546	11,55	aABC	7,74	bBCDE
INPA R667	10,96	aABCD	7,01	bDE
INPA R548	9,93	aBCDE	7,68	bCDE
INPA R560	9,44	aBCDE	7,06	bDE
INPA R557	9,33	aBCDE	6,47	bE
INPA R573	9,01	aBCDEF	7,34	aCDE
INPA R571	8,87	bBCDEF	11,63	aAB
INPA R672	8,61	bCDEF	12,10	AA
INPA R555	8,28	aCDEF	7,97	aBCDE
INPA R574	7,26	bDEF	9,81	aABCDE
INPA R631	6,59	bEF	11,10	aABC
INPA R568	5,27	bF	7,99	aBCDE
INPA R598	5,18	aF	5,98	aE
Controle	0,43	aG	0,37	aF
Médias dos meios	8,62	X	8,40	X

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, (minúscula na linha, para meios) e (maiúscula na coluna, entre os rizóbios) ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Ao se analisar os dados para se comparar ambas as fontes de carbono (tolueno ou petróleo) (Tabela 6), observou-se que houve diferença entre essas fontes apenas quando se usou os isolados INPA R674, R571, R631 e R598, que com exceção do último, formaram camadas mais delgadas quando se usou o tolueno, sugerindo que suas enzimas degradadoras tem certa preferência para esse subproduto. Essas diferenças refletiram estatisticamente ao se verificar qual das duas fontes de carbono formou camadas mais espessas de emulsificantes hidrofóbicos, com o tolueno sendo usado pelos rizóbios para formar uma camada de espessura média de 8,98 cm, que foi significativamente maior do que a formada quando se usou o petróleo (8,06 cm).

Tabela 6 – Índice de Emulsão (Água em Óleo)

Rizóbios	Fontes de Carbono			
	Tolueno		Petróleo	
-----cm-----				
INPA R674	16,71	AA	11,03	BA
INPA R677	12,54	aB	11,00	AA
INPA R672	11,15	aBC	9,56	aAB
INPA R667	8,75	aBCDE	9,22	aAB
INPA R557	6,83	aDEF	8,98	aAB
INPA R546	10,57	aBCD	8,72	aAB
INPA R574	8,36	aCDE	8,72	aAB
INPA R571	11,89	aBC	8,61	bAB
INPA R548	9,66	aBCDE	7,96	aAB
INPA R560	8,60	aBCDE	7,90	aAB
INPA R573	8,55	aCDE	7,81	aAB
INPA R631	10,18	aBCDE	7,51	bAB
INPA R555	8,98	aBCDE	7,27	aAB
INPA R598	3,97	bFG	7,19	aAB
INPA R568	6,26	aEF	7,00	a B
Controle	0,44	aG	0,36	a C
Médias das Fontes	8,98	X	8,05	Y

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, (minúscula na linha, dentro de cada rizóbio) e (maiúscula na coluna, dentro de cada fonte e entre os Rizóbios) ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Ao se comparar as duas soluções salinas quanto às quantidades dos emulsificantes hidrossolúveis formados na camada óleo em água (Tabela 7), observou-se que no geral, a solução SYM proporcionou maior quantidade desses surfactantes que a solução INPA, uma vez que individualmente, a maioria dos isolados produziu mais ao se usar aquela solução. As exceções ficaram para os isolados INPA R557, R574, R548 e R568, que produziram mais surfactantes ao usarem a solução INPA.

Tabela 7 - Índice de Emulsão (óleo em água).

Rizóbios	Soluções salinas			
	INPA		SYM	
-----U-----				
INPA R631	0,40	bABC	2,24	aA
INPA R672	0,71	bA	2,15	aA
INPA R571	0,30	bBC	1,98	bEF
INPA R674	0,34	bABC	1,42	aB
INPA R555	0,36	bABC	0,77	aC
INPA R677	0,67	aAB	0,64	aCD
INPA R560	0,48	aABC	0,52	aCDE
Controle	0,59	aABC	0,28	bDEF
INPA R667	0,33	aABC	0,28	aDEF
INPA R573	0,24	AC	0,26	aDEF
INPA R598	0,20	AC	0,23	aEF
INPA R557	0,73	AA	0,23	bEF
INPA R574	0,49	aABC	0,22	bEF
INPA R546	0,35	aABC	0,20	aEF
INPA R548	0,49	aABC	0,13	bEF
INPA R568	0,43	aABC	0,08	bF
Médias dos meios	0,44	Y	0,73	X

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, (minúscula na linha, dentro de cada rizóbio) e (maiúscula na coluna, dentro de os Rizóbios) ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Ao se comparar as fontes de carbono nessa camada de emulsificantes hidrofílicos (Tabela 8), observou-se que no geral, não houve diferença entre se adicionar tolueno ou petróleo, mas uma análise mais detalhada indica que em 11 do total de 15 isolados não houve, de fato, diferença na quantidade de produção dessas substâncias surfactantes ao se usar tanto um quanto o outro produto orgânico. Mas os isolados INPA R672, R557 e R598 produziram mais quando se usou tolueno e, o isolado INPA R555 produziu mais quando se usou o petróleo como fontes de carbono.

