



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO PELA ATUAÇÃO  
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms DE  
AMBIENTE AQUÁTICO DA AMAZÔNIA**

**SIOMARA DIAS DA ROCHA**

**MANAUS - AM**

**DEZEMBRO - 2015**

**BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO PELA ATUAÇÃO  
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms DE  
AMBIENTE AQUÁTICO DA AMAZÔNIA**

**SIOMARA DIAS DA ROCHA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração: Química Analítica

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Tereza Cristina Souza de Oliveira**

**MANAUS – AM**

**DEZEMBRO – 2015**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Rocha, Siomara Dias da

R672b Biodegradação de Hidrocarbonetos de Petróleo Pela Atuação de Fungos Endofíticos Isolados da Macrófita *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms de Ambiente Aquático Da Amazônia / Siomara Dias da Rocha – 2015. 127 f.: il. color; 31 cm.

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tereza Cristina Souza de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Amazonas.

1. Biodegradação 2. Hidrocarbonetos 3. Fungos Endofíticos 4. Macrófita I. Oliveira, Tereza Cristina Souza de (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

"Diz-se que, antes de um rio entrar no oceano, ele treme de medo.

Olha para trás, para toda a jornada: os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira...O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar! Voltar é impossível na existência. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas TORNAR-SE oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.

Assim somos nós.

Só podemos ir em frente e arriscar.

Coragem!!

Avance firme e torne-se Oceano!!!"

Osho

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente a Deus pela força e motivação todos os dias;*

*A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tereza Cristina de Souza Oliveira, pela orientação e incentivo na realização deste trabalho;*

*Ao Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pelo apoio e espaço concedido em seu laboratório;*

*A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Antônia Queiroz de Souza pelo auxílio no entendimento do trabalho microbiológico;*

*Ao meu grande amigo João, por todo conhecimento transmitido a mim, por sua confiança e motivação;*

*À minha família que mesmo de longe sempre acreditaram em mim, incentivando e apoiando cada um à sua maneira;*

*À minha Avó Mercedes Lopes Dias (In memorian) pelo carinho e apoio sempre presentes. Saudades eternas...*

*Ao Alessandro Rocha por toda a sua atenção, carinho e ensinamentos tomados como lição para vida. Agradeço de coração!*

*Aos professores e colegas, pela participação em minha vida acadêmica.*

*A todos os meus amigos do laboratório de genética do FCA, em especial ao Prof. Dr. Pedro Queiroz Neto, pela importante orientação em vários momentos deste trabalho, pelo apoio e incentivo.*

*Aos colegas do laboratório de genética Mozanil, Felipe, João e Ítalo, obrigada pela amizade e por auxiliarem em alguns momentos.*

*Aos amigos da Central Analítica pelo inestimável auxílio nas atividades laboratoriais.*

*Ao amigo Raimundo Jr. pela ajuda na cromatografia gasosa, muito obrigada pela sua disponibilidade em esclarecer dúvidas.*

*À Hyelen Gouveia pela disponibilidade de análises no cromatógrafo da Central de Laboratórios-Fucapi.*

*Ao amigo Milton Viana por sua paciência e disponibilidade para me acompanhar na Fucapi;*

*Aos colegas do laboratório da Biotecnologia, Nilo, Mauricio e Dina por ceder espaço para as minhas amostras no shaker da Biotecnologia;*

*À minha dídima Lorena Mota por todo auxílio, motivação e por acreditar no meu potencial mesmo diante das constantes dificuldades.*

*À minha amiga Pamela Nunes pelo apoio e motivação;*

*Ao amigo Joel pelo auxílio e motivação;*

*Aos alunos de iniciação científica, em especial Vanessa Sales pelo auxílio nas análises e apoio;*

*À Petrobrás, por ceder o petróleo bruto da Refinaria de Manaus-REMAN;*

*À Universidade Federal do Amazonas pela formação profissional;*

*Ao CNPQ, pelo apoio financeiro à realização deste projeto e pela bolsa concedida;*

*À banca examinadora, pelas importantes contribuições a este trabalho;*

*E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

*E principalmente à minha mãe Maria Dias, meu pai Volnei da Rocha, minhas irmãs Thalia e Thaís Rocha, minha madrastra Socorro Itauana, meus novos amigos: Ralph, Fernando e Rubem Levi e a turma do tecido acrobático os quais me forneceram apoio incondicional e incentivo.*

*AMO VOCÊS.*

**MUITO OBRIGADA!!!**

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS.....  | i   |
| LISTA DE TABELAS.....  | iii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....  | iv  |
| RESUMO.....  | v   |
| ABSTRACT.....  | vi  |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 15  |
| 2 OBJETIVOS.....   | 20  |
| 2.1 Objetivo Geral.....  | 20  |
| 2.2 Objetivo Específico.....   | 20  |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 21  |
| 3.1 A Bacia Amazônica e sua biodiversidade.....  | 21  |
| 3.2 Macrófitas.....  | 22  |
| 3.3 Aspectos da Biorremediação.....  | 23  |
| 3.4 Biodegradação de Hidrocarbonetos de Petróleo.....  | 24  |
| 3.5 Utilização de Fungos Filamentosos na degradação de HPA.....  | 28  |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 36  |
| 4.1 Material Biológico.....  | 36  |
| 4.2 Planejamento Experimental.....   | 37  |
| 4.2.1 Reativação dos Fungos.....   | 37  |
| 4.2.2 Purificação e Preservação dos fungos.....  | 37  |
| 4.3 Teste de Biodegradabilidade.....   | 38  |
| 4.4 Produção do consórcio fúngico.....   | 40  |
| 4.5 Preparação de Amostras para Avaliação dos Processos de Biorremediação.....                           | 41  |
| 4.5.1 Experimentos com Bioestimulação e Bioaugmentação.....  | 42  |
| 4.6 Análise de Hidrocarbonetos.....  | 43  |
| 4.6.1 Extração Líquido-Líquido das Amostras Biorremediadas.....  | 43  |
| 4.6.2 Limpeza e Fracionamento dos Extratos por Cromatografia em Coluna (CC).....                         | 44  |
| 4.6.3 Determinação de Parâmetros para Calibração Instrumental e Confecção das Curvas Analíticas.....     | 45  |
| 4.6.4 Determinação dos 16 HPA por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) ..... | 47  |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 53  |
| 5.1 Teste de Biodegradabilidade.....   | 53  |
| 5.2 Parâmetros de Calibração Instrumental.....   | 57  |
| 5.3 Testes preliminares: Escolha dos Tempos de Degradação e Aplicação do consórcio microbiano.....       | 60  |
| 5.4 Análise de Hidrocarbonetos.....  | 61  |
| 5.4.1 Hidrocarbonetos Aromáticos.....  | 63  |

|       |   |      |
|-------|---|------|
| 5.4.2 | Análise Estatística.....  | 73   |
| 6     | CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 76   |
| 7     | CRONOGRAMA FINAL.....   | 79   |
| 8     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 81   |
|       | ANEXOS.....   | vii  |
|       | Anexo I - Imagens dos procedimentos de suspensão seriada e preparação das lâminas.....  | vii  |
|       | Anexo II - Imagens dos Procedimentos de extração líquido-líquido, limpeza e fracionamento, concentração e secagem dos extratos.....                             | viii |
|       | Anexo III - Imagens macro e microscópicas das linhagens utilizadas no consórcio.....  | ix   |
|       | Anexo IV - Curvas de Calibração pelo método da padronização Interna obtidas pelas injeções das diferentes concentrações do padrão de referência dos 16 HPA..... | x    |
|       | Anexo V - Análise do óleo da Unidade de Produção de Urucu.....  | xiv  |
|       | Anexo VI - Distribuição das concentrações individuais dos 16 HPA do controle e da média da triplicata de cada amostra.....                                      | xv   |
|       | Anexo VII – Cromatogramas das injeções em CG-EM.....  | xxi  |



## LISTA DE FIGURAS

|           |  |        |
|-----------|--|--------|
| Figura 1  | Estruturas moleculares dos 16 principais HPA, de acordo com a US EPA.  | Pg. 26 |
| Figura 2  | Exemplo de HPA (Benzoapireno).   | Pg. 28 |
| Figura 3  | Degradação bacteriana: transformação de diversos compostos aromáticos em catecol. Fonte: adaptado de (LEMOS <i>et al.</i> , 2008).   | Pg. 30 |
| Figura 4  | Vias metabólicas de degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos por fungos. Fonte: adaptado de Cerniglia (1997) e Wilson e Jones (1993).  | Pg. 31 |
| Figura 5  | Esquema simplificado da ação do citocromo P-450. Fonte: Adaptado de Nelson & Cox, 2011.  | Pg. 31 |
| Figura 6  | Ciclo catalítico das lacases; FOH = substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu <sup>2+</sup> (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O <sub>2</sub> . Fonte: Adaptado de Aguiar & Ferraz, 2011. | Pg.32  |
| Figura 7  | Localização do ponto de coleta da planta no igarapé da Guarita. Fonte: Google Earth. <b>A:</b> Saída dos efluentes da Refinaria Isaac Sabbá - Manaus/AM. <b>B:</b> Amostra da macrófita <i>Eichhornia crassipes</i> Mart. Solms.   | Pg. 36 |
| Figura 8  | Esquema da purificação dos Fungos. Fonte: Adaptado de (Batista, 2009).   | Pg. 38 |
| Figura 9  | Esquema da aplicação do Teste de Biodegradabilidade do 2,6- diclorofenol indofenol (DCPIP).  | Pg. 39 |
| Figura 10 | Esquema da produção do consórcio microbiano: <i>Phoma herbarum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Penicillium citrinum</i> – Aplicação das Técnicas de Bioaumento e Bioestímulo.   | Pg. 41 |
| Figura 11 | Esquema da metodologia empregada nas análises de hidrocarbonetos alifáticos e HPA, segundo EPA - 3510C; EPA - 8270D.   | Pg. 45 |
| Figura 12 | Cromatógrafo gasoso acoplado à Espectrometria de Massas (CG-EM) – Central de Laboratórios – FUCAPI, Manaus-AM, 2015.   | Pg.48  |
| Figura 13 | Curva de calibração com padronização interna obtida após a injeção do mix dos 16 HPA na concentração de 1000 ng mL <sup>-1</sup> e mix dos padrões internos  | Pg. 49 |

|           |   |        |
|-----------|---|--------|
|           | deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12), à concentração de 10 000 ng mL <sup>-1</sup> .   |        |
| Figura 14 | Curvas Analíticas utilizadas para a Quantificação dos 16 HPA presentes nas amostras. Obtidas com o auxílio do Programa <i>Microsoft Excel</i> (2013).   | Pg. 51 |
| Figura 15 | Curvas Analíticas utilizadas para a Quantificação dos 16 HPA presentes nas amostras. Obtidas com o auxílio do Programa <i>Microsoft Excel</i> (2013).   | Pg. 52 |
| Figura 16 | <b>A.</b> Amostras de fungos após a oxidação biológica, sinalizada pela mudança de cor do indicador DCPIP. <b>B.</b> Reação redox realizada pelo indicador DCPIP. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula. Fonte: Adaptado de Bidoia <i>et al.</i> (2010). | Pg. 54 |
| Figura 17 | Relação do tempo de degradação versus fungos selecionados para verificação da ocorrência de oxidação biológica.   | Pg. 55 |
| Figura 18 | Efeito das diferentes condições de pH e de nutrientes nas concentrações do somatório de 16 HPA em 7 dias de experimento.  | Pg. 60 |
| Figura 19 | Perfil do percentual de degradação dos 16 HPA analisados para todas as condições aplicadas em 7 dias.   | Pg. 65 |
| Figura 20 | Perfil do percentual de degradação para os somatórios dos 16 HPA em todas as amostras.  | Pg. 67 |
| Figura 21 | Comparativo entre os somatórios dos 16 HPA do controle e da amostra em diferentes tempos (pH ácido e sem adição de nutrientes).   | Pg. 70 |
| Figura 22 | Comparativo entre os somatórios dos 16 HPA do controle e da amostra em diferentes tempos (pH básico e sem adição de nutrientes).  | Pg. 70 |
| Figura 23 | Comparativo entre os somatórios dos 16 HPA do controle e da amostra em diferentes tempos (pH neutro e sem adição de nutrientes).  | Pg. 71 |
| Figura 24 | Comparativo entre os somatórios dos 16 HPA do controle e amostra do tempo 96 horas para os meios: ácido, básico e neutro (com e sem nutrientes).  | Pg. 72 |
| Figura 25 | Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk.   | Pg. 74 |

## LISTAS DE TABELAS

|           |  |        |
|-----------|--|--------|
| Tabela 1  | Padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 para Águas Doces de Classe II.  | Pg. 17 |
| Tabela 2  | Meio de cultura Bushnell Haas utilizado para o estudo de micro-organismos que degradam hidrocarbonetos.                                    | Pg. 40 |
| Tabela 3  | Especificação das condições nos experimentos com bioaugmentação e bioestimulação.  | Pg. 42 |
| Tabela 4  | Parâmetros de análise cromatográfica, de acordo com EPA 8270D.   | Pg. 47 |
| Tabela 5  | Lista dos 16 HPA analisados, íons m/z, padrão de recuperação <i>p</i> -terfenil-d <sub>14</sub> e padrões internos para a quantificação.   | Pg. 50 |
| Tabela 6  | Identificação dos fungos selecionados para testes de biodegradabilidade.   | Pg. 53 |
| Tabela 7  | Parâmetro de Calibração: Linearidade.  | Pg. 58 |
| Tabela 8  | Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) em ng mL <sup>-1</sup> .  | Pg. 59 |
| Tabela 9  | Somatório das concentrações de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) expressas em ng.mL <sup>-1</sup> e porcentagem de degradação. | Pg. 66 |
| Tabela 10 | Análise dos efeitos de interação ANOVA.  | Pg. 74 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |   |
|---------------------|---|
| Aceft               | Acenaftileno  |
| Ace                 | Acenafteno  |
| Ant                 | Antraceno   |
| BaA                 | Benzo(a)antraceno   |
| BaPi                | Benzo(a)pireno  |
| BbF                 | Benzo(b)fluoranteno   |
| BkF                 | Benzo(k)fluoranteno   |
| BghiPe              | Benzo[g,h,i]perileno  |
| Cri                 | Criseno   |
| DbahA               | Dibenzo[a,h]antraceno   |
| Fen                 | Fenantreno  |
| F                   | Fluoreno  |
| Fl                  | Fluoranteno   |
| F1                  | Fração de extração contendo hidrocarbonetos alifáticos (alcanos)  |
| F2                  | Fração de extração contendo os HPAs   |
| CG-EM               | Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas  |
| CG-DIC              | Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama   |
| HPA                 | Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos   |
| Ipi                 | Indeno[1,1,2-cd]pireno  |
| m/z                 | Razão massa/carga   |
| N                   | Naftaleno   |
| ng mL <sup>-1</sup> | Nanograma por mililitro unidade equivalente a partes por bilhão (ppb)                                     |
| PI                  | Padrão interno  |
| Pir                 | Pireno  |
| R <sup>2</sup>      | Coefficiente de determinação  |
| Scan                | Escaneamento; em cromatografia: modo de varredura   |
| USEPA               | Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos ( <i>United States Environmental Protection Agency</i> ) |

## RESUMO

O interesse pelo estudo da contaminação ambiental por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) reside no fato de que a maioria destes compostos são potencialmente carcinogênicos e mutagênicos. Os micro-organismos desempenham um importante papel, uma vez que utilizam essas substâncias como fonte de energia. No presente estudo, os fungos isolados da macrófita *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms foram selecionados em meio BH (Bushnell Haas) contendo petróleo bruto pela técnica baseada no indicador redox 2,6 - diclorofenol indofenol (DCPIP), por meio da ocorrência de oxidação biológica indicada pela mudança na coloração do meio de cultivo. Destacando-se neste teste, os fungos codificados F13, F14 e F01, respectivamente: *Phoma herbarum*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium citrinum*, que apresentaram atividade biológica entre 24 e 48 horas. Com o intuito de contribuir para o avanço nas pesquisas sobre biorremediação este trabalho desenvolveu estudos sobre degradação de hidrocarbonetos utilizando consórcio fúngico em meio mineral líquido (BH) suplementado com 15 µL de petróleo bruto utilizando ensaios de bioaumento e bioestímulo em diferentes tempos de biodegradação: tempo 0, 48 horas, 96 horas e 7 dias. Para avaliar o comportamento da degradação do petróleo pelos fungos foram realizadas análises quantitativas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) a partir da aplicação de métodos analíticos: extração líquido-líquido do sobrenadante da amostra na presença de petróleo (prevista no Método EPA 3510C) e sob a ação do consórcio fúngico; em seguida realizou-se a etapa de limpeza e fracionamento da amostra em coluna aberta (Método EPA 8270D modificado) obtendo-se a fração dos HPA para análise dos 16 compostos, considerados de média polaridade e estabelecidos como prioritários pela *Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos* (US EPA); e como última etapa: separação e quantificação dos hidrocarbonetos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). As curvas analíticas apresentaram valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) acima de 0,99 para os 16 HPA. Os valores médios de recuperação para o surrogate *p*-terfenil adicionado nas amostras antes da etapa de extração ficaram na faixa de 67,15 a 99,06%. A investigação da biodegradação desses compostos recalcitrantes possibilitou evidenciar o potencial desses fungos em consórcio, fato observado no decorrer dos 7 dias do experimento e pela diminuição da concentração individual dos compostos analisados. Esses resultados possibilitaram observar o comportamento da degradação do óleo bruto e inferir que as amostras com correção de pH ácido sem fonte adicional de nutrientes apresentou-se mais eficiente na degradação dos 16 HPA em até 7 dias com a redução da concentração variando entre  $179,56 \pm 0,07$  a  $77,00 \pm 0,21$  ng.mL<sup>-1</sup> equivalente a 64% de degradação. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk comprovou que os dados não seguem uma distribuição normal, com p-valor 0,02 (<0,05). A análise ANOVA mostrou que o tempo influencia diretamente na degradação. Acredita-se que este estudo contribua com os inúmeros trabalhos sobre biorremediação na Amazônia com finalidade de avançar nas pesquisas sobre a redução de contaminantes ambientais, em especial hidrocarbonetos aromáticos.

**Palavras-chave:** contaminação ambiental, biorremediação, consórcio fúngico, degradação, bioaumento, bioestímulo.

## ABSTRACT

The interest in the study of environmental contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) lies in the fact that most of these compounds are potentially carcinogenic and mutagenic. Microorganisms play an important role, since they use these substances as a source of energy. In this study, the fungal isolates of the macrophyte *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms were selected in medium BH (Bushnell Haas) containing the crude technique based on redox indicator 2, 6 - dichlorophenol indophenol (DCPIP), by means of oxidation occurring biological indicated by a change in coloring of the culture medium. Standing out this test, the fungi encoded F13, F14 and F01, respectively, *Phoma herbarum*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium citrinum*, which exhibited biological activity between 24 and 48 hours. In order to contribute to the advancement in research on bioremediation this work developed studies on hydrocarbon degradation using fungal consortium in liquid mineral medium (BH) supplemented with 15  $\mu$ L of crude oil using bioaugmentation and biostimulation tests in different biodegradation times: time 0, 48 hours, 96 hours and 7 days. To evaluate the oil degradation behavior by fungi were performed by quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from the application of analytical methods: liquid-liquid extraction of the sample supernatant in the presence of oil (in accordance with EPA Method 3510C) and under the action of fungal consortium. Then there was the cleaning step and fractionation of the sample in open column (EPA Method 8270D modified) obtaining a fraction of the HPA for the analysis of 16 compounds, considered of medium polarity and established as priorities by the Environmental Protection Agency States (US EPA); and as a last step: separation and quantification of hydrocarbons by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analytical curves showed determination coefficient values ( $R^2$ ) above 0.99 for the 16 HPA. The mean recovery values for *p*-terphenyl surrogate added to the samples before the extraction stage were in the range of 67.15/99.06%. The investigation of the possible degradation of these recalcitrant compounds demonstrate the potential of these fungi in a consortium, which was observed during the 7 days of the experiment and the decrease in individual concentration of the analyzed compounds. These results allow to observe the crude oil degradation behavior and infer that the samples with pH correction acid without additional source of nutrients showed to be more efficient in the degradation of HPA 16 within 7 days with the reduced concentration of between  $179.56 \pm 0.07$  to  $77,00 \pm 0.21$  ng mL<sup>-1</sup> equivalent to 64% degradation. The normality test of Shapiro-Wilk proved that the data does not follow a normal distribution, with p-value 0.02 (<0.05). The ANOVA analysis showed that time directly influences the degradation. It is believed that this study contributes to the numerous studies on bioremediation in the Amazon in order to advance the research on the reduction of environmental contaminants, particularly aromatic hydrocarbons.

**Keywords:** environmental contamination, bioremediation, fungal consortium, degradation, bioaugmentation, biostimulation.

## 1. INTRODUÇÃO

O mundo atual ainda está bastante dependente do petróleo e de seus derivados para a manutenção de sua atividade industrial. Durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de armazenamento do petróleo e de seus derivados podem vir a ocorrer derramamentos acidentais ocasionando a contaminação de solos, rios, etc. (ANDRADE *et al.*, 2010). Tais ocorrências vêm motivando, principalmente, a realização de pesquisas relacionadas com a remediação de sítios contaminados (AISLABIE *et al.*, 2004; MARÍN *et al.*, 2006).

Nas duas últimas décadas têm se observado, que a poluição causada por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ao meio ambiente. Existe uma grande preocupação acerca das decorrentes atividades industriais, principalmente, na Amazônia cujo principal meio de transporte é o fluvial. De forma geral, destacam-se acidentes com petróleo como, os grandes derrames nos oceanos, que apesar de serem minimizados não podem ser solucionados totalmente, mas principalmente derramamentos em menor proporção, como os vazamentos nos oleodutos que também trazem inúmeros impactos ao ambiente receptor (BATISTA, 2009).

A poluição ambiental causada pela liberação de hidrocarbonetos de petróleo, em especial hidrocarbonetos policíclicos aromáticos apresentam grandes riscos aos ecossistemas aquáticos e terrestres. Os tratamentos tradicionais, tais como barreiras flutuantes de contenção e recolhimento, adsorção por materiais naturais ou sintéticos não visam à degradação do petróleo (ANDRADE *et al.*, 2010).

Neste contexto destacam-se os processos de biorremediação, que utilizam micro-organismos para minimizar ou remover poluentes do ambiente, incluindo a limpeza de águas subterrâneas, solos, lagos, processos para tratamento de esgoto e principalmente hidrocarbonetos de petróleo (AUTRY & ELLIS, 1992). Segundo Oliveira (2006) a

biorremediação vem sendo bastante fundamentada na recuperação de ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo por utilizar o potencial metabólico de certos micro-organismos e diminuir o caráter tóxico de determinados compostos.

A microbiologia de degradação de hidrocarbonetos constitui um campo de pesquisa em pleno desenvolvimento. Tal interesse deve-se ao impacto que estes compostos podem causar no meio ambiente, e à crescente utilização de procedimentos microbiológicos de descontaminação de ambientes aquáticos e terrestres, em razão de derramamentos acidentais. A remediação natural é uma das formas de atenuação de ambientes impactados que apresenta baixos custos e atualmente vem sendo aprimorada envolvendo processos físicos como o calor ou a irradiação ultravioleta, reações químicas decorrentes do pH ou da ação de certas substâncias no ambiente, e por processos biológicos através de enzimas existentes em animais, plantas e micro-organismos (BONAVENTURA & JOHNSON, 1997; SILVA & FAY, 1997).

A identificação de distribuição característica e predominante dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), podem auxiliar na avaliação de degradação de petróleo (PETERS & MOLDOWAN, 1993; PETERS, WALTER, MOLDOWAN, 2005). Os HPA são compostos presentes na fração do petróleo, mas sobretudo, são compostos formados em combustão incompleta da matéria orgânica. São compostos estruturados com dois a seis anéis benzênicos associados. Os métodos existentes são baseados em cromatografia líquida e cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG/EM) – este último é o método requerido para identificação e quantificação dos HPA.

Quando são encontradas concentrações elevadas dos HPA, sendo estas superiores ao valor de referência da legislação ambiental (CONAMA 357/05) em ambientes onde há influência antropogênica significativa, isso se torna um fator alarmante devido à alta toxicidade desses compostos, o que pode acarretar sérios danos para a biota aquática e para as pessoas que



dependem do consumo dessa água para sobreviver. A Tabela 1 apresenta valores máximos de referência para HPA.

**Tabela 1.** Padrões estabelecidos de HPA pela Resolução CONAMA 357/2005 para Águas Doces de Classe II.

| <b>Hidrocarbonetos (HPA)</b> | <b>Concentração (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b> |
|------------------------------|---|
| Criseno                      |   |
| Benzo(a)antraceno            |   |
| Benzo(b)fluoranteno          |   |
| Benzo(k)fluoranteno          | 0,018   |
| Benzo[g,h,i]perileno         |   |
| Benzo(a)pireno               |   |
| Indeno[1,2,3-cd]pireno       |   |
| Dibenzo[a,h]antraceno        |   |

Os micro-organismos que realizam a biorremediação utilizam o carbono dos hidrocarbonetos, processando essas moléculas e transformando-as em compostos inócuos ao ambiente. Utilizar o potencial metabólico de certos micro-organismos para minimizar ou remover poluentes de hidrocarbonetos de petróleo é um dos principais objetivos da biorremediação. No entanto, ressalta-se a necessidade de demais nutrientes (nitrogênio, fosfato e outros minerais) por parte destes seres para assegurar sua sobrevivência (DUTKA, 1989).

Nos últimos anos vários estudos sobre biodegradação foram desenvolvidos na Amazônia com a utilização de fungos e/ou bactérias, sendo observado nestas pesquisas várias indicações do potencial de biodegradação de petróleo por micro-organismos (BATISTA, 2009; ARAÚJO, 2014; SOUZA, 2015). No entanto, ainda não se conhece o resultado detalhado sobre a eficiência de degradação dos compostos presentes durante a realização dos processos, como o estudo das rotas de biodegradação e subprodutos ou biotransformação. Por exemplo, se os micro-organismos proporcionam a degradação completa dos compostos aromáticos que tem maior importância quanto a toxicidade.

Lemos *et al.* (2008) consideram que os remediadores podem acarretar desequilíbrio no ecossistema e danos ao meio ambiente e destacam a Resolução nº 314 do CONAMA a qual estabelece que estes deverão ser registrados no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para fins de produção, importação, comercialização e utilização, exceto os remediadores destinados à pesquisa e experimentação.

De acordo com Batista (2009), o conhecimento adquirido da associação micro-organismo/planta é de grande importância para entender quais são os mecanismos de adaptação que as plantas utilizam para habitarem ambientes hostis. São restritos os estudos acerca destes micro-organismos, entretanto destaca-se seu potencial biotecnológico na síntese de diversos compostos bioativos de interesse para o homem e para o ambiente.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são agentes transformadores eficazes, em face de sua habilidade em degradar uma ampla gama de substâncias orgânicas comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias. Os micro-organismos vêm se apresentando como poderosa alternativa aos métodos convencionais de tratamento, sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais (UHURAHY, 1998).

Bento *et al.* (2008) destacam que compostos com propriedades surfactantes/emulsificantes com ação intra ou extracelular são sintetizados por uma grande variedade de organismos vivos, sendo denominados biosurfactantes quando produzidos por micro-organismos. E estão diretamente envolvidos na remoção de petróleo e seus derivados do ambiente, sendo produzidos por fungos e bactérias (BICCA *et al.*, 1999). Batista (2002) destaca que os surfactantes microbianos são moléculas complexas e compreendem compostos várias classes químicas, incluindo os peptídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos, glicopeptídeos e lipopeptídeos.

As macrófitas apresentam um papel importante no fluxo de energia no ecossistema limnico, e são as principais fontes de alimento para muitos animais (GRANATO, 1995). A escolha *Eichhornia crassipes* neste trabalho deve-se a um aspecto de especial interesse que é a presença desta planta em ambientes contaminados e poluídos. Estes ambientes representam importante mecanismo de equilíbrio, liberando nutrientes e oxigênio na água.

A espécie *Eichhornia crassipes* Mart. Solms é conhecida como mureru ou aguapé, sendo uma espécie que sobrevive tanto em áreas degradadas quanto em áreas não degradadas, sugerindo a existência de interações desta espécie com uma microbiota epifítica e endofítica com potencial para conferir determinadas vantagens que auxiliariam na sobrevivência da planta hospedeira (SPINDOLA, 2007).

Azevedo (1999) descreve que as distinções entre micro-organismos endofíticos, epifíticos e patogênicos são de natureza apenas didática, não existindo um claro limite entre grupos e sim um gradiente entre eles. Segundo o autor “um fungo endofítico, por exemplo, pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um micro-organismo epifítico pode, eventualmente, habitar uma planta e lá permanecer por certo período, causando ou não danos à mesma”.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar a atividade biorremediadora do consórcio fúngico associados à macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, coletada em ambiente impactado por hidrocarbonetos de petróleo.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Realizar teste de biodegradabilidade com indicador redox 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) para seleção do consórcio fúngico;
2. Reativar fungos selecionados com potencial para degradação de hidrocarbonetos de petróleo em meio mineral Bushnell Haas (BH);
3. Produzir consórcio microbiano com os fungos selecionados que apresentaram maior potenciação de degradação de hidrocarbonetos;
4. Realizar ensaios com meio líquido suplementado com petróleo aplicando técnicas de bioaugmentação e bioestimulação utilizando o consórcio fúngico;
5. Determinar a concentração de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) nas amostras em meio mineral líquido suplementado com petróleo bruto e avaliar a atividade biorremediadora em diferentes tempos por CG-EM.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biodiversidade Amazônica

Diversos autores ressaltam a Amazônia como a região com a maior biodiversidade do mundo. Em especial, a região de várzea que representa um dos ecossistemas de maior produtividade de nutrientes para um ambiente aquático. Fitoplânctons, macrófitas aquáticas e terrestres e a cobertura vegetal de floresta inundada contribuem com bioprodutividade anual de 110 t.m.s (Massa seca) /ha (JUNK, 1985; PIEDADE *et al.*, 1997; WITTMAN *et al.*, 2004; DAGG *et al.*, 2004)

Segundo Garcia (1995) a diversidade biológica está diretamente relacionada com a diversidade dos seres vivos – plantas, animais, micro-organismos e do ecossistema sendo representada pela diversidade genética, diversidade de espécies e diversidade de habitats. Lacava e Azevedo (2008) também ressaltam que as estimativas quanto ao número de micro-organismos existentes revelam que atualmente são conhecidos menos de 10% de espécies de fungos e bactérias. Desta forma se faz necessário a bioprospecção de organismos com potencial para serem utilizados em processos de biorremediação adaptados às condições específicas de cada região, em particular na Amazônia, onde as atividades antrópicas têm interferido de forma intensa e contínua nos ecossistemas naturais.

Peixoto *et al.* (2008) afirmam que o princípio da biorremediação se baseia na prospecção de populações microbianas que possuam a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. A atividade microbiana é reconhecida como um dos fatores mais importantes na eliminação de contaminantes do ambiente (MONTEIRO, 1997).

Em seus estudos Souza (2015) destaca a importância da prospecção de bactérias e fungos para empregar em remediação ambiental, principalmente de espécies que apresentam

maior potencial em biodegradação, produção de enzimas envolvidas neste processo e viabilidade para utilização em consórcios microbianos.

### **3.2 Macrófitas Aquáticas**

As macrófitas aquáticas são vegetais que habitam desde brejos até ambientes totalmente submersos e podem viver livres, enraizadas ou flutuantes, flutuam na superfície da água, como é o caso do aguapé (*Eichhornia crassipes*), entre outros. Elas possuem o pecíolo (base da folha) cheio de tecido esponjoso para se manterem flutuantes além de apresentarem várias adaptações morfológicas e fisiológicas que as tornam capazes de colonizar os diversos ambientes aquáticos (ESTEVES, 1998).

As macrófitas aquáticas têm sido utilizadas em sistemas de tratamento de efluentes e na recuperação de ambientes degradados. São, ainda, grandes armazenadoras de nutrientes e toleram ambientes impactados, sendo assim consideradas excelentes bioindicadores, inclusive da toxicidade do petróleo e de seus derivados (POMPÊO, 2003).

A espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms é conhecida como mururu ou aguapé e pertence à família Ponteriaceae. É uma espécie que sobrevive tanto em áreas degradadas quanto em áreas não degradadas, sugerindo a existência de interações desta espécie com uma microbiota epifítica (habitam os tecidos externos) e endofítica (vivem em seu interior) com potencial para conferir determinadas vantagens que auxiliariam na sobrevivência da planta hospedeira. As raízes do aguapé naturalmente absorvem nutrientes, incluindo metais, tais como: chumbo, mercúrio e estrôncio-90, bem como alguns compostos orgânicos recalcitrantes com características carcinogênicas e mutagênicas (AZEVEDO, 1999).

Micro-organismos epifíticos são assim denominados, por habitarem os tecidos externos, vivendo na superfície dos vegetais. Micro-organismos endofíticos são aqueles cultiváveis ou

não, que penetram a planta e vivem em seu interior, interagindo com outras espécies de micro-organismos, sem causar algum dano ou prejuízo ao seu hospedeiro, ou mesmo, estruturas externas visíveis (BATISTA, 2009). Há evidências da influência desses micro-organismos em diversas características expressas pela planta, dentre as quais podemos citar: a produção de hormônios de crescimento e antibióticos, como a proteção contra herbívoros (pela produção de alcalóides), entre outros (CLAY *et al.*, 1993).

O sistema radicular do aguapé funciona como um filtro mecânico e retém material particulado (orgânico e mineral) existentes na água, e cria um ambiente rico em atividades de fungos e bactérias endofíticas e epifíticas, passando a ser um agente de despoluição, reduzindo a DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a taxa de coliformes e a turbidez das águas poluídas. Além da diminuição da carga orgânica, o aguapé se nutre de elementos químicos minerais como o nitrogênio e fósforo, degrada cianeto livre diminuindo suas concentrações no ambiente externo, controlando assim a poluição orgânica e química (GRANATO, 1995).

Batista (2009) destaca a eficácia da utilização do aguapé como agente despoluente em locais contaminados, pois a espécie age como um filtro natural, apresentando a capacidade de incorporar em seus tecidos uma grande quantidade de nutrientes através de suas raízes longas e finas, com uma enorme quantidade de bactérias e fungos, atuando sobre as moléculas tóxicas, quebrando sua estrutura e permitindo que a planta assimile estes componentes tóxicos.

### **3.3 Aspectos da Biorremediação**

Segundo Prince (1996), a biorremediação pode ser definida como uma tecnologia eficaz para o tratamento de áreas contaminadas, por meio do uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor determinados poluentes, ou seja, realizando a biodegradação. É realizada por meio da adição de micro-organismos nativos e exógenos, ou até micro-organismos geneticamente modificados, que aceleram o processo natural da biodegradação.

Uma das formas de degradar os resíduos presentes no meio ambiente é utilizar o seu próprio potencial de reação contra esses químicos. Nesse sentido, os micro-organismos desempenham um importante papel, uma vez que utilizam essas substâncias como fonte de energia. Desta forma, desempenham a função de restauração dos padrões ambientais (MELO & AZEVEDO, 1997).

Marín (2006) destacam os dois enfoques da biorremediação: bioaumento e bioestímulo, que consistem na adição de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos adaptados ou de biossurfactantes e estimulação do crescimento microbiano no local contaminado pela adição de nutrientes, respectivamente.

Os parâmetros temperatura, umidade, fluxo de oxigênio, pH e os nutrientes (fósforo e nitrogênio), podem ser empregados para implementar o processo de biodegradação por meio do bioestímulo (PANDEY *et al.*, 2000). No processo de biorremediação há exploração da diversidade genética e da versatilidade metabólica dos micro-organismos para a transformação de contaminantes em produtos finais menos tóxicos, os quais são integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (ALEXANDER, 1994; BATISTA, 2009).

### **3.4 Biodegradação de Hidrocarbonetos de Petróleo**

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e, em menor escala de compostos oxigenados, nitrogenados, sulfurados e metais pesados, resultantes de processos físico-químicos sofridos pela matéria orgânica, que se depositou juntamente com fragmentos de rochas durante a formação de estruturas sedimentares, milhões de anos atrás (WAGENER & SCOFIELD *et al.*, 2002).

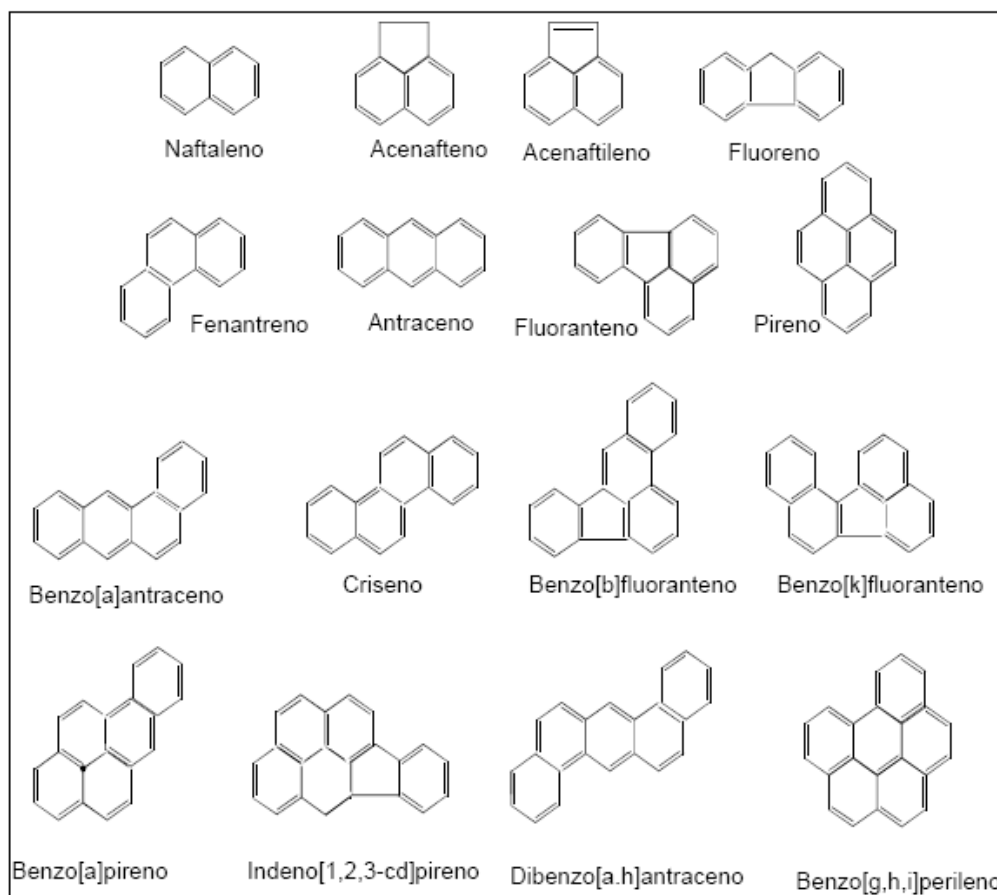
Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser divididos em quatro classes: os saturados, os aromáticos, os asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e as resinas (piridinas, quinolinas, carbasóis, sulfóxidos e amidas). Os hidrocarbonetos diferem quanto a



sua suscetibilidade ao ataque microbiano, tendo sido ordenados de forma decrescente: n-alcanos, alcanos ramificados, aromáticos de baixo peso molecular e cicloalcanos. Desta forma, os alcanos não ramificados e os compostos aromáticos de baixo peso molecular são mais suscetíveis ao ataque dos micro-organismos do que os compostos aromáticos alquil-substituídos, cicloalcanos, compostos polares e asfaltenos (SALANITRO, 2001).

Nem todos os hidrocarbonetos podem ser biodegradados, mas estima-se que a biodegradabilidade de diferentes tipos de óleo cru encontra-se na faixa de 70% a 97%. A fração não degradável do óleo corresponde aos asfaltenos e às resinas, que são considerados compostos biologicamente inertes (PRINCE *et al.*, 1999). Dentre os HPA, destacam-se os 16 HPA (Figura 1) que são considerados poluentes de alta prioridade ambiental pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) devido ao seu potencial carcinogênico e mutagênico. Enquanto o Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional (NIOSH), também dos EUA, prioriza 17 HPA para investigação, sendo o composto adicional o Benzo(e)pireno (NIOSH, 1998).

A biodegradação de hidrocarbonetos pode ser entendida como a quebra destes componentes do petróleo para componentes de menor peso molecular ou mais polares por ação de micro-organismos (ROSATO, 1997). Vários autores destacam a importância dos micro-organismos no processo de biodegradação (CUNHA & LEITE, 2000; OLIVEIRA, 2001; CRAPEZ *et al.*, 2002, MARIANO, 2006; DIAS, 2007).



**Figura 1.** Estruturas moleculares dos 16 HPA determinados como prioritários em estudos ambientais pela Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos (US EPA).

LOPES (2010) estudou esses hidrocarbonetos no sedimento de fundo do rio Negro, na orla de Manaus e observou hidrocarbonetos predominantes de fontes mistas de matéria orgânica, destacando-se a origem biogênica, ou seja, pela degradação de biomassa, como de origem petrogênicas, pela presença e degradação de óleo. Estes foram mais predominantes nos pontos de coleta próximo às drenagens dos igarapés São Raimundo e Educandos, os quais são os igarapés que recebem maior influência de efluentes domésticos e industriais.

Segundo Melo & Azevedo (1997), a atividade microbiana é reconhecida como um dos fatores mais importantes na eliminação de produtos químicos do ambiente. Determinados ambientes poluídos apresentam contaminação por metais pesados. Uma vez que, esses metais

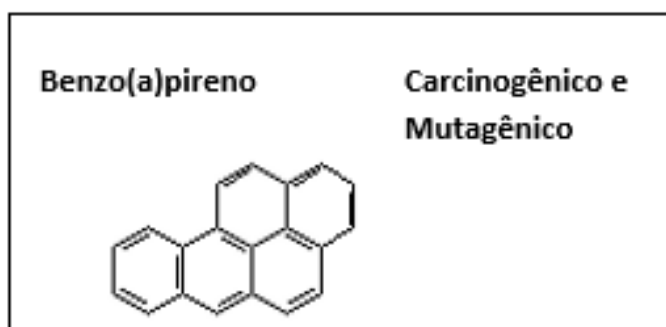
também se fazem presentes no petróleo bruto, os micro-organismos tem um importante papel, pois absorvem e acumulam metais do ambiente onde proliferam, uma vez que os metais, como cofator, tais como o ferro, o zinco, cobre, molibdênio, entre outros, que são componentes essenciais de um grande número de enzimas e outras moléculas biológicas.

A especificidade do processo de biodegradação de hidrocarbonetos pode ser descrita como o potencial genético de um micro-organismo em particular em introduzir uma molécula de oxigênio em uma de hidrocarboneto e, com relativamente poucas reações, gerar produtos intermediários que na sequência entram na via catabólica da célula (ROSATO, 1997).

A biodegradação do petróleo é bastante complexa, dependendo da natureza do óleo, da natureza da comunidade microbiana e da variedade de fatores ambientais que influenciam a comunidade microbiana (ATLAS, 1994). Uma investigação mais detalhada sobre a contaminação por hidrocarbonetos requer a quantificação de compostos individuais nas frações de alifáticos e de aromáticos, a fim de (i) se obter dados mais exatos sobre a concentração total desses compostos, assim como, para determinar a concentração individual de composto de maior toxicidade, e (ii) calcular diversos índices indicativos de origem que auxiliam na avaliação da importância relativa das fontes predominantes dos hidrocarbonetos encontrados (WANG *et al.*, 1999; YUNKER *et al.*, 2002).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) constituem um grupo de compostos contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados (Figura 1). Estes compostos são formados, principalmente, pela combustão incompleta da matéria orgânica. Os estudos em cobaias têm demonstrado que muitos desses compostos, incluindo o benzo(a)pireno (BaP), são carcinogênicos e mutagênicos, sendo também considerados potencialmente genotóxicos e carcinogênicos para os humanos (CARUSO & ALABURDA, 2008).