Tabela 8 – Índice de Emulsão (Óleo em Água)

Rizóbios	Fontes de Carbono			
	Tolueno		Petróleo	
-----U-----				
INPA R571	1,03	aBC	1,260	AA
INPA R631	1,39	aAB	1,25	AA
INPA R672	1,74	AA	1,11	bAB
INPA R674	0,82	aCD	0,94	aAB
INPA R555	0,25	bE	0,89	aAB
INPA R677	0,59	aDE	0,72	aBC
INPA R560	0,53	aDE	0,48	aCD
INPA R548	0,23	aE	0,40	aCDE
INPA R557	0,61	aDE	0,35	bCDE
INPA R546	0,22	aE	0,32	aDE
INPA R574	0,47	aDE	0,24	aDE
INPA R667	0,38	aE	0,23	aDE
INPA R568	0,30	aE	0,22	aDE
INPA R573	0,34	aE	0,16	aDE
INPA R598	0,36	aE	0,07	bE
Controle	0,45	aDE	0,07	b E
Médias das Fontes	0,61	X	0,70	Y

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, (minúscula na linha, dentro de cada rizóbio) e (maiúscula na coluna, dentro de os Rizóbios) ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que os isolados de rizóbios testados produziram mais substâncias biosurfactantes do que alguns outros citados na literatura.

Jacobucci et al. (2009), ao testar a produção de biosurfactantes por *Pantoea agglomerans*, utilizando o querosene como fonte de carbono, obteve produção de uma camada estável de 2,5 cm de água em óleo e a atividade do tipo óleo em água, foi de 0,15 U. Com o *Planococcus citreus*, em caldo de cultura, tendo o azeite como fonte de carbono, produziu 1,079 U de óleo-em-água e 0,2 cm de água-em-óleo.

Estudos realizados para verificar a atividade emulsificante por culturas puras de *Corynebacterium aquaticum*, mista de *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus* sp., mista de *Corynebacterium* sp., *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides* e, pura de *Bacillus subtilis* mostraram que surfactantes do tipo óleo em água (hidrossolúveis) de 0,15 U a 13,72 U e do tipo água em óleo (lipossolúveis) de 0,54 cm a 2,47 cm (PINTO; COSTA, 2009).

Barros et al. (2008), através de uma análise inicial do índice de emulsificação de hidrocarbonetos (pentano, benzeno, Hexano, octano, tecano, tolueno, diesel e gasolina),

verificaram que todas as emulsões testadas apresentaram altos valores do IE. Os valores com maiores diferenças ocorreram com o decano (1,25), tolueno (2,52) e diesel (1,24). Estes valores de emulsificação são considerados baixos quando comparados com os obtidos por Luz et al. (2011) ao estudarem a biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletados em amostras de água residuária nas proximidades de uma distribuidora de combustíveis situada no bairro Nacional, zona norte da cidade de Porto Velho-RO. O surfactante produzido pelo consórcio apresentou um índice de emulsificação de 53%, quando o diesel foi utilizado como agente apolar.

Outros micro-organismos, como algumas espécies de fungos, com potencial de degradação de hidrocarbonetos também foram testados. Colla et al. (2012) verificaram que as maiores atividades emulsificantes variaram entre 7,2 a 7,9 EU (Unidades de Emulsificação) na espécie *Aspergillus fumigatus*. Luna et al. (2012) estudaram a capacidade da espécie de fungo *Candida sphaerica* na remoção de poluentes de areia contaminada com óleo de motor. Estes autores demonstraram que após 144h de cultivo com duas fontes de carbono, a espécie de fungo *Candida sphaerica* mostrou a remoção de 95% do óleo contaminante.

A produção de biosurfactantes é de grande importância na biorremediação, pois essas moléculas tornam o contaminante mais biodisponível. Portanto os trabalhos citados são de grande relevância para a solução de problemas causados pelo derramamento de petróleo.

Diversos fatores ambientais (pH, fonte de carbono, temperatura, água, entre outros), podem influenciar na utilização de poluentes pelos micro-organismos. O pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos micro-organismos (JACQUES et al., 2007).

De acordo com os resultados obtidos, observando-se que o pH (Figura 4), variou ao se usar o meio INPA com valores iniciais de 5,32 a 6,93 e no meio SYM de 6,22 a 7,47. Após 48 horas foi observado o pH final com relação ao meio INPA de 4,07 a 6,15 e SYM de 4,78 a 7,73 e todos contendo petróleo como fonte de carbono com produção de biomassa, indicando com isso, neutralidade.

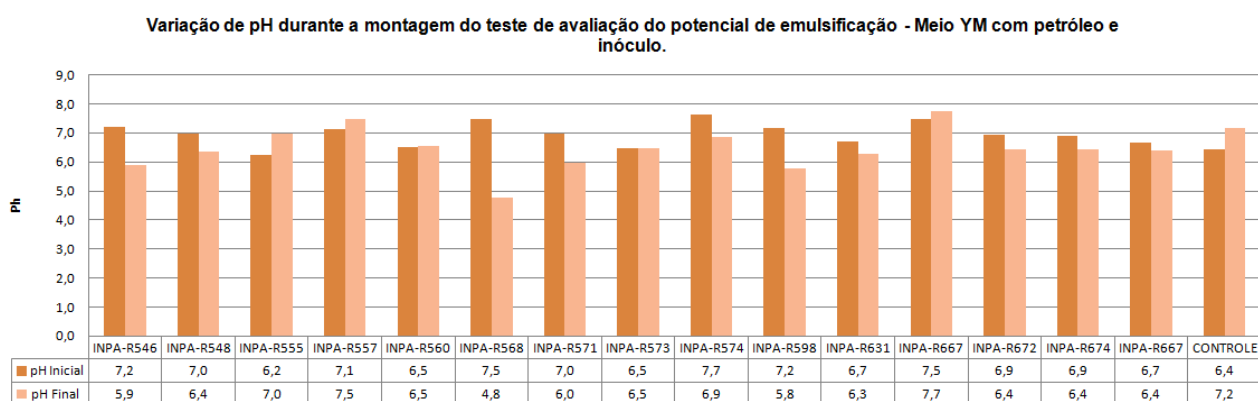
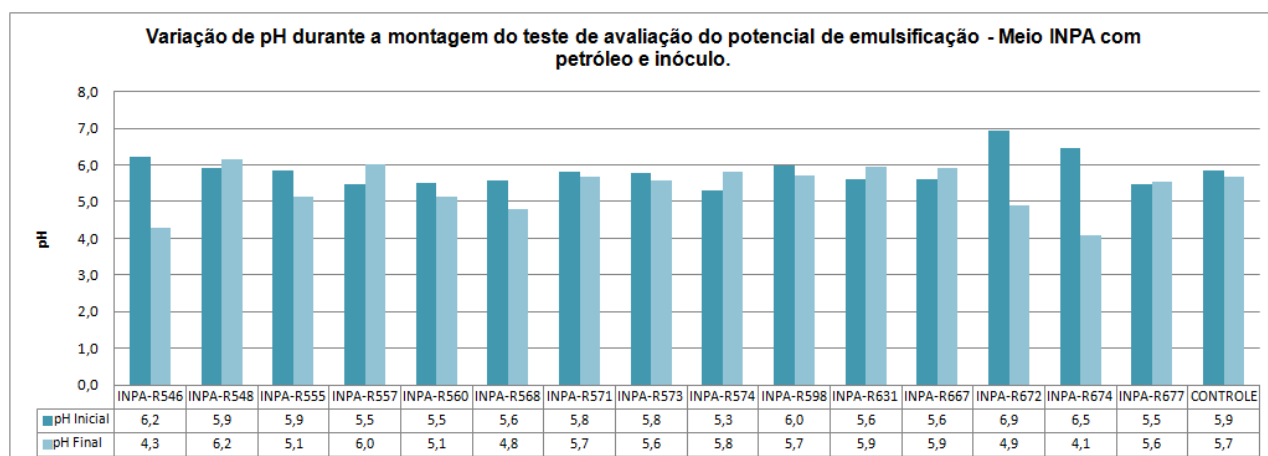


Figura 4 – pH inicial e final das amostras submetidas ao teste de avaliação de produção de biossurfactantes.

O pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos micro-organismos (JACQUES et al. 2007).

Micro-organismos degradantes de petróleo são mais abundantes em ambientes com pH entre 6,0 e 8,0, sendo os fungos mais resistentes às condições de pH ácido (LEAHY; COLWELL, 1990).

Algumas características apresentam vantagens sobre os surfactantes convencionais como tolerância à temperatura, pH e força iônica. Alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídico de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 h e pH entre 5 e 12 (NITSCHKE; PASTORE 2002). De acordo com

esses parâmetros, mesmo havendo variações de pH entre 4 e 7 nas amostras com os meios salinos (INPA e SYM) e com a fonte de carbono (petróleo), os valores obtidos estão dentro da faixa de pH ideal.

4. CONCLUSÕES

Todos os 15 rizóbios testados apresentaram habilidade de biodegradar petróleo e tolueno quando usados como fontes de carbono.

No teste do colapso da gota, os rizóbios utilizaram a mesma fonte de carbono com meios diferentes (INPA e SYM) e formaram microemulsões quando se usou o meio salino INPA, mas não quando se usou o meio SYM.

Na avaliação da atividade de produção de biossurfactantes, os valores do índice de emulsificação água em óleo foram altos, demonstrando o potencial dos micro-organismos em produzir biossurfactantes, apesar dos valores de baixos a médios adquiridos no índice de emulsificação de óleo em água.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMASSU, W.; KORUS, R. A. Engineering of biorremediation processes: needs and limitations. **Crawford, R.; Crawford D. (Editors)**, Cambridge University Press: 13-34, 1996.