O benzo(a)pireno (BaP) (Figura 2) é um dos HPA mais estudados e é utilizado como indicador da presença de outros HPA. Esse composto é um contaminante de ampla distribuição ambiental, presente em diversas matrizes, como solo, água, ar e alimentos. Sendo considerado o mais cancerígeno. Segundo a U.S. Environmental Protection Agency (US EPA), o BaP em quantidades superiores a  $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$  na água potável causa problemas à saúde. Na maioria das águas e sedimentos, o BaP resiste ao ataque por micro-organismos ou substâncias químicas reativas, podendo, contudo, evaporar ou ser degradado por exposição à luz solar (LOPES, 2010).



**Figura 2.** Estrutura do Benzo(a)pireno.

A caracterização da contaminação ambiental por hidrocarbonetos pode ser realizada em diferentes níveis, dependendo da metodologia analítica empregada e da estratégia de coleta de amostras. Em levantamentos preliminares, podem ser usados métodos mais simples, que se limitam a quantificação da concentração total de um grupo não específico de substâncias, tais como os “óleos e graxas” e os HPA totais. Os HPA apresentam massa molecular variando entre  $128$  e  $178 \text{ g mol}^{-1}$ . A solubilidade deste grupo em água varia entre os altamente insolúveis (benzo[g,h,i]perileno:  $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ ) a pouco solúveis (naftaleno:  $31 \text{ mg L}^{-1}$ ), conforme LATIMER e ZHENG, 2003).

Foi realizado estudo pioneiro de investigação das fontes e de níveis de hidrocarbonetos em sedimento de área remota, no Rio Solimões e em oito lagos entre os municípios de Coari e Manaus, assim como, no igarapé do Quarenta na região do Pólo Industrial de Manaus (OLIVEIRA, 2007). As concentrações obtidas nesse estudo para o somatório de 16HPA foram na faixa de concentração entre 3,1 e 66,1 ng g<sup>-1</sup> na primeira coleta, e entre 1,4 e 27,4 ng g<sup>-1</sup> na segunda coleta, tendo apresentado grande variação entre as estações e épocas de amostragem. Essas concentrações são correspondentes aos níveis de hidrocarbonetos em áreas remotas encontrados por outros autores (TOLOSA *et al.*, 2004; LOPES, 2010).

Souza (2015) destaca a presença de derramamentos pontuais na Amazônia, devido a emissão contínua pelo tráfego das embarcações, bem como atividades industriais e veiculares na região urbana, atividades estas que contribuem para o aumento da concentração de HPA no ambiente. Tal grupo de poluentes é considerado ubíquo e a persistência dos mesmos varia conforme sua massa molecular, sendo os de baixa massa mais suscetíveis a degradação enquanto os de alta massa são mais persistentes no ambiente, como o benzo(a)pireno por exemplo, representado na Figura 2 (ALMEIDA *et al.*, 2007).

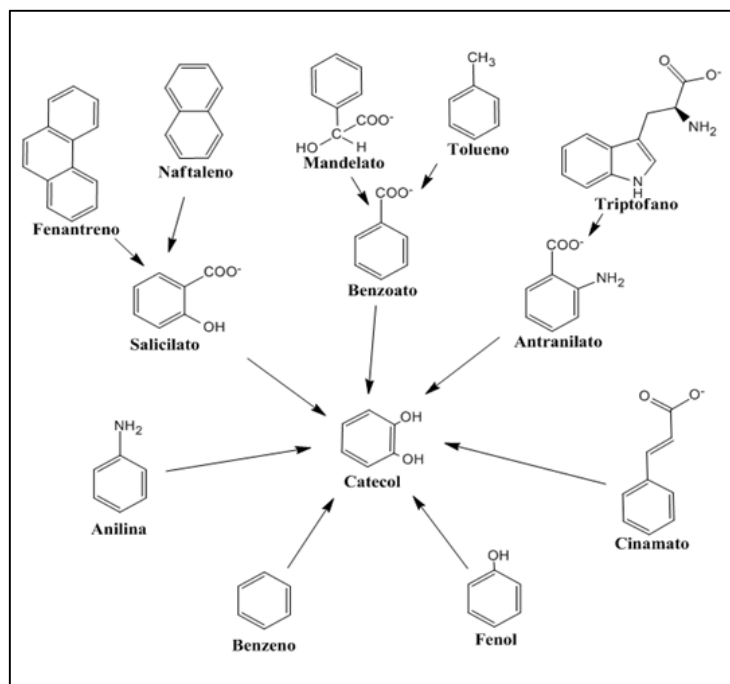
### **3.5 Utilização de Fungos Filamentosos na Degradação de HPA**

Os fungos filamentosos destacam-se em ensaios de biorremediação, principalmente porque toleram a toxicidade do ambiente mais do que as bactérias, sobrevivem em condições de estresse com pH extremamente ácido e pobre em nutrientes. Também são capazes de formar extensas redes miscelias, produzir enzimas catabólicas com baixa especificidade e usam compostos orgânicos (poluentes) como substratos (LEMOS *et al.*, 2008; HARMS *et al.*, 2011).

Várias vias metabólicas de degradação dos HPA já foram identificadas em diferentes micro-organismos, porém as mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas

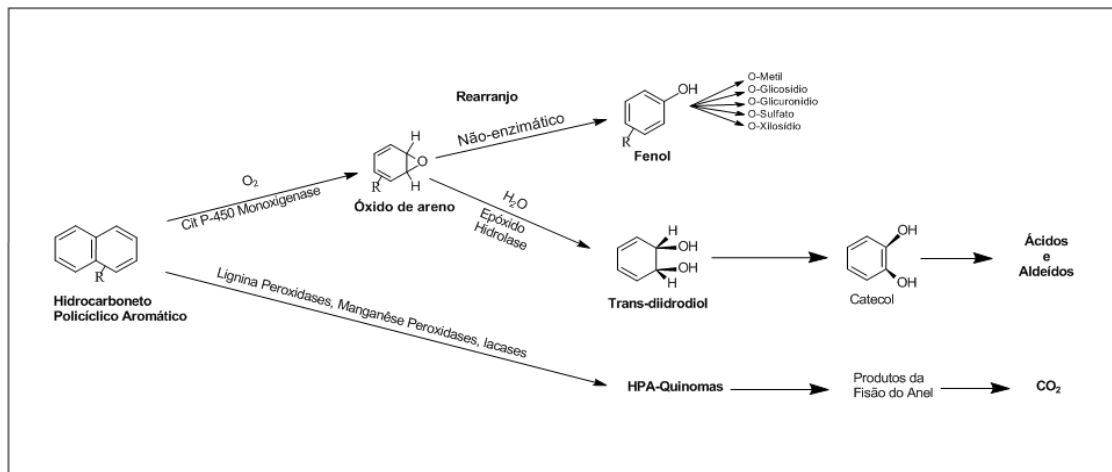
bactérias, pelos fungos lignolíticos (um grupo composto principalmente por basidiomicetos que produzem enzimas que degradam a lignina da madeira) e pelos fungos não-lignolíticos (fungos que não produzem estas enzimas) que inclui os grupos dos Zygomycetos, Ascomycetos e Hifomicetos. Para algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cunninghamella* (CERNIGLIA E SUHERLAND, 2001; SOUZA, 2015).

Em geral, as vias metabólicas bacterianas de degradação aeróbica de hidrocarbonetos aromáticos podem ser divididas em três partes. Na primeira, o substrato aromático é transformado num metabólito dihidroxiaromático, tipicamente um catecol, como mostra a Figura 3. A segunda fase consiste na abertura do anel do catecol por dioxigenases. E na terceira fase do catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos, o produto resultante da abertura do anel é convertido em intermediários do metabolismo central como acetil-CoA, oxalato e piruvato.



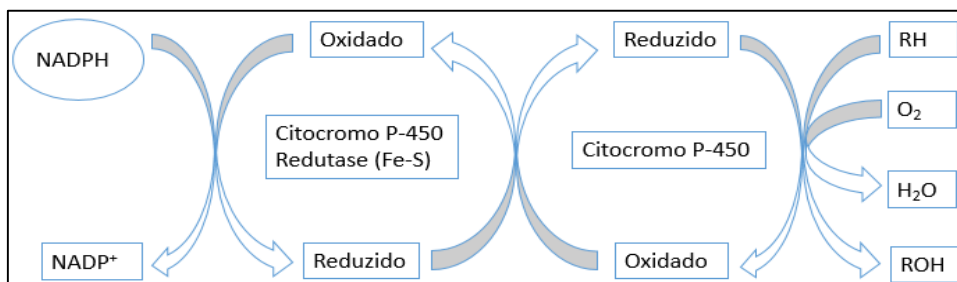
**Figura 3.** Degradação bacteriana: transformação de diversos compostos aromáticos em catecol. Fonte: adaptado de (LEMOS *et al.*, 2008).

A Figura 4 demonstra o ataque aos HPA por fungos. Os fungos iniciam a degradação por meio de uma reação de hidroxilação, enquanto que as bactérias, geralmente, realizam uma oxidação para dar início à fissão do anel (DEL' ARCO, 1999)



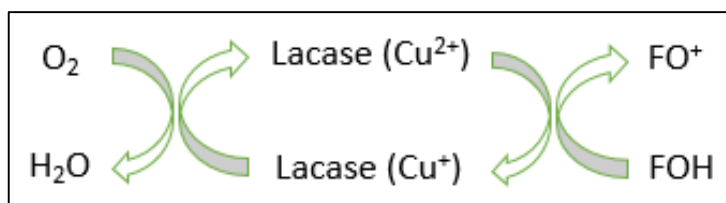
**Figura 4.** Vias metabólicas de degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos por fungos. Fonte: adaptado de Cerniglia (1997) e Wilson e Jones (1993).

Os fungos não utilizam os HPA como a única fonte de carbono e energia. Por isso, o meio deve ser suplementado com uma fonte de carbono que favoreça a degradação dos HPA. Geralmente os fungos não lignolíticos metabolizam os HPA a diidrodiois, fenóis e quinonas. As vias metabólicas de conjugação conduzem à detoxificação, produtos de oxidação, como as quinonas, podem ser bioativas e tóxicas. Várias enzimas estão envolvidas na metabolização de HPA: citocromo P-450 (Figura 5), as enzimas extracelulares lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase (SETTE *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Esquema simplificado da ação do citocromo P-450. Fonte: Adaptado de Nelson & Cox, 2011.

O citocromo P-450 é uma família de proteínas similares; cada membro com diferente especificidade pelo substrato. Esse citocromo pode reagir com  $O_2$  e ligar com monóxido de carbono, o complexo da sua forma reduzida com o monóxido de carbono exibe intensa absorção de luz a 450 nm, por isso o nome P-450. Conforme o esquema da Figura 5 apresentado acima verifica-se que o citocromo catalisa reações de hidroxilação em que um substrato orgânico, RH, é hidroxilado a R-OH, incorporando um átomo de oxigênio do  $O_2$  e o outro átomo é reduzido a  $H_2O$  pelos equivalentes redutores fornecidos pelo NADH ou pelo NADPH, que podem ser transferidos para o citocromo P-450 por uma proteína ferro-enxofre (NELSON & COX, 2011). A Figura 6 apresenta o ciclo catalítico das lacases.



**Figura 6.** Ciclo catalítico das lacases; FOH = substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4  $Cu^{2+}$  (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de  $O_2$ . Fonte: Adaptado de Aguiar & Ferraz, 2011.

As lacases atuam pela abstração de 1 elétron de fenóis, em função da redução de  $Cu^{2+}$  a  $Cu^{1+}$  que, por sua vez, reduz  $O_2$  a  $H_2O$ , permitindo que a enzima atue de forma cíclica, conforme mostrado na (Figura 6). Entretanto, essas enzimas também podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas por meio da oxidação de alguns mediadores sintéticos como o hidroxibenzotriazol (HBT), ou mesmo naturais como derivados do ácido benzoico e íons  $Mn^{2+}$  (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

Os fungos não mineralizam, ou seja, não metabolizam os HPA de modo que promova a completa degradação, levando a formação de  $CO_2$  e  $H_2O$ , tanto quanto as bactérias. A produção



de intermediários poli-hidroxiados pode ser o passo limitante na degradação de HPA por fungos. Além de contribuir no processo de mineralização dos HPA, os fungos produzem compostos altamente solúveis em água, aumentando a sua reatividade química, que pode facilitar o ataque por parte de bactérias autóctones (CERNIGLIA E SUHERLAND, 2001; LEMOS *et al.*, 2008).

Apesar de existir uma suscetibilidade pré-definida ao ataque microbiano, nem sempre esse padrão é universal. No trabalho de Cooney *et al.* (1985) foi reportada uma degradação maior de naftalenos do que de hexadecanos, na presença de misturas de sedimentos aquíferos em lago de água doce. Ainda de forma análoga, Jones *et al.* *apud* Leahy e Colwell (1990) observaram uma extensa degradação de alquilaromáticos em sedimentos marinhos, antes de detectar quaisquer mudanças no perfil de alcanos em uma amostra de óleo cru testada. Contrariamente ao exposto acima, no trabalho de April *et al.*, (2000) foi citada a degradação da fração alifática de óleo cru, constituída por alcanos com 12 a 26 átomos de carbono, enquanto que a degradação de aromáticos não foi observada. Foi encontrado resultados semelhantes no trabalho de Chaîneau *et al.*, 1999.

Outros autores comentam que a degradação de HPA pela via microbiana, pode ser realizada tanto pelo emprego do HPA como fonte de carbono e energia, bem como por cometabolismo (co-oxidação). No cometabolismo os sistemas enzimáticos empregados para degradar hidrocarbonetos utilizados como substratos e, portanto, associados ao crescimento dos micro-organismos também degradam hidrocarbonetos não associados ao crescimento microbiano (LEAHY e COLWELL, 1990).

Jacques e colaboradores (2005) utilizaram inóculos de consórcio microbiano composto por seis bactérias: (*Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium sp.*, *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microcateriaceae bacterium* e *Naphthaleneutilizing bacterium*) e um fungo (*Fusarium oxysporum*) no solo contaminado, que degradou 48, 67 e 22% do antraceno,

fenantreno e pireno respectivamente; e em solo degradou 92% e mineralizou mais de 78% desses hidrocarbonetos em diferentes concentrações, aumentou a produção de CO<sub>2</sub>, em aproximadamente, 10 vezes em relação a microbiota autóctone do solo.

Um estudo foi conduzido por Boonchan *et al.* (2000) visando avaliar a degradação e a mineralização de HPA pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, pelo fungo *Penicillium janthinellum* e pelo consórcio resultante da inoculação conjunta destes dois micro-organismos. Em presença de benzo(a)pireno, nenhum dos micro-organismos cresceu isoladamente, porém na forma de consórcio houve crescimento de ambos e degradação de 59% do HPA no meio de cultura mineral. A mineralização do benzo(a)pireno foi nula quando culturas puras da bactéria ou do fungo estavam presentes. Quando foram inoculados conjuntamente, a mineralização do HPA foi de 25%.

Venkateswaran & Harayama (1995), por meio do enriquecimento de culturas, isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto, verificando que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presentes foram biodegradadas por uma cultura mista. Contudo, quando as culturas foram colocadas puras, nenhuma delas apresentou melhor degradação do que quando estavam consorciadas.

Silva *et al.* (2007) selecionou linhagens de fungos filamentosos resistentes às condições adversas e capazes de degradar compostos fenólicos a partir de águas residuárias de postos de gasolina. As espécies isoladas pelos autores foram: *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* e *Phoma sp.* e estes apresentaram potencial na degradação dos referidos compostos. Hofrichter *et al.* (1993) citaram que áreas contaminadas por fenóis e outros hidrocarbonetos aromáticos costumam conter fungos filamentosos, agindo na sua degradação. Algumas linhagens, como o *Penicillium sp.* são adaptadas a concentrações superiores a 1.500 mg L<sup>-1</sup> e somente poucos fungos sobrevivem com fenol como única fonte de carbono.

Piecková & Jesenská (1999) investigaram a presença dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Aerobasidium*, *Acremonium* e *Mucor* em locais com altos índices de radiação na Usina Nuclear de Chernobyl, alguns anos após o acidente nuclear. Estes trabalhos confirmam que estes gêneros constituem um grupo de fungos filamentosos que apresentam mecanismos de resistência a condições ambientais adversas.

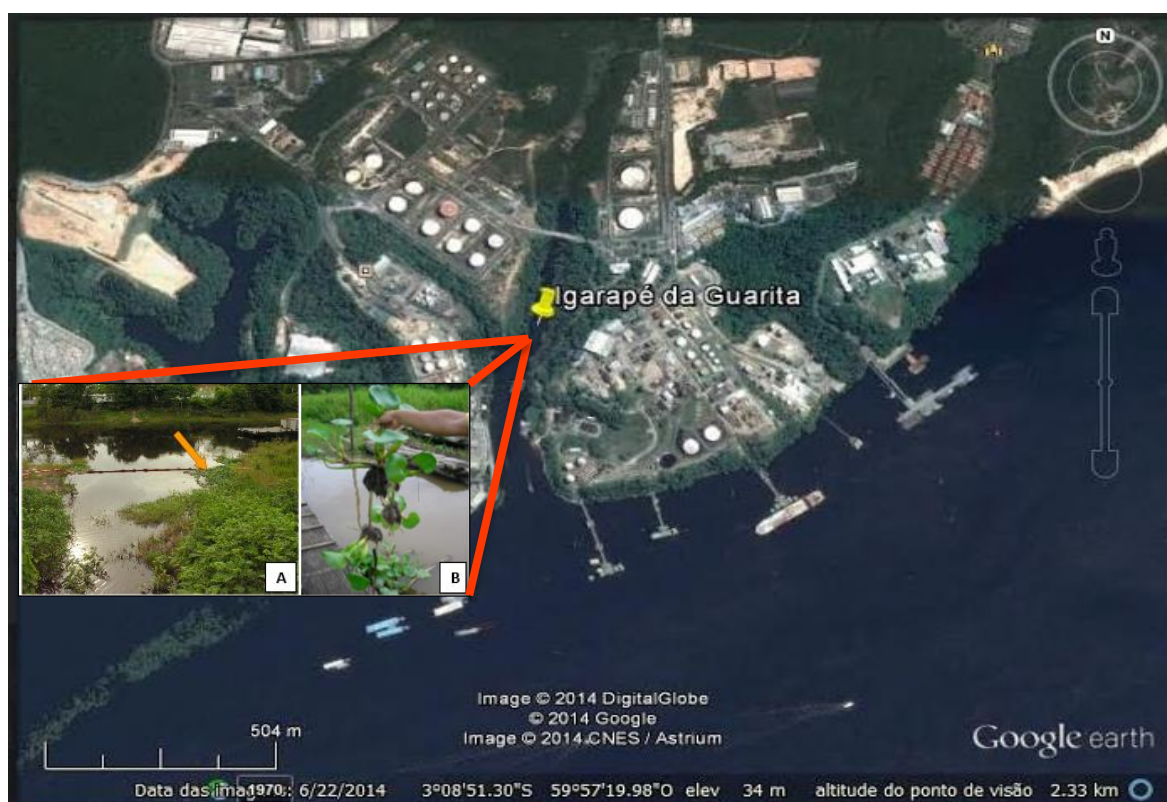
Hanson *et al.* (1993) desenvolveu o teste da biodegradabilidade pelo uso do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Este teste simples e de caráter qualitativo tem sido bastante utilizado na etapa de seleção bactérias, leveduras, fungos filamentosos e consórcios microbianos com potencial para degradar hidrocarbonetos (MARIANO *et al.*, 2007; SANCHES, 2009; BATISTA, 2009; LUZ *et al.*, 2011; ELIAS, 2013; ARAÚJO, 2014; SOUZA, 2015; SOUZA, *et al.* 2015). O princípio desta técnica é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um aceptor 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 (HANSON *et al.*, 1993).

Diante do exposto, esta dissertação apresenta a proposta de estudo da ação biorremediadora de micro-organismos associados à macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, presentes em áreas aquáticas sob influência de hidrocarbonetos provenientes de resíduos de petróleo e seus derivados. A obtenção do consórcio fúngico por meio de técnicas de bioaumento e bioestímulo proporciona um avanço nas pesquisas sobre biorremediação. O presente trabalho está inserido no escopo do Projeto da Rede CTPetro Amazônia: “Tecnologias para a recuperação de ecossistemas e conservação da biodiversidade na Amazônia Brasileira” que visa desenvolver técnicas limpas e eficazes para minimização de poluentes do meio ambiente buscando a preservação da biodiversidade dos ecossistemas aquáticos e terrestres.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico

A seleção do consórcio fúngico envolveu 10 linhagens de fungos filamentosos isolados a partir da macrófita *Eichhornia crassipes* Mart. Solms que foi coletada no igarapé da Guarita (S03°08'46.3" e O59°57'24,4"), área que recebe a saída de efluentes da REMAN – Refinaria Isaac Sabbá da Petrobrás/Manaus-AM, conforme mostrado na Figura 7. Os fungos utilizados no experimento fazem parte da coleção de fungos filamentosos do Projeto Diversidade Microbiana obtida de macrófitas na Amazônia e seu potencial biotecnológico em parceria com a Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Universidade Estadual do Amazonas (UEA/ESA).



**Figura 7.** Localização do ponto de coleta da planta no igarapé da Guarita. Fonte: Google Earth. **A:** Saída dos efluentes da Refinaria Isaac Sabbá - Manaus/AM. **B:** Amostra da macrófita *Eichhornia crassipes* Mart. Solms.

## **4.2 Planejamento experimental**

### **4.2.1 Reativação dos Fungos**

Foram utilizadas 10 linhagens de cada um dos respectivos fungos: *Fusarium*, *Penicillium*, *Bionectria* e *Phoma*. Os fungos foram inoculados em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Agar) acrescido com petróleo bruto e incubado em estufa D.B.O (demanda bioquímica de oxigênio) por um período de 7 dias a 28°C.

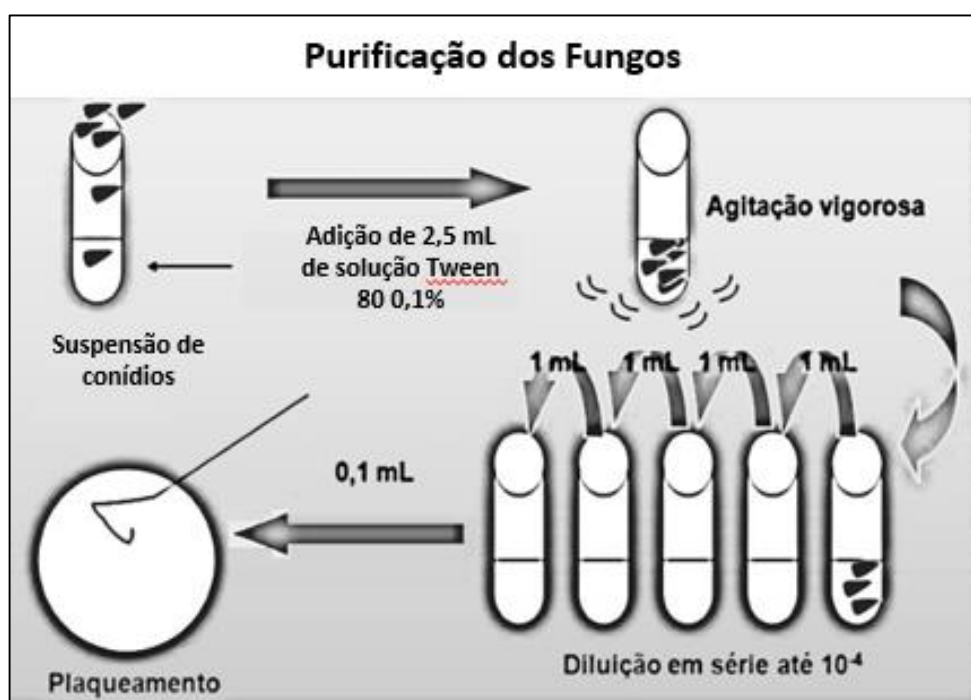
### **4.2.2 Purificação e preservação dos fungos**

Após o crescimento e esporulação dos fungos isolados foram obtidas culturas monospóricas afim de se obter uma nova colônia a partir de um único conídio. Para tal utilizou-se a técnica da diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo desenvolvido por Azevedo e Costa (1973), com adaptações conforme descrito abaixo.

Em câmara de fluxo laminar, as estruturas reprodutivas dos fungos foram raspadas com auxílio de uma alça de platina flambada. Preparou-se uma suspensão de conídios em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução Tween-80 0,1%. Os tubos foram submetidos à agitação, por um minuto, em agitador Vórtex e 1 mL da suspensão em Tween-80 foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,9%. A nova suspensão foi agitada, por alguns segundos, em agitador Vortex. Foram realizadas quatro suspensões seriadas {1:10; 1:100; 1:1000; 1: 10000}, conforme esquema da Figura 8.

Foram distribuídos 100 µL, em duplicata, de cada uma das duas últimas diluições em placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Agar). Após a germinação dos esporos, foi transferido, de cada placa, um fragmento do meio BDA contendo uma ponta de hifa

produzida a partir da germinação de um único esporo. O fragmento foi transferido para uma nova placa de Petri com meio BDA a qual foi mantida em Câmara Incubadora à 28°C, pelo tempo necessário para o crescimento dos fungos colônia (aproximadamente 10 dias). Após o crescimento das colônias, os fungos isolados foram conservados pelo método desenvolvido por Castellani (1939), onde pequenos blocos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL. Seguindo a metodologia adaptada de Winn e colaboradores (2008) foi realizada a técnica de microcultivo para preparação de lâminas para microscopia dos fungos selecionados, corando-as com azul de lactofenol com finalidade de se ter certeza da purificação, imagens em Anexo I.



**Figura 8.** Esquema da purificação dos Fungos. Fonte: Adaptado de BATISTA, 2009.

### 4.3 Teste de Biodegradabilidade

Foi utilizada a técnica do indicador redox, 2,6-diclorofenol indofenol, por meio da ocorrência de oxidação biológica indicada pela mudança na coloração do meio de cultivo. Primeiramente, foi produzido um inóculo de cada fungo: uma alçada por mL de água

esterilizada em um tubo de ensaio. Os tubos foram vedados com papel alumínio autoclavado e colocados para homogeneizar em um vórtex. Em seguida, foi adicionado 1 mL do inóculo de cada fungo em 20 mL de caldo Bushnell Haas acrescido de 100  $\mu$ L de petróleo bruto, 200  $\mu$ L de ampicilina 25 mg mL<sup>-1</sup> e 0,5 mL do indicador redox DCPIP nos frascos.

O teste foi desenvolvido em triplicata, sendo utilizados como controle os frascos contendo o meio com o petróleo, sem presença de fungos e outros contendo o meio com o fungo, porém sem o petróleo. Os frascos foram incubados em shaker com temperatura média a 28°C a 120 rpm para analisar o crescimento dos fungos durante um período de 76 horas, ao final do qual foi realizado um comparativo entre a descoloração do indicador DCPIP obtida nos frascos inoculados com os controles, conforme a Figura 9.



**Figura 9** - Esquema da aplicação do Teste de Biodegradabilidade do 2,6- diclorofenol indofenol (DCPIP).

#### 4.4 Produção de Consórcio fúngico

Após o teste de biodegradabilidade foram selecionadas três linhagens de fungos para formalizar um consórcio microbiano, sendo eles F13, F14 e F01, respectivamente: *Fusarium moniliforme*, *Phoma herbarum* e *Penicillium citrinum*. A partir destas linhagens foi produzido um consórcio fúngico que visou avaliar a capacidade do mesmo em degradar hidrocarbonetos de petróleo em experimento contendo meio BH (Buchnell Haas) em uma concentração de 5 mL.L<sup>-1</sup>.

O meio BH (Tabela 2) é recomendado para a análise microbiológica de combustível pelo comitê Special Publication (SIM, 1963) na deterioração de combustíveis pela atuação de micro-organismos. Este meio contém todos os nutrientes exceto hidrocarbonetos, necessários para o crescimento de alguns fungos e bactérias (DIFCO, 1984).

**Tabela 2.** Meio de cultura Bushnell Haas utilizado para o estudo de micro-organismos que degradam hidrocarbonetos.

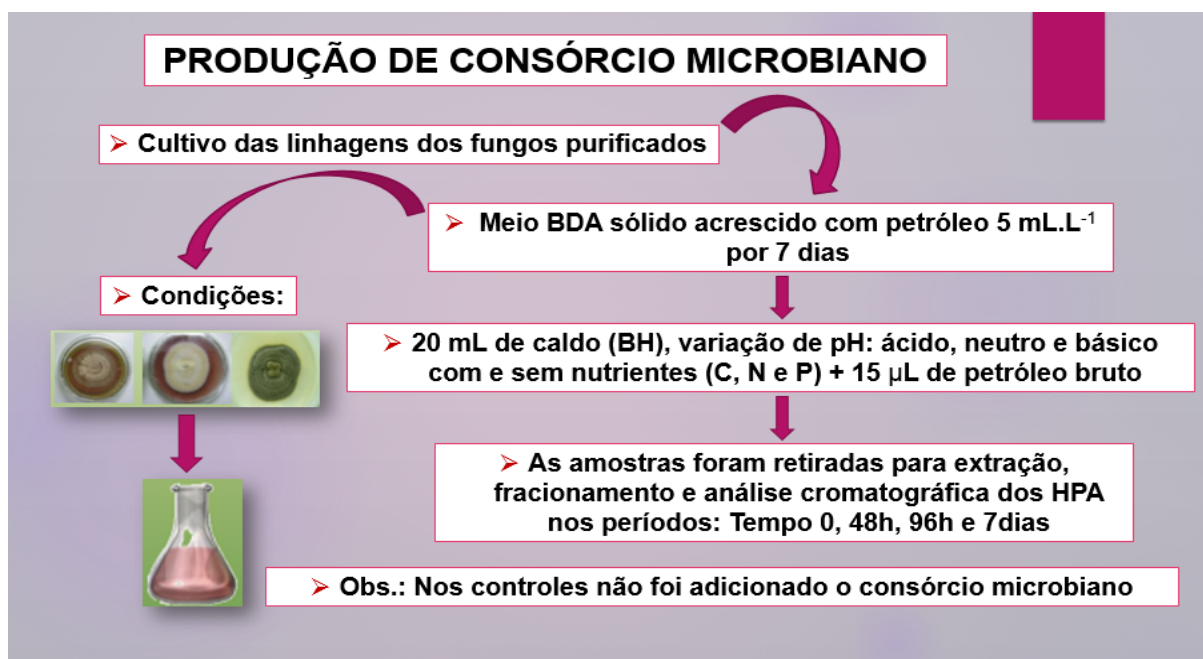
| Componentes                  | Quantidade/L          |
|------------------------------|-----------------------|
| Sulfato de magnésio          | 0,20g                 |
| Fosfato monopotássico        | 1,00g                 |
| Fosfato dipotássico          | 1,00g                 |
| Nitrato de amônio            | 1,00g                 |
| Cloreto de ferro             | 0,05g                 |
| Cloreto de cálcio            | 0,02g                 |
| Antibactericida (Ampicilina) | 2mL/                  |
| pH 7,0 ± 0,2 a 25°C          | 25mg mL <sup>-1</sup> |

**Fonte:** Adaptado de Bushnell and Haas (1941).

A reativação dos fungos ocorreu da seguinte forma: cada fungo foi colocado para crescer em placa de Petri contendo meio de cultura BDA com petróleo no período de 7 (sete) dias. A Figura 10 apresenta o esquema resumido da preparação do consórcio fúngico. Após crescimento fúngico foi produzido o consórcio, no qual com auxílio de uma seringa estéril de 3 mL (sem o bico), foi retirado um bloco de tamanho padrão de cada um dos fungos e introduzidos em tubos de ensaio estéreis, contendo 20 mL de meio Bushnell-Haas com



diferentes condições de pH (ácido, neutro e básico), respectivamente, pH (5,5, 7,0 e 8,0). Os frascos foram agitados por um minuto em vórtex, em seguida foram acrescentados 15 µL de petróleo bruto (cedido pela Refinaria de Manaus – REMAN - PETROBRAS, originário do Pólo de Produção Urucu) e reservados para realização dos diferentes experimentos.



**Figura 10** - Esquema da produção do consórcio microbiano: *Phoma herbarum*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium citrinum* – Aplicação das Técnicas de Bioaumento e Bioestímulo

#### 4.5 Preparação de Amostras para Avaliação dos Processos de Biorremediação

Para a avaliação da eficiência dos processos de biorremediação, as análises dos hidrocarbonetos de petróleo foram realizadas por um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, conforme (Oliveira, 2001) onde foram trabalhadas as seguintes variáveis:

- Meio em diferentes pH: ácido, básico e neutro (para verificar melhor faixa de pH para o crescimento fúngico);
- Adição ou não de nutrientes: fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, provenientes, respectivamente, (de glicose, nitrato de amônio e de fosfato monopotássico);
- Diferentes períodos de degradação: tempo 0, 48 horas, 96 horas e 7 dias.

#### 4.5.1 Experimentos com bioaugmentação e bioestimulação

Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaios de 100 mL. Em cada recipiente foram adicionados 20 mL de amostra com pH ajustado para ácido, neutro e básico) acrescido com 15 µL de petróleo bruto e fonte adicional ou não de nutrientes. Para cada um dos tubos de ensaio com a especificação fonte adicional de C, N e P contendo 20 mL de amostra, foram adicionados 0,4 g de nutriente (glicose, nitrato de amônio e fosfato monopotássico). Foram retiradas alíquotas em diferentes tempos: tempo 0 (considerado assim que adicionada a alíquota do óleo bruto na amostra); 48 (quarenta e oito) horas; 96 (noventa e seis) horas e 07 (sete) dias de processo (Tabela 3), a fim de quantificar os hidrocarbonetos presentes no óleo bruto.

**Tabela 3.** Especificação das condições nos experimentos com bioaugmentação e bioestimulação.

| <b>Tubo de ensaio</b> | <b>Especificações</b>  |
|-----------------------|--|
| <b>01</b>             | Consórcio + petróleo com pH ácido + fonte adicional de C, N e P    |
| <b>02</b>             | Controle com pH ácido com nutrientes (meio BH + petróleo)          |
| <b>03</b>             | Consórcio + petróleo com pH ácido sem adição de fonte de C, N e P  |
| <b>04</b>             | Controle com pH ácido sem nutrientes (meio BH + petróleo)          |
| <b>05</b>             | Branco ácido (meio BH + consórcio)                                 |
| <b>06</b>             | Consórcio + petróleo com pH básico + fonte adicional de C, N e P   |
| <b>07</b>             | Controle com pH básico com nutrientes (meio BH + petróleo)         |
| <b>08</b>             | Consórcio + petróleo com pH básico sem adição de fonte de C, N e P |
| <b>09</b>             | Controle com pH básico sem nutrientes (meio BH + petróleo)         |
| <b>10</b>             | Branco básico (meio BH + consórcio)                                |
| <b>11</b>             | Consórcio + a petróleo com pH neutro + fonte adicional de C, N e P |
| <b>12</b>             | Controle com pH neutro com nutrientes (meio BH + petróleo)         |
| <b>13</b>             | Consórcio + petróleo com pH neutro sem adição de fonte de C, N e P |
| <b>14</b>             | Controle com pH neutro sem nutrientes (meio BH + petróleo)         |
| <b>15</b>             | Branco neutro (meio BH + consórcio)                                |

Conforme a Tabela 3 descrita acima, os controles foram considerados os tubos de ensaio que não tinham adição do consórcio microbiano. Os frascos foram colocados em shaker a temperatura de 28°C e 120 rpm, sendo retirados para extração nos diferentes períodos (tempo 0, 48h, 96h e 7dias).

Para análise dos resultados foram considerados os que obtiveram melhor rendimento após passar por todos os processos até a quantificação dos hidrocarbonetos, sendo então realizado o tratamento dos dados estatísticos com auxílio do software *Action 2.9*. Todos os experimentos descritos acima foram realizados com o consórcio dos fungos em triplicatas, a fim de se verificar melhor eficiência no processo de degradação de hidrocarbonetos.

#### **4.6 Análise de Hidrocarbonetos**

##### **4.6.1 Extração líquido-líquido das amostras biorremediadas**

Após a biorremediação das amostras, estas foram retiradas conforme o tempo de observação pré-estabelecido e submetidas à extração por solventes. O protocolo analítico usado para a extração líquido-líquido de amostras de água baseia-se no método EPA 3510C, visando à obtenção de fase orgânica da amostra. Nesta etapa adiciona-se padrão de referência certificado, sendo utilizado para controle de eficiência do método, ou seja, verificar a recuperação do método.

As alíquotas de 20 mL de amostras de meio mineral BH contendo o consórcio fúngico mais o petróleo bruto foram retiradas conforme o tempo de observação e submetidas a um processo de extração líquido-líquido. O processo de extração foi realizado com 40 mL da mistura dos solventes: hexano e diclorometano (Marca Tedia - UV/HPLC), na composição 1:1 (v/v), que foi dividida em três partes sendo adicionado 50 µL de padrão de recuperação (*p*-terfenil-*d*<sub>14</sub>) a 10.000 ng mL<sup>-1</sup> e 50 µL do padrão de recuperação (triacontrano-*d*<sub>62</sub>) a 500 mg L<sup>-1</sup>

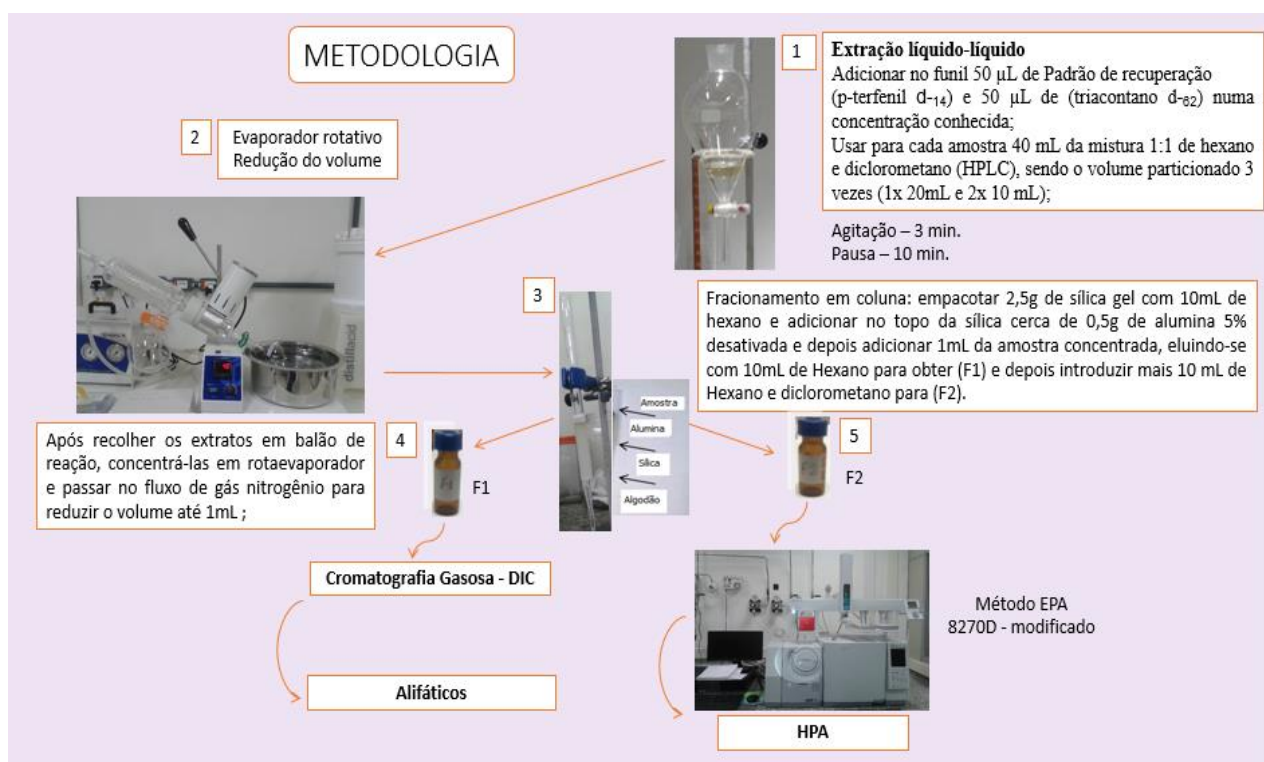
<sup>1</sup>. O uso de padrão de recuperação é requerido pelo método padrão para verificar as perdas do analito que ocorrem na extração. O tubo de ensaio foi agitado em vórtex por cerca de um minuto no modo contínuo e transferido todo o conteúdo sobrenadante para um funil de separação de 125 mL.

A agitação foi realizada durante 3 minutos e a pausa foi de 10 minutos para observar as separações das fases. Após agitação vigorosa e a separação das fases, foi retirada a fase orgânica, ou seja, a cada etapa de agitação e pausa o registro foi aberto de forma a deixar que a fase densa evacuar restando apenas à fase etérea no funil e descartando-se o extrato aquoso. Em seguida reduziu-se o volume da amostra até 1 mL em um evaporador rotativo para a concentração dos compostos orgânicos de interesse.

#### **4.6.2 Limpeza e Fracionamento dos Extratos por Cromatografia em Coluna (CC)**

Os processos de limpeza e fracionamento do extrato foram realizados pela técnica de cromatografia em coluna aberta de vidro. Para o empacotamento da coluna cromatográfica pesou-se 2,5 g de sílica gel ultrapura SiliCycle (fase normal 70-230mesh) e ativou-se a  $120^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , transferiu-se para um béquer (50mL) com adição de Hexano (HPLC), introduzindo-se lentamente a fase estacionária na coluna com este solvente. Logo após adicionou-se 0,5 g de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 5% desativada (para reter possíveis impurezas, tal como lipídeos e graxas) e em seguida a amostra (extrato concentrado) foi colocada cuidadosamente no topo da coluna para eluir. A fração contendo os compostos saturados, de menor polaridade foram eluídos com 10 mL de Hexano para obtenção da primeira fração (F1) onde são recolhidos os hidrocarbonetos alifáticos (alcanos). Observação: Esta fração foi devidamente acondicionada e reservada para análises futuras; e a segunda fração (F2) contendo os compostos aromáticos, de polaridade intermediária foi recolhida após a eluição com 10 mL da mistura (1:1) de Hexano e Diclorometano, no fim do processo foram obtidas duas frações as quais foram devidamente

rotuladas e armazenadas. Em seguida procede-se a secagem das duas frações em fluxo contínuo de gás nitrogênio para redução do volume das frações até aproximadamente 1 mL, sendo estas armazenadas em vials de 1,5 mL para posterior análise por cromatografia gasosa. A Figura 11 demonstra o esquema trabalhado durante a extração e fracionamento dos hidrocarbonetos alifáticos e HPA. As imagens do procedimento encontram-se em Anexo II.



**Figura 11** - Esquema da metodologia empregada nas análises de hidrocarbonetos alifáticos e HPA, segundo EPA - 3510C; EPA - 8270D.

#### 4.6.3 Determinação de parâmetros para calibração instrumental e confecção das Curvas Analíticas

Foram confeccionadas curvas analíticas com padrões certificados de calibração externa (Marca SUPELCO), para o grupo de 16 hidrocarbonetos aromáticos na faixa de: 10, 50, 100,

250, 500, 750 e 1000 ng mL<sup>-1</sup>, como parte do pré-ajuste analítico no equipamento para as determinações.