AHMAD, D.; MEHMANNAVAZ, R.; DAMAJ, M. Isolation and Characterization of Symbiotic N₂-Fixing *Rhizobium meliloti* from Soils Contaminated with Aromatic and Chloroaromatic Hydrocarbons: PAHs and PCBs. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 39. N. I, p. 33-43. 1997.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2.ed. New York: Academic. 1999. 453p.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE Fate of Spilled Oil in Marine Waters: Where does it go? What does it do? How do Dispersants Affect it? In: API Publication Number 4691, USA. 1999.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e seus Derivados. **Eclética Química**. São Paulo, 35 – 3:43, 2010.

ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.31, p. 178-182, 1995.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Sussex**, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BARROS, C.F.F. et al. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, n 4, p. 979-985, out.-dez. 2008.

BARROS, J. Y. et al. Indicadores de Qualidade de solos em Área de Mineração e Metalurgia de Chumbo. I – Micro-organismos. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** vol. 34 no.4 Viçosa July/Aug. 2010.

BASTOS, A. C. S; FREITAS, A. C. Agentes e Processos de Interferência, degradação e dano ambiental. In: CUNHA, S. B; GUERRA, A. J. T. **Avaliação e perícia ambiental**. 10.ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, p. 68. 2010.

BENNET, J. W., FAISON, B. D. Use of fungi in Biodegradation. Em: Manual of Environmental Microbiology. **Ed. Christon J. Hurst, J. ASM Press**, Washington D. C., USA, p. 758-765, 1997.

BERNETH, L. et al. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Miner. Metall. Proc.**, 17:105-111, 2000.

BERTHE-CORTI, L.; FETZNER, S. **Acta Biotechnology**, 3-4, 299-336. 2002.

BODOUR, A. A.; MAIER, R. M.. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**. Volume 32, Issue 3, Pages 273-280, 1 May 1998.

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3280–3287. 2003.

BUENO, M. S.; SILVA, N. A.; CRUZ, G. H. C. Estudo da Produção de Biossurfactante em Caldo de Fermentação. **Quím. Nova**, Vol. 33, No. 7, 1572-1577, 2010.

CALVET, R, L Sol Propriétés et Fonctions, Tome 1 – Constitution ET Structure phénomènes aux interfaces. **Edition France agricole**, 2003.

CASTIGLIONI, L. G.; BERTOLIN, E. T.; COSTA, V. A. J. Produção de Biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* Utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato. **Quím. Nova**, Vol. 32, No. 2, 292-295, 2009.

CATER, T.K.M. et al. Bactérias isoladas de mangues do Rio Cocó e do Riacho das Guaribas (CE) e seu potencial na egradação de derivados e constituintes de petróleo, **Geochim**, Brasil, v. 21, n 1, p. 140 - 150, 2007.

CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. Capítulo X - Investigação para Biorremediação. 77p. 2004.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. [online]. Brasil, 2010. Disponível em:<<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em: 13 jan. 2010.

CHAGAS JUNIOR, A. F. **Características Agronômicas e Ecológicas de Rizóbios Isolados de Solos Ácidos e de Baixa Fertilidade da Amazônia**. 172 f. Tese (Programa Multi-Institucional de Pós Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas. Manaus/ AM. 2007.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et AL. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, p. 359-366, 2010.

CHEN, W. X.; WANG, E. T.; KUYKENDALL, L. D. Genus *Mezorhizobium*, Family Photobacteriaceae. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, George Garrity (Ed.), Springer-Verlag, 2 ed., v. 2, p. 403-408. 2005.

COELHO, F. J. R. C. et AL. PAH Degrading Bacteria in an Estuarine System. **Biological Responses to Contaminants**, p. 77–87, 2010.

COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M.; GIL, A. S. L. Biossorção De Cádmiio E Produção De Biossurfactantes Por Fungos Filamentosos Em Fermentação Submersa. **Revista CIATEC – UPF**, v.4, n. 1, p 1-10, 2012.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2009). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em 08 de abr. 2013.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, 224-229 p. 1987.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. 2005. 87 p. Dissertação - (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2005.

CRAPEZ, M. A. C. et al. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, 30: 170. 2002.

CRUZ, G. F.; MARSAIOLI, A. J. Processos Naturais de Biodegradação do Petróleo em Reservatórios. **Quim. Nova**, V. 35, N. 8, p. 1628-1634, 2012.

DE VOS, P.; TRUPER, H. G.; TINDAL, B. J. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes Xth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meetings, 28, 29 and 31 July and 1 August 2002, Paris, France. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 55, p. 525-532, 2005.

DUARTE, W. M. **Identificação de Actinomicetos Isolados de Solo Impactado com Resíduos Petroquímicos e Seleção de Potenciais Degradadores de Misturas de Diesel e de Biodiesel**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, RS: UFRGS, 2012.

EUZÉBY, J. P.; KURO, T. Corrigenda to the Validation Lists. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 51, p. 1933-1938, 2001.