O Limite de Detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e o Limite de Quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis (EURACHEM, 1998; GUIMARÃES, 2010). O LD e o LQ foram determinados por meio do preparo de 7 replicatas de uma solução de concentração equivalente ao menor ponto da curva: 10 ng mL<sup>-1</sup>. Para tanto obtiveram-se o desvio-padrão das replicatas de branco com adição de pequena concentração dos analitos. De acordo com as Equações (1) e (2):

$$LD = X + t . s \quad (1)$$

Onde:

X = média dos valores das replicatas; o valor de t para 99% de confiança é 3,143 vezes o desvio padrão (s), considerando as 7 replicatas, temos 7-1= 6 graus de liberdade.

$$LQ = X + 6 . s \quad (2)$$

Onde:

X = média dos valores dos brancos; 6 vezes o desvio padrão amostral dos brancos (s).

A exatidão foi analisada por meio do ensaio da tendência/recuperação envolvendo o uso de padrões de referência certificados (INMETRO-DOQCGCRE-008, 2010). Podendo ser expressa como recuperação analítica, conforme a Equação (3) abaixo:

$$\frac{\text{valor obtido}}{\text{valor esperado}} \times 100\% \quad (3)$$

#### 4.6.4 Determinação dos 16 HPA por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os compostos aromáticos eluídos na fração 2 foram transferidos para vials de 1,5 mL, adicionando-se 25 µL da solução mix dos padrões internos deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12), na concentração de 10.000 ng mL<sup>-1</sup>. A determinação dos compostos aromáticos (Fração 2 –HPA) foi realizada por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas - CG-EM (Equipamento Marca: Shimadzu; QP2010 Ultra; Gás carreador: He) utilizando coluna capilar utilizada foi uma DB5-MS (25m x 0,25mm, 0,25µm; composição da fase estacionária (5% difenil, 95% dimetil polissiloxano); a injeção foi realizada em modo splitless, conforme a Figura 12. A Tabela 4 apresenta os gradientes de temperatura estabelecidos para validação do método normalizado que foram utilizados nas análises cromatográficas pela injeção de 1µL da amostra:

**Tabela 4.** Parâmetros de análise cromatográfica, de acordo com EPA 8270D.

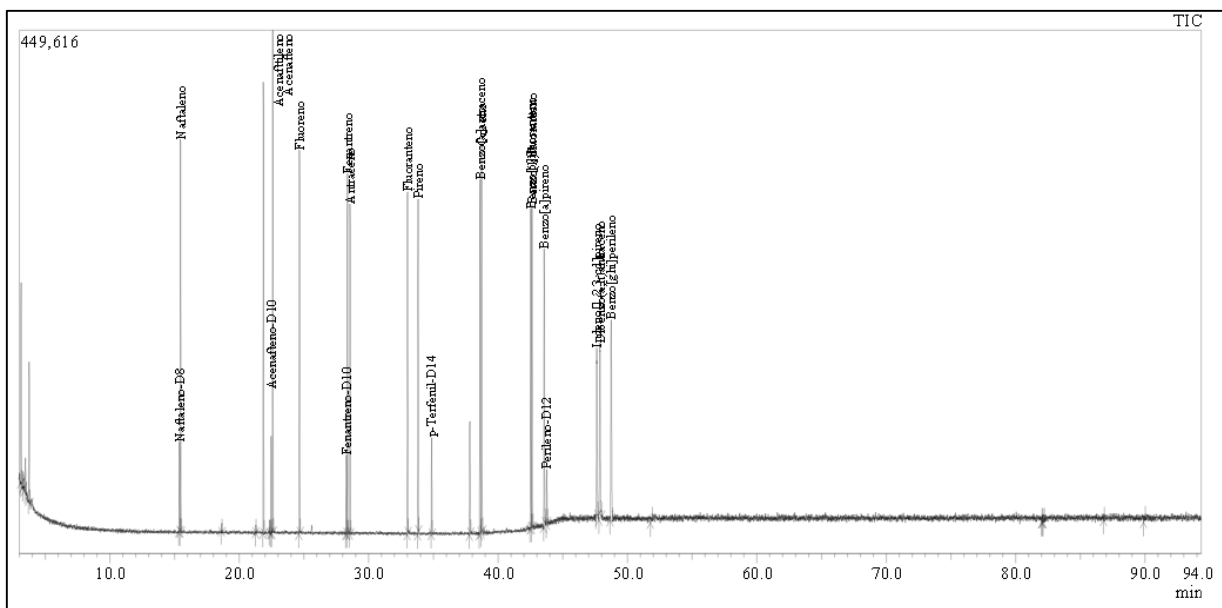
|                        |  |
|------------------------|--|
| Fluxo do gás Hélio 5.0 | 2,0 mL.min <sup>-1</sup>   |
| Temperatura do injetor | 250°C  |
| Temperatura da coluna  | 50°C durante 5min; 80°C a 5°C.mi <sup>-1</sup> ; elevando-se a 280°C a 6°C/min in <sup>-1</sup> permanecendo em isoterma por 20 min, sendo o tempo total de análise de 94.33 minutos |
| Fonte de ionização     | 200 °C   |
| Intervalo de massa     | 55 – 450 u.m.a   |
| Tempo de SCAN          | 0,45 segundos  |
| Energia do feixe de e- | 70 eV  |
| Corrente de emissão    | 250 A  |



**Figura 12** - Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (CG-EM) – Central de Laboratórios – FUCAPI, Manaus-AM, 2015.

As condições cromatográficas foram otimizadas utilizando-se 1  $\mu\text{L}$  de uma solução padrão com os dezesseis HPA na concentração de  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  no modo SCAN. O método apresentou resolução satisfatória, conforme Figura 13. A calibração do equipamento e definição do método por CG-EM foi realizada utilizando-se soluções de concentrações conhecidas (10, 50, 100, 250, 500, 750 e  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) de HPA contendo: naftaleno (N), acenaftileno (Aceft), acenafteno (Ace), fluoreno (F), fenantreno (Fen), antraceno (Ant), fluorantreno (Fl), pireno (Pi), benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Cri), benzo(b)fluorantreno (BbF), benzo(k)fluorantreno (BkF), benzo(a)pireno (BaPi), indeno[1,2,3-cd]pireno (Ipi), Dibenzo[a,h]antraceno (DbahA), benzo[g,h,i]perileno (BghiPe) na concentração de  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  marca *SUPELCO* a partir da qual foram preparadas soluções para construção das curvas analíticas utilizando como solvente diclorometano grau HPLC.





**Figura 13** - Cromatograma com padronização interna obtida após a injeção do mix dos 16 HPA na concentração de  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  e mix dos padrões internos deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12), à concentração de  $10\,000 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Os compostos foram identificados por meio da razão entre as áreas dos analito e os áreas dos padrões interno deuterados, verificando seus respectivos tempos de retenção e massa do íon molecular. A Tabela 5 apresenta a lista dos compostos aromáticos analisados. As quantificações dos compostos foram baseadas nas curvas analíticas com padronização interna, demonstrado nas Figuras 14 e 15 para alguns dos analitos (naftaleno, acenafteno, fenantreno, criseno e perileno). Para a quantificação foi necessária a divisão dos 16 compostos em cinco grupos, conforme o número de anéis aromáticos presentes, sendo considerada a área do pico de cada analito presente na amostra em relação a área do pico dos respectivos padrões internos deuterados: naftaleno-d8 (2 anéis), acenafteno-d10 e fenantreno-d10 (3 anéis), criseno-d12 (4 anéis) e perileno-d12 (5 e 6 anéis) correspondente ao número de anéis do composto, conforme apresentado na Tabela 5.

A partir das concentrações dos individuais dos 16 HPA para o controle e para a média de cada triplicata das amostras foi calculada a Taxa de degradação (Taxa%) pela ação dos micro-organismos, conforme a Equação 4.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{(\text{HPA controle} - \text{média HPA amostra})}{\text{HPA controle}} \times 100\% \quad (4)$$

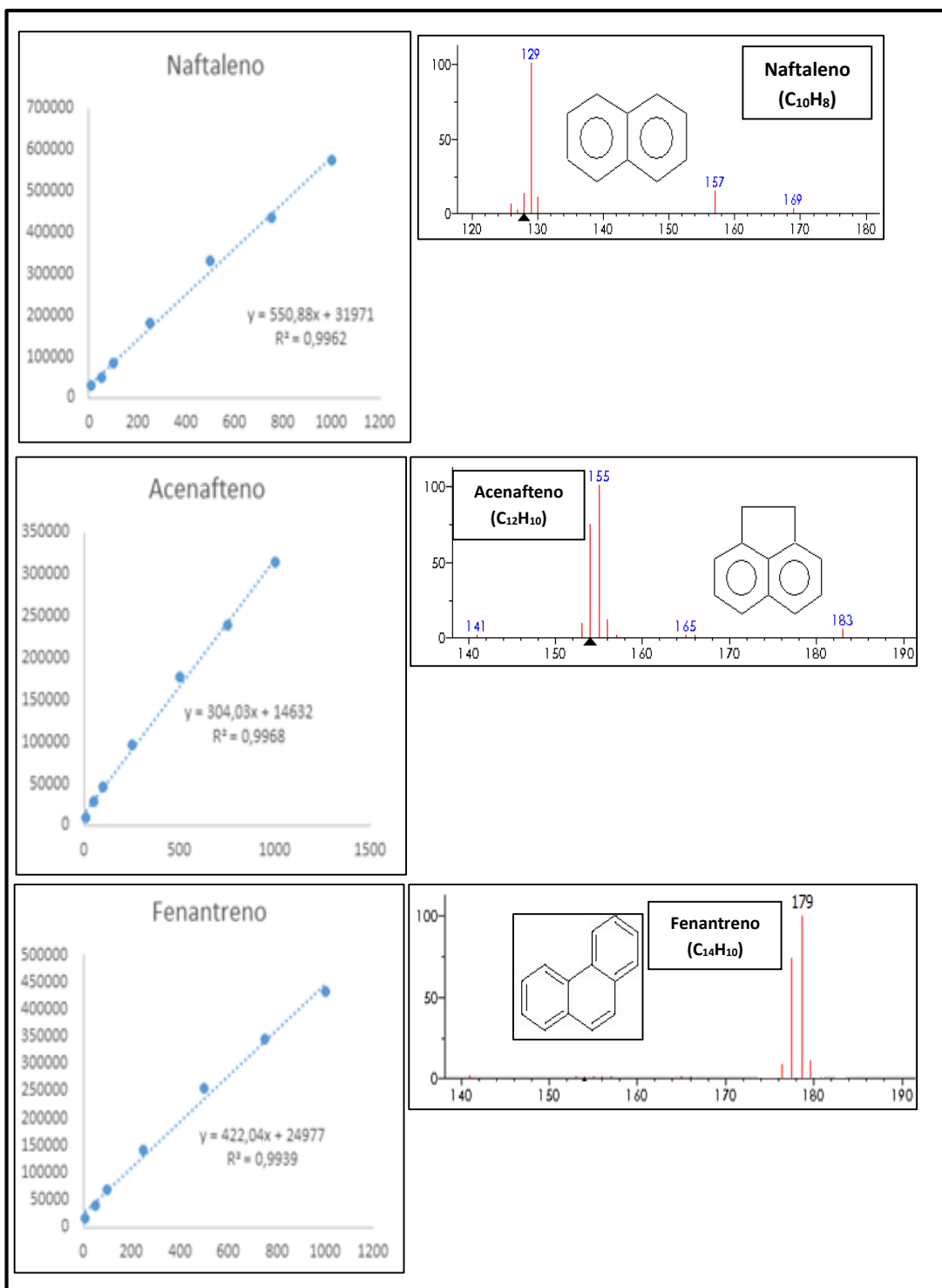
A partir das concentrações dos somatórios dos 16 HPA para o controle e para as amostras foi calculada a Taxa de degradação (%), conforme a Equação 5.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{(\sum 16\text{HPA controle} - \sum 16\text{HPA amostra})}{\sum 16\text{HPA controle}} \times 100\% \quad (5)$$

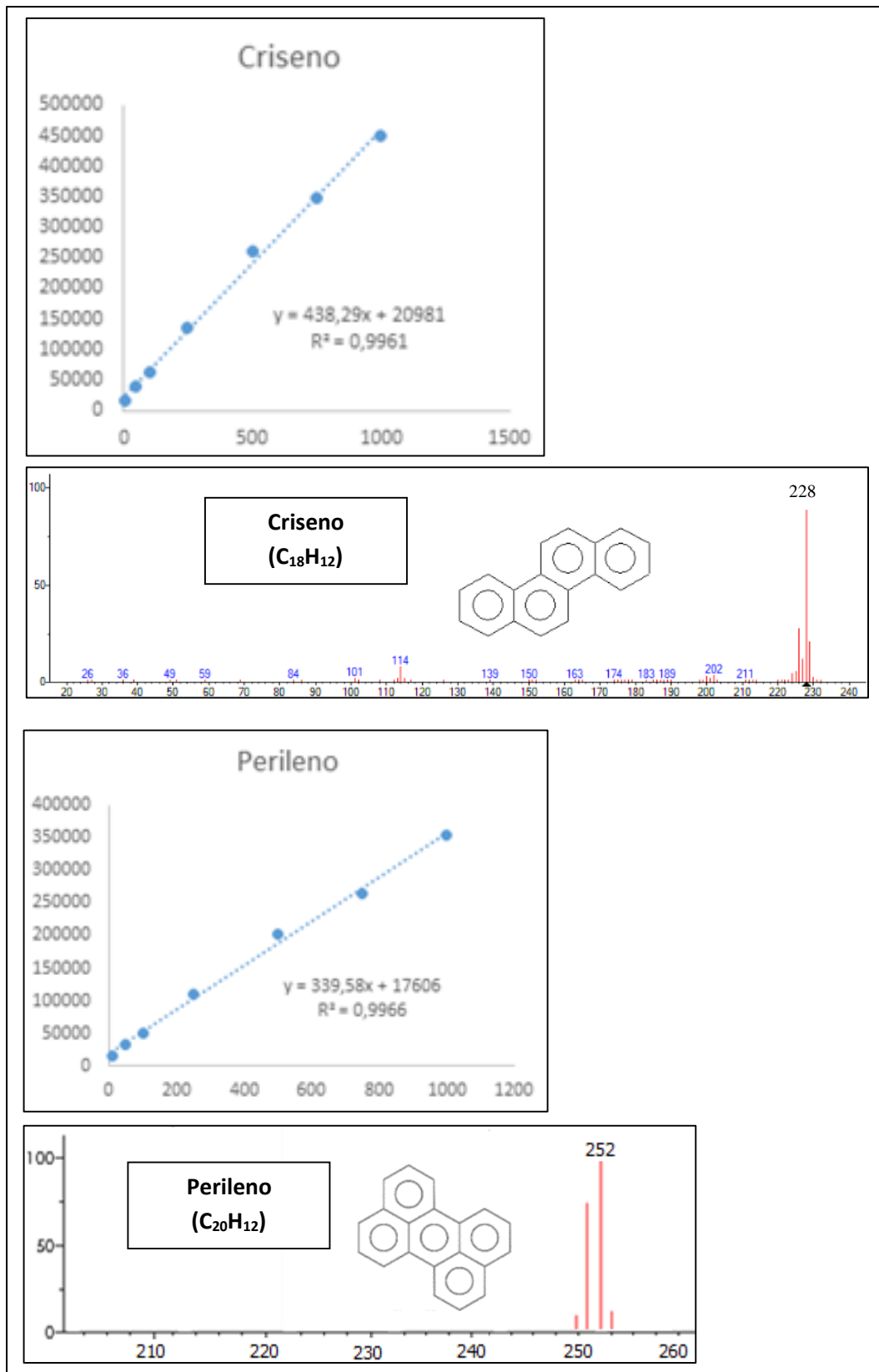
**Tabela 5** - Lista dos 16 HPA analisados, íons m/z, padrão de recuperação *p*-terfenil-d<sub>14</sub> e padrões internos para a quantificação.

| Compostos                                      | Abreviaturas | Fórmula                         | Íons (m/z) | Nº anéis | Tempo de Retenção (min) | Padrão interno (PI)        |
|--|--------------|---------------------------------|------------|----------|-------------------------|----------------------------|
| Naftaleno                                      | N            | C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>  | 128        | 2        | 15.463                  | Naftaleno-d <sub>8</sub>   |
| Acenaftileno                                   | Aceft        | C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>  | 152        | 3        | 21.658                  | Acenafteno-d <sub>10</sub> |
| Acenafteno                                     | Ace          | C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> | 154        | 3        | 23.050                  | Acenafteno-d <sub>10</sub> |
| Fluoreno                                       | F            | C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> | 166        | 3        | 24.648                  | Acenafteno-d <sub>10</sub> |
| Fenantreno                                     | Fen          | C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> | 178        | 3        | 28.354                  | Fenantreno-d <sub>10</sub> |
| Antraceno                                      | Ant          | C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> | 178        | 3        | 28.688                  | Fenantreno-d <sub>10</sub> |
| Fluoranteno                                    | Fl           | C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> | 202        | 4        | 32.660                  | Criseno-d <sub>12</sub>    |
| Pireno   | Pi           | C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> | 202        | 4        | 33.467                  | Criseno-d <sub>12</sub>    |
| <i>p</i> -terfenil-d <sub>14</sub> (surrogate) |              | C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> | 244        | -        | 34.865                  | Criseno-d <sub>12</sub>    |
| Benzo(a)antraceno                              | BaA          | C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> | 228        | 4        | 38.613                  | Criseno-d <sub>12</sub>    |
| Criseno  | Cri          | C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> | 228        | 4        | 38.739                  | Criseno-d <sub>12</sub>    |
| Benzo(b)fluoranteno                            | BbF          | C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> | 252        | 5        | 42.526                  | Perileno-d <sub>12</sub>   |
| Benzo(k)fluoranteno                            | BkF          | C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> | 252        | 5        | 42.624                  | Perileno-d <sub>12</sub>   |
| Benzo(a)pireno                                 | BaPi         | C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> | 252        | 5        | 43.400                  | Perileno-d <sub>12</sub>   |
| Indeno[1,2,3-c,d]pireno                        | IPi          | C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> | 276        | 6        | 47.638                  | Perileno-d <sub>12</sub>   |
| Dibenzo[a,h]antraceno                          | DbahA        | C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> | 278        | 5        | 47.900                  | Perileno-d <sub>12</sub>   |
| Benzo[g,h,i]perileno                           | BghiPe       | C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> | 276        | 6        | 48.749                  | Perileno-d <sub>12</sub>   |

Fonte: Adaptado de Oliveira (2007) e US EPA – Método 8270-D modificado



**Figura 14-** Curvas Analíticas utilizadas para a Quantificação dos 16 HPA presentes nas amostras pelo método da padronização interna. Obtidas com o auxílio do Programa *Microsoft Excel* (2013).



**Figura 15-** Curvas Analíticas utilizadas para a Quantificação dos 16 HPA presentes nas amostras pelo método da padronização interna. Obtidas com o auxílio do Programa *Microsoft Excel* (2013).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste da Biodegradabilidade

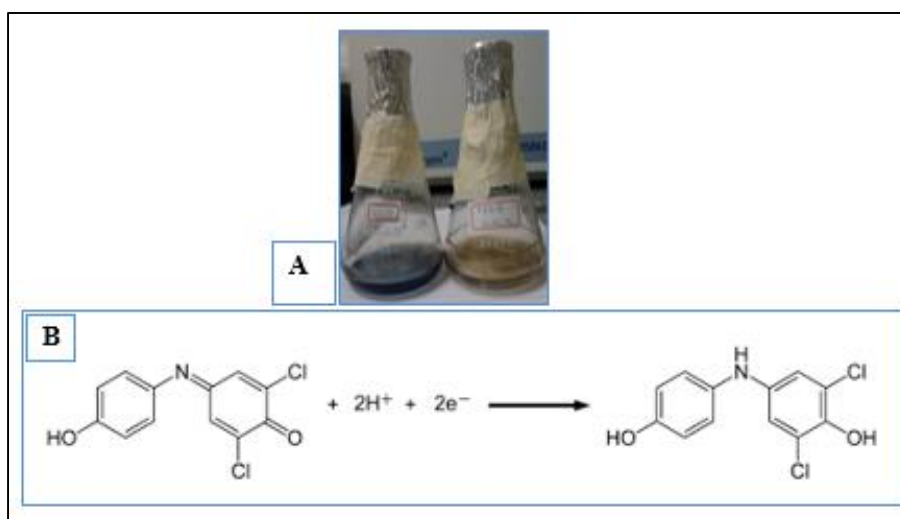
O presente estudo destaca a importância da utilização de linhagens microbianas isoladas em meio seletivo a partir da macrófita *Eichhornia crassipes* Mart. Solms coletada na saída de efluentes da refinaria da Petrobrás/Manaus – AM (REMAN). A etapa de seleção de fungos promissores para formação de um consórcio com potencial em degradar hidrocarbonetos, envolveu um teste de biodegradabilidade. Este ensaio demonstrou que os 10 fungos analisados possuem habilidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo.

Verificou-se a ocorrência de oxidação biológica em todas as amostras testadas com variação entre 24 a 76 horas de incubação no meio de cultivo à  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , sinalizada pela mudança de coloração do indicador redox 2,6 - diclorofenolindofenol (DCPIP). Sendo que a degradação do petróleo bruto ocorreu antes do tempo previsto que fora estimado em 7 dias. A Tabela 6, apresenta a identificação das espécies de fungos utilizadas no experimento.

**Tabela 6.** Identificação dos fungos selecionados para testes de biodegradabilidade.

| Fungos | Espécies                     | Identidade |
|--------|------------------------------|------------|
| F01    | <i>Penicillium citrinum.</i> | 98%        |
| F06    | <i>Phoma herbarum</i>        | 96%        |
| F13    | <i>Fusarium moniliforme</i>  | 98%        |
| F14    | <i>Phoma herbarum</i>        | 96%        |
| F19    | <i>Fusarium oxysporum</i>    | 94%        |
| F23    | <i>Phoma herbarum</i>        | 96%        |
| F24    | <i>Fusarium moniliforme</i>  | 98%        |
| F27    | <i>Penicillium sp.</i>       | 95%        |
| F45    | <i>Phoma herbarum</i>        | 98%        |
| F46    | <i>Bionectria ochroleuca</i> | 96%        |

O princípio deste teste é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um aceptor 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), conforme a Figura 16. Esta técnica desenvolvida por Hanson *et al.* (1993) tem sido utilizada em vários trabalhos, como por exemplo, os resultados obtidos por Mariano *et al.* (2007) que demonstraram que os inóculos empregados nos experimentos de biodegradação foram capazes de biodegradar óleo diesel.



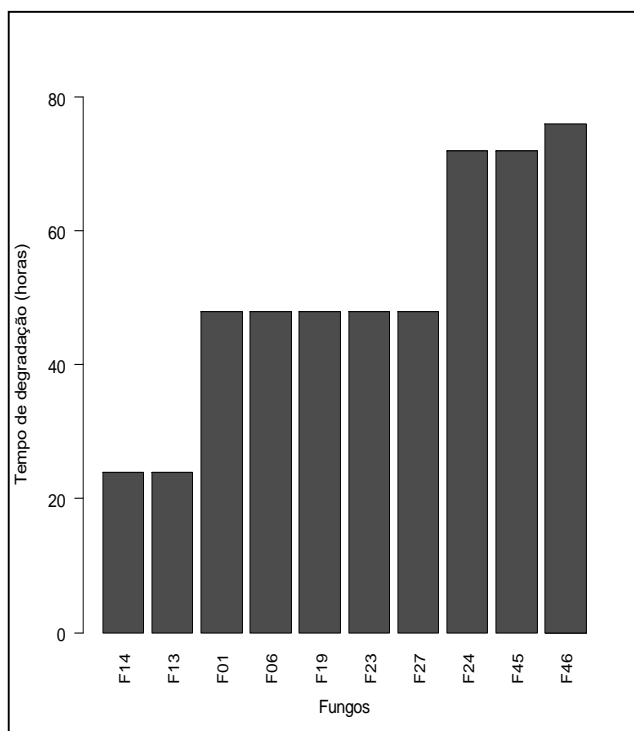
**Figura 16** – A. Amostras de fungos após a oxidação biológica, sinalizada pela mudança de cor do indicador DCPIP. B. Reação redox realizada pelo indicador DCPIP. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula. Fonte: Adaptado de Bidoia *et al.* (2010).

O teste do DCPIP realizado por Bisognin (2012) demonstrou que 8 colônias de fungos isolados de uma biopilha apresentaram capacidade de biodegradar o contaminante sem a dependência de outras espécies. Esta avaliação permitiu constatar maior eficiência por determinadas colônias pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Verticillium*. Também foi constatado no mesmo trabalho que em 80% dos

arranjos de micro-organismos avaliados, os consórcios microbianos apresentaram resultados satisfatórios mais rapidamente que as culturas puras na biodegradação do óleo diesel.

Araújo e Lemos (2002) identificaram 60 fungos filamentosos com capacidade em degradar hidrocarbonetos, os quais foram agrupados em quatro gêneros: *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Aspergillus*. Os dois primeiros gêneros citados por esses autores também foram verificados neste trabalho e ambos obtiveram destaque no teste de biodegradabilidade. As bactérias também têm potencial para degradar hidrocarbonetos. Mariano (2006) utilizou o teste do indicador redox DCPIP para estudar a degradação de óleo diesel por consórcios das bactérias *Staphylococcus hominis*, *Kocuria palustres* e *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo resultados positivos.

A Figura 17, a seguir, foi criada com o auxílio software *Action 2.9*, e relaciona o tempo de degradação com os fungos selecionados, mostrando o potencial de degradação de petróleo para cada fungo.



**Figura 17** - Relação do tempo de degradação versus fungos selecionados para verificação da ocorrência de oxidação biológica.

Analisando a Figura 17 observa-se que os fungos codificados: F13 e F14 foram os que apresentaram maior eficiência de degradação biológica quanto à cinética da reação em até 24 horas de experimento. Observa-se que os fungos dos gêneros *Penicillium* (F01 e F27), *Phoma* (F06, F23) e *Fusarium* (19) apresentaram eficiência na oxidação biológica em 48 horas, enquanto os gêneros *Fusarium* (F14) e *Penicillium* (F45) apresentaram tempo de degradação do petróleo bruto em 72 horas. Apenas o gênero *Bionectria* (F46) apresentou 76 horas para degradação do petróleo.

Apesar dos fungos: F01, F06, F19, F23 e F27 apresentarem o mesmo tempo de oxidação biológica (48 horas), houve necessidade de se escolher uma espécie distinta que formaria o consórcio com as duas espécies que obtiveram o menor tempo (24 horas) que eram de gêneros diferentes (*Fusarium e Phoma*). Logo, optou-se pelo gênero *Penicillium* e selecionou-se o de primeira codificação com um índice de similaridade mais próximo da espécie indicada no banco de dados (GenBank). Considerando-se que os fungos codificados F13, F14 e F01, respectivamente, *Fusarium moniliforme*, *Phoma Herbarum* e *Penicillium citrinum* apresentaram bons resultados como agentes degradadores de hidrocarbonetos de petróleo em até 48 horas de experimento. As imagens macro e microscópica do consórcio selecionado encontram-se em Anexo III.

Tais espécies podem agir por complementaridade e liberar enzimas diferentes que ajudam no processo de conversão do contaminante em nutrientes, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Portanto, a somatória do potencial destes três fungos na produção do consórcio microbiano torna essas linhagens promissoras para possíveis tratamentos por biorremediação. A partir deste estudo fez-se a seleção dos fungos para o consórcio microbiano utilizado neste trabalho.



## 5.2 Parâmetros de Calibração Instrumental

Os parâmetros avaliados neste estudo foram: linearidade (curva de calibração externa: faixa de trabalho e faixa linear); exatidão (estudo de tendência/recuperação) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). No estudo de linearidade foi avaliado se a faixa de trabalho utilizada se apresentava linear para todas as concentrações utilizadas do padrão de referência certificado contendo os 16 HPA e a série de n-alcenos estudados. Para isso, foram preparadas quintuplicatas em seis níveis de concentração (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng mL<sup>-1</sup>) em diclorometano grau HPLC. As curvas de calibração para os 16 HPA encontram-se em Anexo IV.

As curvas de analíticas obtidas para cada um dos compostos foram utilizadas para gerar as equações da reta. As curvas analíticas para cada analito apresentaram coeficiente de correlação quadrado maior que 0,99, o que indica um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Logo, o método apresentou-se linear para a faixa de trabalho utilizada (10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng mL<sup>-1</sup>).

Os valores encontrados para os parâmetros de desempenho determinados na validação da metodologia analítica para os dezesseis HPA em solução estão apresentados nas Tabela 7 com as informações referentes ao parâmetro Linearidade.

**Tabela 7 – Parâmetro de Calibração: Linearidade.**

| <b>HPA</b>                    | <b>Lin. r<sup>2</sup></b> | <b>Equação da reta</b> |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------|
| <b>Naftaleno</b>              | 0,9961                    | y = 550,87x + 31971,64 |
| <b>Acenaftileno</b>           | 0,9955                    | y = 489,21x + 25310,15 |
| <b>Acenafteno</b>             | 0,9967                    | y = 304,02x + 14632,13 |
| <b>Fluoreno</b>               | 0,9952                    | y = 312,56x + 16690,55 |
| <b>Fenantreno</b>             | 0,9938                    | y = 422,038x + 24977,9 |
| <b>Antraceno</b>              | 0,9934                    | y = 415,23x + 21745,16 |
| <b>Fluoranteno</b>            | 0,9958                    | y = 441,90x + 22435,05 |
| <b>Pireno</b>                 | 0,9963                    | y = 453,38x + 21135,26 |
| <b>Benzo(a)antraceno</b>      | 0,9949                    | y = 411,43x + 22978,04 |
| <b>Criseno</b>                | 0,9960                    | y = 428,28x + 20980,9  |
| <b>Benzo(b)fluoranteno</b>    | 0,9934                    | y = 371,84x + 23415,03 |
| <b>Benzo(k)fluoranteno</b>    | 0,9957                    | y = 425,92x + 22768,29 |
| <b>Benzo(a)pireno</b>         | 0,9966                    | y = 339,58x + 17606,73 |
| <b>Indeno(1,2,3-cd)pireno</b> | 0,9972                    | y = 323,84x + 14590,49 |
| <b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>  | 0,9902                    | y = 353,24x + 10570,58 |
| <b>Benzo(ghi)perileno</b>     | 0,9963                    | y = 386,45x + 15674,82 |

Lin. = Linearidade.

O LD e o LQ foram determinados utilizando o desvio padrão (S) de 7 replicatas de branco com adição de pequena concentração dos analitos (10 ng mL<sup>-1</sup>), de acordo com as equações: LD = X + t.s (1) e LQ = X + 6.s (2). Os valores de LD e LQ encontrados para cada HPA estão descritos na Tabela 8. Os valores de LD encontrados estão entre 0,08 ng mL<sup>-1</sup> para o Dibenzo(a,h)antraceno e 0,28 ng.mL<sup>-1</sup> para o Benzo(b)fluoranteno. Os valores de LQ encontrados estão entre 0,12 ng mL<sup>-1</sup> para o Acenaftileno e 0,43 ng mL<sup>-1</sup> para o Benzo(ghi)perileno.

**Tabela 8** – Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) em ng mL<sup>-1</sup>.

| <b>HPA</b>                    | <b>LD</b> | <b>LQ</b> |
|-------------------------------|-----------|-----------|
| <b>Naftaleno</b>              | 0,16      | 0,19      |
| <b>Acenaftileno</b>           | 0,10      | 0,12      |
| <b>Acenafteno</b>             | 0,16      | 0,17      |
| <b>Fluoreno</b>               | 0,16      | 0,19      |
| <b>Fenantreno</b>             | 0,22      | 0,30      |
| <b>Antraceno</b>              | 0,19      | 0,25      |
| <b>Fluoranteno</b>            | 0,21      | 0,23      |
| <b>Pireno</b>                 | 0,20      | 0,25      |
| <b>Benzo(a)antraceno</b>      | 0,20      | 0,24      |
| <b>Criseno</b>                | 0,21      | 0,25      |
| <b>Benzo(b)fluoranteno</b>    | 0,28      | 0,30      |
| <b>Benzo(k)fluoranteno</b>    | 0,22      | 0,27      |
| <b>Benzo(a)pireno</b>         | 0,17      | 0,24      |
| <b>Indeno(1,2,3-cd)pireno</b> | 0,25      | 0,28      |
| <b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>  | 0,08      | 0,15      |
| <b>Benzo(ghi)perileno</b>     | 0,23      | 0,43      |

A exatidão do método foi determinada por meio do ensaio de tendência/recuperação utilizando spike do padrão surrogate *p*-terfenil a 10.000 ng mL<sup>-1</sup> nas amostras antes da etapa de extração líquido-líquido. Foi obtida pela equação:

$$\frac{\text{valor obtido}}{\text{valor esperado}} \times 100\% \quad (3)$$

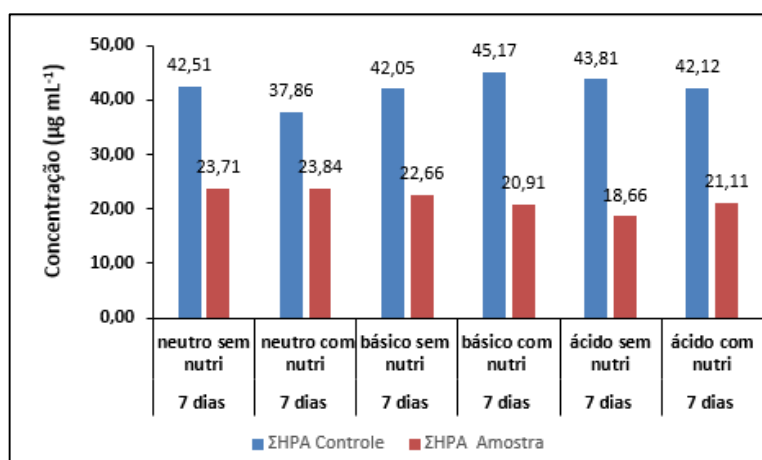
Os resultados de recuperação para o padrão surrogate *p*-terfenil adicionado antes da etapa de extração líquido-líquido variaram de 67,15 a 99,06%, sendo considerado aceitável para o método.

### 5.3 Testes preliminares: Escolha dos tempos de biodegradação e aplicação do consórcio microbiano

Em testes preliminares realizados em parceria com o estudo de Elias (2013) utilizando meio BH (Bushnell Haas) contendo o consórcio dos fungos: *Phoma herbarum*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium citrinum* e acrescidas com petróleo bruto, nos períodos de 24h, 7 e 14 dias sendo utilizadas as técnicas de bioaumento e bioestímulo com adição de padrões certificados de hidrocarbonetos para verificar a eficiência dos métodos analíticos aplicados. As amostras foram retiradas para extração e análise no Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (CG/EM).

Foram realizados ensaios preliminares para a quantificação dos compostos utilizando-se o método da padronização interna. Neste estudo admitiu-se para a avaliação o potencial de degradação de 6 HPA. A quantificação foi realizada considerando-se a área do pico de cada composto presente na curva analítica em relação à do pico do padrão interno.

A Figura 18 apresenta o efeito das diferentes condições empregadas para avaliar o potencial de degradação com o uso do consórcio microbiano.



**Figura 18** - Efeito das diferentes condições de pH e de nutrientes nas concentrações do somatório de 16 HPA em 7 dias de experimento.

Analisando a Figura 18 foi observado uma diminuição da concentração no somatório do 16 HPA em 7 dias de experimento 18,  $65 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados preliminares para avaliação de degradação até 14 dias obtidos para as amostras em meio neutro, básico e ácido evidenciaram que a maior porcentagem de degradação foi em amostras com meio ácido sem a adição de nutrientes (53%). Fato não observado satisfatoriamente após 14 dias, pois houve pouca variação na concentração dos hidrocarbonetos depois dos 7 dias, sendo a porcentagem de degradação para 14 dias em meio ácido sem a adição de nutrientes equivalente a 56%.

Em seus estudos Elias (2013) destaca que após o ataque microbiano são gerados subprodutos de menor peso molecular e mais reativos, enquanto os compostos de cadeias mais longas com números maiores de anéis aromáticos são menos suscetíveis aos ataques dos micro-organismos. Souza (2015) destaca a necessidade de um tempo maior para a mineralização desses compostos. Contudo, se faz necessário avaliar o tempo de meia vida da biodegradação e assim, promover a otimização das técnicas com finalidade de reduzir o tempo de biorremediação. Por isso, no trabalho atual foram selecionados intervalos de tempo em até 7 dias para verificar a cinética de degradação.

#### **5.4 Análise de Hidrocarbonetos**

Pesquisas têm demonstrado que o isolamento de micro-organismos nativos permite que linhagens adaptadas em condições estresse, como pH extremo ou baixa concentração de nutrientes, sejam utilizadas em estudos de biorremediação (ELIAS, 2013; ARAÚJO, 2014; SOUZA, 2015; SOUZA, *et al.* 2015). Permitindo, assim, a prospecção de novas espécies, sendo a biodegradação mais provável quando os xenobióticos apresentam estruturas químicas semelhantes aos compostos naturais promovendo a liberação de enzimas que catabolizam estas moléculas.

Neste estudo foi produzido um consórcio de fungos isolados a partir da *Eichhornia crassipes* Mart. Solms e testado quanto a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em experimento contendo meio mineral líquido (BH) suplementado com 15 µL de petróleo bruto em diferentes tempos de biodegradação: tempo 0, 48 horas, 96 horas e 7 dias. O consórcio foi constituído pelas linhagens identificadas como: *Phoma herbarum*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium citrinum*, pelo uso de técnicas de bioaumento e bioestímulo.

Em seus estudos Gouvéia (2010) destaca que no Brasil, o petróleo de melhor qualidade foi descoberto em 1987, em Urucu, na Amazônia, e possui densidade relativa de 44° API. Por ser um óleo muito leve, a partir dele são produzidos principalmente derivados de alto valor agregado, como o óleo diesel e a nafta. Segundo dados da PETROBRAS (1997), o petróleo de Urucu é considerado leve porque contém 15% de hidrocarbonetos aromáticos (pesados), 20,2% de compostos naftalênicos (médios) e 64,8% de compostos parafínicos (leves). A UNEP (United Nations Environment Programme Chemicals) (2002) destaca que os principais HPA presentes no petróleo bruto são o naftaleno, o fenantreno e seus derivados alquilados. Fato comprovado pela análise da alíquota do óleo e das amostras, pela concentração elevada de fenantreno. A concentração individual e total dos 16 hidrocarbonetos aromáticos para a alíquotas de 15 µL do óleo bruto encontra-se em Anexo V.

Em relação a utilização de consórcio e não apenas de culturas puras, acredita-se que a soma do potencial destes micro-organismos contribui para uma maior taxa de degradação de compostos recalcitrantes. Corroborando com esta afirmativa, Batista (2009) destaca que consórcios microbianos têm apresentado melhores resultados nas taxas de degradação de compostos tóxicos e recalcitrantes do que culturas puras. Fato determinado pela ação conjunta de micro-organismos com metabolismos diversificados, o que proporciona maior eficiência na

transformação ou mineralização dos compostos. Ambientes que sofreram determinado impacto com compostos recalcitrantes, tal como os hidrocarbonetos, podem ser considerados como ambientes seletivos para seleção de uma microbiota ativa na degradação desses contaminantes.

A utilização de consórcios microbianos com linhagens distintas, podem ser favoráveis para aumentar as taxas de mineralização dos HPA e apresentarem complementaridade metabólica ou mesmo co-metabolismo, se comparado as culturas puras. Em contrapartida o estudo recente de Souza e colaboradores (2015) destacam a utilização de cepas puras. Em seus ensaios de biodegradação com o fungo da podridão branca *Megasporoporia sp.* foi evidenciada degradação de 54% de benzo(a)pireno em 14 dias de experimento. Contudo, afirmou ser possível otimizar a taxa de degradação por meio de ajustes em alguns parâmetros, tais como temperatura, pH e fontes de nutrientes. Assim como nos estudos preliminares deste trabalho, Souza *et al* (2015) reporta que em seus experimentos que não foi observado um aumento significativo de degradação entre os períodos de 7 e 14 dias.

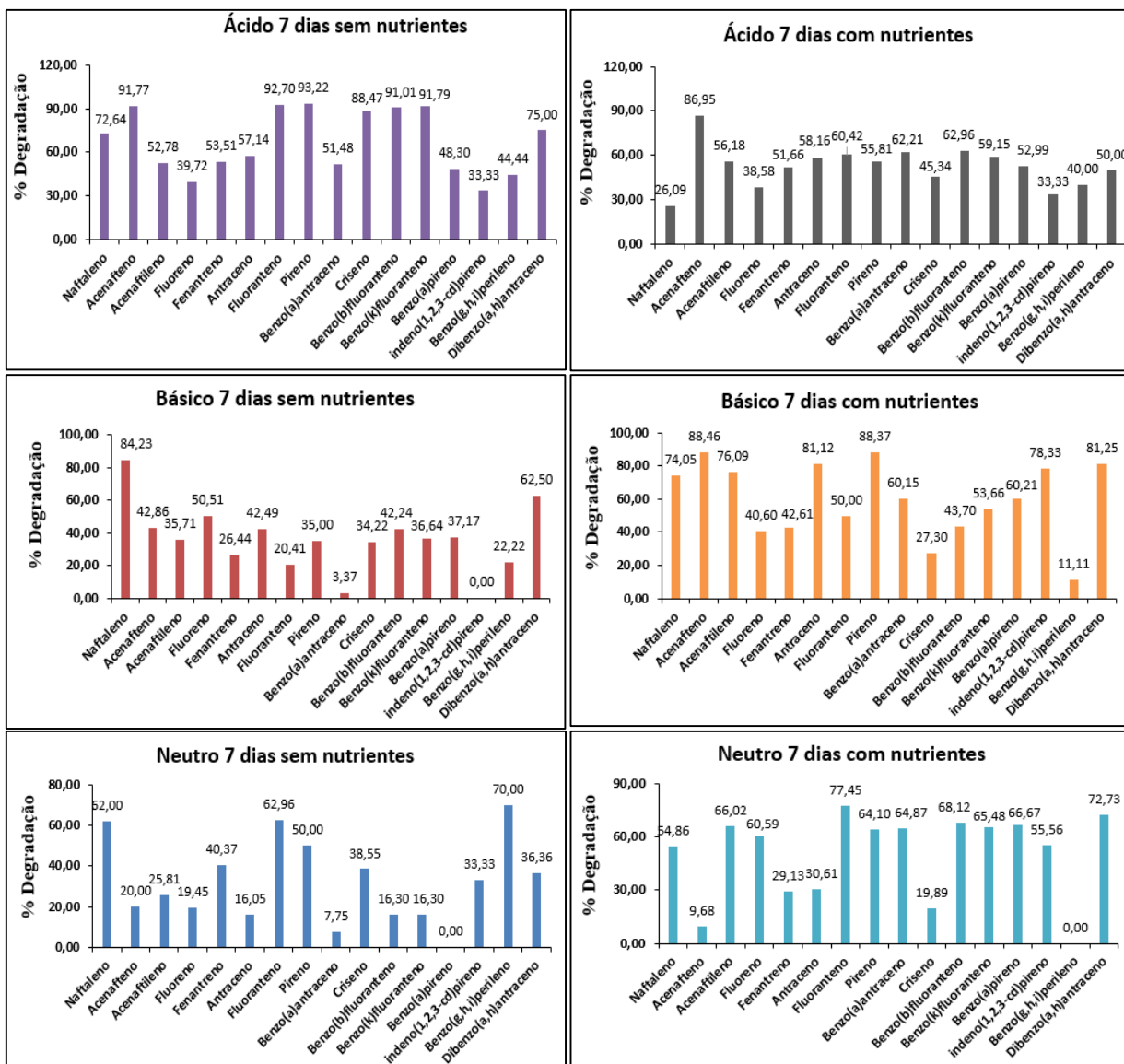
#### **5.4.1 Hidrocarbonetos Aromáticos**

Os resultados dos experimentos com bioaumento e bioestímulo estão apresentados a seguir, avaliando-se o potencial de degradação dos HPA, pela análise do somatório da concentração em  $\text{ng mL}^{-1}$  dos 16 HPA tidos como prioritários pela US EPA: naftaleno (N), acenaftileno (Aceft), acenafteno (Ace), fluoreno (F), fenantreno (Fen), antraceno (Ant), fluorantreno (Fl), pireno (Pi), benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Cri), benzo(b)fluorantreno (BbF), benzo(k)fluorantreno (BkF), benzo(a)pireno (BaPi), indeno[1,2,3-cd]pireno (Ipi), Dibenzo[a,h]antraceno (DbahA), benzo[g,h,i]perileno (BghiPe). Sendo avaliadas as amostras controle sem a presença de consórcio e as amostras degradadas com o consórcio em diferentes tempos, com variação de pH: ácido, neutro e básico e com ou sem nutrientes adicionais.

Em relação à distribuição individual dos 16 compostos aromáticos nas amostras, pode-se verificar, em geral, a predominância de Fenantreno e em escalas menores de Naftaleno, Fluoreno, Fluoranteno, Benzo(a)antraceno e Criseno. As concentrações dos HPA de maior peso molecular com 5 e 6 anéis foram significativamente mais baixas. No estudo de Oliveira (2007) as distribuições desses compostos foram semelhantes, destacando-se, em maior intensidade, o grupo dos homólogos alquilados de fenantreno. A Figura 19 apresenta o percentual de degradação da distribuição individual dos 16 HPA analisados para todas as condições aplicadas em 7 dias. No Anexo VI verifica-se a concentração individual dos compostos e em destaque a concentração elevada do Fenantreno, em geral, variando nos controles entre 102,47 e 128 ng mL<sup>-1</sup> e para as amostras entre 73,87 e 114,37 ng mL<sup>-1</sup>.

Analisando a Figura 19 verifica-se que a maior percentagem de degradação visível no perfil de distribuição é para o meio ácido 7 dias sem adição de nutrientes. Foi verificada uma degradação de 53,51% para o Fenantreno, enquanto para o meio básico e neutro, os melhores perfis de degradação estão em amostras com fonte adicional de nutrientes. Para o meio básico 7 dias com adição de nutrientes a degradação do Fenantreno foi de 42,61%, enquanto para o meio neutro nas mesmas condições essa taxa foi de 29,13%. O valor máximo de taxa de degradação observado foi para o Pireno com 93,22% para o meio ácido sem nutrientes. No entanto observa-se que alguns compostos foram totalmente mineralizados: o Indeno[1,2,3-cd]pireno no meio básico sem nutrientes, o Benzo(a)pireno no meio neutro sem nutrientes e o Benzo[g,h,i]perileno no meio neutro com nutrientes.





**Figura 19** – Perfil do percentual de degradação dos 16 HPA analisados para todas as condições aplicadas em 7 dias.

A Tabela 9 apresenta os resultados do somatório das concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) expressa em  $\text{ng mL}^{-1}$ , seus respectivos desvios-padrão e porcentagem de degradação. Estes resultados foram obtidos por meio da calibração da técnica cromatográfica por meio da padronização interna, sendo considerada a divisão dos 16 compostos em cinco grupos, conforme o número de anéis aromáticos presentes, sendo considerada a área do fragmento principal de cada composto presente na curva analítica em

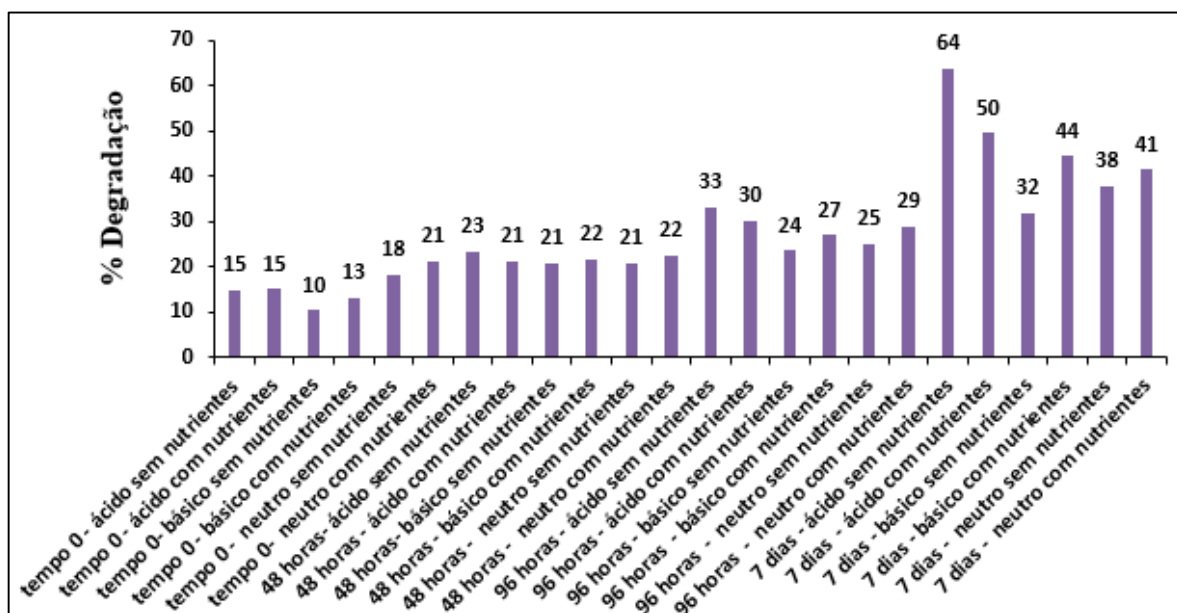
relação à área dos respectivos padrões internos deuterados: naftaleno-d8 (2 anéis), acenafteno-d10 e fenantreno-d10 (3 anéis), criseno-d12 (4 anéis) e perileno-d12 (5 e 6 anéis) correspondente ao número de anéis do composto. As concentrações individuais dos HPA analisados estão apresentadas no Anexo VI.

**Tabela 9** – Somatório das concentrações de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) expressas em ng mL<sup>-1</sup> e porcentagem de degradação.

| TEMPO              | NUTRIENTES | Σ16HPA<br>CONTROLE | DESVPAD | Σ16HPA<br>AMOSTRA | DESVPAD | DIFERENÇA | %<br>DEGRADAÇÃO |
|--------------------|------------|--------------------|---------|-------------------|---------|-----------|-----------------|
| <b>MEIO ÁCIDO</b>  |            |                    |         |                   |         |           |                 |
| 0                  | <b>sem</b> | 211,02             | ±0,45   | 179,56            | ±0,28   | 31,46     | 15              |
| 0                  | <b>com</b> | 220,57             | ±0,45   | 187,57            | ±0,07   | 33,00     | 15              |
| 48h                | <b>sem</b> | 217,01             | ±0,19   | 166,15            | ±0,16   | 50,86     | 23              |
| 48h                | <b>com</b> | 197,90             | ±0,04   | 155,89            | ±0,05   | 42,01     | 21              |
| 96h                | <b>sem</b> | 207,81             | ±0,21   | 139,09            | ±0,14   | 68,72     | 33              |
| 96h                | <b>com</b> | 202,53             | ±0,19   | 141,31            | ±0,02   | 61,22     | 30              |
| 7dias              | <b>sem</b> | 212,70             | ±0,70   | 77,00             | ±0,21   | 135,7     | 64              |
| 7dias              | <b>com</b> | 179,69             | ±0,51   | 90,66             | ±0,31   | 89,03     | 50              |
| <b>MEIO NEUTRO</b> |            |                    |         |                   |         |           |                 |
| 0                  | <b>sem</b> | 180,26             | ±0,05   | 147,46            | ±0,02   | 32,80     | 18              |
| 0                  | <b>com</b> | 185,53             | ±0,01   | 146,05            | ±0,02   | 39,48     | 21              |
| 48h                | <b>sem</b> | 178,48             | ±0,03   | 141,40            | ±0,07   | 37,08     | 21              |
| 48h                | <b>com</b> | 181,87             | ±0,04   | 140,96            | ±0,07   | 40,91     | 22              |
| 96h                | <b>sem</b> | 177,81             | ±0,01   | 133,42            | ±0,01   | 44,39     | 25              |
| 96h                | <b>com</b> | 176,79             | ±0,07   | 125,99            | ±0,07   | 50,8      | 29              |
| 7dias              | <b>sem</b> | 182,26             | ±0,08   | 113,55            | ±0,09   | 68,71     | 38              |
| 7dias              | <b>com</b> | 188,56             | ±0,06   | 110,41            | ±0,22   | 78,15     | 41              |
| <b>MEIO BÁSICO</b> |            |                    |         |                   |         |           |                 |
| 0                  | <b>sem</b> | 171,40             | ±0,24   | 153,73            | ±0,13   | 17,67     | 10              |
| 0                  | <b>com</b> | 210,42             | ±0,02   | 182,90            | ±0,03   | 27,52     | 13              |
| 48h                | <b>sem</b> | 196,54             | ±0,02   | 155,87            | ±0,02   | 40,67     | 21              |
| 48h                | <b>com</b> | 207,87             | ±0,27   | 163,06            | ±0,15   | 44,81     | 22              |
| 96h                | <b>sem</b> | 179,39             | ±0,08   | 137,18            | ±0,01   | 42,21     | 24              |
| 96h                | <b>com</b> | 171,90             | ±0,04   | 125,50            | ±0,06   | 46,40     | 27              |
| 7dias              | <b>sem</b> | 182,12             | ±0,09   | 124,08            | ±0,06   | 58,04     | 32              |
| 7dias              | <b>com</b> | 176,36             | ±0,07   | 97,97             | ±1,04   | 78,39     | 44              |

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 9 é possível observar que a concentração total dos HPA presentes nas amostras varia de conforme o pH e fonte adicional ou não de nutrientes. Foi verificado que o fator tempo exerce bastante influência nos processos de degradação, visto que em 7 dias de experimento houve um decaimento considerável do somatório dos 16 HPA presentes no meio mineral suplementado com petróleo bruto.

É possível observar que o somatório das concentrações dos controles contendo nutrientes variou de ( $220,57 \pm 0,45$  a  $171,90 \pm 0,04$  ng mL<sup>-1</sup>) enquanto os controles sem adição de nutrientes variaram de ( $217,01 \pm 0,19$  a  $171,40 \pm 0,24$  ng mL<sup>-1</sup>). A concentração total dos 16 HPA nas amostras com nutrientes variou de ( $187,57 \pm 0,07$  a  $90,66 \pm 0,31$  ng mL<sup>-1</sup>) enquanto as amostras sem adição de nutrientes variaram de ( $179,56 \pm 0,28$  a  $77,00 \pm 0,21$  ng mL<sup>-1</sup>). A Figura 20 destaca o percentual de degradação para os somatórios do 16 HPA nos diferentes tempos e condições indutoras.



**Figura 20** – Perfil do percentual de degradação para os somatórios dos 16 HPA em todas as amostras.

Verifica-se que a taxa de degradação (%) varia gradualmente ao longo dos 7 dias de experimento em função do pH e indução por fonte adicional de nutrientes. Em destaque encontra-se o somatório da média da triplicata para 7 dias meio ácido sem nutrientes com 64% de degradação. Seguido neste mesmo tempo por meio ácido com nutrientes com 50%, meio básico com nutrientes com 44% e neutro com nutrientes com 41% de degradação. Foi averiguado que a fonte adicional de nutrientes (C, N, P) funcionou como fator indutor para os meios com ajuste de pH básico e neutro. Contudo para o meio com ajuste para ácido este tipo de indução não foi satisfatório. Somente quando considerarmos o resultado em 7 dias, já que nesse período foi degradado metade dos compostos analisados.

O perfil do somatório para os tempos 0 e 48 horas não apresentam uma degradação tão expressiva para as diferentes condições empregadas. No entanto é válido salientar que o tempo 0 apresentou uma leve degradação, mesmo em tão pouco tempo de exposição ao consórcio. Pode-se dizer que a alíquota de óleo bruto sofreu um colapso quando adicionada ao meio de cultura contendo o consórcio fúngico havendo diminuição da tensão superficial. Para o meio neutro com nutrientes a taxa de biodegradação foi mais elevada 21% enquanto para o meio ácido que vem se apresentando como condição mais favorável, neste tempo apresentou taxa inferior, apenas de 15%. Um fato interessante é visualizado nos valores dos somatórios das amostras na Tabela 9 para o período de 48 horas verifica-se uma aproximação das taxas de degradação em todas as condições, variando entre 21-23%.

Alguns fungos demonstram maior habilidade na quebra da gota de óleo, testes semelhantes foram realizados por Batista (2009) com bactérias isoladas da espécie *Eichhornia crassipes*, onde foram encontrados resultados positivos nas formações de micro emulsões após uma semana de crescimento. Resultados parecidos foram obtidos por Bitencourt *et al.* (2005)

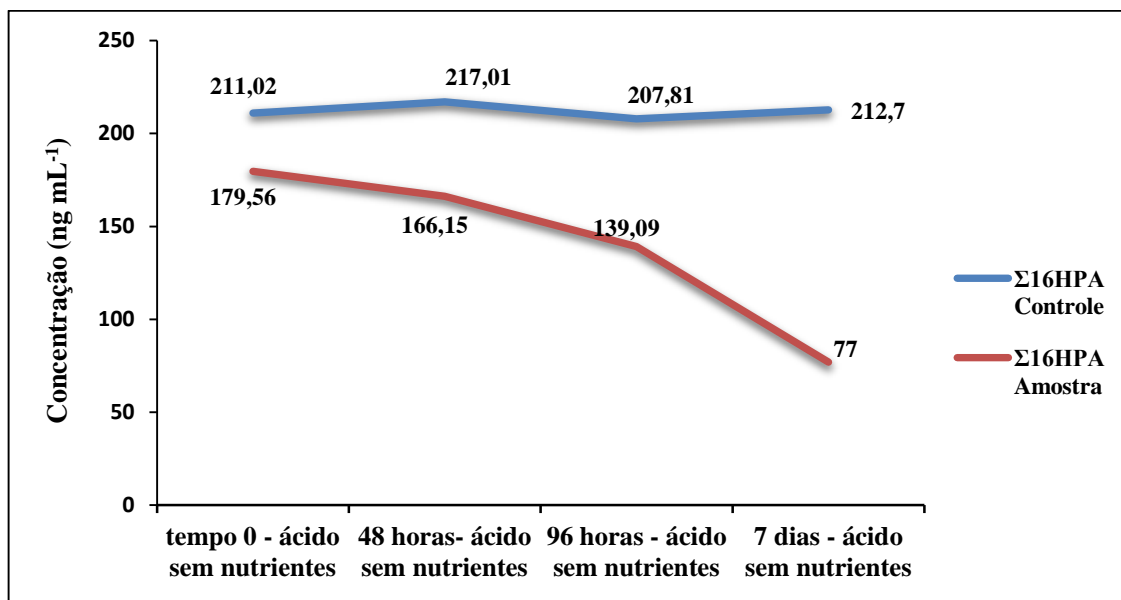
em testes realizados com consórcio de micro-organismos, isolados de talos de algas e incubados com compostos aromáticos.

De acordo com Jacques (2007), dependendo das condições, o tempo de degradação pode variar, pois é importante considerar que a bioestimulação deve ser precedida de criteriosa avaliação, visando determinar os nutrientes e as doses que necessitam ser adicionadas. A intensidade de biodegradação dos HPA é influenciada por diversos fatores, como: disponibilidade de nutrientes, oxigênio, pH, composição, concentração, entre outros (MARGESIN & SHINNER, 1996).

A completa degradação dos hidrocarbonetos é favorecida em valores de pH próximos à neutralidade. Contudo, existem relatos de processos de biodegradação em solos ácidos de florestas tropicais com pH variando de 4,0 a 6,0 (AMADI *et al.*, 1996). De acordo com Alexander (1994), muitas espécies de fungos desenvolvem-se melhor em pH ácido. O que torna importante frisar a importância do pH na degradação de hidrocarbonetos, já que neste trabalho foi observado um decaimento na concentração destes contaminantes principalmente em pH ácido (5,5). Quando os micro-organismos estão em pH diferente de neutro sua capacidade de multiplicação depende de sua capacidade de modificar o pH adverso. Quando em pH ácido, os aminoácidos-descarboxilases de muitos micro-organismos são ativados (pH próximo de 4), resultando na produção de aminas que aumentam o pH. Por outro lado, em pH alcalino, ocorre a atividade de aminoácido-desaminases (pH próximo de 8) que produzem prótons, cujo efeito é a redução do pH.

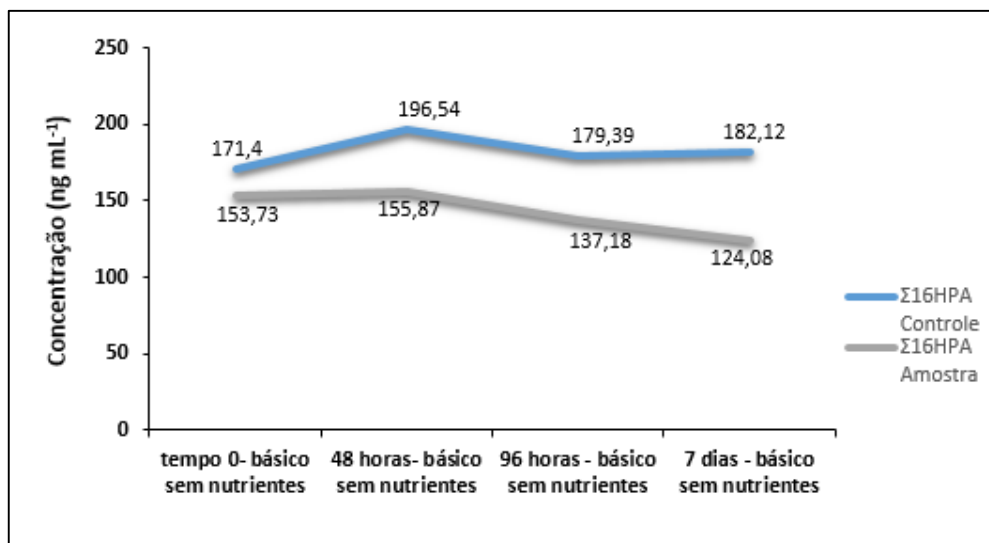
A amostra que ficou em destaque neste estudo de degradação foi 7 dias ajustada para meio ácido sem adição de nutrientes com concentração total dos 16 HPA de  $77,00 \pm 0,21$  ng mL<sup>-1</sup> equivalente a 64% de biodegradação. A Figura 21 comprova o perfil da biodegradação

pela presença de consórcio e sem adição de nutrientes para as amostras em 7 dias de meio ácido nos diferentes tempos.



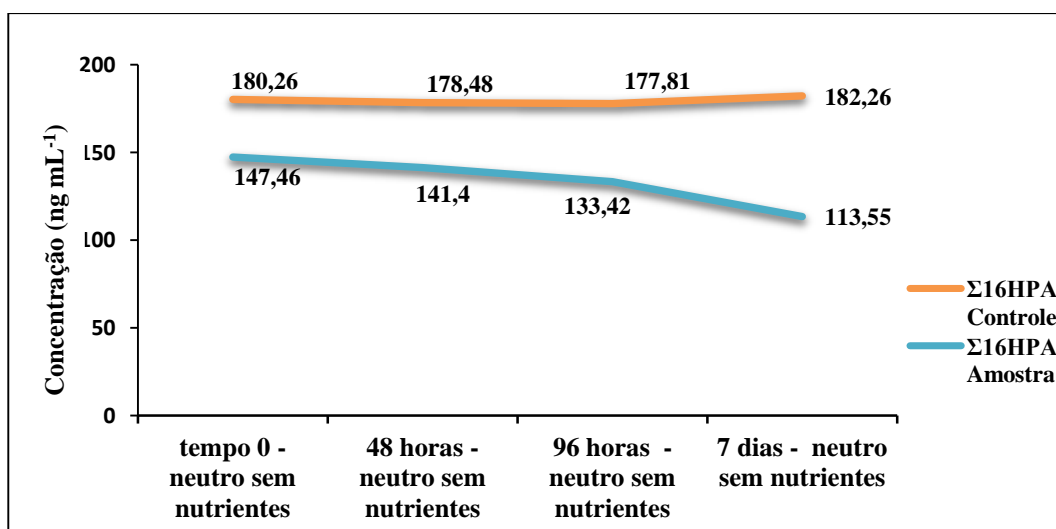
**Figura 21** – Comparativo entre os somatórios dos 16 HPA do controle e da amostra em diferentes tempos (pH ácido e sem adição de nutrientes).

A Figura 22 apresenta o perfil da biodegradação para o meio básico sem adição de nutrientes nos diferentes tempos. Demonstrando claramente o perfil de baixa degradação, por isso não se observa um decaimento tão expressivo dos valores dos somatórios dos 16 HPA. A amostra com ajuste básico em 7 dias sem adição de nutrientes apresentou somatório dos 16 HPA de  $124,08 \pm 0,06 \text{ ng mL}^{-1}$  equivalente a 32% de biodegradação.



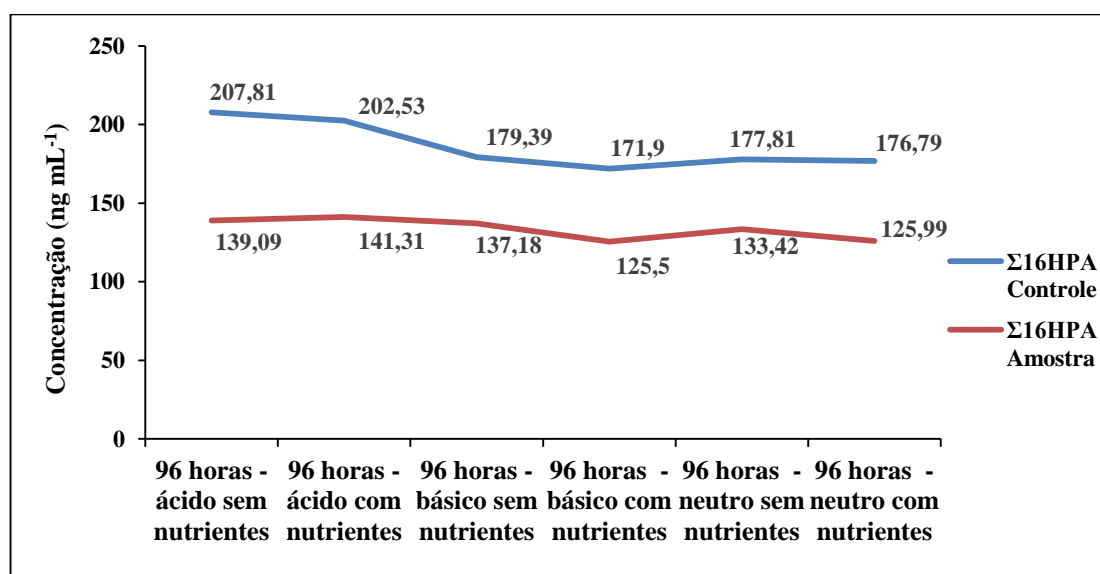
**Figura 22** – Comparativo entre os somatórios dos 16 HPA do controle e da amostra em diferentes tempos (pH básico e sem adição de nutrientes).

A Figura 23 apresenta o perfil da biodegradação pela presença de consórcio e sem adição de nutrientes para as amostras em 7 dias com meio neutro nos diferentes tempos. A amostra com ajuste neutro sem nutrientes apresentou somatório dos 16 HPA de  $113,55 \pm 0,09 \text{ ng mL}^{-1}$  equivalente a 38% de biodegradação. Observa-se que o valor da taxa de degradação é mais elevado do que para o meio básico 7 dias sem nutrientes (32%), porém menor do que para o meio ácido (64%).



**Figura 23** – Comparativo entre os somatórios dos 16 HPA do controle e da amostra em diferentes tempos (pH neutro e sem adição de nutrientes).

A Figura 24 apresenta o perfil comparativo da biodegradação para as amostras no período de 96 horas com e sem nutrientes. Observa-se que nesse período o valor da taxa de degradação é mais elevado para o meio ácido sem nutrientes apresentando somatório de 16 HPA  $139,09 \pm 0,14 \text{ ng mL}^{-1}$  e taxa de 33% enquanto para a condição ácido com nutrientes apresentou 30% de degradação, porém a taxa da condição de pH diferente que mais se aproxima desta é o meio neutro com nutrientes com 29 %.



**Figura 24** – Comparativo entre os somatórios dos 16 HPA do controle e amostra do tempo 96 horas para os meios: ácido, básico e neutro (com e sem nutrientes).

Conceição e colaboradores (2005) reportam que os fungos filamentosos possuem uma resistência maior do que as bactérias e leveduras quando expostos a valores de pH extremos. Sendo observado que as colônias de fungos filamentosos tiveram um maior crescimento na superfície de meios cujos valores de pH foram ajustados em 4, quando comparado ao crescimento obtido nos meios ajustados em pH 5. Corroborando com os resultados aqui obtidos, apesar do pH ter sido ajustado para 5,5, a taxa de degradação dos compostos dos 16 HPA analisados foi elevada, tendo forte influência das diferentes condições aplicadas e neste caso o pH se torna um importante aliado para considerações futuras no emprego de consórcios puros ou mistos.



Os resultados evidenciam que na ausência do carbono proveniente da degradação de matéria orgânica, os fungos liberam enzimas monooxigenases, conforme Lemos *et al.* (2008), o que possibilita a degradação dos HPA presentes na alíquota de 15 µL do petróleo bruto e assim se desenvolvem aproveitando os compostos como fonte de carbono e energia, promovendo a mineralização destes, liberando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água. No caso dos fungos, liberando subprodutos que requerem atenção, quanto ao estudo da degradação completa, já que os mesmos não conseguem degradar totalmente a fração aromática do óleo bruto e requerem auxílio de outros micro-organismos ou de mais estímulo no meio. Além do controle do nível de toxicidade que pode levar a depleção da vida. Sendo observada uma diminuição acentuada da concentração dos compostos, principalmente em 7 dias com ajuste ácido, onde foi visualizada pelos valores dos somatórios uma redução de mais da metade da concentração dos compostos e mineralização de alguns, como o benzo(a)pireno.

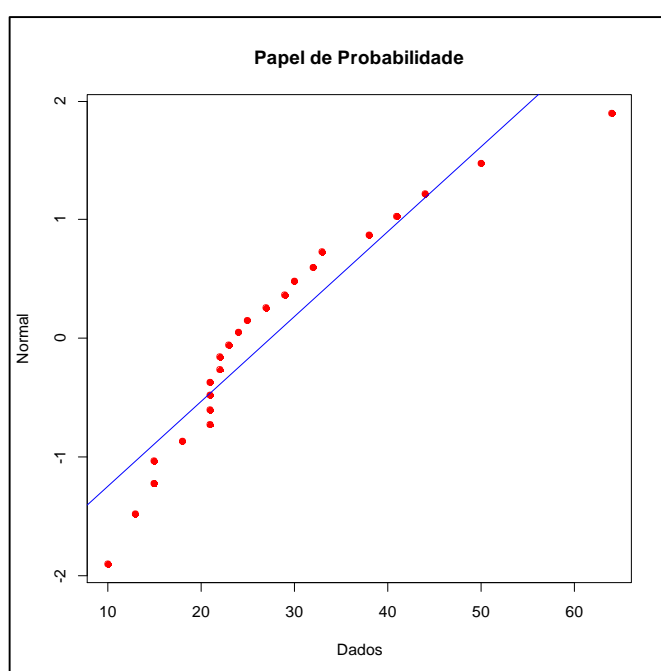
O consórcio fúngico utilizado neste trabalho tem suas particularidades, pois as três linhagens escolhidas são de espécies distintas entre si. O que leva a produção de enzimas com especificidades diferentes e formação de subprodutos ou metabólitos secundários diferentes. Neste contexto se faz necessário um estudo mais abrangente sobre as possíveis vias metabólicas.

#### **5.4.2 Análise Estatística**

A tentativa de otimização das condições de degradação de HPA pode ser mensurada pelo uso da técnica de experimentos fatoriais completos. Segundo Parvez *et al.* (2008), experimentos fatoriais 2<sup>n</sup> revelam os efeitos principais de cada fator individualmente como também das várias interações entre os fatores que influenciam na variável resposta (efeito). Entre as vantagens deste tipo de experimento está a redução do número de ensaios necessários para avaliação das melhores condições para um determinado planejamento. Neste estudo, foi realizado um

experimento do tipo 2<sup>3</sup>. A análise estatística dos dados foi efetuada com o auxílio do software *Action 2.9*. Os efeitos de interação foram estimados por meio de análise multifatorial ANOVA.

Para verificar a normalidade dos dados primeiramente foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk no intuito de avaliar se seguem uma distribuição normal. Para este teste, o nível de significância adotado foi de 95% ( $\alpha = 0,05$ ). A Figura 25 apresenta a aplicação do Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para o conjunto de dados.



**Figura 25** - Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk.

Analisando a Figura 25 verifica-se que os dados não seguem uma distribuição normal. Apesar disso os dados foram submetidos à análise deste experimento via ANOVA. O p-valor encontrado foi de 0,02 sendo ( $<0,05$ ). Esse resultado sustenta a hipótese levantada inicialmente de que as condições empregadas exercem influência na degradação dos compostos e fatores como pH e fonte de nutrientes são considerados indutores de degradação dos HPA. A Tabela 10 apresenta a análise de variância aplicada no conjunto de dados. Nela é possível observar os

efeitos de interação entre os diferentes fatores: Tempo, Condição presença e ausência de nutrientes e pH.

**Tabela 10** – Análise dos efeitos de interação ANOVA.

| <i>Fatores</i>        | <i>G.L</i> | <i>Soma de Quadrados</i> | <i>Quadrado médio</i> | <i>Estat. F</i> | <i>p-valor</i> |
|-----------------------|------------|--------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| <b>Tempo</b>          | 3          | 2896,46                  | 965,49                | 61,41           | 0,0001         |
| <b>Condição</b>       | 1          | 5,04                     | 5,04                  | 0,32            | 0,5917         |
| <b>pH</b>             | 2          | 214,33                   | 107,17                | 6,82            | 0,0285         |
| <b>Tempo:pH</b>       | 6          | 335,67                   | 55,94                 | 3,56            | 0,0739         |
| <b>Tempo:condição</b> | 3          | 3,79                     | 1,26                  | 0,08            | 0,9683         |
| <b>Condição:pH</b>    | 2          | 100,33                   | 50,17                 | 3,19            | 0,1138         |
| <b>Resíduos</b>       | 6          | 94,33                    | 15,72                 |                 |                |

Analisando a Tabela da ANOVA, verifica-se que a Soma de Quadrados representa a variação total no intuito de quantificar a variação de cada fator e a interação entre estes. Logo, quanto maior o valor, mais significativo o fator ou a interação entre os fatores. Neste caso, verifica-se que o tempo é o fator de maior influência sobre a degradação. A predominância do tempo em relação aos demais fatores também é visualizada no valor do teste F onde, para o tempo o  $F_{calculado} > F_{crítico}$  e o p-valor reafirma esta hipótese ( $p\text{-valor} < 0,05$ ). Observa-se a interação entre os fatores tempo:pH e condição:pH, sendo que ambos apresentaram valor de soma dos quadrados elevado e p-valor acima de 0,05. O que confirma a hipótese de que as condições indutoras empregadas, como fonte adicional de nutrientes influenciam diretamente na degradação dos HPA variando conforme o pH do meio. Corroborando com os resultados anteriormente discutidos.

## 6. CONCLUSÃO

O emprego de fungos filamentosos neste trabalho deve-se a um aspecto de especial interesse que é a tolerância dos mesmos em ambientes contaminados e tóxicos. Acredita-se que através da compreensão do poder de ação de micro-organismos degradadores dos grupos de hidrocarbonetos, seja possível ampliar este potencial em escala industrial de modo a encontrar alternativas viáveis para a descontaminação, em especial de ambientes aquáticos. Para tanto, se faz necessário conhecer o comportamento de biodegradação individual dos HPA para depois avançar nos estudos sobre a atuação de enzimas intra e extracelulares e assim, observar a produção de compostos intermediários até atingir a completa mineralização dos compostos tóxicos.

O estudo das linhagens de fungos demonstrou o potencial destes para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. No teste de biodegradabilidade, os fungos F13 (*Fusarium*) e F14 (*Phoma*) degradaram o óleo bruto em 24 horas de experimento. As dez linhagens testadas apresentaram oxidação biológica do meio em até 76 horas. Fato que comprova que o teste de biodegradabilidade do DCPIP é eficaz na seleção de espécies promissoras para aplicação de consórcio microbiano. Nesse estudo foi sugerido a formação de um consórcio com os fungos que apresentaram melhores tempos de degradação, sendo eles F13, F14 e F01, respectivamente, *Fusarium moniliforme*, *Phoma Herbarum* e *Penicillium citrinum*.

Os resultados dos testes preliminares evidenciaram que os fungos: *Phoma herbarum*, *Fusarium moniliforme*, e *Penicillium citrinum* possuem potencial para degradar hidrocarbonetos de petróleo, pois apresentaram uma alta taxa de biodegradação dos HPA total presentes no óleo bruto ao final de 7 dias de experimento comprovando a cinética da reação, considerado para análise mais esmiuçada a partir dos ensaios preliminares em até 14 dias.

Assim, o consórcio escolhido possui características promissoras para o emprego em biorremediação.

A avaliação do comportamento da degradação do petróleo pelos fungos foi verificada após a análise cromatográfica por meio das concentrações individuais dos compostos nos ensaios (in vitro) permitindo observar a eficiência do processo de biorremediação pelo uso de técnicas de bioaumento e bioestímulo. Foi verificado que alguns compostos foram totalmente mineralizados em 7 dias: o Indeno[1,2,3-cd]pireno no meio básico sem nutriente e o Benzo[g,h,i]perileno no meio neutro com nutrientes. Em destaque a mineralização do Benzo(a)pireno para o meio neutro sem nutrientes.

Após encontrar as concentrações individuais de cada composto foram obtidos o somatório das concentrações dos 16 HPA presentes nas amostras e com auxílio de uma ferramenta estatística foi possível verificar que as amostras de 7 dias com pH ajustado para ácido e sem adição de nutrientes apresentaram uma diminuição acentuada na concentração total dos hidrocarbonetos de  $77,00 \pm 0,21 \text{ ng.mL}^{-1}$  com taxa de 64% de biodegradação. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk comprovou que os dados não seguem uma distribuição normal, com p-valor 0,02 ( $<0,05$ ). Fato que já era previsto devido ao gradiente de degradação verificado entre as diferentes combinações dos experimentos de bioaumento e bioestímulo. A análise ANOVA mostrou que o tempo influencia diretamente na degradação. Contudo, o uso de indutores como fonte adicional de nutrientes (carbono, fosfato e nitrogênio), também se mostram significativos, bem como a variação do pH. A análise de variância permitiu com sucesso estipular as melhores condições a serem aplicadas in vitro de forma a se otimizar processos de degradação de hidrocarbonetos, neste caso de HPA.

É válido citar que este estudo complementa o trabalho realizado por Elias (2013), o qual utilizou as mesmas linhagens de fungos e obteve resultados parecidos, indicando taxas de

degradação elevadas para o meio BH com ajuste ácido sem nutrientes. Contudo Elias (2013) considerou apenas o somatório de 6 HPA. Enquanto neste estudo considerou-se o somatório dos 16 HPA. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com a pesquisa precursora deste e confirmam o potencial de degradação dos gêneros de fungos estudados. Na literatura pouco se reporta sobre uma avaliação mais completa para a degradação dos 16 HPA tidos como prioritários em estudos ambientais pela US EPA devido a toxicidade desse grupo, por conta das suas características carcinogênicas e mutagênicas. Ressalto ainda a importância deste estudo mais detalhando na aplicação de métodos analíticos visando determinar a concentração individual dos 16 hidrocarbonetos aromáticos e o somatório dos mesmos, fortalecendo assim, a indicação do potencial de biodegradação dessas linhagens de fungos empregadas no consórcio. Espera-se que este trabalho possa somar-se com diversos outros que denotam a importância da redução de contaminantes em diferentes ecossistemas, visando aprimorar processos de biorremediação utilizando cultura de micro-organismos, em especial os fungos, oriundos da região amazônica.

#### **Considerações para Trabalhos Futuros:**

- ✚ Produzir consórcios de culturas mistas com utilização de fungos e bactérias visando aumentar a eficiência da biodegradação, levando a possível mineralização, ou seja, conversão do contaminante em nutrientes, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O;
- ✚ Aplicação do consórcio microbiano em amostras de água de ambiente impactado com petróleo e derivados, tal como: zonas portuárias onde há movimentação constante de embarcações;
- ✚ Determinar os HPA alquilados, pois são gerados subprodutos de baixo peso molecular;

- ✚ Estudo das enzimas extra e intracelulares envolvidas durante o processo de degradação e elucidação das possíveis rotas metabólicas para avaliar os subprodutos gerados, em especial a produção de biossurfactantes;
- ✚ Associação de outras técnicas analíticas que possam contribuir para análise de resultados, tais com: RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e LC-EM (Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na Biodegradação de Materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Quim. Nova*, vol. 34, n. 10, 1729-1738, 2011.

AISLABIE, J.M.; BALKS, M.R.; FOGHT J.M. & WATERHOUSE, E.J. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environ. Sci. Technol.*, 38:1265-1274, 2004.

ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation. San Diego, Academic Press Inc., 1994.

ALMEIDA, F. V.; CENTENO, A. J.; BISINOTI, M. C.; JARDIM, X. F. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Química Nova*, v. 30, n.8, p. 1976-1985, 2007.

AMADI, A.; ABBEY, S. D. & NMA, A. Chronic effects of oil spill on soil properties and microflora of a rainforest ecosystem in Nigeria. *Water, Air and Soil Pollution*, 86:1-11, 1996.

ANDRADE, J. de A., AUGUSTO, F. & JARDIM, Isabel C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Ecl. Quím.*, São Paulo, 35 - 3: 17 - 43, 2010.

APRIL, T. M.; FOGHT, J.M.; CURRH, R.S. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can. J. of Microbiol.* 46 38-49. 2000.

ARAÚJO, F. S.; LEMOS, J. L. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. In: X Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT, 2002.

ARAÚJO, S. P. de. Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na Amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014. 157f.

ARRUDA, F. V. F. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. 56p. 2011.



ATLAS, Ronald M. Microbial hydrocarbons degradation-bioremediation of soils spills. Journal Chemical Technology and Biotechnology. V.52, p. 149-156, 1994.

AUTRY, A. R. & ELLIS, G. H. Environmental prog., v. 11, p. 318-323, 1992.

AZEVEDO, João Lúcio. Botânica: uma Ciência básica ou aplicada?. Revista Brasil Bot., São Paulo, V.22, n.2(suplemento), p.225-229, out. 1999.

BATISTA, S. B. Bactérias de Ambientes Contaminados Com Petróleo ou Derivados Produtoras de Surfactantes e Emulsificantes. Tese apresentada Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. Viçosa. Minas Gerais. 2002. 32p.

BATISTA, I. H. Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: Um estudo com bactérias isoladas de *Eichhornia Crassipes* na Amazônia. Tese de doutorado (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, 2009. 184p.

BENTO, Fátima M.; CAMARGO, Flávio A.O.; GAYLARDE, Christine C. Biosurfactantes. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. Microbiologia Ambiental. 2ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

BICCA, Flávio C.; FLECK, Leonardo C. & AYUB, Marcos A. Z. Proction of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. Revista de Microbiologia, v.30, p.231-236, 1999.

BIDOIA, E. D; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Méndez-Vilas, p: 1277-1288. 2010.

BISOGNIN, R. P. Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC: Santa Cruz do Sul, 139p., 2012.

BITENCOURT, J. A.P.1, BARCELOS, M. A.1, GUERRA, L. V. 1, SAVERGNINI; F. 1, CRAPEZ, M. A. C. Produção de biosurfactante e diversidade metabólica do consórcio bacteriano isolado do biofilme do talo da alga caulerpa racemosa (forsskål), coletada na praia

do forno, búzios, rio de janeiro. Trabalho técnico científico apresentado no 3º Congresso de P&D em Petróleo e Gás, 2004.

BONAVENTURA C.; JOHNSON F.M. Healthy environments for healthy people: Bioremediation today and tomorrow. *Environmental Health Perspectives*, 105: 5-20, 1997.

BOONCHAN, S. et al. Degradation and mineralization of highmolecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungalbacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.66, n.3, p.1007-1019, 2000.

CARUSO, Miriam Solange Fernandes; ALABURDA, Janete. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)* [online]. 2008, vol.67, n.1, pp. 1-27, 2008.

CASTELLANI. A Viability of some pathogenic in fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* 42, 225-226. 1939.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19: 324- 333, 1997.

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. In: GADD, G. M. (Org.). *Fungi in Bioremediation*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. P. 136-187.

CHAÎNEAU, C.H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E. e OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *The Science of the Total Environment*, 227: 237-247, 1999.

CLAY, R.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory of fungi endophytic infestation on competitive interactions among grasses. *Ecology Brooklyn*, v. 74, p. 1767-1777, 1993.

COLLA, L. M. & COSTA, J. A. V.; Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. *Vetor*, v.13, p. 85-103, 2003.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A. de; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. de F. Fungos Filamentosos Isolados do rio Atibaia, SP e Refinaria de Petróleo Biodegradadores de compostos Fenólicos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72.n.1, p. 99-106, Jan./ Mar., 2005.

Resolução CONAMA Nº 357/2005 – “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências”. - Data da legislação: 17/03/2005 – Publicação DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63

COONEY, J. J., SILVER, S. A.; BECK, E. A. Factor's influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes. *Microbial Ecology*, 11: 127-137, 1985.

CRAPEZ, M.A.C; BORGES, A.L.N; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo, *Ciência Hoje*, v.30, N 179, 2002. UFLA, p. 277-283, 2002.

CUNHA, Cláudia Duarte & LEITE, Selma Gomes Ferreira. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:45-49, 2000.

DAGG, M., BENNER, R., LOHRENZ, S., LAWRENCE, D. “Transformation of dissolved and particulate materials on continental shelves influenced by large rivers: plume processes”, *Continental Shelf Research*, v. 24, pp. 833–858, 2004.

DEL'ARCO, J. P. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999. 171 p.

DIAS, Fábio G. Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente conta minado com derivados de petróleo. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007. 106p.

DUTKA, B. J. (Ed). *Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canadá, 1989.

ELIAS, E. P. Biorremediação de ambientes aquáticos sob influência de resíduos de petróleo pela ação de fungos isolados da macrófita *Eichhornia crassipes* na Amazônia. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013. 129p.

ESTEVES, Francisco de Assis. Fundamentos de Limnologia, Rio de Janeiro: Interciência, 2. ed., 1998.

EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, v. 61, 1998.

GARCIA, E.S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.11, n.3, jul./set. 1995.

GRANATO, M. Utilização do aguapé no tratamento de efluentes com cianetos. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, Série Tecnologia Ambiental, v.5: 1-39, 1995.

HANSON, K.G.; JITENDRA, J. D. NIGAM and ANJANA, J.D. A rapid and sample screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotec. Tech.* v. 07, p. 745-748, 1993.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature reviews: microbiology*, v.9, n. 1, p.177-191, 2011.

HOFRICHTER, M.; GÜNTHER, T.; FRITSCH, W. Metabolism of phenol, chloro- and nitrophenols by the *Penicillium* strains Bi 72 isolated from a contaminated soil. *Biodegradation*, v. 3. p. 415-421, 1993.