FARIAS, R. F.; Introdução à química do Petróleo. Rio de Janeiro: **Ciência Moderna**, 1º Ed., 106 p, 2008.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. et al. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios de isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, DF, n. 45, p. 1.465-1.471, 2010.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. et al. Poly- β -hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] root nodules. **Applied Biochemistry and Biotechnology, Amsterdam**, n. 163, p. 473-484, 2011.

FIORAVANTI, K. L.; CELINO, J. J.; ROSSI-ALVA, J. C. Isolamento, Seleção e Identificação De Microorganismos Degradadores De Petróleo E Seus Derivados Em Sedimentos De Manguezais Contaminados. **Cadernos de Geociências**, v. 9, n. 2, novembro 2012

FONTES, C. G.; AMARAL, F. F. P.; COELHO, Z. A. M. Produção de biosurfactante por levedura. **Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, Química Nova, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GARNIER, P.M. et al. Metabolic degradation of methyl tert-butyl ether by a soil consortium: effect of components present in gasoline. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 46:79-84, 2000.

GAYLARDE, C. C., BELLINA, L. D. M., MANFIO, P. G. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Meio Ambiente. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. N. 34, 2005.

HANSON, K. G., DESAI, J. D., DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Kew, v.7, n.10, p. 745-748, 1993.

HANSON R, S; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiol Ver**, v. 60, p. 439–471. 1996.

HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 40. N.7. p. 667-672. Jul. 2005.

HARAYAMA, S. et al. Petroleum biodegradation in marine environments. **J. Molec. Microbiol. Biotechnol**, v.1, n.1, p. 63-70, 1999.

HAWERROTH, F. J.; CRESTANI, M.; SANTOS, J. C. P. Desempenho de cultivares de feijoeiro sob inoculação com Rhizobium e relação entre os caracteres componentes do rendimento de grãos. Semina. **Ciências Agrárias** (Impresso), v. 32, p. 897-908, 2011.

IPAAM Avalia grau do derramamento de petróleo no Rio Negro para definir multa. Publicado 27 de Março, 2013, 5h32. **Jornal Amazônia na Rede**. WWW.amazonianarede.com.br. Acessado em 03.04.2013

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JACOBUCCI, F. D. Reducing COD level on oily effluente by utilizing biosurfactant-producing bactéria. **Braz, arch. Boil. Technol**, Curitiba, v. 52, n. 4, July/Aug. 2009.

JESUS, E. D. C. et al. Leguminosae nodulating bacteria diversity from three different land use systems in Brazilian Western Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

JOHNSON, V. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **London: Biotechnology Letters**. v. 6, 487 – 490 p. 1992.

KAMPFEER, P. et al. *Chelatobacter heintzii* (Auling et al. 1993) is a later subjective synonym of *Aminobacter aminovorans* (Urakami et al. 1992). **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 52, p. 835-839, 2002.

KESTER, A. S. AND FOSTER, J. W. Diterminal oxidation of long-chain alkanes by bacteria. Received for publication 19 November 1962.

KOLESNIKOVAS, C.; OLIVEIRA, E.; DUARTE, U. Avaliação de Risco Toxicológico para Hidrocarbonetos Totais de Petróleo em Forma Fracionada Aplicada à Gestão e Monitoramento de Água Subterrânea em um Complexo Industrial. **Águas Subterrâneas**, v.23, n.01, p.31-44, 2009.

KUYKENDALL, L. D.; DAZZO, F. B. Genus *Allorhizobium*. In Brenner, Krieg, Staley and Garrity (Editors), The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilon proteobacteria, The Proteobacteria, Part C, Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**, Springer, v.2, n. 2, p. 345-346, 2005.

KUYKENDALL, L. D. et al. Genus *Rhizobium*, a highly divergent genus in a revised family, the Rhizobiaceae. In: Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**, George Garrity (Ed.), Springer, 2 ed., v.2, p. 324-340, 2005.

LAI, C. C. et al. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 609-614, 2009

LEE K.; LEVY M. Biodegradation of Petroleum in the Marine Environment and its Enhancement. **Advence Environmental Science and Technology**. 22. 217-43. 1988.

LEAHY, L. L.; COLWELL, R. R.; **MICROBIOL. REV.** 54, 305; 1990

LIMA, D. C. R. **Micro-organismos Degradadores de Petróleo Isolados de Solos Rizosféricos da Província Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas**. 71 f. Dissertação de Mestrado do Curso de Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, 2010.

LINDSTRÖM, K. et al. Potential of the *Galega – Rhizobium galegae* System for Bioremediation of Oil-Contaminated Soil. *Food Technol. Biotechnol.* v. 41, n. 1, p. 11–16, 2003.

LIU, J; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of the China. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v.28, n.5, p.465-77, 2005.

LUNA, J. M. et al. Properties of the Biosurfactant Produced by *Candida Sphaerica* Cultivated in Low-Cost Substrates. *Chemical Engineering Transactions*, v. 27, p. 67-72, 2012.

LUZ, C. C. et al. Estudos De Biodegradação De Óleo Diesel Por Consórcio Microbiano Coletado Em Porto Velho – Ro, Amazônia. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 775-779, 2011.