INMETRO, Orientação sobre validação de métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 – FEV/2010.

JACQUES, Rodrigo J. S.; BENTO, Fátima M. & CAMARGO, Flávio A. O., ANTONIOLLI, Zaida Inês. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência e Nat.*, UFSM, v. 29 (1), p. 7 - 24, 2007.

JACQUES, R.J.S. Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005. 170f.

JUNK, W.J. “The Amazon floodplain - a sink or source for organic carbon?” In: *Degens ET, Kempe S, Herrera R, ed. Transport of Carbon and Minerals in Major World Rivers*, pp. 267–283, SCOPE/UNEP, 1985.

LACAVAL, Paulo T. & AZEVEDO, João L. Técnicas moleculares aplicadas aos estudos de Ecologia microbiana: A PCR em tempo real (2008). In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. *Microbiologia Ambiental*. 2ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54: 305-315, 1990.

LEMO, J. L. S.; OLIVEIRA, S. D.; BARROS, C. A.; REICHE, A. P. Fungos Filamentosos: Agentes de Degradação de Petróleo e de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs), Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 58p.

LOPES, Alcinei Pereira. Estudo de hidrocarbonetos e metais em sedimentos de fundo da orla urbana da cidade de Manaus. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010. 89 p.

LUZ, C.C.; SANTOS, E.A.; SANTOS, M.O.S.; MUSSY, M.Y.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W.R.; BRUCHA, G.; REIS, M.M.; REIS, M.G. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia. *Química Nova*, Vol. 34, No. 5, 775-779, 2011.

MARGESIN, R. SCHINNER, F. Chronic effects of oil spill on soil properties and microflora of a rainforest ecosystem in Nigeria: *Water Air Soil Pollut.*, v.86(1-4), p.1-11. 1996.

MARIANO, A. P. Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminados com Óleo Diesel. Tese de doutorado, Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, São Paulo, 2006.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. de F. de; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Braz. Jour. of Microb.*, v. 38, n.2, p. 346-353, 2007.

MARÍN, J.A.; MORENO, J.L.; HERNÁNDEZ, T. & GARCÍA, C. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation*, 17:251-261, 2006.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. Microbiologia ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 440 p.

MICHELL, D.S.; TUR, N.M. The rate of growth of *Salvinia molesta* (*S. auriculata* Auct.) in laboratory and natural conditions. *J. appl. ecol.* 12: 213-225, 1975.

MONTEIRO, R. T. Degradação de Pesticidas. *In*: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. Microbiologia ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 440p.

NELSON, D. L. COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Coordenação da tradução: HORN, F.; revisão técnica: DALMAZ, C.; FARIAS, S. E. – 5 Ed. – Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.

NIOSH. Polynuclear aromatic hydrocarbons by HPLC: method 5506. NIOSH Manual of analytical methods (NMAM). 4 th ed. 1998.

OLIVEIRA, A. de; DALY, D. C.; VARELLA, D. ALMEIDA, H. de. Florestas do Rio Negro. São Paulo: Companhia das Letras, UNIP, 2001.

OLIVEIRA, Fernando J. S. O. Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001;

OLIVEIRA, V. M., MANFIO, G.P. Molecular approaches for the screening of novel enzymes. *In*: Jean-Louis Reymond. (Ed.). *Enzyme Assays: High-throughput screening, genetic selection and fingerprinting*. p. 221-238, 2006.

OLIVEIRA, Tereza C.S. Caracterização de marcadores moleculares e uso de diferentes proxis para estudo do registro de combustão em sedimento na Amazônia Central (Coari-Manaus). Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2007, 193 p.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R. & MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I - bioprocesses and products. *Process Biochem.* Vol. 35. Pg. 1153-1169. 2000.

PEIXOTO, Raquel S.; ROSADO, Alexandre S.; TAKETANI, Rodrigo G.. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável. *In* MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. *Microbiologia Ambiental*. 2ª Ed. Embrapa Meio Ambiente, 2008.

PETERS, K.E.; MOLDOWAN, J.M. The biomarker guide. Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 363p, 1993.

PETERS, K. E., WALTERS, C. C. & MOLDOWAN, J. M.; The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History. Cambridge University Press, 2005, 471p.

PIECKOVÁ, E. & JESENSKÁ, Z. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann. Agric. Environ. Med.*, v.6, p.1-11, 1999.

PIEIDADE M.T.F, JUNK, W.J., LONG, S.P. “Nutrient dynamics of the highly productive C4 macrophyte *Echinochloa polystachya* on the Amazon floodplain”, *Functional Ecology*, v. 11, pp. 60–65, 1997.

PETROBRAS. Características do petróleo de Urucu. CNPES: SEPESQ: DIQUIM: SETAV. 1997.

POMPÊO, M. L, M.; MOSCHINI-CARLOS, VIVIANE. Macrófitas Aquáticas e perifíton, aspectos ecológicos e metodológicos. São Carlos: Rima, 2003.

PRINCE, R.C. Petroleum Spill Bioremediation in Marine Environments. *Critical Reviews Microbiology*, 19: 217-242, 1996.

PRINCE, R. C.; VARADARAJ, R.; FIOCCO, R. J.; LESSARD R. R. Bioremediation as an oil spill response tool. *Environmental Technology*, 20:891-896,1999.

ROSATO, Yoko Bomura. Biodegradação do Petróleo. *In* MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 440 p.

SALANITRO, J. P. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. *Advances in Agronomy*, 72: 53-105, 2001.

SANCHES, R. de J. Seleção de Micro-organismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos e diesel. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009. 66p

SETTE, Carla B.; PEDRETE, Thaís de A., FELIZZOLA, Juliana; NUDI, Adriana H.; SCOFIELD, Arthur de L.; WAGENER, Angela de L.R. Formation and identification of PAHs metabolites in marine organisms. *Marine Environmental Research* - 91: 2e13, 2013.

SILVA, Célia M.M. de S. & FAY, Elisabeth Francisconi. Persistência e Biomagnificação de moléculas xenobióticas. *In* MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 440 p.

SILVA, C.M.M.S.; VIEIRA, R.F.; FAY, E.F.; OLIVEIRA, C. DE S. Efeito do paclobutrazol sobre a microbiota do solo. *In*, C.M.M.S.; FAY, E.F. *Impacto ambiental do regulados de crescimento paclobutrazol*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003.

SILVA, L. E. C.; LUDWIG, K. V. F.; NEWMANN, D.; SHENEIDER, A. C.; ONOFRE, S. B. Fungos Filamentosos degradadores de compostos fenólicos isolados de águas residuárias de postos de combustíveis. *Revista de Biologia e Saúde da UNISEP Biology & Healthy Journal*, 1: 101 – 108, 2007.

SIM. Special Publication Society for Industrial. Washington, DC, n.1, July, 1963.

SOUZA, Hilton M. de L. Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos de sedimentos contaminados do Rio Negro com potencial para degradação de Hidrocarbonetos de Policíclicos Aromáticos. Tese (Doutorado em Biotenologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015. 115f

SOUZA, Hilton M. de L.; TANIGUCHI, Sati; OLIVEIRA, Tereza C. S. de; OLIVEIRA, Hiléia S. B.; ZANOTTO, Sandra P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Superficial Sediments of the Negro river in the Amazon region of Brasil. *Journal of the Brazilian Chemical Society – JBCS*, Vol. 26, 7: 1438-1449, July – 2015.

SPINDOLA, Luciana A. Macrófitas aquáticas em duas lagoas marginais do Rio Taquari, Coxim, MS. Dissertação de Mestrado (Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2007.

TOLOSA, S. M.; HEIKHOLESAMI, M. R.; VILLENEUVE, S. J. P. et al. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal Caspian sea sediments, *Marine Pollution Bulletin*, n. 48, p. 44-60, 2004.



UNEP (United Nations Environment Programme Chemicals). Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Antarctica Regional Report. p. 86, 2002)

URURAHY, A.F.P.; PEREIRA Jr, N. & MARTINS, M. D. M. Desempenho de um Biorreator do Tipo CSTR no Processo de Degradação de Borra Oleosa. Boletim Técnico PETROBRÁS, Rio de Janeiro, 41 (3/4): 125-132, jul/dez, 1998.

VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. *Can. J. Microbiol.*, Vol. 41, pp.767-775, 1995.

WANG, P.F., MARTIN, J.-M., MORRISON, G. Water quality and eutrophication in Tampa Bay, Florida. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 49: 1-20, 1999.

WAGENER, Ângela de Luca, SCOFIELD, Arthur L. et al. Monitoramento dos Danos Causados pelo Derramamento de Óleo em Manguezais: desenvolvimento de novas abordagens. PUC/ RJ. 2002.

WILSON, S. C.; JONES, K. C. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 88: 229-249, 1993.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E. W.; PROCOP. G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WITTMANN, F., JUNKA, W. J., PIEDADE, M.T.F. “The varzea forests in Amazonia: flooding and the highly dynamic geomorphology interact with natural forest succession”, *Forest Ecology and Management* v. 196, pp. 199–212, 2004.

YUNKER, M.B., BACKUS, S.M., GRAF PANNATIER, E., JEFFRIES, D.S., MACDONALD, R.W. Sources and Significance of Alkane and PAH Hydrocarbons in Canadian Arctic Rivers. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 55: 1-31, 2002.

## ANEXOS

### Anexo I – Imagens dos procedimentos de suspensão seriada e preparação das lâminas.

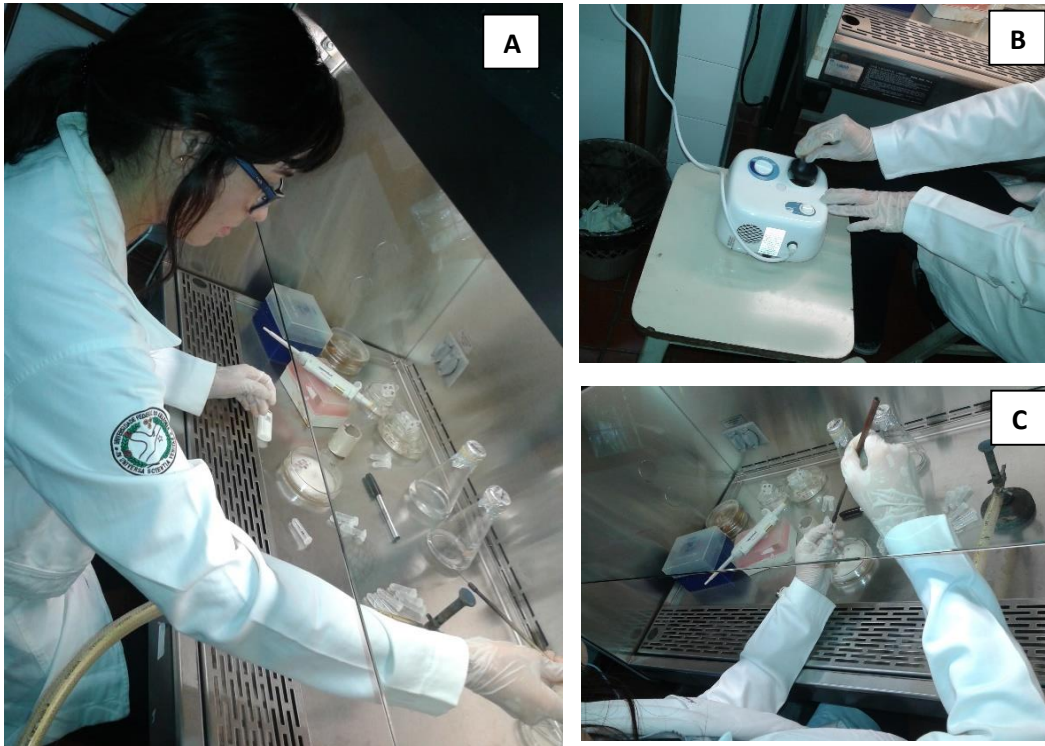


Figura – (A) Suspensão seriada; (B) Agitação em vórtex; (C) Plaqueamento.

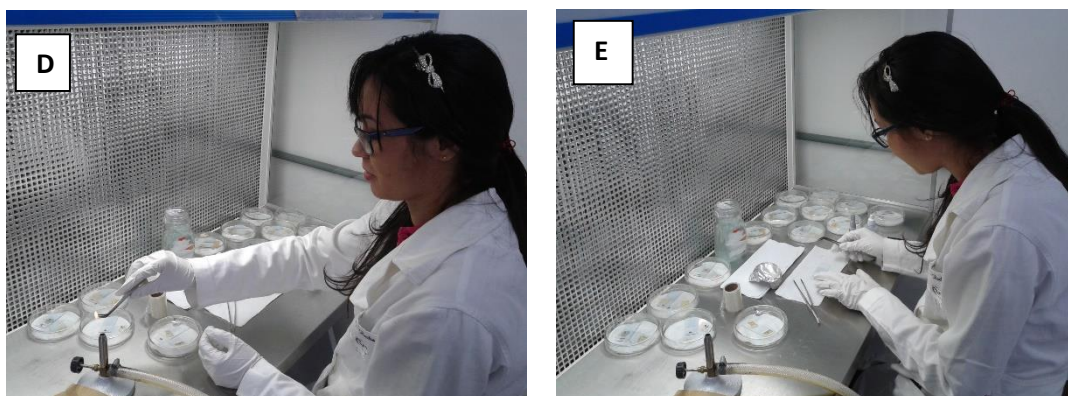


Figura – (D) Retiradas da lamínula após 7 dias de inóculo; (E) Montagem de lâminas para microscopia coradas com azul de lactofenol.

**Anexo II – Imagens dos Procedimentos de extração líquido-líquido, limpeza e fracionamento, concentração e secagem dos extratos.**



**Figura – (A) Extração líquido-líquido das amostras; (B) Concentração dos extratos em evaporador rotativo; (C) Fracionamento em coluna aberta de vidro; (D) Eluição dos extratos e obtenção das frações; (E) Secagem das amostras em fluxo de nitrogênio.**

Anexo III – Imagens macro e microscópicas das linhagens utilizadas no consórcio.

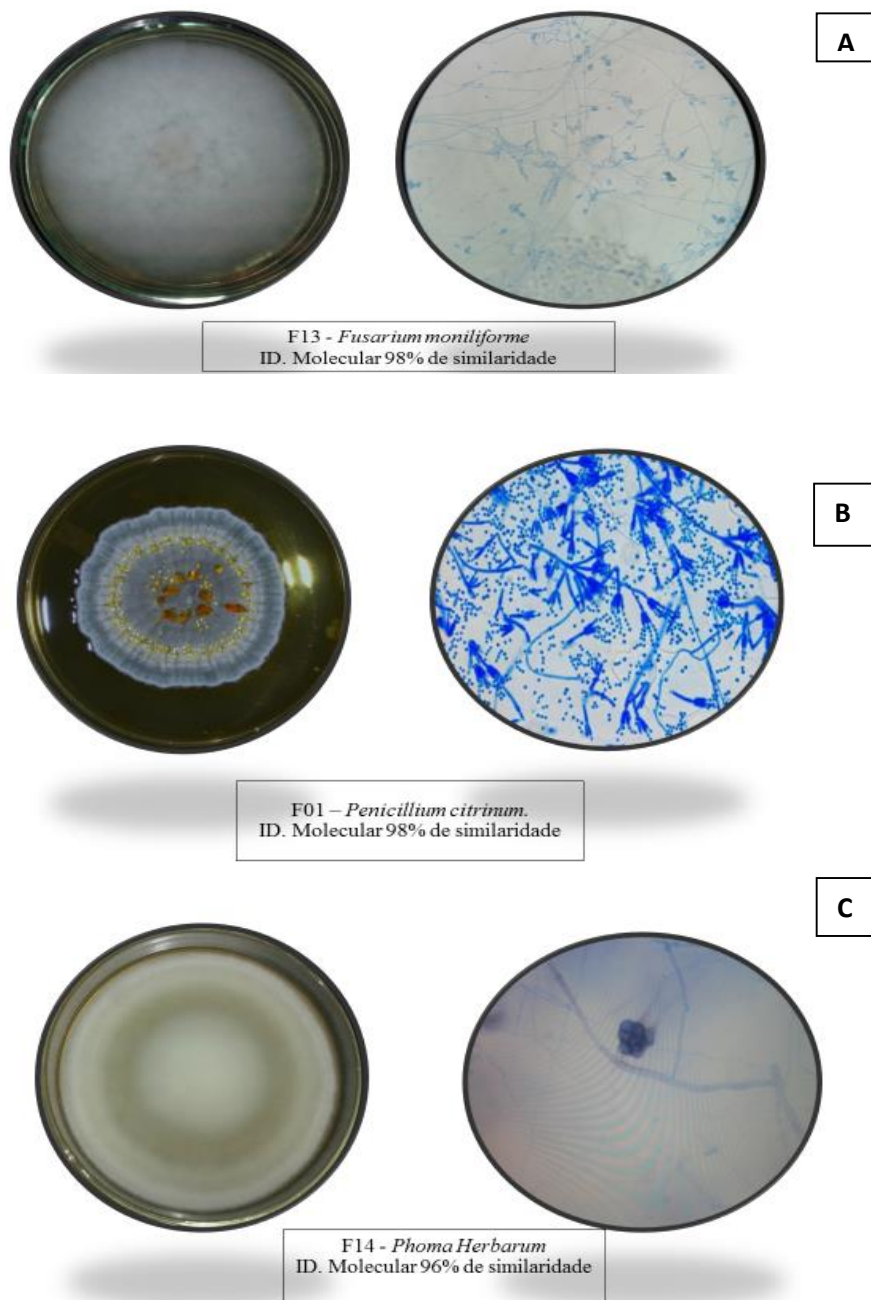
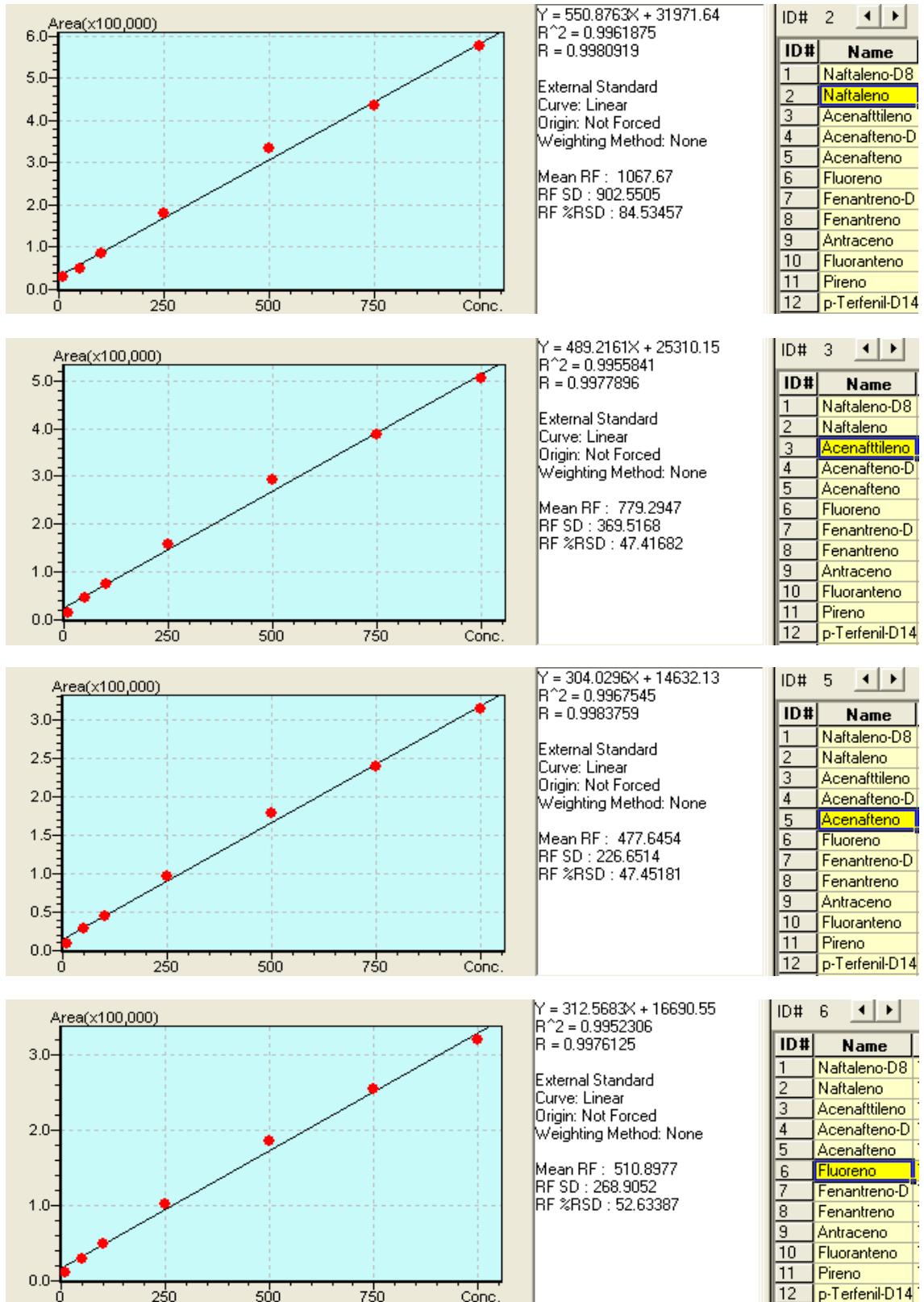


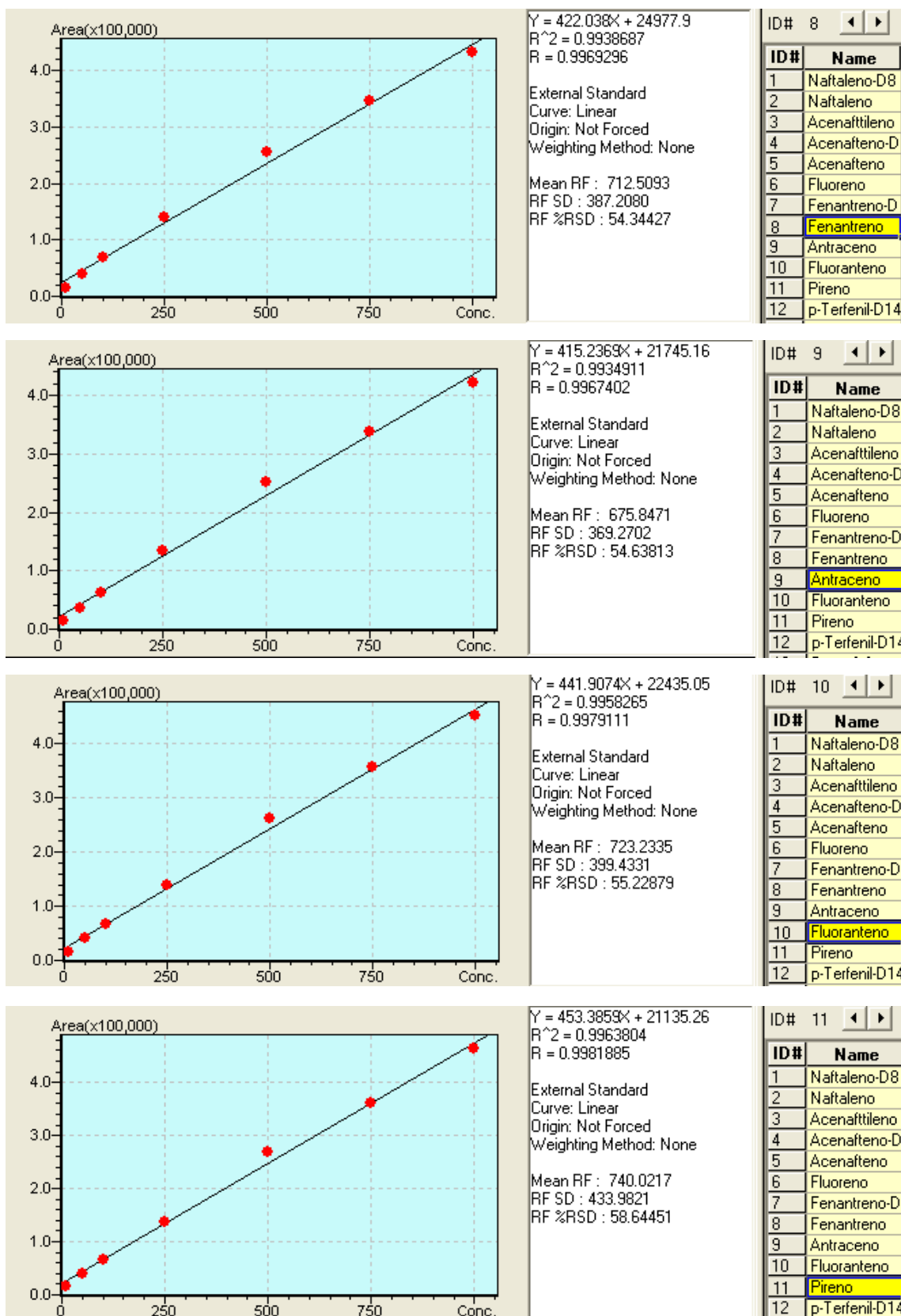
Figura – Culturas dos Fungos utilizados no consórcio e imagens das lâminas; (A) *Fusarium moniliforme*; (B) *Penicillium citrinum*; (C) *Phoma herbarum*. Os fungos utilizados nos experimentos foram cedidos da coleção do ano 2008 de fungos filamentosos do Projeto: “Diversidade Microbiana obtida de macrófitas na Amazônia e seu potencial biotecnológico” em parceria com a Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Universidade Estadual do Amazonas (UEA/ESA). Os dados da identificação molecular também foram cedidos por este projeto.



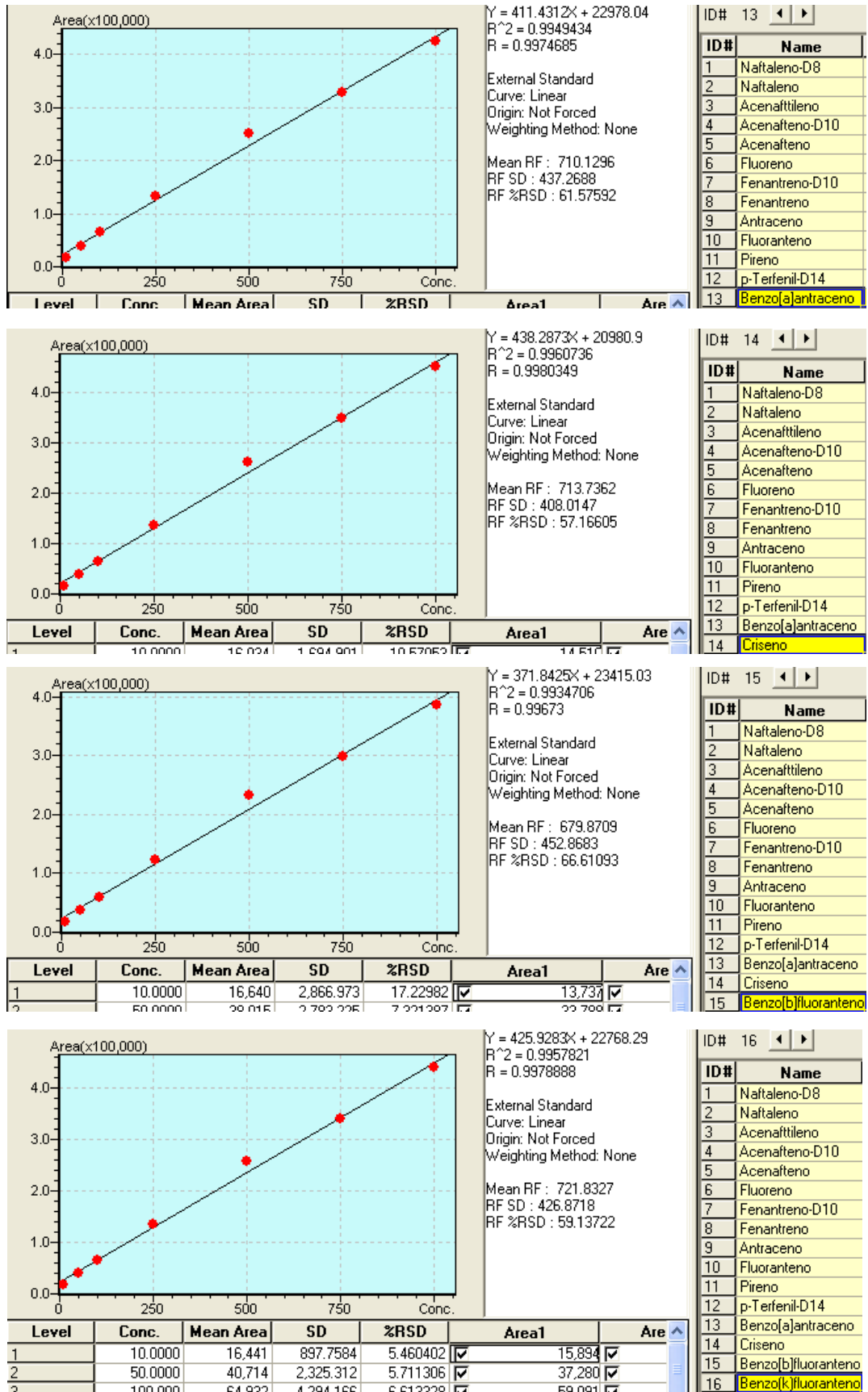
**Anexo IV:** Curvas de Calibração pelo método da padronização Interna obtidas pelas injeções das diferentes concentrações do padrão de referência dos 16 HPA



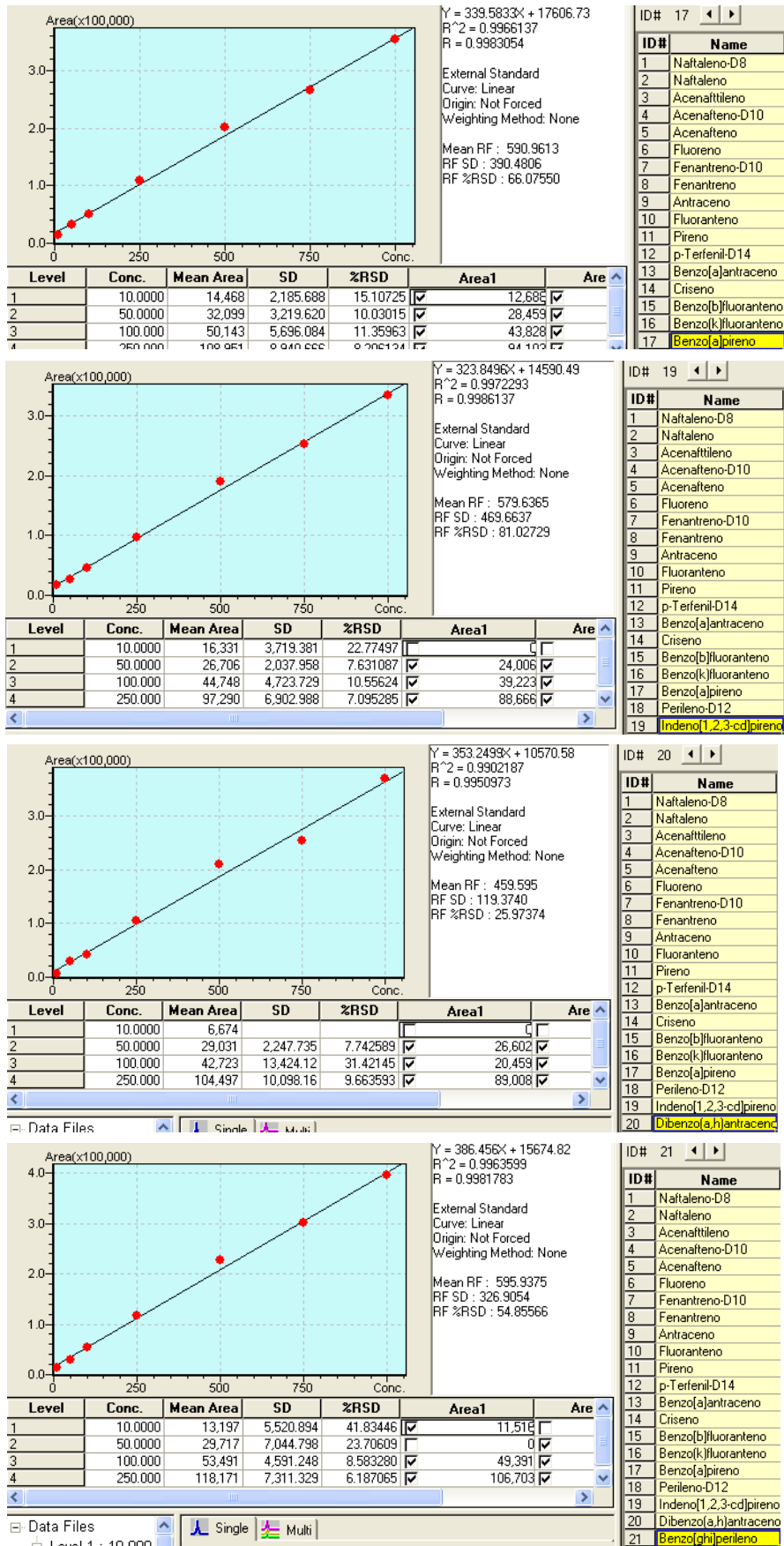
**Anexo IV:** Curvas de Calibração pelo método da padronização Interna obtidas pelas injeções das diferentes concentrações do padrão de referência dos 16 HPA



**Anexo IV:** Curvas de Calibração Interna obtidas pelas injeções das diferentes concentrações do padrão de referência dos 16 HPA



**Anexo IV: Curvas de Calibração pelo método da padronização Interna obtidas pelas injeções das diferentes concentrações do padrão de referência dos 16 HPA**

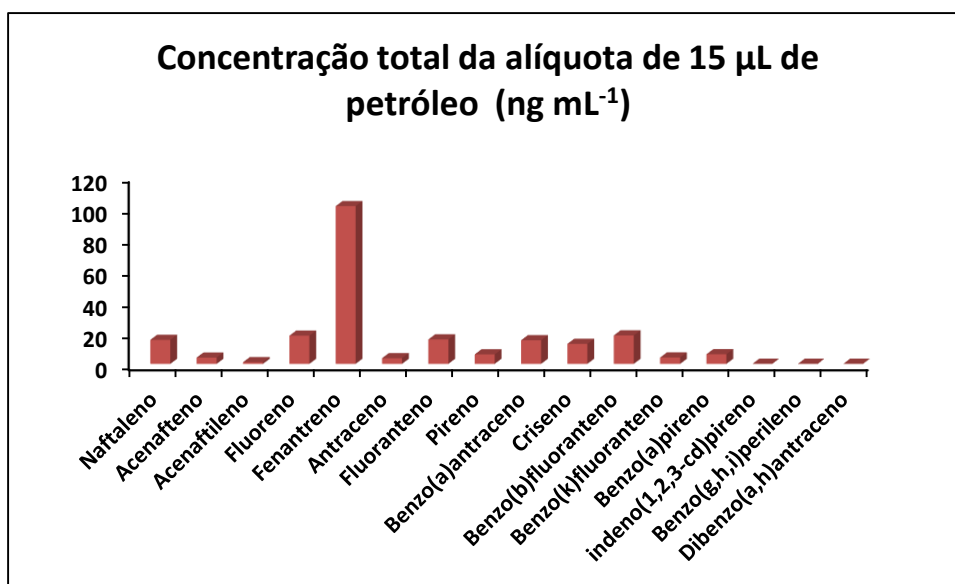




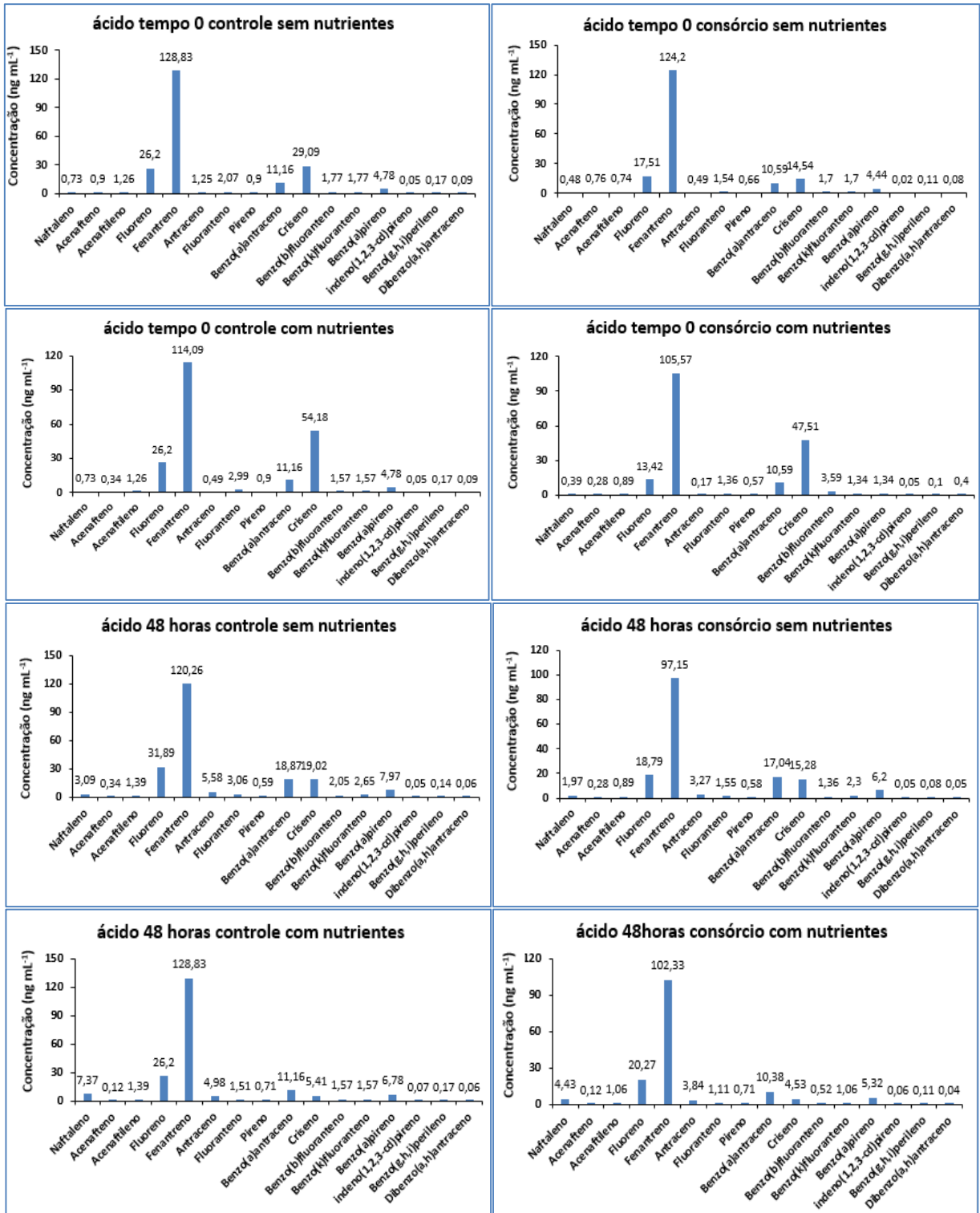
## Anexo V – Análise do óleo da Unidade de Produção de Urucu

- ✚ Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) expressas em  $\text{ng mL}^{-1}$  em amostra de óleo da Unidade de Produção de Urucu.