MANIASSO, N. AMBIENTES MICELARES EM QUÍMICA ANALÍTICA. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARIANO, P. A.; ANGELIS, F. D.; BONOTTO, M. D. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. *ENG. Sanit. Ambiental*, Vol. 12 – N^o3, 296-304, jul/set 2007.

MARQUÉS A. M. et al. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chemistry and Physics of Lipids*, 158 110–117, 2009.

MARTENS, M. et al. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal Systematics Evol. Microbiology*, v. 58, p. 200-214, 2008.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 29(5/6):1005-1010, 1997.

MARTINS, O. E. M. Desenvolvimento sustentável e Transporte Marítimo. **Verba Juris** (UFPB), v. 6, p. 249-268, 2007.

MATSUURA, A. B. J.; **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

MEDEIROS, E. V. et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, Maringá, 2009.

MIRANDA, R. C. et al. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco –Brazil. **Brazilian Archives of Biology And Technology**. V.50, n. 1, pp.147-152, January 2007.

MORAES, B. E.; TORNISIELO, T. M. S. Biodegradation of Oil Refinery Residues Using Mixed- Culture of Microorganisms Isolated from a Landfarming. **Brazilian archives of Biology and technology.**, v.52, n. 6, p. 1571-1578, 2009.

MOURA, G.C.D.; **Efeitos da Adição de Nutrientes nos Solos Contaminados por Petróleo no Processo de Biorremediação.** 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2012.

NANO, G.; BORRONI, A.; ROTA, R. Combined slurry and solid phase bioremediations of diesel contaminated soil. **J. Hazard. Mater.**, B100:79-94, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002

OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, H. P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia** 30:203 – 208, 1999.

PEREIRA, N. J; GOMES, E. B de; SORIANO, A. U. Biodegradação de hidrocarbonetos. Rio de Janeiro, 76p. **Séries em biotecnologia**, v.3, 2009.

PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; Moldowan, J. M. The Biomerker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History. vol. 1, 2nd Ed, **Cambridge University Press**, 2005

PINTO , M. H.; MARTINS , R. G; COSTA , J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v.32, n.8, p. 2104-2108, 2009.

POONTHRIGPUN, S. et al. Novel Intermediates of Acenaphthylene Degradation by *Rhizobium* sp. Strain CU-A1: Evidence for Naphthalene-1,8-Dicarboxylic Acid Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6034–6039, 2006.

RABUS , R. et al. Anaerobic Initial Reaction of n-Alkanes in a Denitrifying Bacterium: Evidence for (1-Methylpentyl)succinate as Initial Product and for Involvement of an Organic Radical in n-Hexane Metabolism **Journal Bacteriology**. v. 183, p. 1707-1715, 2001.

REGINATTO, C; COLLA, M. L.; THOMÉ, A. Biorremediação de Resíduos Oleosos em Solos. **Revista CIATEC – UPF**, vol. 3 n. 2, p.p.19-31. 2011

ROCHA, S. R. O. **Avaliação de Diferentes Processos Oxidativos Avançados no Tratamento de Resíduos de Petróleo**. 101 f. Tese (Programa de Pós Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal/ RN, Setembro 2010.

SAFARY, A. et al. Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria from Caspian Sea. **Biotecnologia**, v. 9, p. 378-382, 2010.

SANTOS, C. E. R. S. et al. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.4, p.249-256, out.-dez, 2007.

SANTOS, V. L. **Emulsificantes – modo de ação e utilização nos alimentos**. Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, RS. 30p. 2008.

SANTOS, H. F. et al. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, air, soil pollut.**, v. 216, p. 329-350, 2011.

SAVAGE, K. N. et al. Biodegradation of low-molecular-weight alkanes under mesophilic, sulfate-reducing conditions: metabolic intermediates and community patterns. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 72, p. 485–495, 2010.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal Genetic Applied Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 79-155, 2003.

SESSITSCH, A. et al. Advances in Rhizobium Research. **Crit Rev Plant Sci**, v. 21, p. 323-378, 2002.

SETUBAL, J. C. The Genomics of Agrobacterium: Insights into its Pathogenicity, Biocontrol and Evolution. *Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology*. **Caister Academic Press**, 2009.

SILVA, A. M. F. D.1,2. et al. Degradação De Petróleo E Produção De Biossurfactante Por Bactérias Isoladas A Partir De Sedimento De Um Manguezal Do Estado Do Rio De Janeiro. In: **III Congresso Brasileiro de Oceanografia**, Rio Grande (RS), 17 a 21 de maio de 2010.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. NifTAL Project and MIRCEN, Hawaii, 365p. 1985.

SOUZA, L. A. G.; SILVA, M. F.; MOREIRA, F. W. Capacidade de nodulação de 100 leguminosas da região Amazônica. **Acta Amazônica**, Manaus, AM, v. 24, n. 1-2, p. 9-18, 1994.

SOUZA, D. B. et al. Estudo de micro-organismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. **Revista de estudos ambientais**, Blumenau, v. 12, n. 2, p. 38-46, 2010.