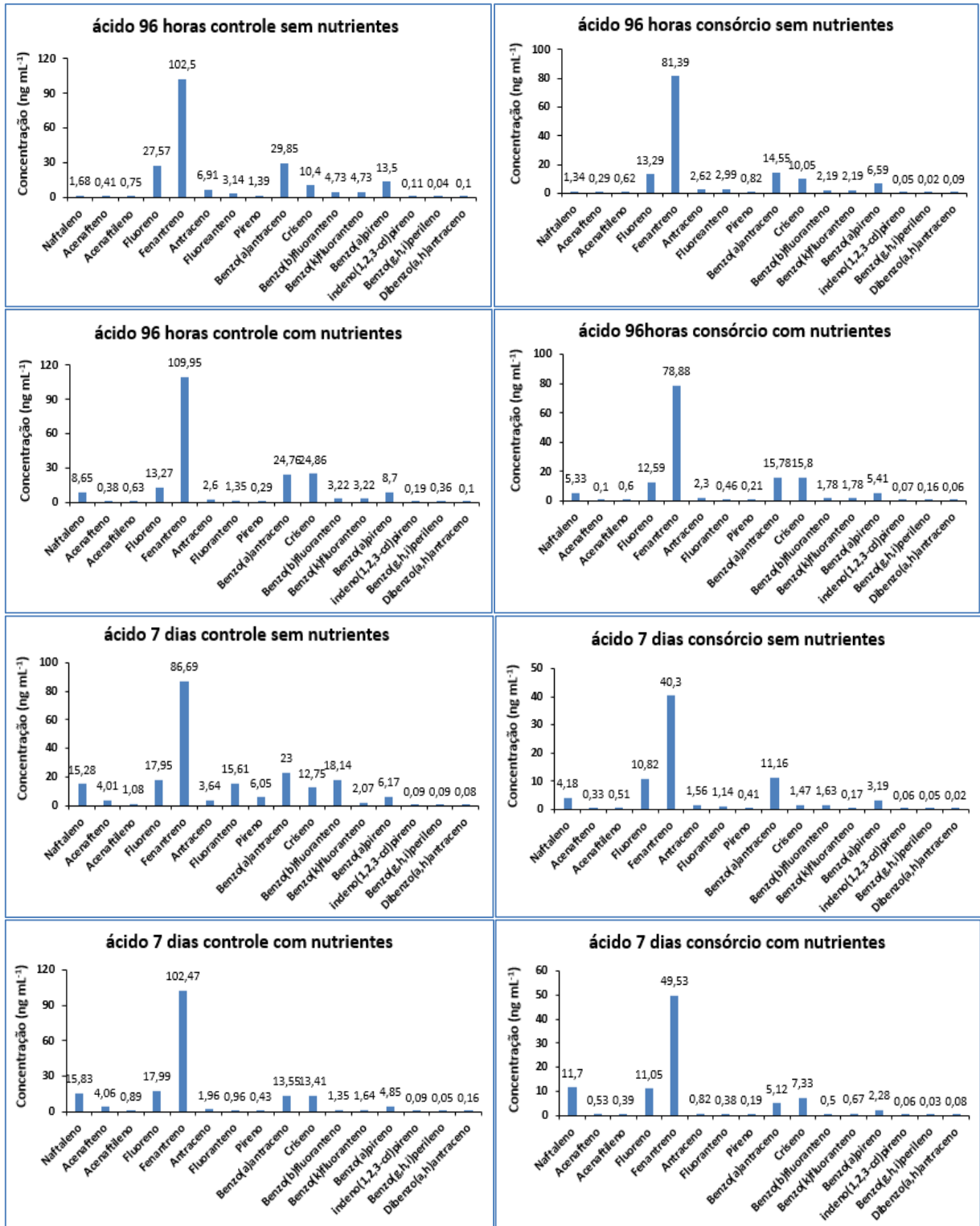
| Composto   | Concentração total ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) |
|--|--|
| Naftaleno  | $15,28 \pm 6,01$                           |
| Acenafteno                                       | $4,01 \pm 0,005$                           |
| Acenaftileno                                     | $1,08 \pm 0,22$                            |
| Fluoreno   | $17,95 \pm 1,14$                           |
| Fenantreno                                       | $100,69 \pm 6,42$                          |
| Antraceno  | $3,64 \pm 0,43$                            |
| Fluoranteno                                      | $15,61 \pm 0,02$                           |
| Pireno   | $6,05 \pm 0,09$                            |
| Benzo(a)antraceno                                | $15,05 \pm 2,37$                           |
| Criseno  | $12,75 \pm 0,07$                           |
| Benzo(b)fluoranteno                              | $18,14 \pm 0,04$                           |
| Benzo(k)fluoranteno                              | $4,07 \pm 0,10$                            |
| Benzo(a)pireno                                   | $6,17 \pm 0,45$                            |
| indeno(1,2,3-cd)pireno                           | $0,1 \pm 0,01$                             |
| Benzo(g,h,i)perileno                             | $0,09 \pm 0,01$                            |
| Dibenzo(a,h)antraceno                            | $0,08 \pm 0,008$                           |
| % Recuperação<br>( <i>p</i> -Terfenil $d_{14}$ ) | $91,61 \pm 0,01$                           |
| <b><math>\Sigma 16\text{HPA}</math></b>          | <b>220,76</b>                              |



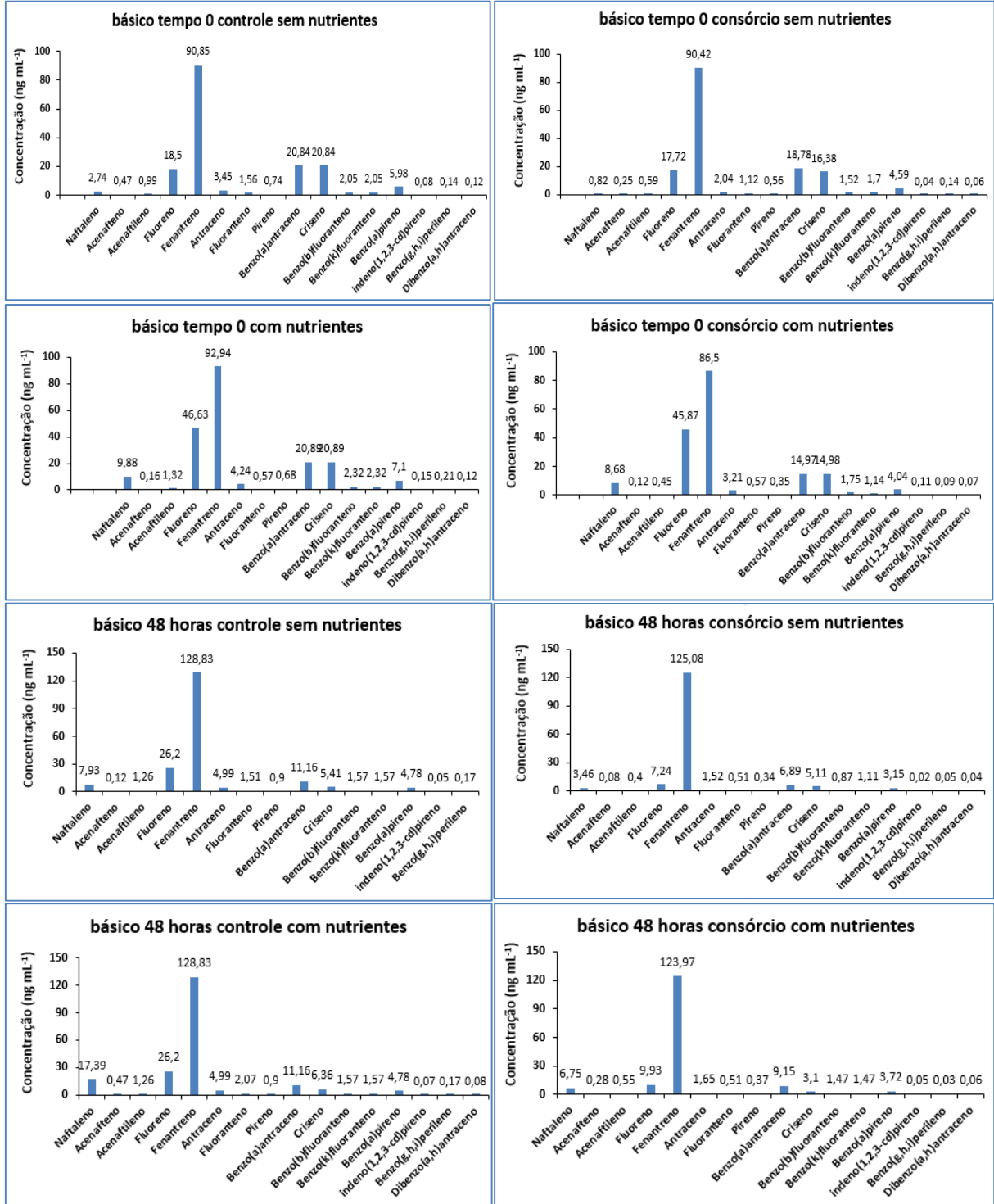
**Anexo VI – Distribuição das concentrações individuais dos 16 HPA do controle e da média da triplicata de cada amostra:**



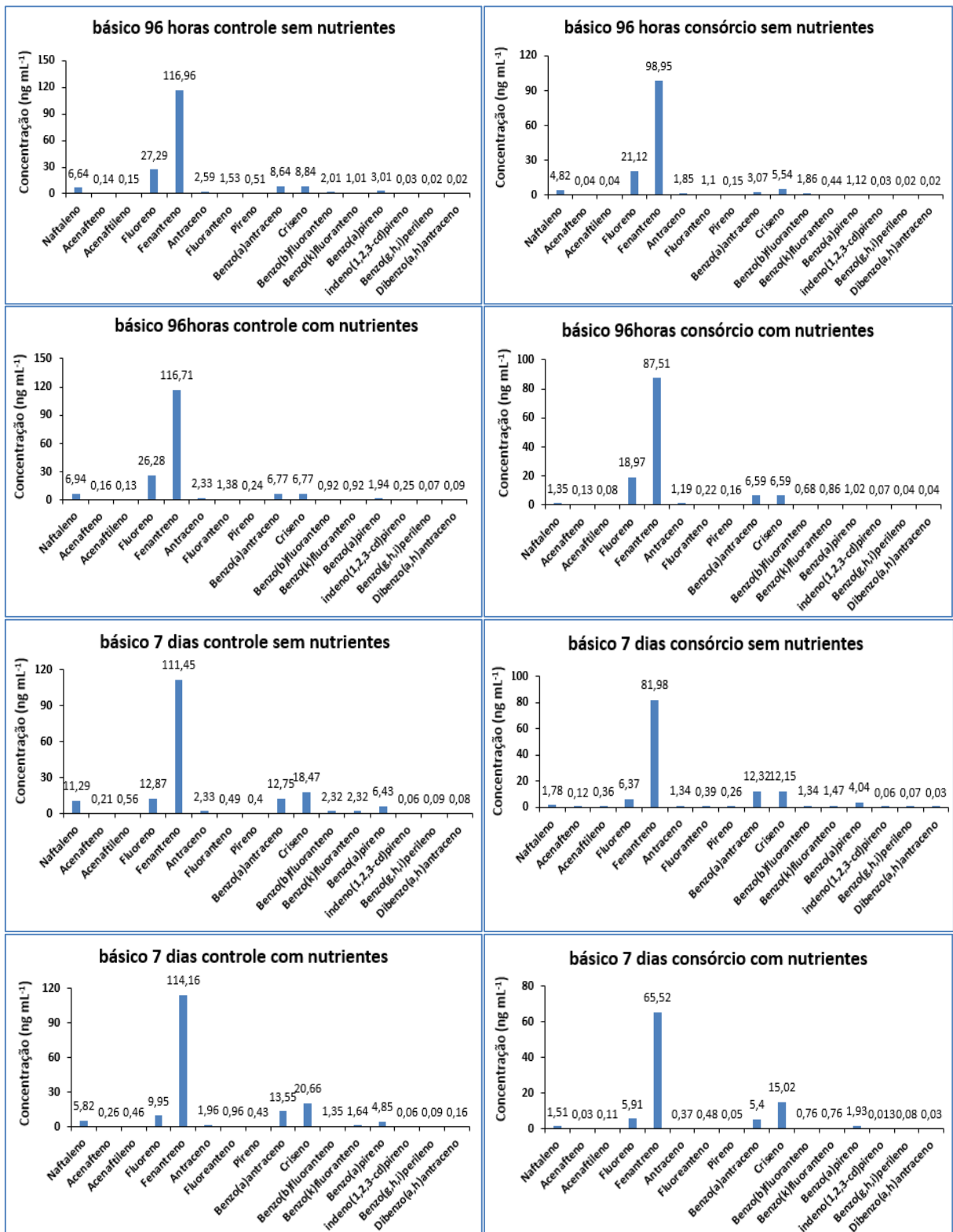
**Anexo VI – Distribuição das concentrações individuais dos 16 HPA do controle e da média da triplicata de cada amostra:**



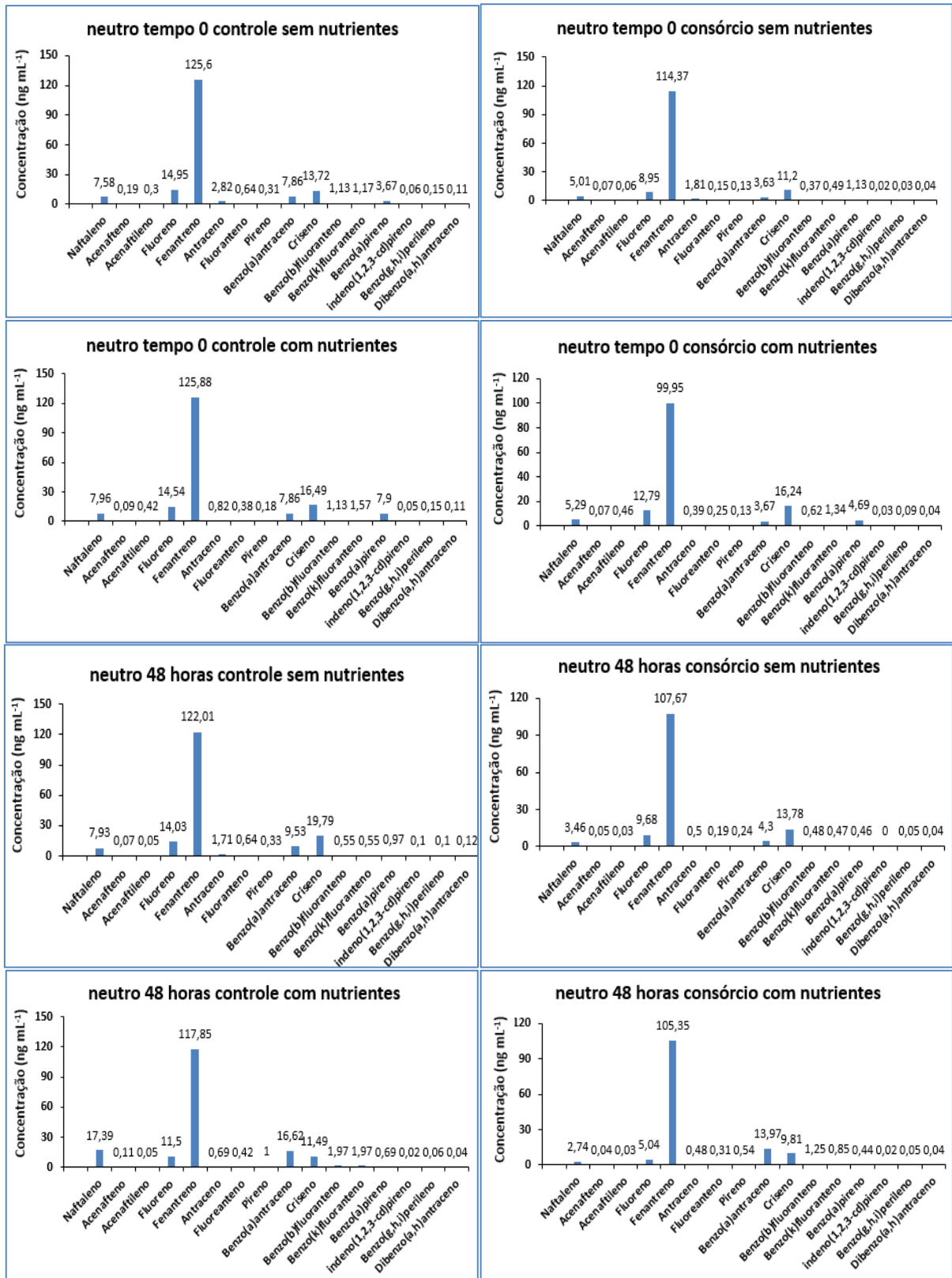
**Anexo VI – Distribuição das concentrações individuais dos 16 HPA do controle e da média da triplicata de cada amostra:**



**Anexo VI – Distribuição das concentrações individuais dos 16 HPA do controle e da média da triplicata de cada amostra:**

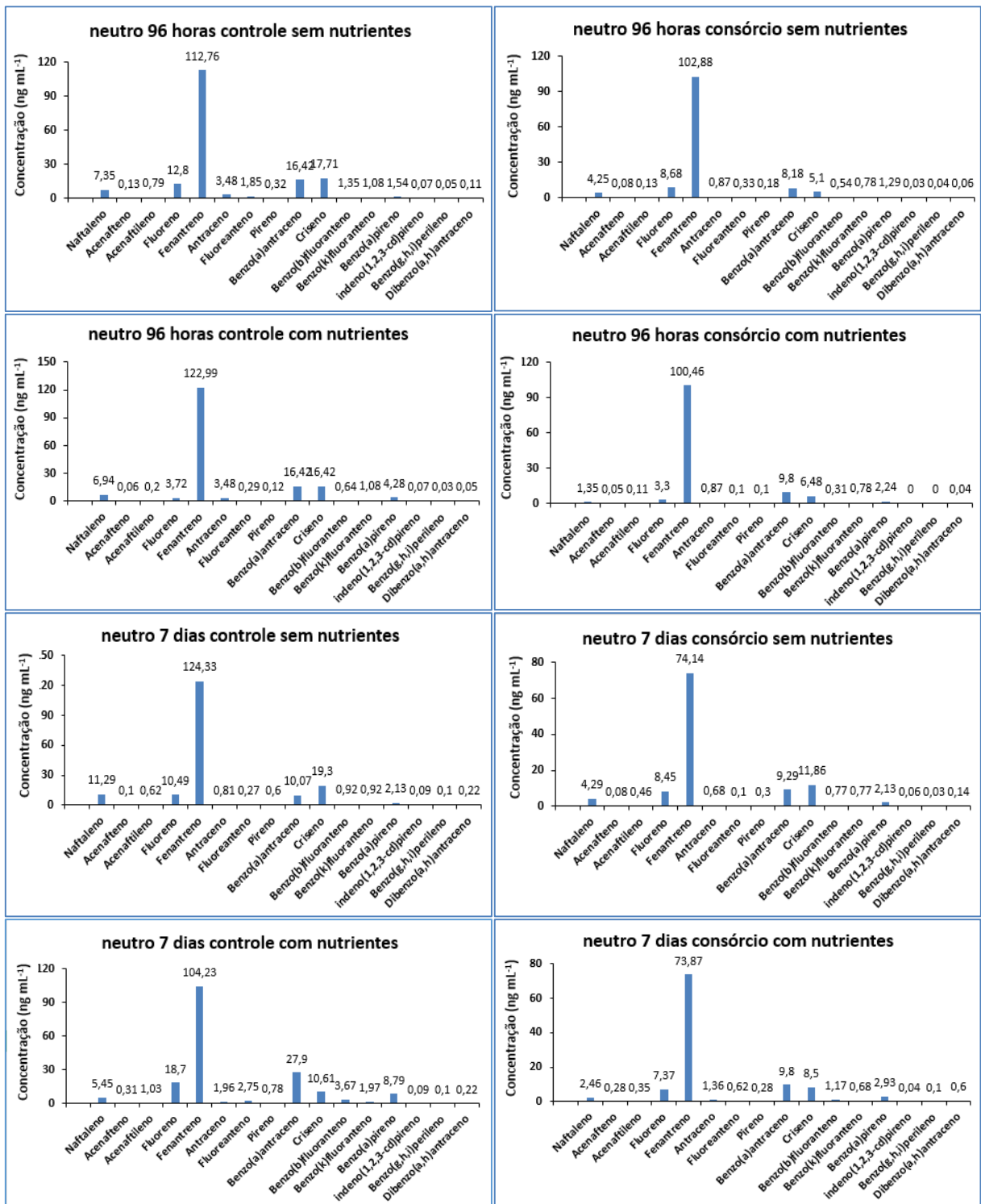


**Anexo VI** – Distribuição das concentrações individuais dos 16 HPA do controle e da média da triplicata de cada amostra:



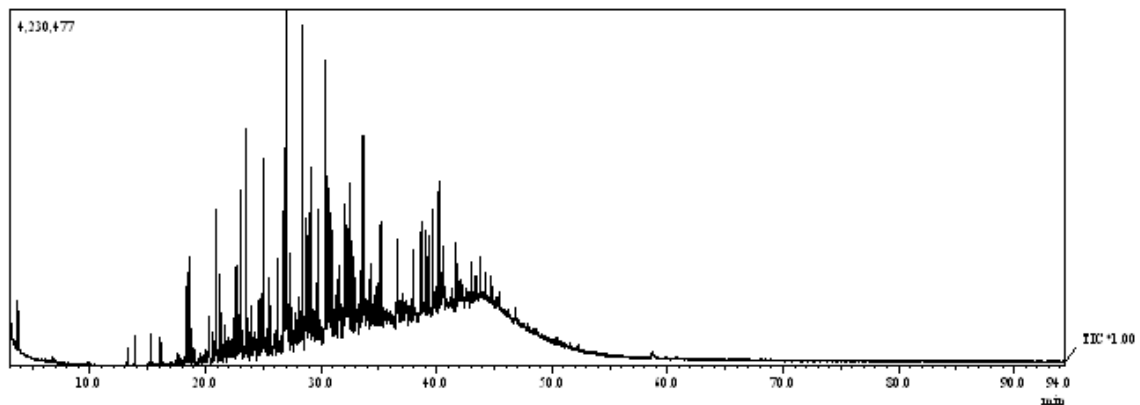


**Anexo VI – Distribuição das concentrações individuais dos 16 HPA do controle e da média da triplicata de cada amostra:**

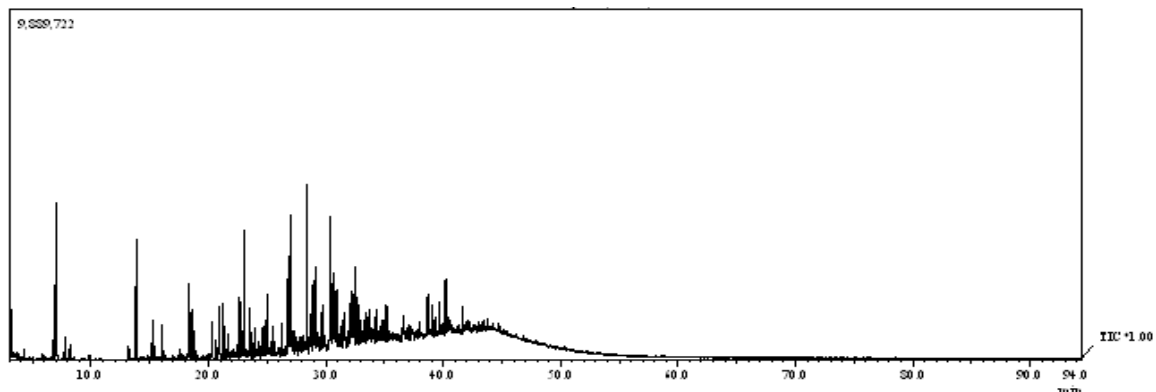


Anexo VII – Cromatogramas das injeções em CG-EM

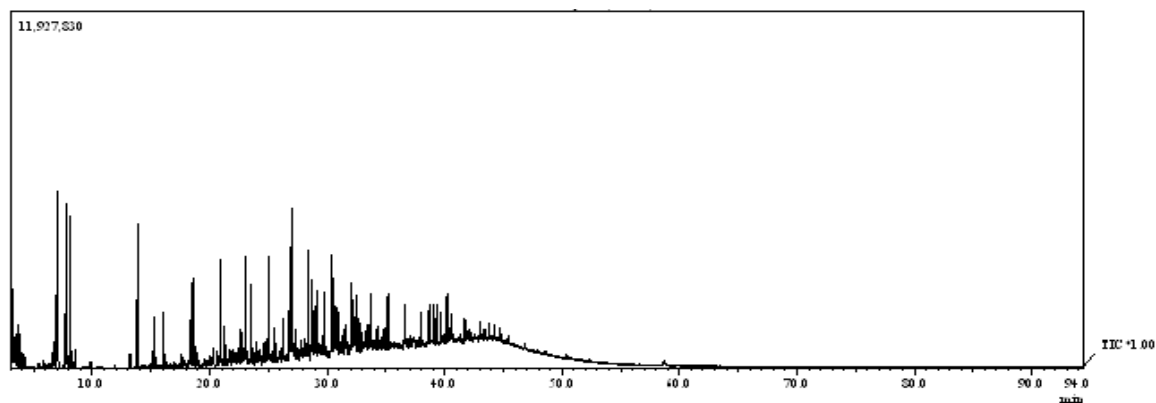
Ácido 7 dias controle com nutrientes



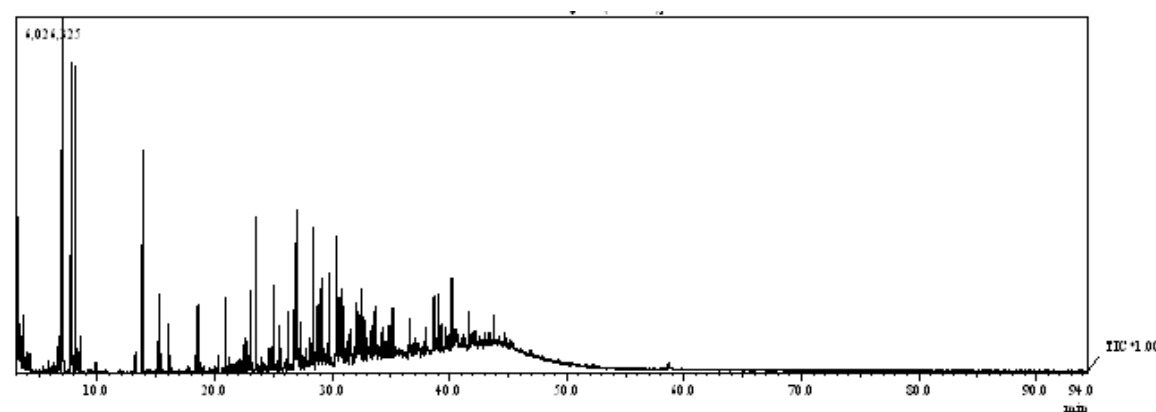
Ácido 7 dias consórcio com nutrientes 1



Ácido 7 dias consórcio com nutrientes 2

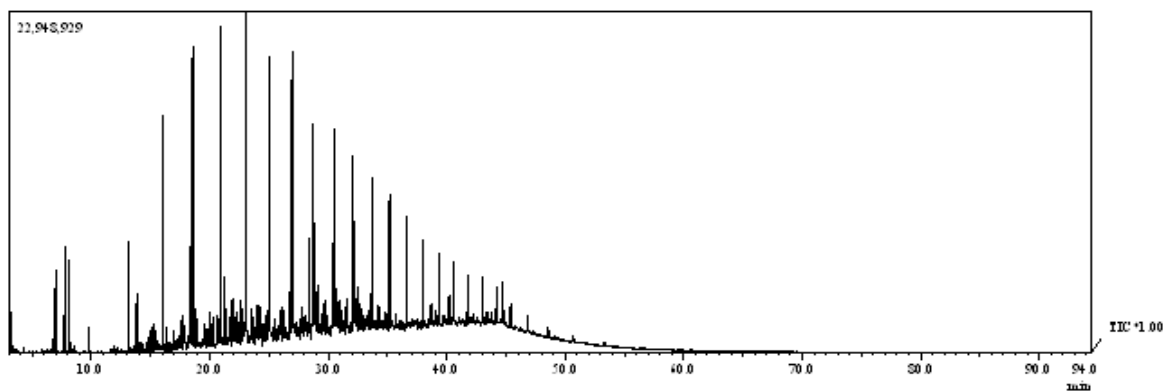


Ácido 7 dias consórcio com nutrientes 3

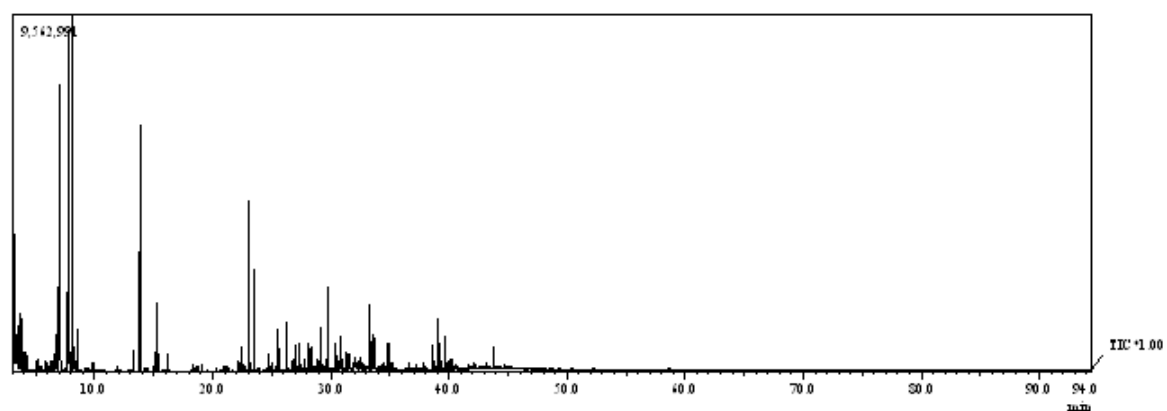




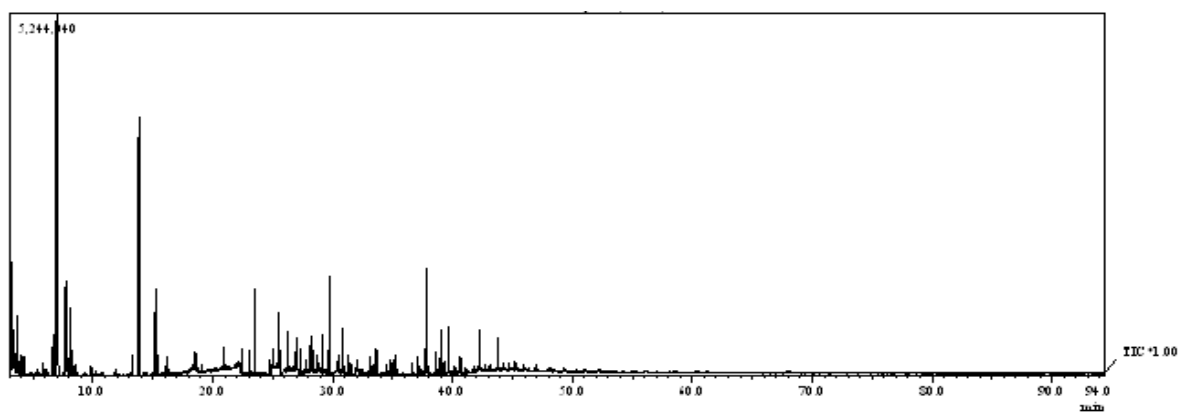
Ácido 7 dias controle sem nutrientes



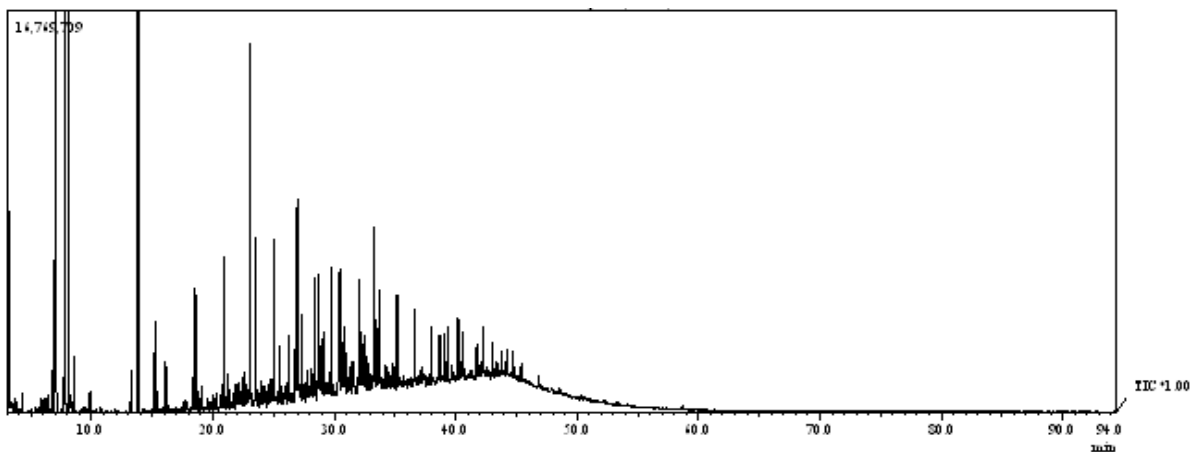
Ácido 7 dias consórcio sem nutrientes 1



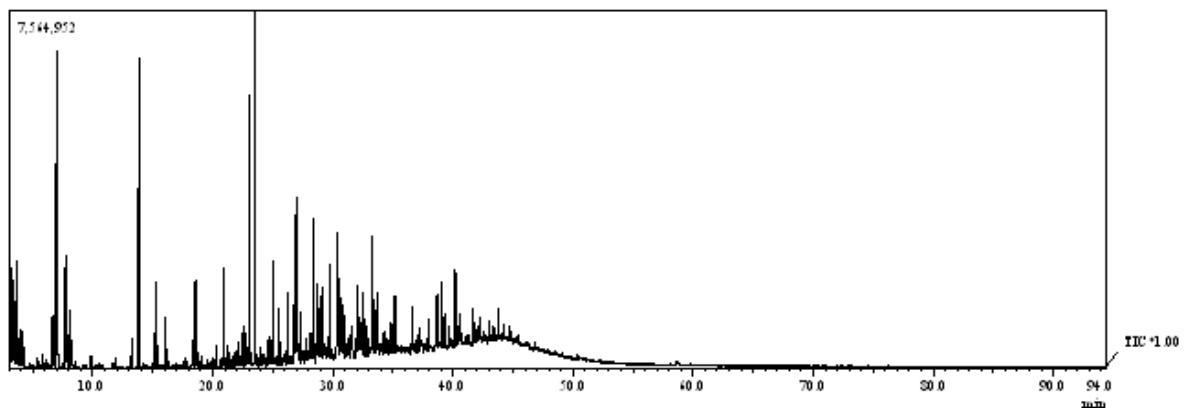
Ácido 7 dias consórcio sem nutrientes 2



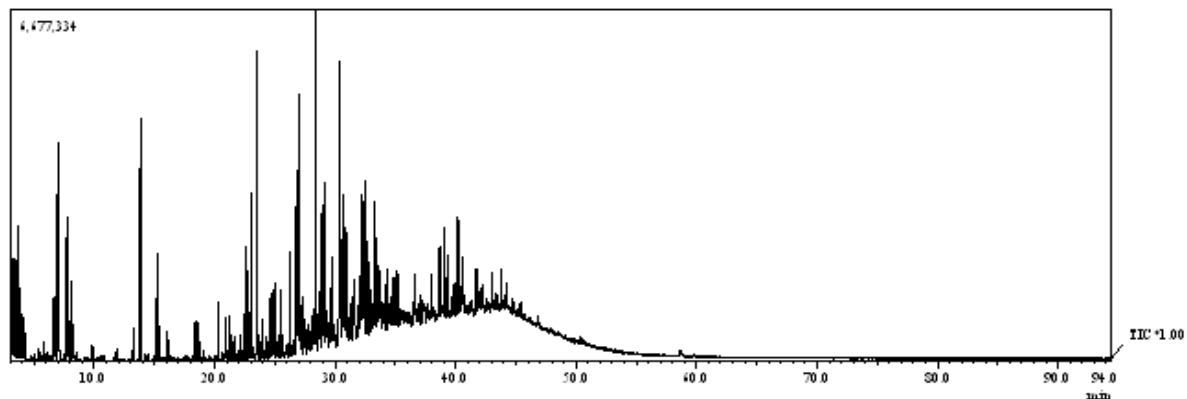
Ácido 96 horas controle com nutrientes



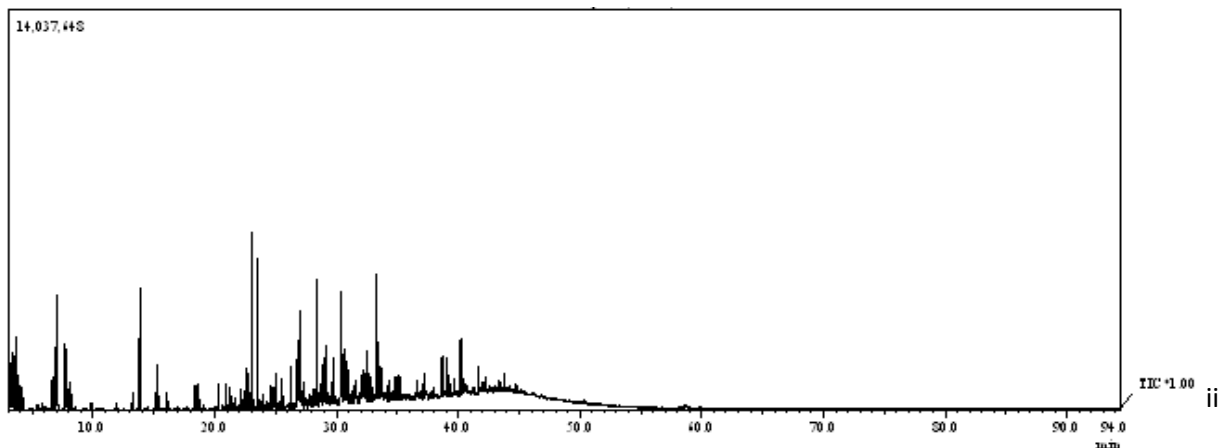
Ácido 96 horas consórcio com nutrientes 1



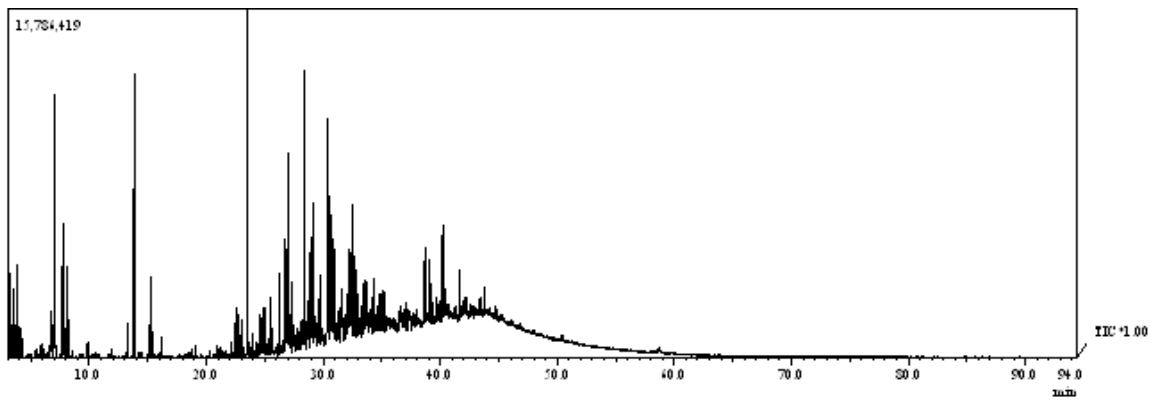
Ácido 96 horas consórcio com nutrientes 2



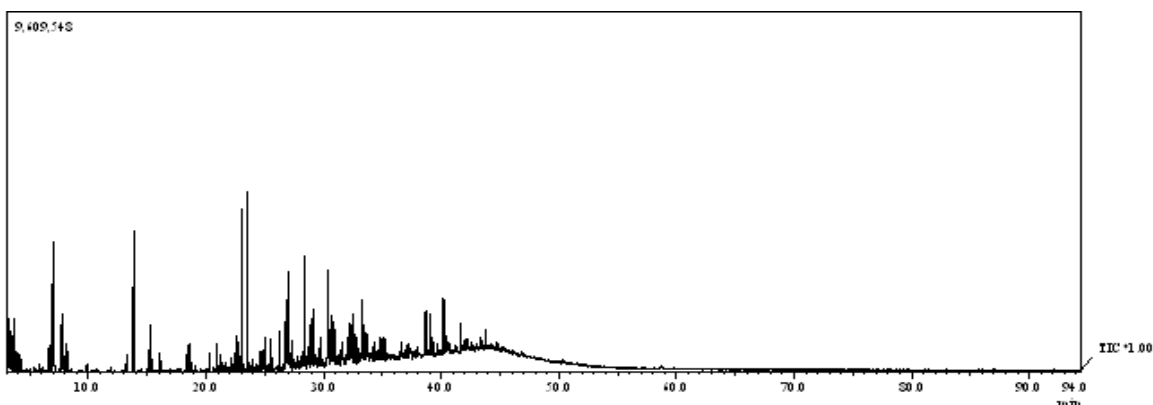
Ácido 96 horas consórcio com nutrientes 3



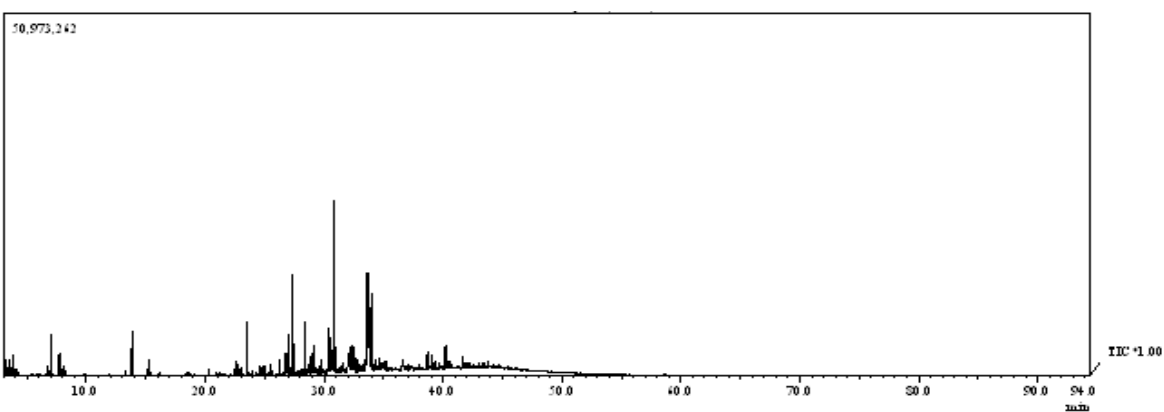
Ácido 96 horas controle sem nutrientes



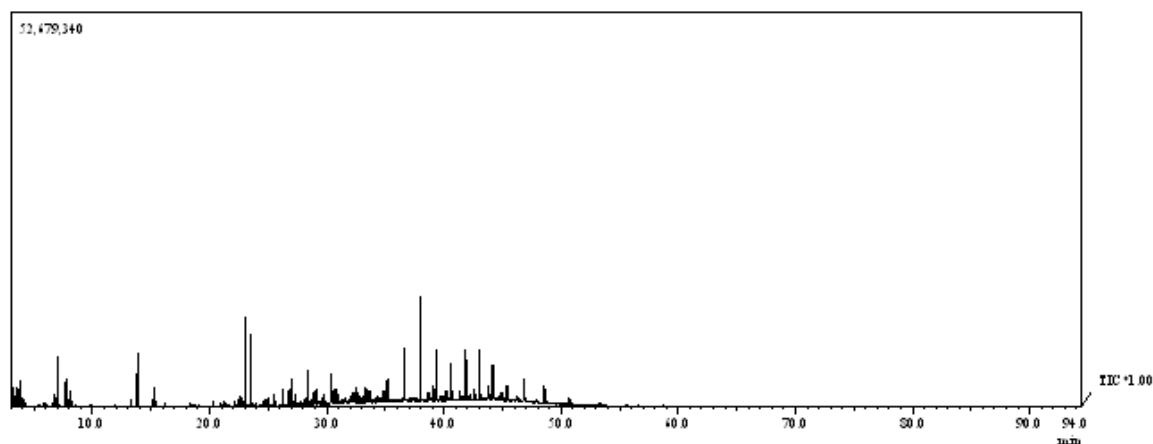
Ácido 96 horas consórcio sem nutrientes 1



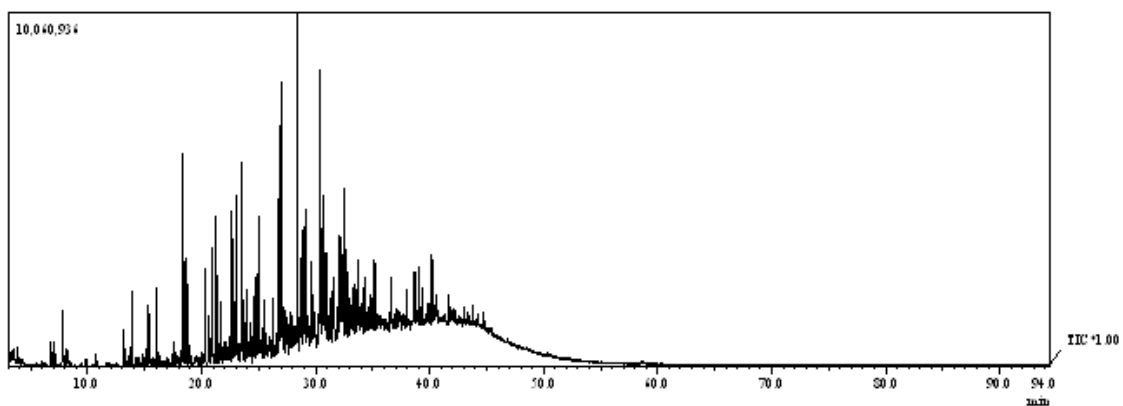
Ácido 96 horas consórcio sem nutrientes 2



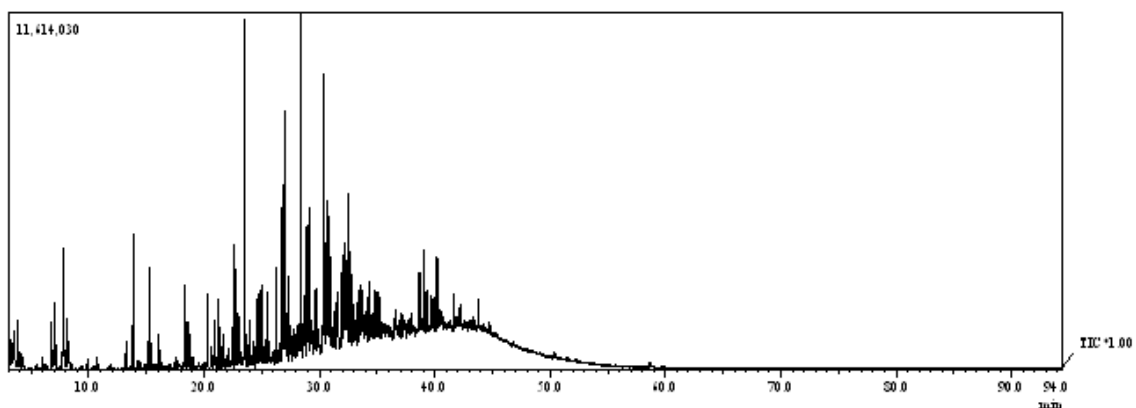
Ácido 96 horas consórcio sem nutrientes 3



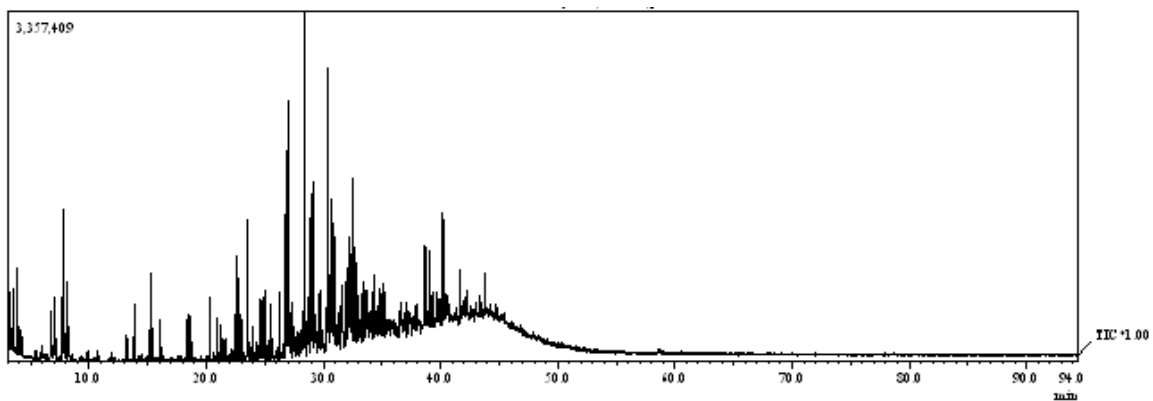
Ácido 48 horas controle com nutrientes



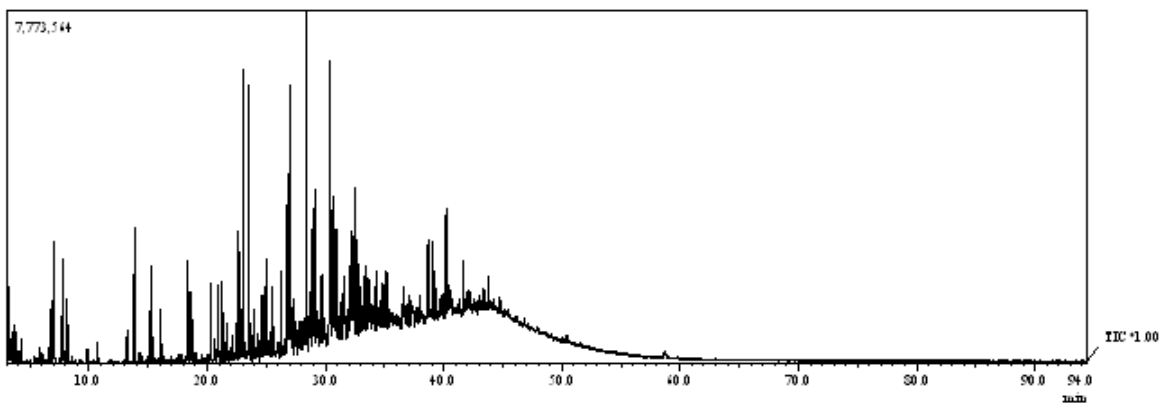
Ácido 48 horas consórcio com nutrientes 1



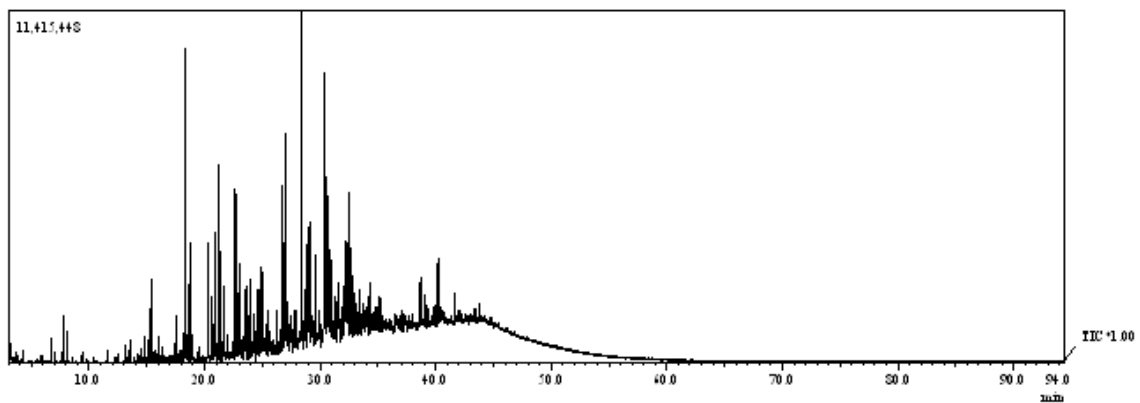
Ácido 48 horas consórcio com nutrientes 2



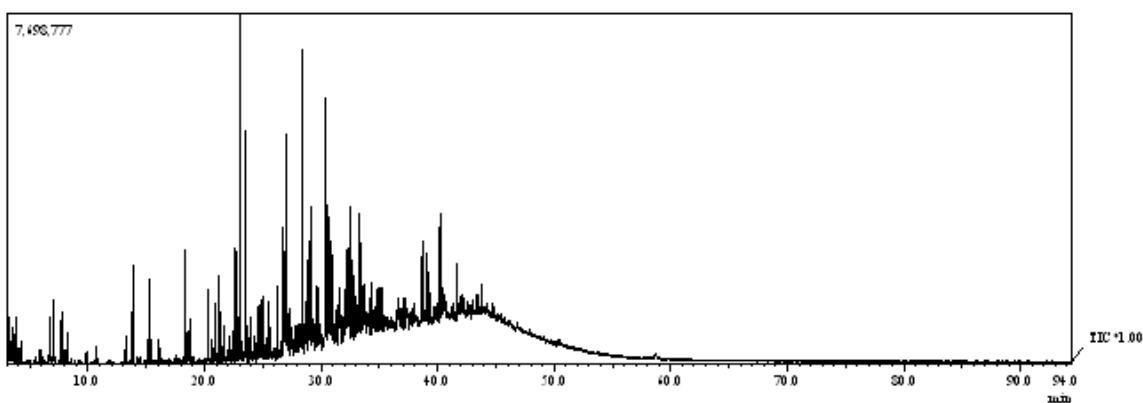
Ácido 48 horas consórcio com nutrientes 3



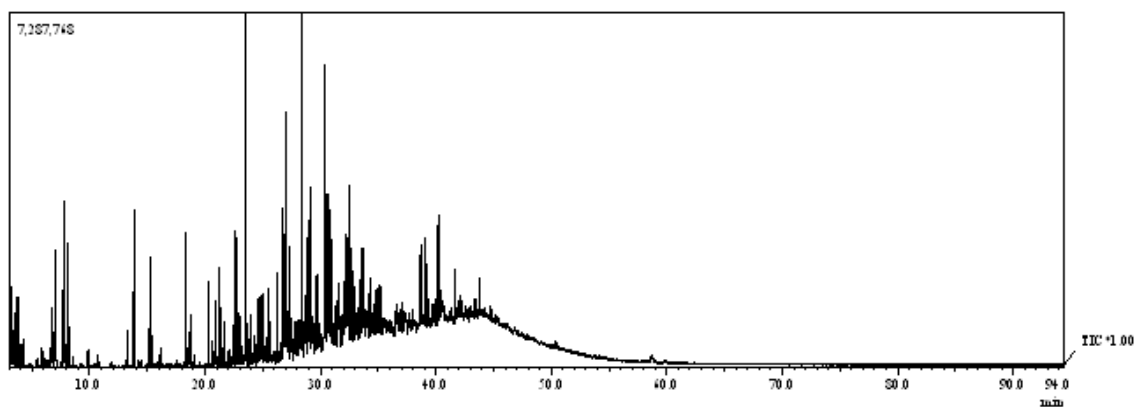
Ácido 48 horas controle sem nutrientes



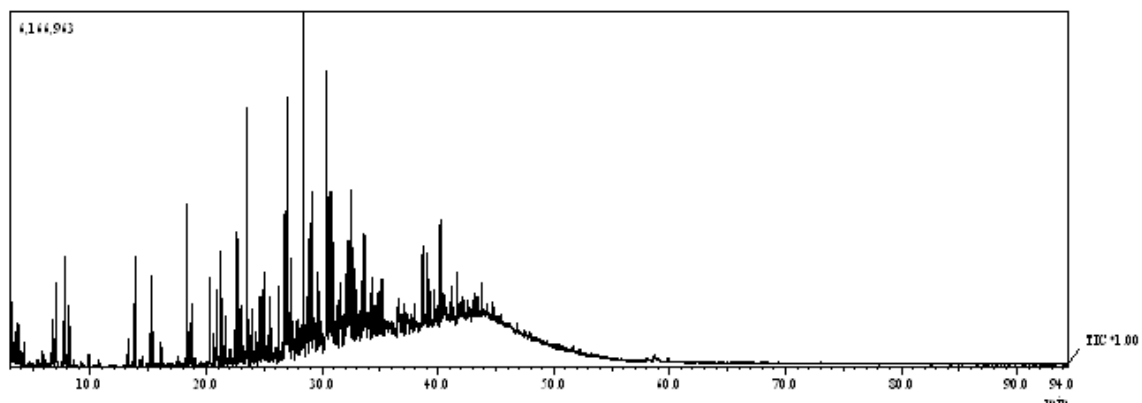
Ácido 48 horas consórcio sem nutrientes 1



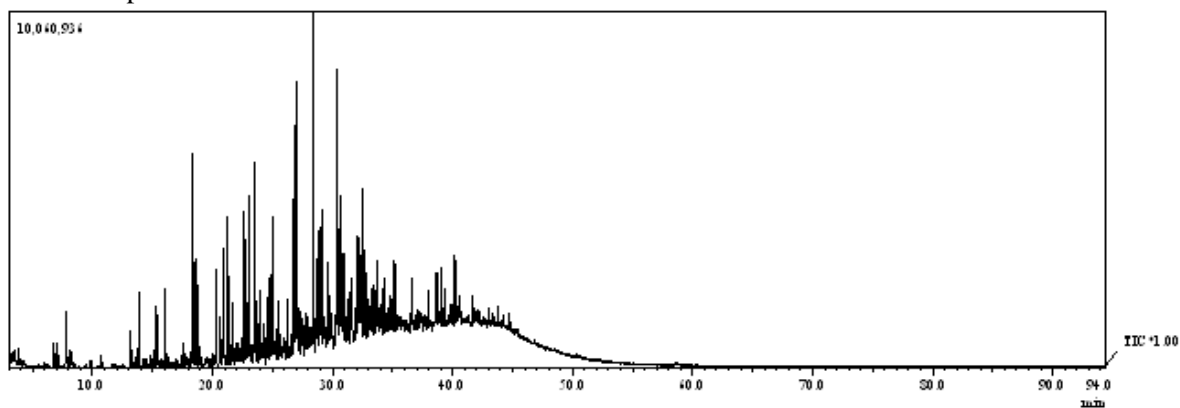
Ácido 48 horas consórcio sem nutrientes 2



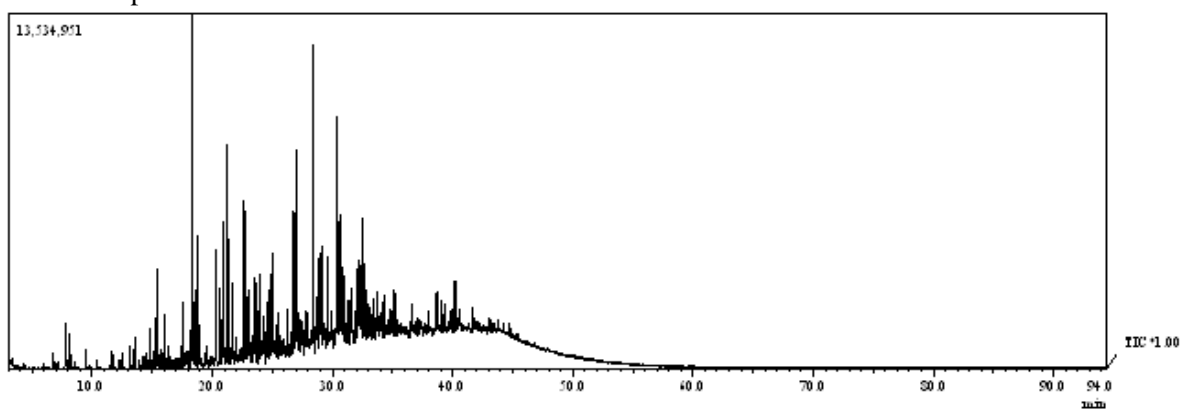
Ácido 48 horas consórcio sem nutrientes 3



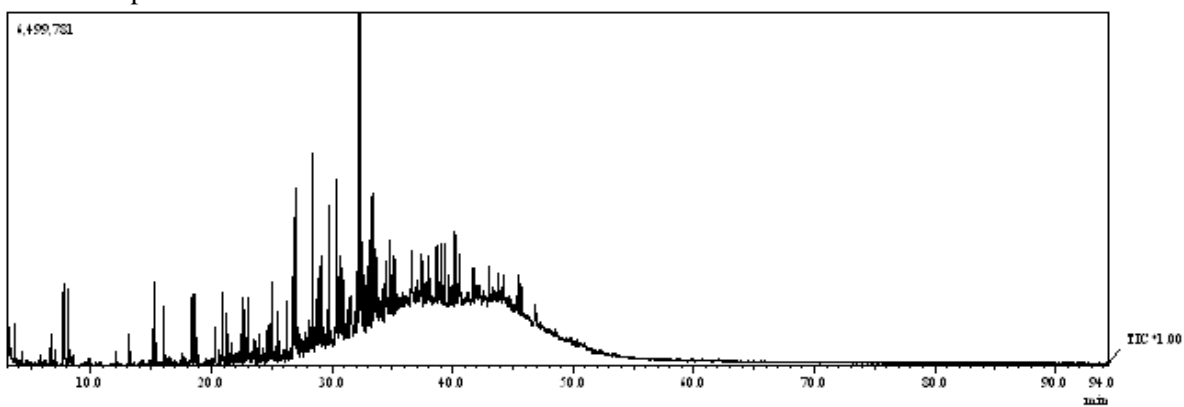
Ácido tempo 0 controle com nutrientes



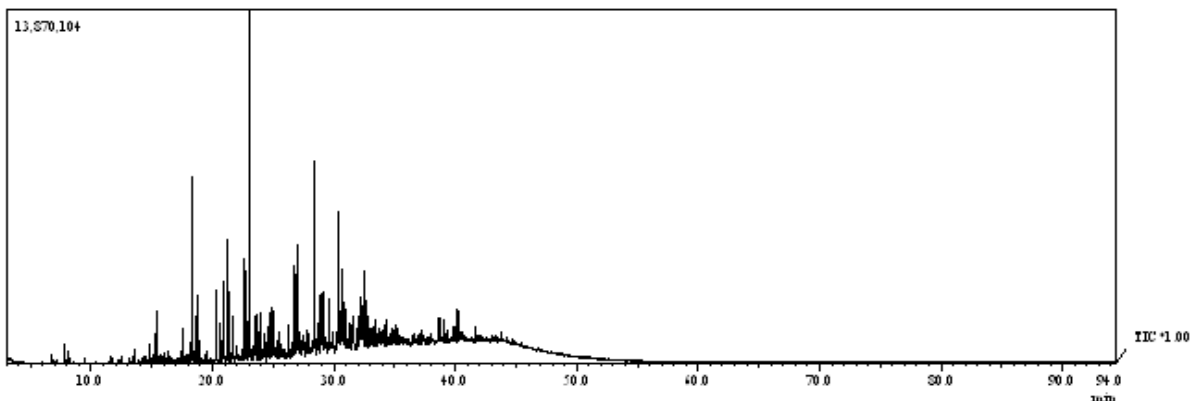
Ácido tempo 0 consórcio com nutrientes 1



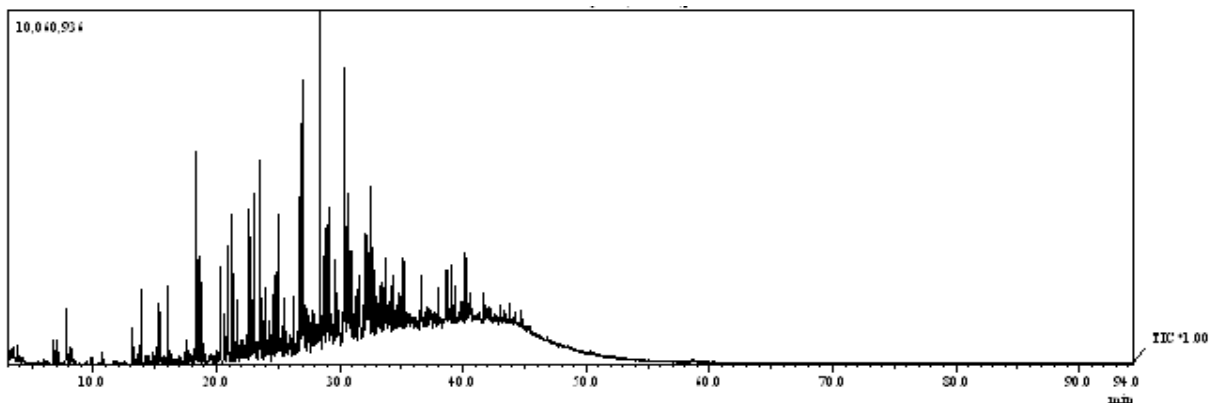
Ácido tempo 0 consórcio com nutrientes 2



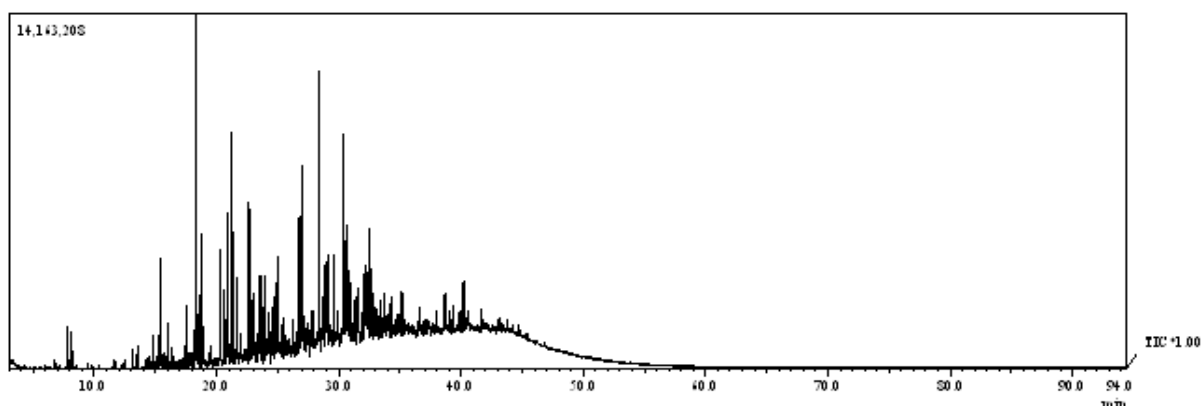
Ácido tempo 0 consórcio com nutrientes 3



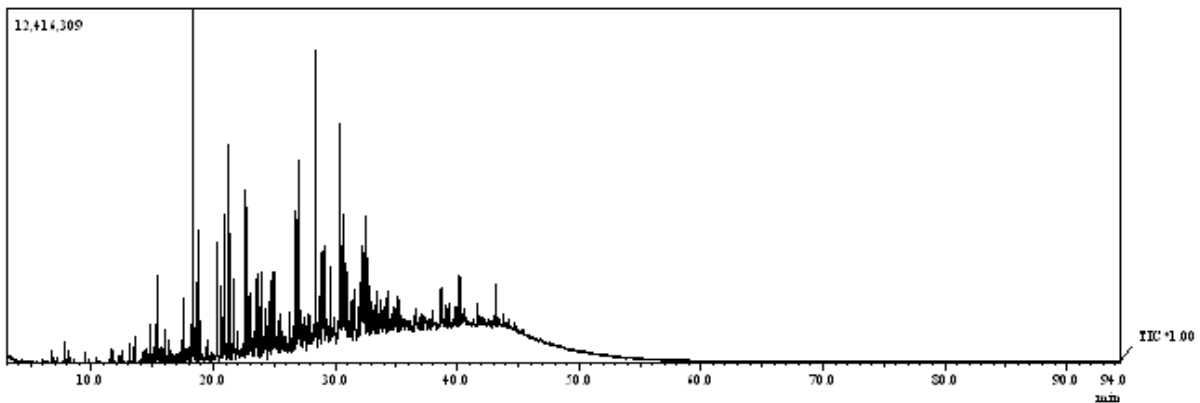
Ácido tempo 0 controle sem nutrientes



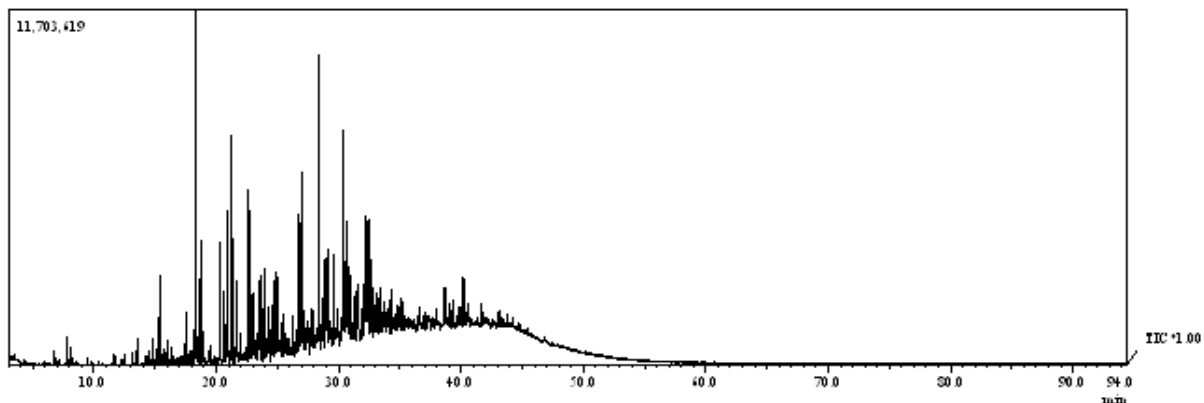
Ácido tempo 0 consórcio sem nutrientes 1



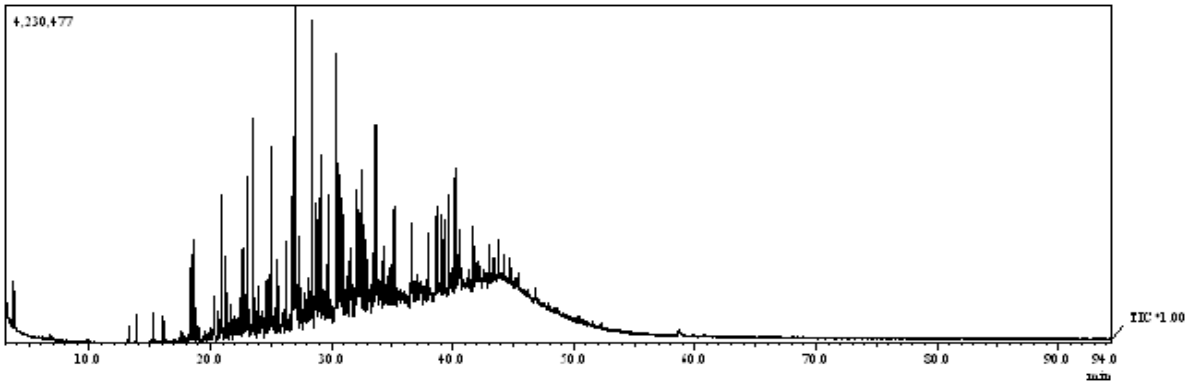
Ácido tempo 0 consórcio sem nutrientes 2



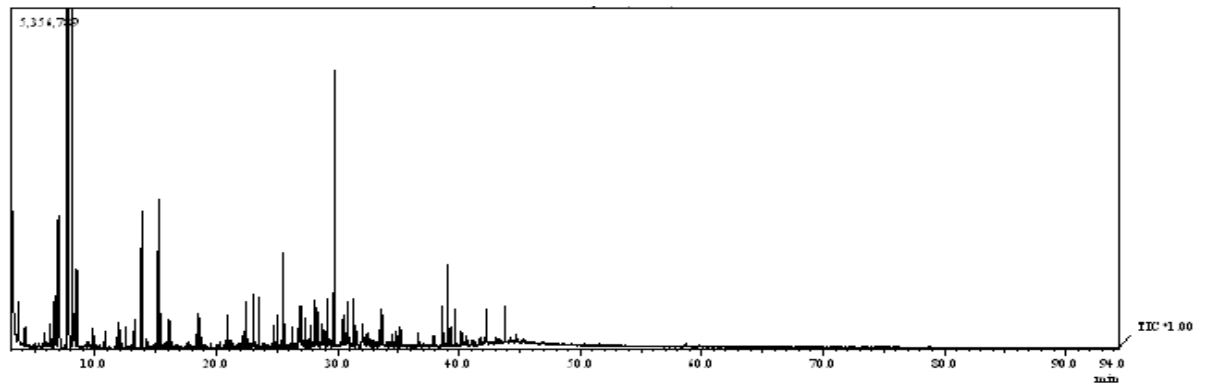
Ácido tempo 0 consórcio sem nutrientes 3



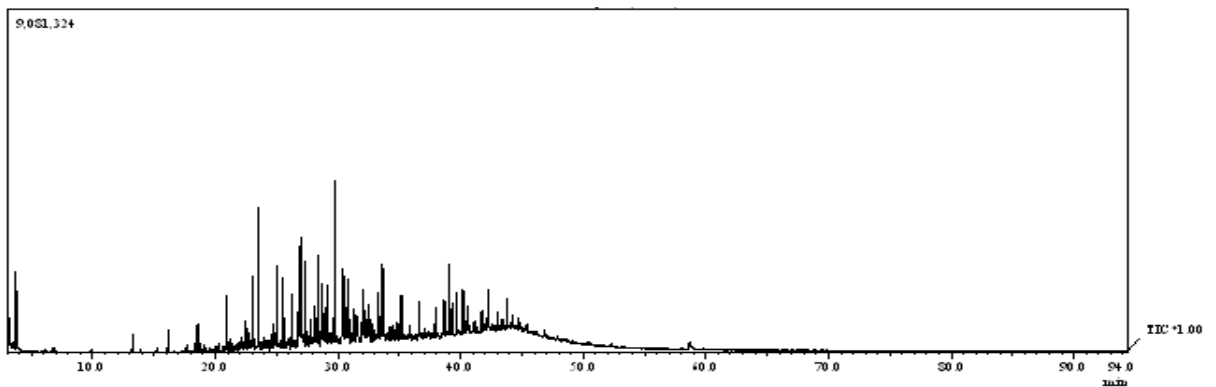
Básico 7 dias controle com nutrientes



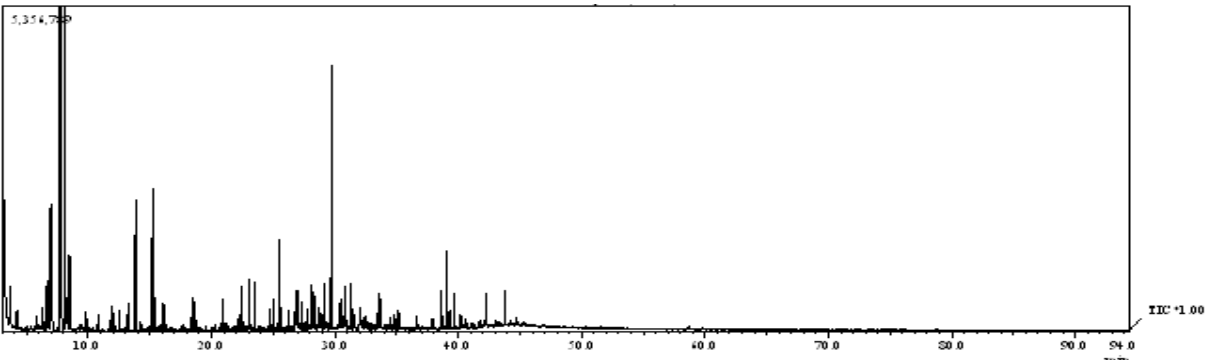
Básico 7 dias consórcio com nutrientes 1



Básico 7 dias consórcio com nutrientes 2

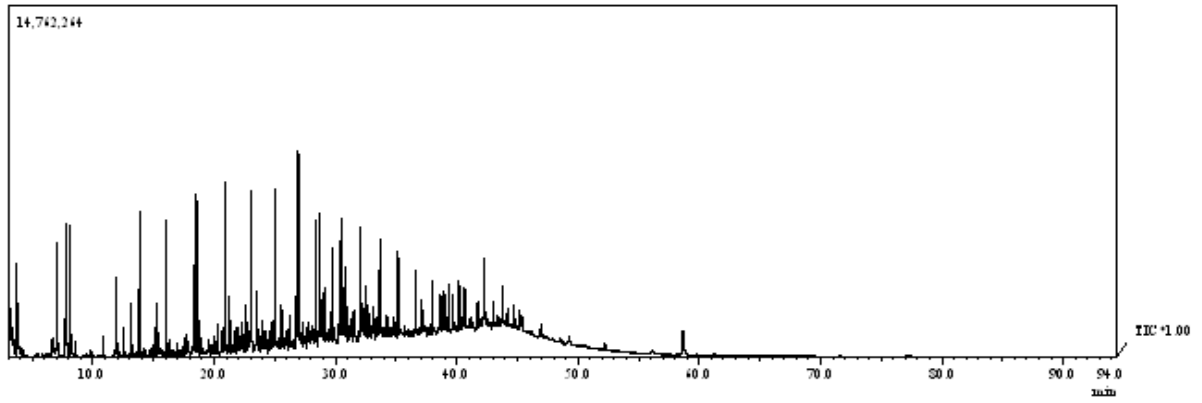


Básico 7 dias consórcio com nutrientes 3

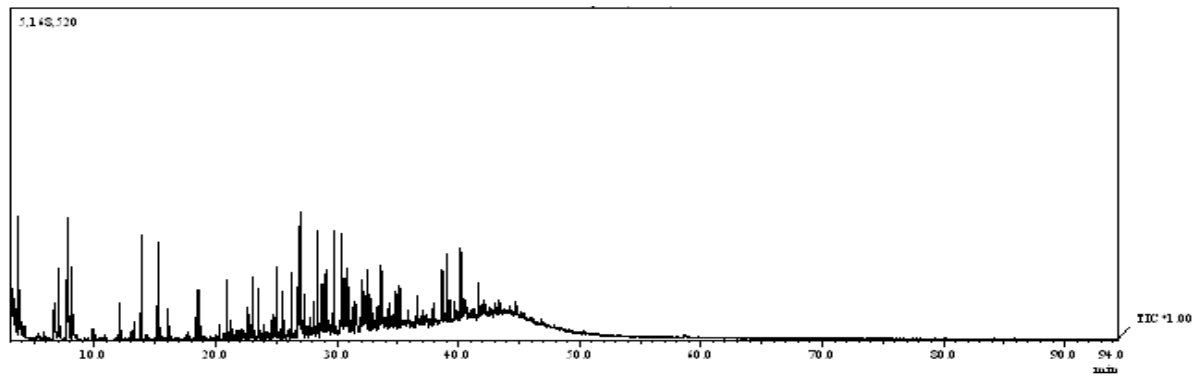




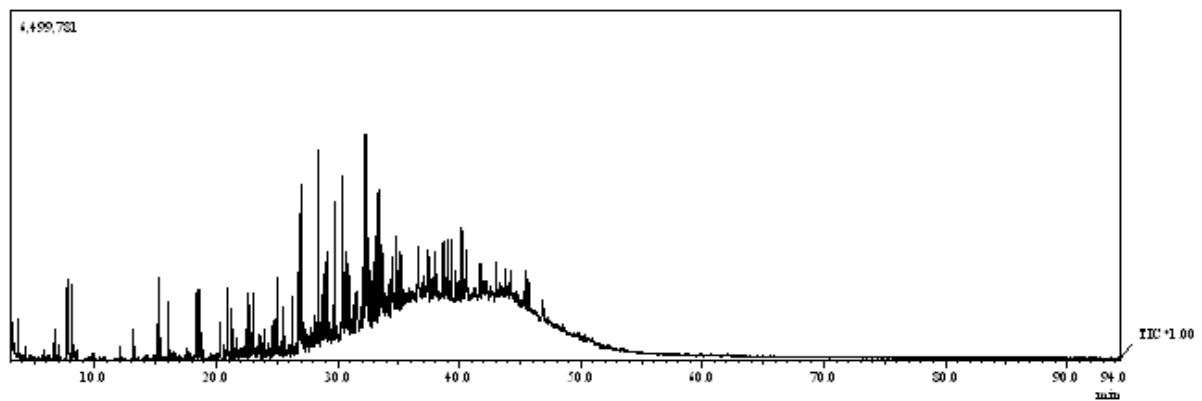
Básico 7 dias controle sem nutrientes



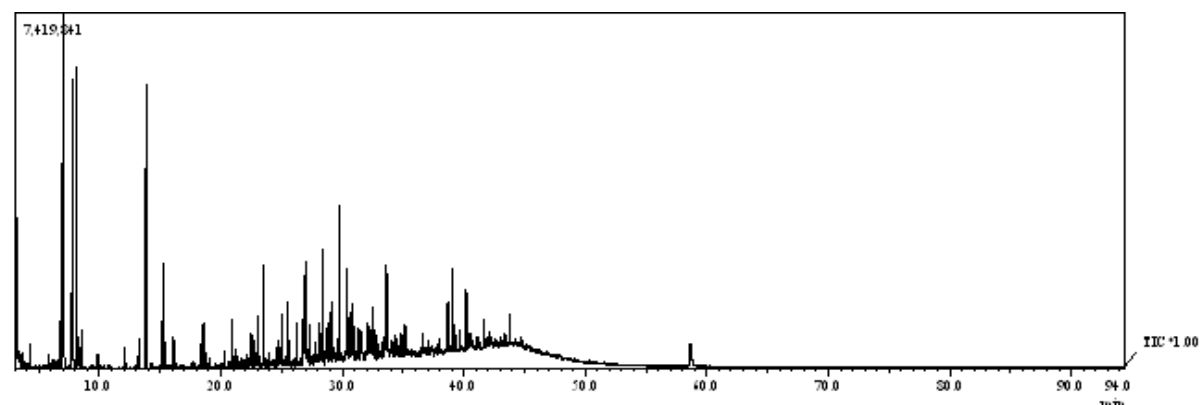
Básico 7 dias consórcio sem nutrientes 1



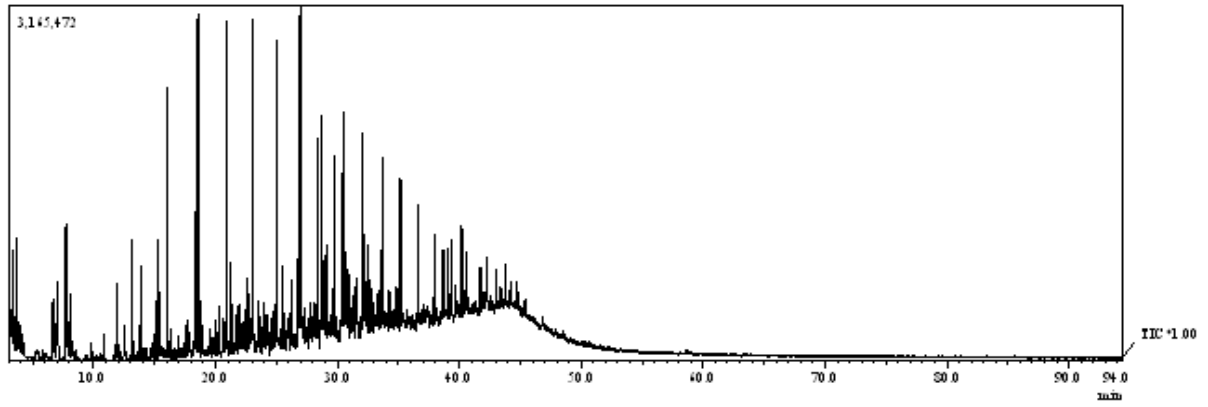
Básico 7 dias consórcio sem nutrientes 2



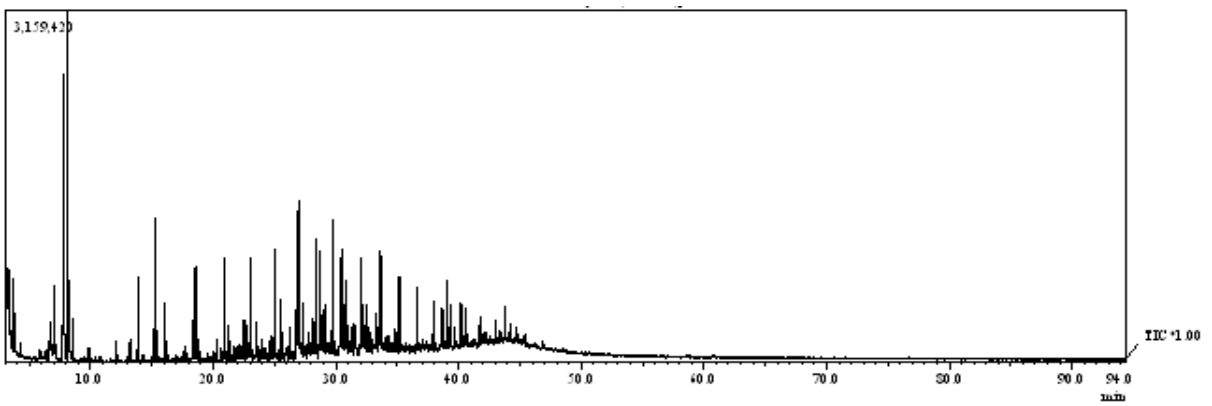
Básico 7 dias consórcio sem nutrientes 3



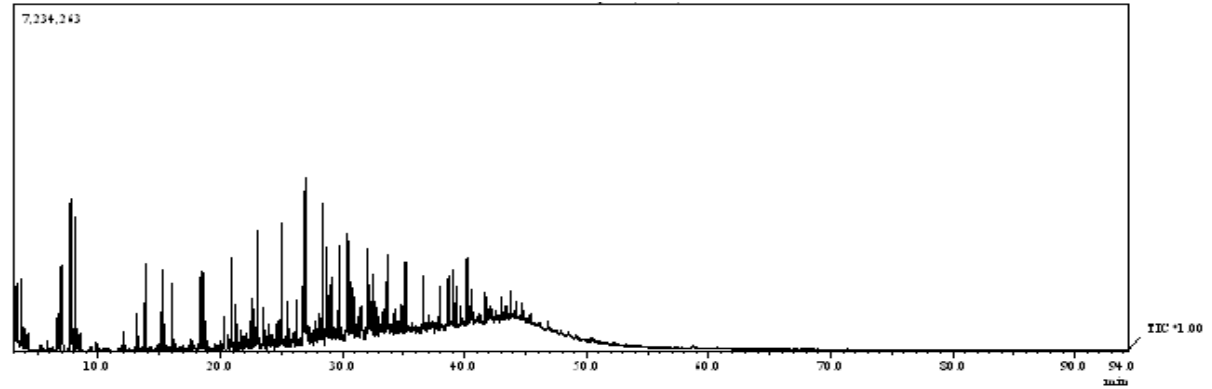
Básico 96 horas controle com nutrientes



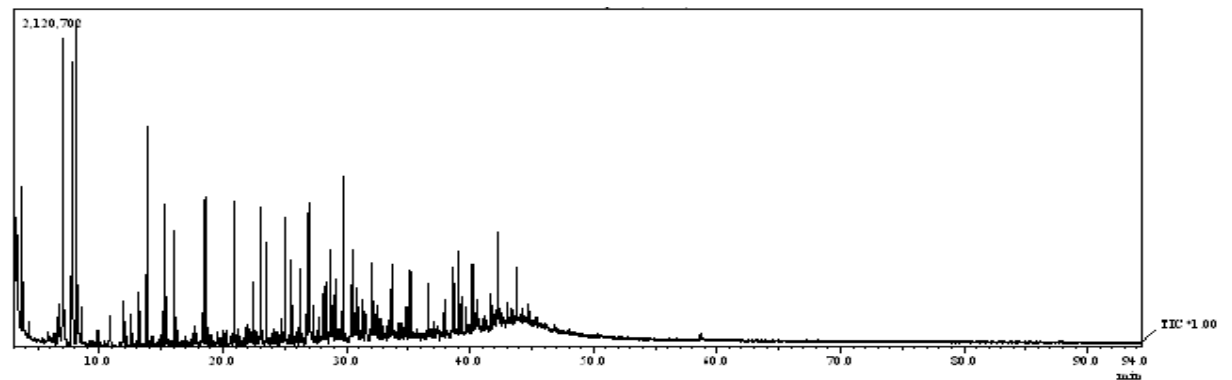
Básico 96 horas consórcio com nutrientes 1



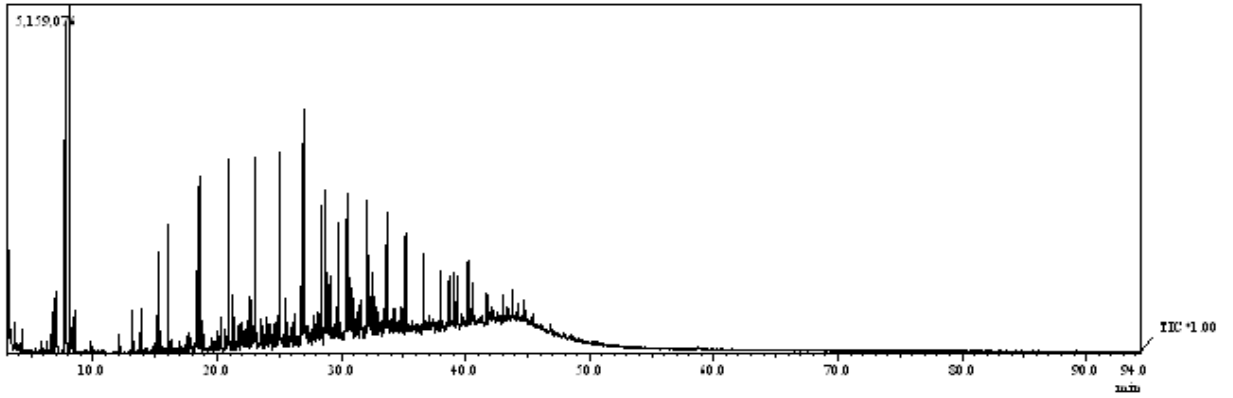
Básico 96 horas consórcio com nutrientes 2



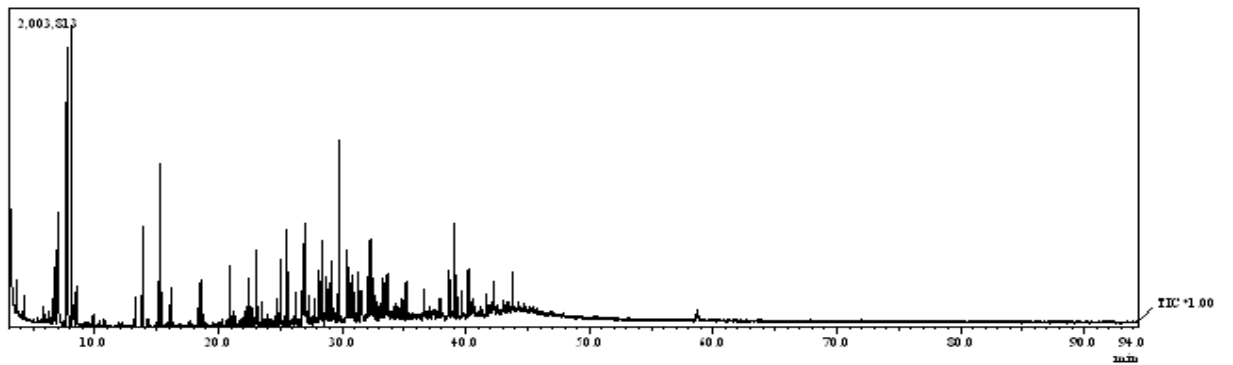
Básico 96 horas consórcio com nutrientes 3