SOUZA, M. P.; MOREIRA, S. M. F. Potencial Econômico da Inoculação de Rizóbios em Feijão-Caupi na Agricultura Familiar: Um Estudo de Caso. **Em Extensão**, Uberlândia, vol. 10. N. 2, p 37-54, jul./dez. 2011.

SPRENT, J. I. Nodulation in legumes. Kew: The Cromwell Press. 146 p. 2001.

TABATABAEE, A. et al. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. **Iranian J Env Health Sci Eng**. v. 2, n. 1, p. 6-12, 2005.

TAMBOURGI E. B. et al. Estudo da produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* utilizando petróleo como substrato. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 17, 2008, Recife. Anais... Recife: UFPE, 2008.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRAVITOL, A. D. Degradação e Biorremediação de Compostos de Petróleo por Bactérias: Revisão. **Oecologia Australis** 1404.12. 2010.

TUGRUL, T.; CANSUNAR, E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 21, p. 851–853, 2005.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbial Molecular Biology Reviews**. v. 67, n.4, p. 503-549, 2003.

VIDALI, M. Bioremediation. **An overview. Pure Appl. Chem.**, 73:1163-1172, 2001

VINCENT, J. M. **A manual for practical study of root nodule bacteria**. IBP Handbook N. 15. Blackwell Scient. Publ. 140p. 1970.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodules bacteria**. Oxford: Brackwell Scientific Publications, 1979.

WANG, L. et al. Isolation and characterization of novel thermophilic degrading long-chain n-alkanes. **Extremophiles**. v. 10, p. 347 – 356, 2006.

WEI, G. et al. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region. **Journal of Hazardous Materials**, 151, 111-117, 2008

WEN, Y. et al. *Rhizobium phenanthrenilyticum* sp. nov., a novel phenanthrene-degrading bacterium isolated from a petroleum residue treatment system. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, n. 57, p. 319–329, 2011.

WENTZEL, A. et al. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1209-1221, 2007

WEON, H. Y. et al. *Kaistia soli* sp. Nov., isolated from a wetland in Korea. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, vol. 58, p. 1522-1524, 2008.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E. & GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo porbactérias: revisão. **Oecologia Australis**. v. 14, n. 4, p. 1010-1020, Dezembro, 2010.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRAVITOL, A. D. Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus derivados. **Revista Virtual Química**. 3 (2), 78-87. 2011

XIONG, Y. et al. Effects of temperature on oil-degrading microbial communities and the biodegradation of petroleum. 5^a Conferência Internacional sobre Bioinformática e Engenharia Biomédica (iCBBE). 2011.

YANG, C. F.; LEE, C. M. Enrichment, isolation, and characterization of 4-chlorophenol-degrading bacterium *Rhizobium* sp. 4-CP-20. **Biodegradation**, Taiwan, v. 19, p. 329–336. 2008.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. **Agronomie**, v. 21. n. 6, p. 569-576.
2001

ANEXOS

Anexo 1 – Índice médio da Atividade emulsificante (água em óleo)

Rizóbios	Meio INPA com Petróleo			Meio INPA com Tolueno		
	Médias	Valor de T	Valor de P	Médias	Valor de T	Valor de P
INPA_R546	9,310	5,804	0,0001	6,347	4,635	0,0001
INPA_R548	8,897	5,547	0,0001	8,333	5,257	0,0001
INPA_R555	6,623	4,129	0,0020	8,003	5,049	0,0001
INPA_R557	9,170	5,717	0,0001	4,140	2,612	0,118 ns
INPA_R560	7,823	4,877	0,0001	6,133	3,869	0,0050
INPA_R568	6,213	3,874	0,0050	8,187	5,165	0,0001
INPA_R571	7,707	4,805	0,0001	13,730	8,662	0,0001
INPA_R573	6,717	4,187	0,0020	5,777	3,644	0,0100
INPA_R574	6,143	3,830	0,0060	8,323	5,251	0,0001
INPA_R598	5,357	3,340	0,0220	2,913	1,838	0,466 ns
INPA_R631	5,200	3,242	0,0280	12,357	7,795	0,0001
INPA_R667	10,883	6,785	0,0001	6,450	4,069	0,0030
INPA_R672	8,173	5,096	0,0001	13,240	8,352	0,0001
INPA_R674	10,573	6,592	0,0001	15,100	9,526	0,0001
INPA_R677	12,950	8,074	0,0001	12,473	7,869	0,0001

ns – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Anexo 2 – Atividade emulsificante (água em óleo)

Rizóbios	Meio YMA com Petróleo	Meio YMA com Tolueno
----------	-----------------------	----------------------

	Médias	Valor de T	Valor de P	Médias	Valor de T	Valor de P
INPA_R546	6,4000	5,1710	0,0001	7,3470	4,6350	0,0070
INPA_R548	6,2970	4,4000	0,0010	8,3330	5,2570	0,0001
INPA_R555	7,1930	5,0270	0,0001	8,0030	5,0490	0,0001
INPA_R557	8,0670	5,6370	0,0001	4,1400	2,6120	0,1180 ns
INPA_R560	7,2530	5,0690	0,0001	6,1330	3,8690	0,0050
INPA_R568	7,0600	4,9330	0,0001	8,1870	5,1650	0,0001
INPA_R571	8,7970	6,1470	0,0001	13,7300	8,6620	0,0001
INPA_R573	8,1700	5,7090	0,0001	5,7770	3,6440	0,0100
INPA_R574	10,5670	7,3840	0,0001	8,3230	5,2510	0,0001
INPA_R598	8,3030	5,8050	0,0001	2,9130	1,8380	0,4660 ns
INPA_R631	9,1000	6,3590	0,0001	12,3570	7,7950	0,0001
INPA_R667	6,8370	4,7770	0,0001	6,4500	4,0690	0,0030
INPA_R672	10,2170	7,1390	0,0001	13,2400	8,3520	0,0001
INPA_R674	10,7670	7,5240	0,0001	15,1000	9,5260	0,0001
INPA_R677	8,3200	5,8140	0,0001	12,4730	7,8690	0,0001

ns – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Anexo 3 – Densidade Óptica (óleo em água)

Rizóbios	Meio YMA com Petróleo	Meio YMA com Tolueno
-----------------	------------------------------	-----------------------------

	Médias	Valor de T	Valor de P	Médias	Valor de T	Valor de P
INPA_R546	- 0,3030	- 2,1290	0,2950 ns	0,1430	0,5860	0,9990 ns
INPA_R548	- 0,3360	- 2,3640	0,1930 ns	0,0500	0,2040	1,0000 ns
INPA_R555	0,8160	5,7330	0,0001	0,1760	0,7230	0,9970 ns
INPA_R557	- 0,2730	- 1,9190	0,4140 ns	0,18830	0,7500	0,9960 ns
INPA_R560	- 0,1360	- 0,9590	0,9750 ns	0,6330	2,5930	0,1230 ns
INPA_R568	- 0,3660	- 2,5740	0,1270 ns	- 0,0200	- 0,0810	1,0000 ns
INPA_R571	1,6500	11,5840	0,0001	1,7660	7,2340	0,0001
INPA_R573	- 0,4200	- 2,9490	0,0570 ns	0,3860	1,5830	0,6460
INPA_R574	- 0,3730	- 2,6210	0,1160 ns	0,2530	1,0370	0,9560 ns
INPA_R598	- 0,4200	- 2,9490	0,0570 ns	0,3330	1,3640	0,7990
INPA_R631	1,7530	12,3090	0,0001	2,1730	8,8990	0,0001
INPA_R667	- 0,0660	- 0,4680	1,0000 ns	0,0660	0,2720	1,0000
INPA_R672	1,6500	11,5840	0,0001	2,0900	8,5580	0,0001
INPA_R674	0,9730	6,8330	0,0001	1,3200	5,4050	0,0001
INPA_R677	0,6430	4,5160	0,0010	0,0930	0,3820	1,0000

ns – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Anexo 4 – Densidade Óptica (óleo em água)

Rizóbios	Meio YMA com Petróleo	Meio YMA com Tolueno
----------	-----------------------	----------------------

	Médias	Valor de T	Valor de P	Médias	Valor de T	Valor de P
INPA_R546	0,1130	1,5420	0,6760 ns	- 0,6030	- 4,2390	0,0020
INPA_R548	0,2960	4,0370	0,0030	- 0,4930	- 3,4660	0,0160
INPA_R555	0,1300	1,7690	0,5130 ns	- 0,5830	- 4,0980	0,0030
INPA_R557	0,1430	1,9510	0,3940 ns	0,1260	0,8900	0,9860 ns
INPA_R560	0,2600	3,5380	0,0130	- 0,4830	- 3,3960	0,0190
INPA_R568	- 0,0330	- 0,4540	1,0000 ns	- 0,2860	- 2,0140	0,3570 ns
INPA_R571	0,0300	0,4080	1,0000 ns	- 0,6130	- 4,3090	0,0010
INPA_R573	- 0,0930	- 1,2700	0,8560 ns	- 0,6030	- 4,2390	0,0020
INPA_R574	0,0130	0,1810	1,0000 ns	- 0,2160	-1,5220	0,6900 ns
INPA_R598	- 0,2730	- 3,7200	0,0080	- ,5060	- 3,5600	0,0130
INPA_R631	- 0,0760	- 1,0430	0,9540 ns	- 0,3000	- 2,1080	0,3060 ns
INPA_R667	- 0,3030	- 4,1280	0,0020	- 0,2160	- 1,5220	0,6900 ns
INPA_R672	- 0,2560	- 3,4930	0,0150	0,4930	3,4660	0,0160
INPA_R674	0,0830	1,1340	0,9230 ns	- 0,5830	- 4,0980	0,0030
INPA_R677	- 0,0260	- 0,3630	1,0000 ns	0,1830	1,2880	0,8460 ns

ns – Não significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.