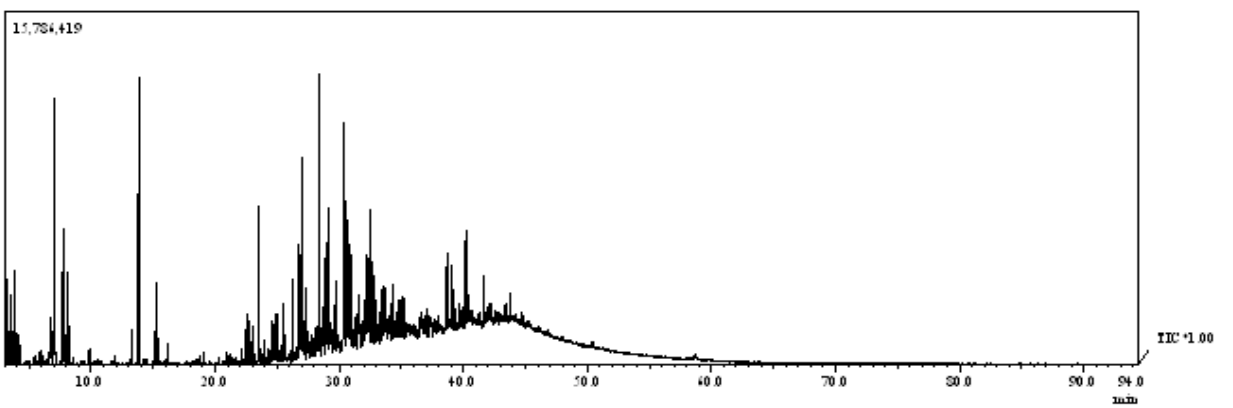
Básico 96 horas controle sem nutrientes



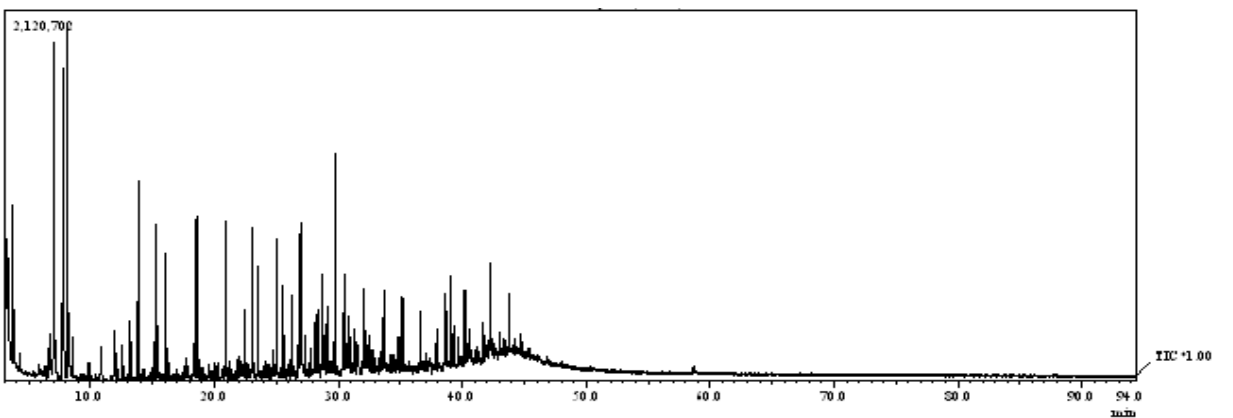
Básico 96 horas consórcio sem nutrientes 1



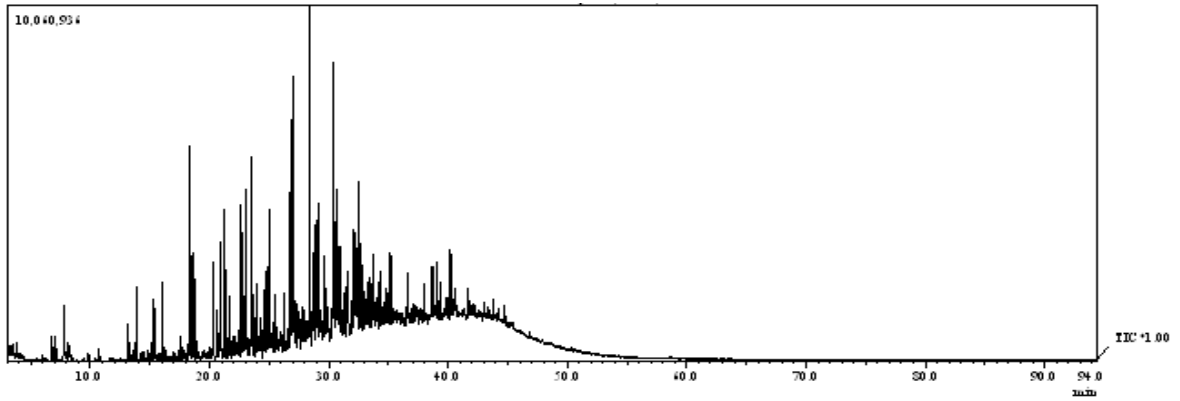
Básico 96 horas consórcio sem nutrientes 2



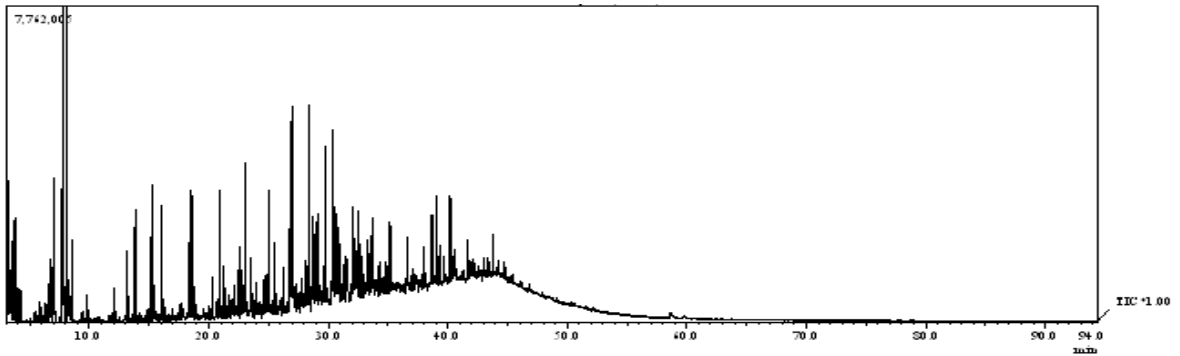
Básico 96 horas consórcio sem nutrientes 3



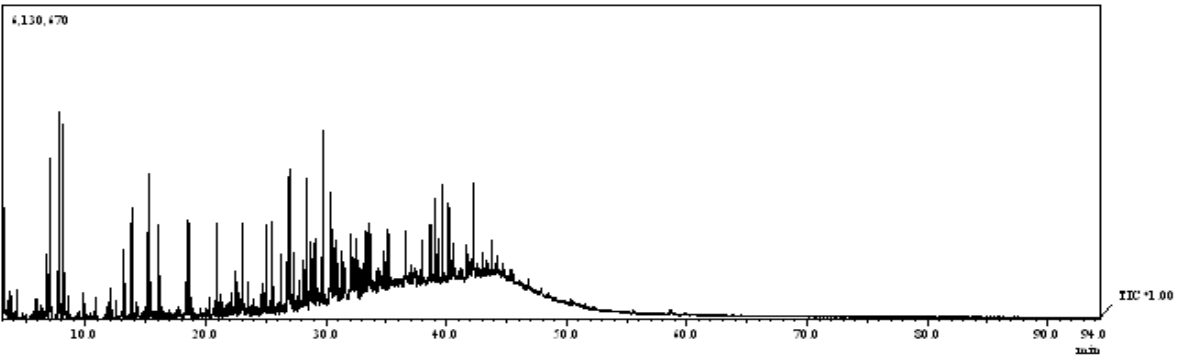
Básico 48 horas controle com nutrientes



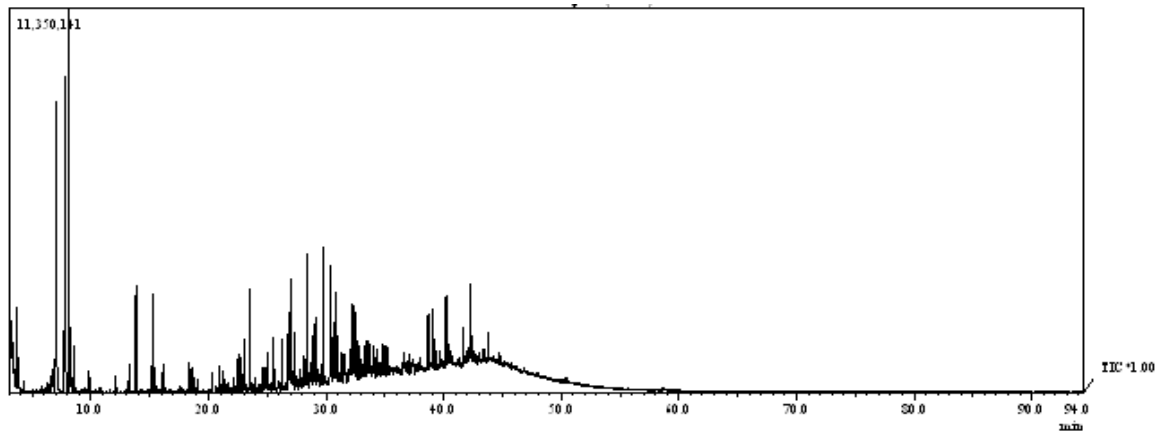
Básico 48 horas consórcio com nutrientes 1



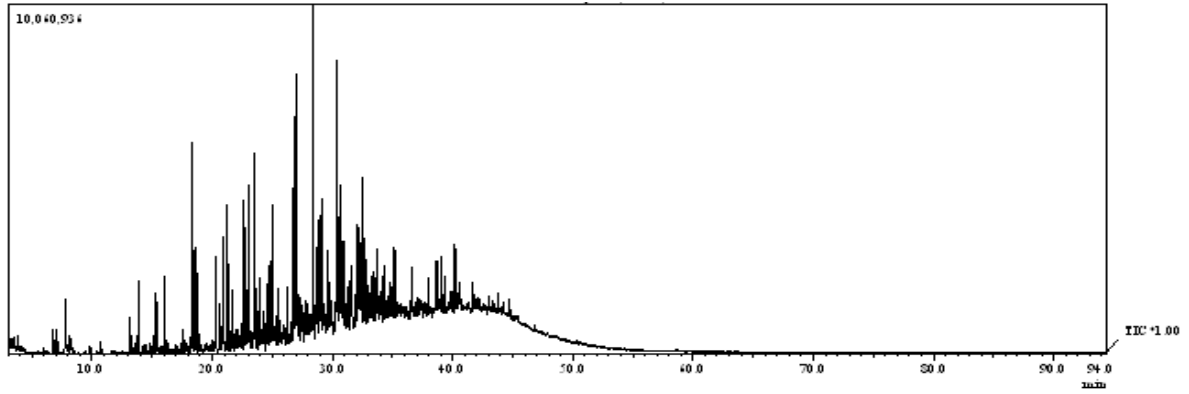
Básico 48 horas consórcio com nutrientes 2



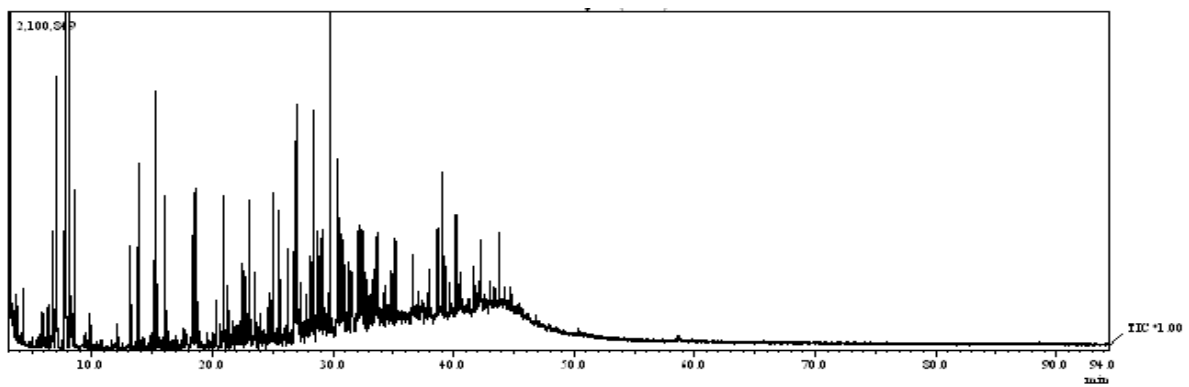
Básico 48 horas consórcio com nutrientes 3



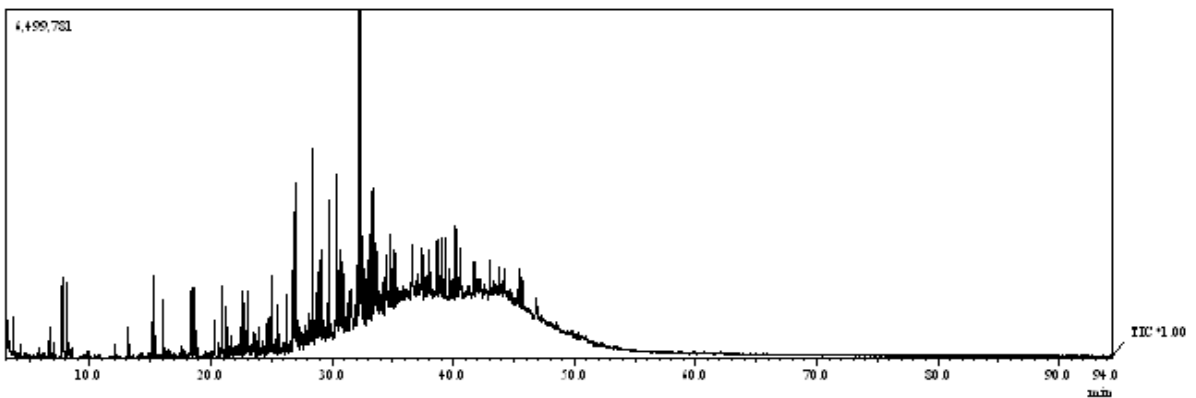
Básico 48 horas controle sem nutrientes



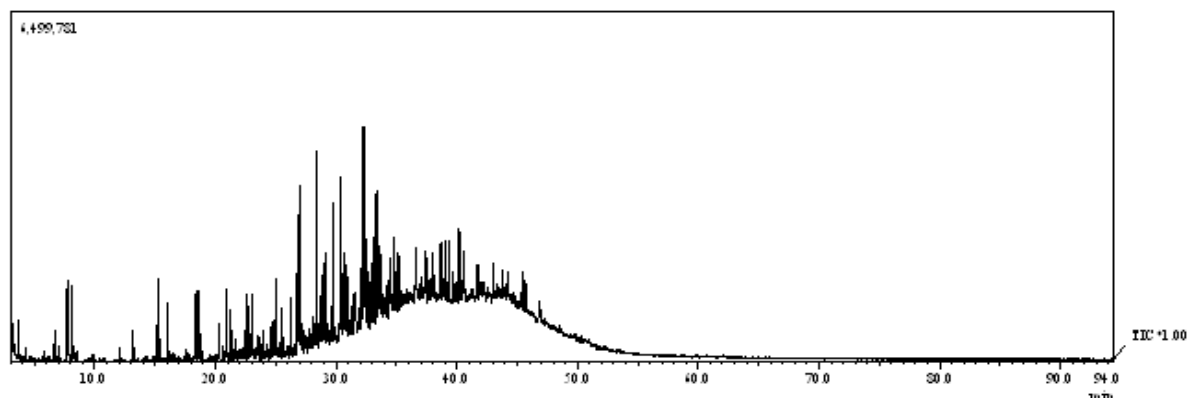
Básico 48 horas consórcio sem nutrientes 1



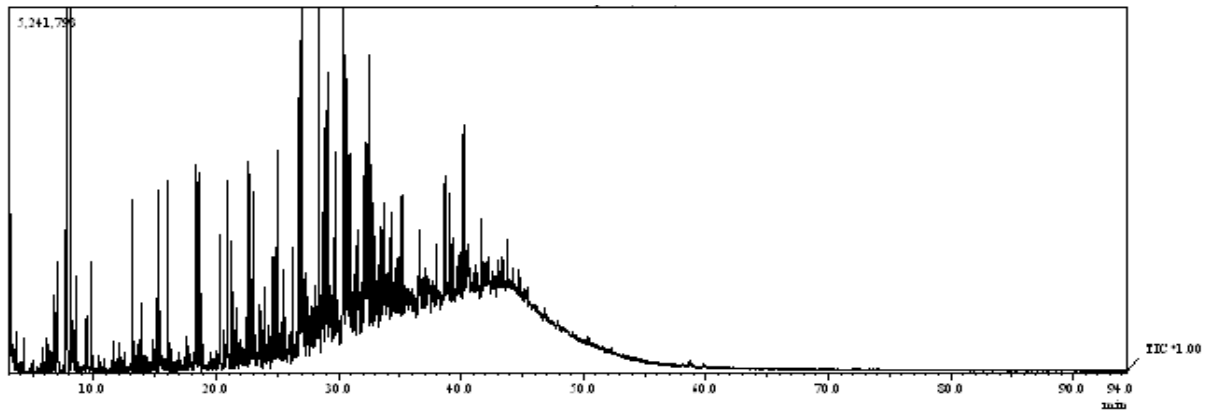
Básico 48 horas consórcio sem nutrientes 2



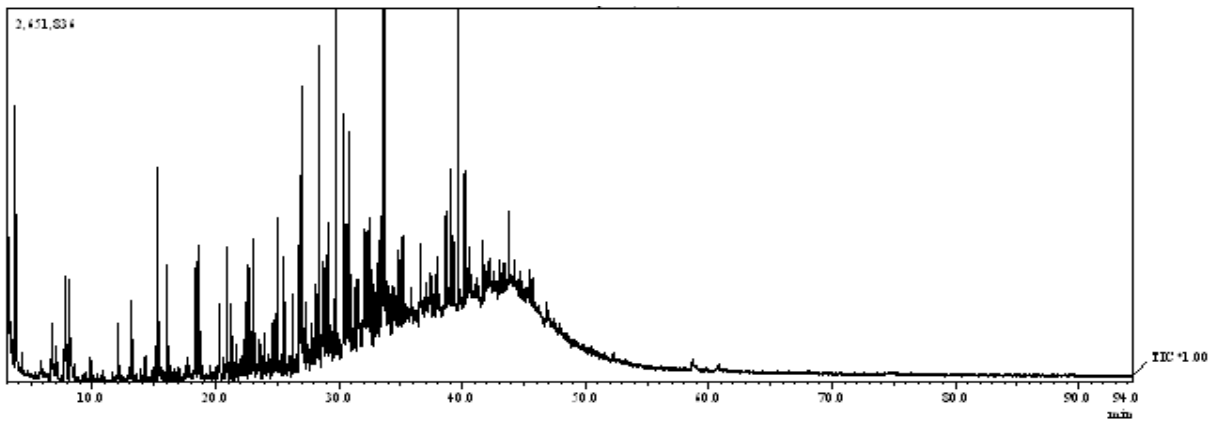
Básico 48 horas consórcio sem nutrientes 3



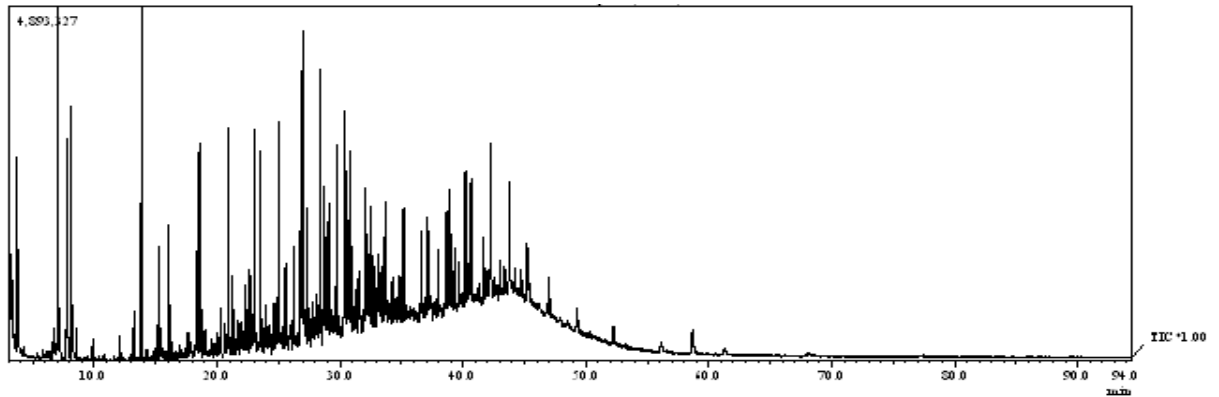
Básico tempo 0 controle com nutrientes



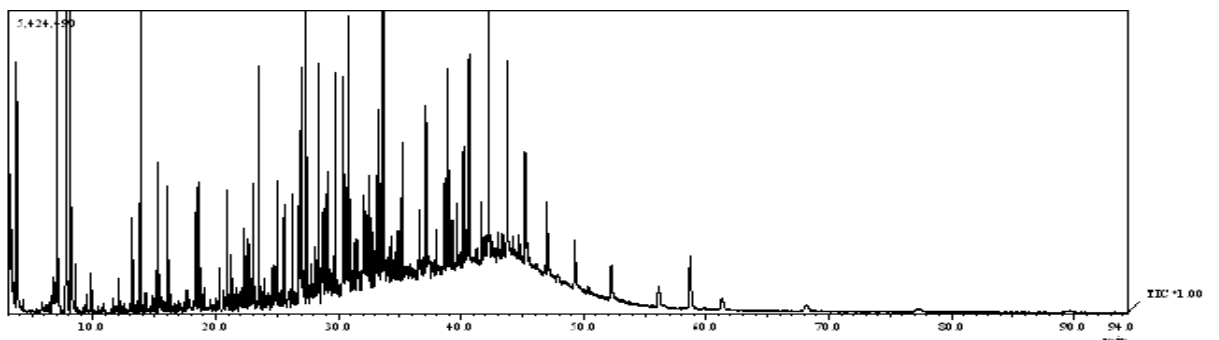
Básico tempo 0 consórcio com nutrientes 1



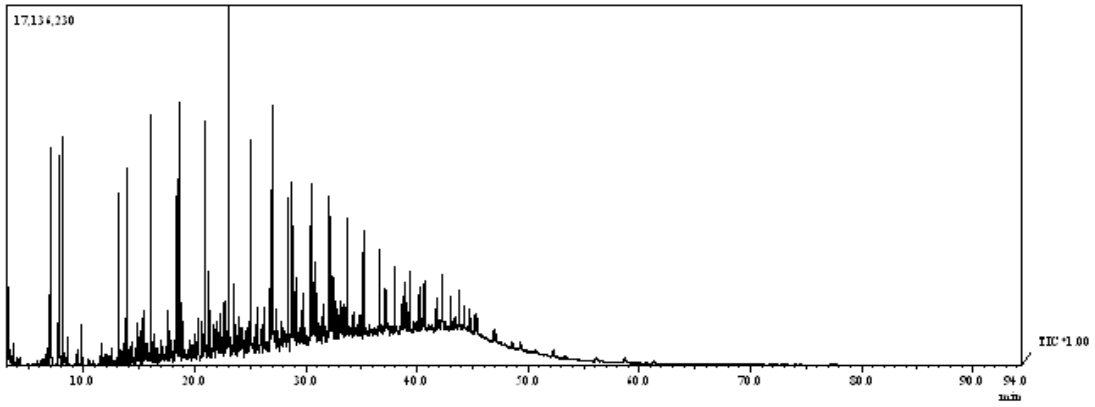
Básico tempo 0 consórcio com nutrientes 2



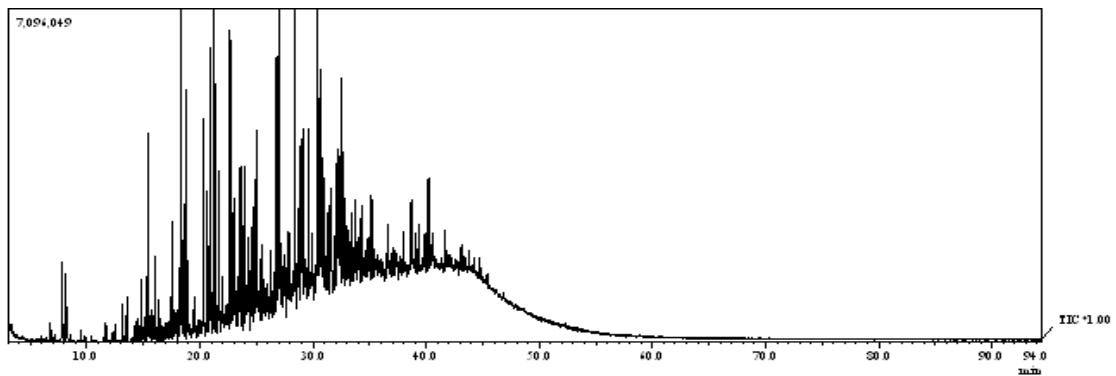
Básico tempo 0 consórcio com nutrientes 3



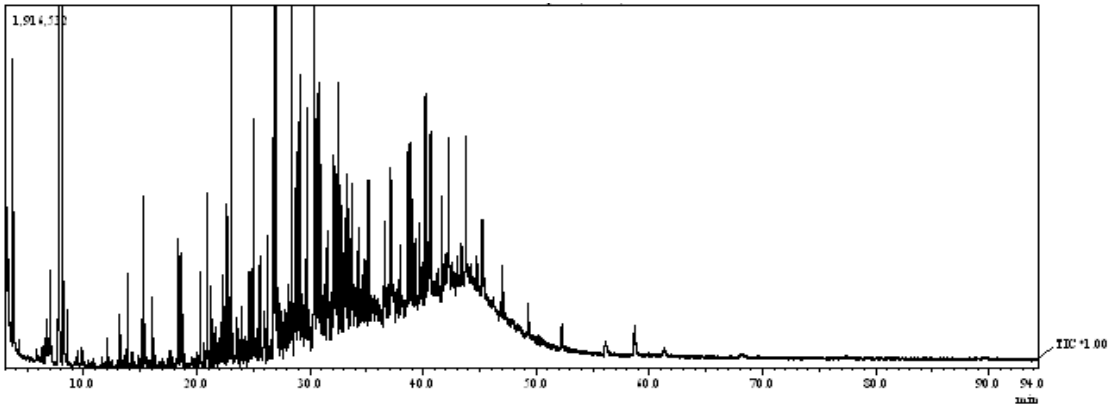
Básico tempo 0 controle sem nutrientes



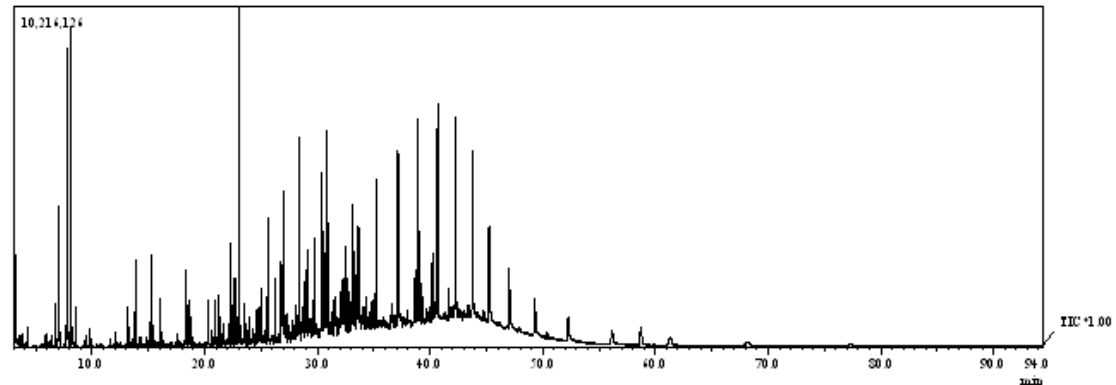
Básico tempo 0 consórcio sem nutrientes 1



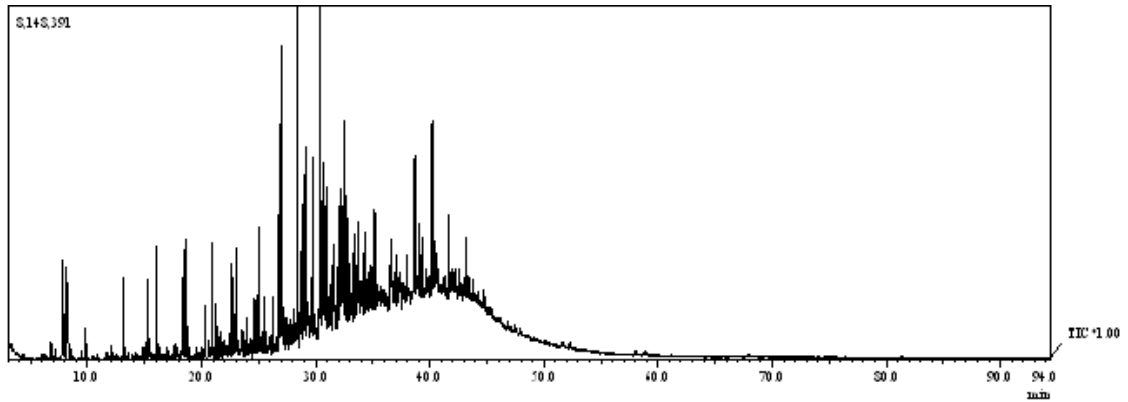
Básico tempo 0 consórcio sem nutrientes 2



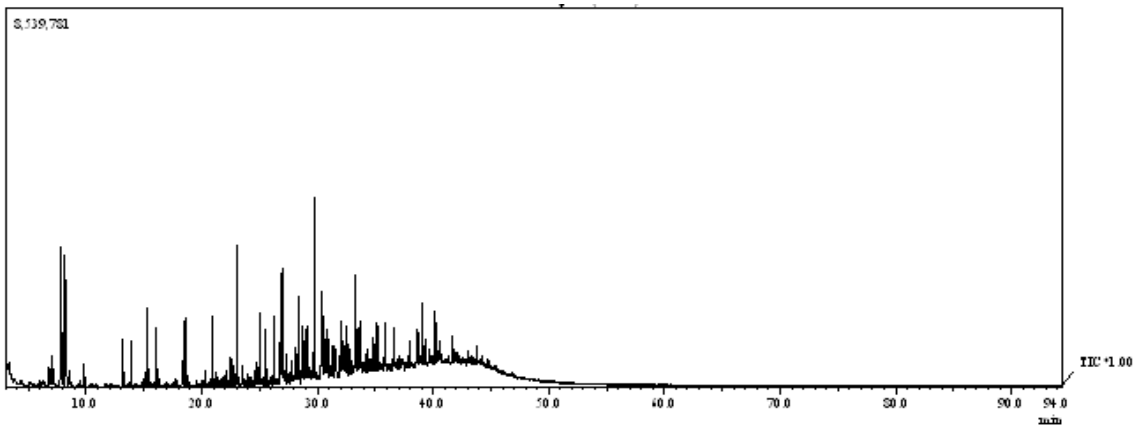
Básico tempo 0 consórcio sem nutrientes 3



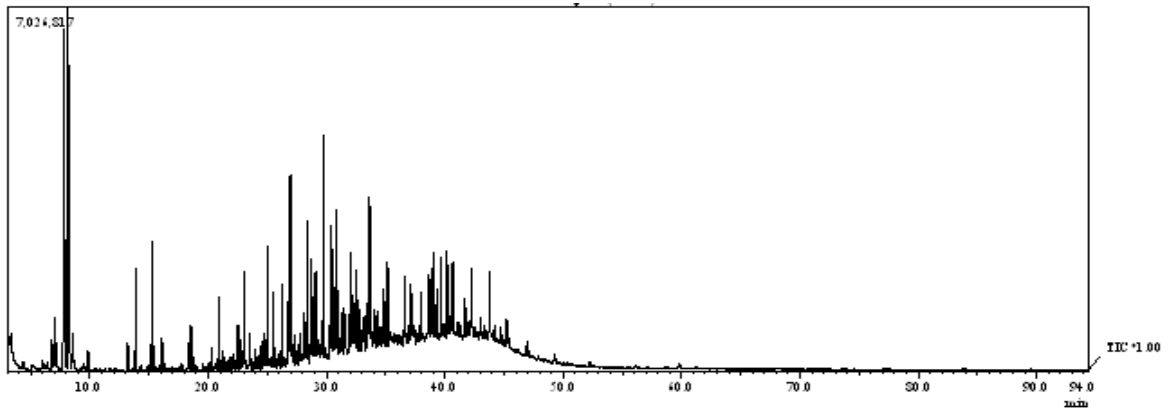
Neutro 7 dias controle com nutrientes



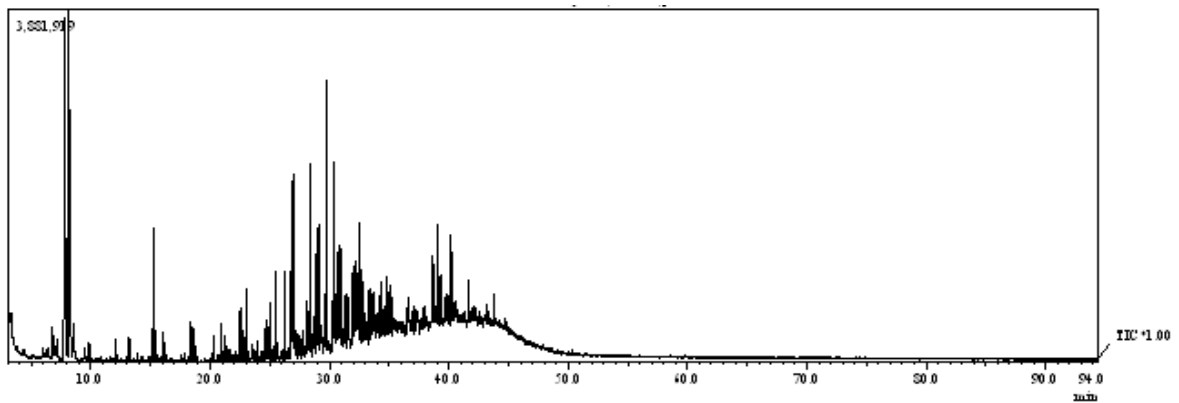
Neutro 7 dias consórcio com nutrientes 1



Neutro 7 dias consórcio com nutrientes 2

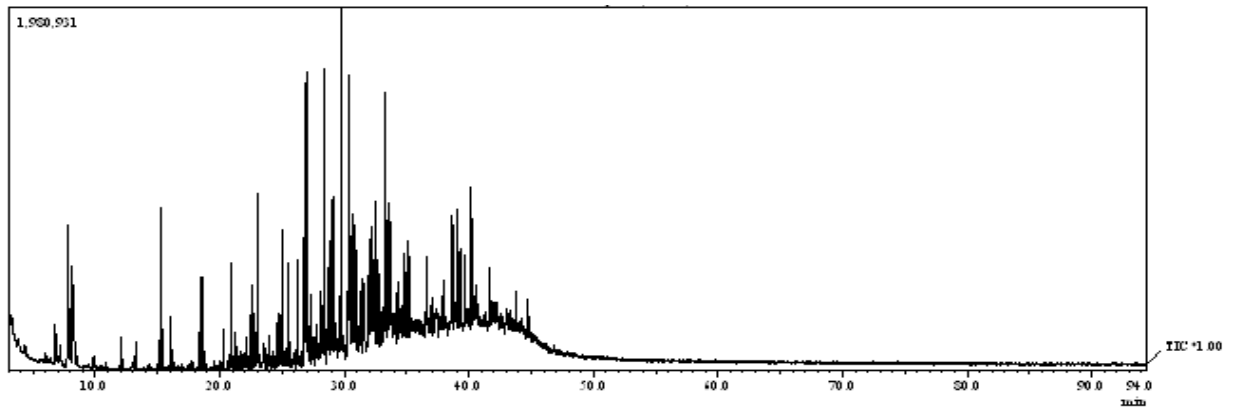


Neutro 7 dias consórcio com nutrientes 3

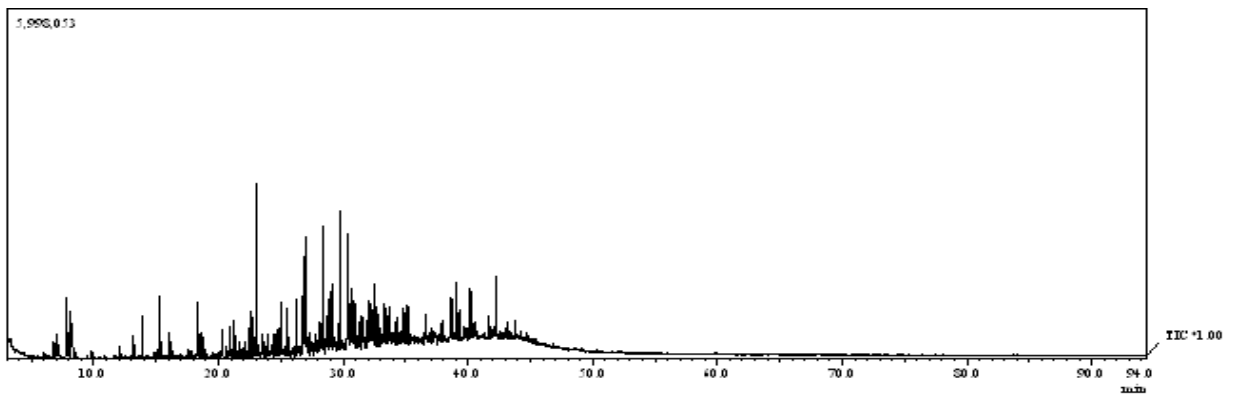




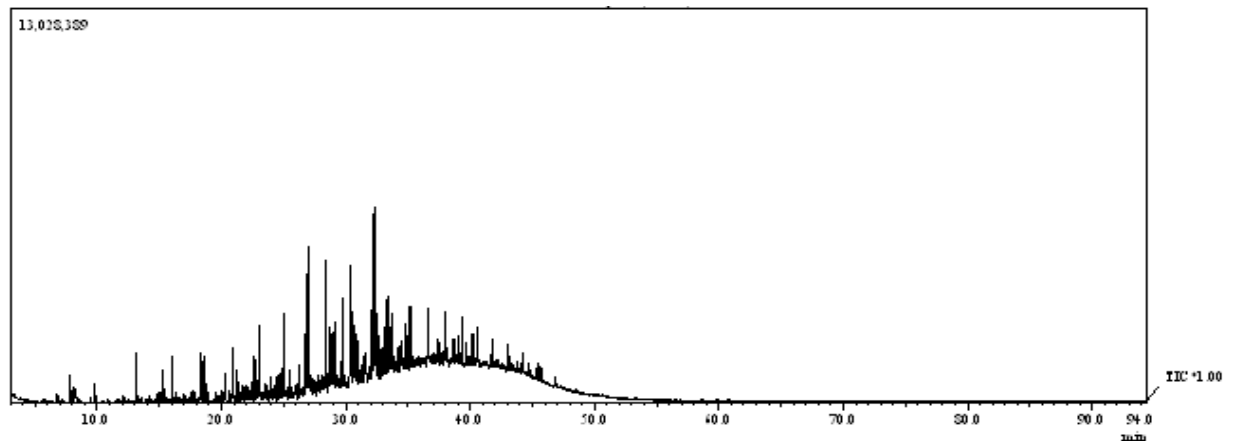
Neutro 7 dias controle sem nutrientes



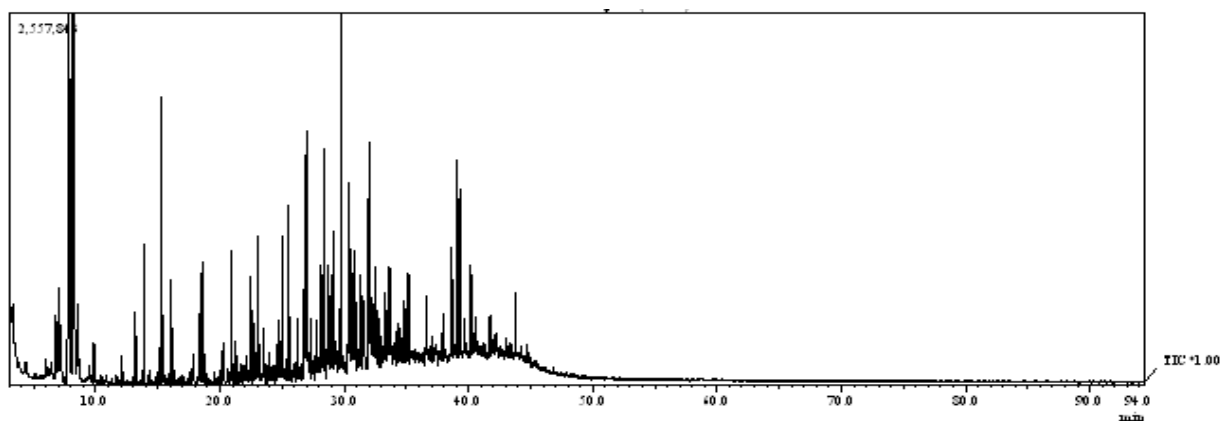
Neutro 7 dias consórcio sem nutrientes 2



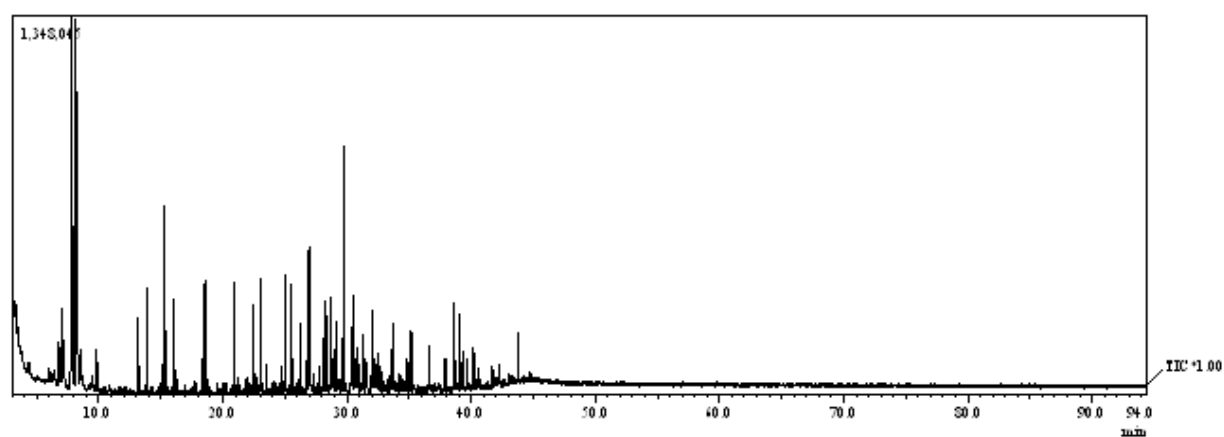
Neutro 7 dias consórcio sem nutrientes 3



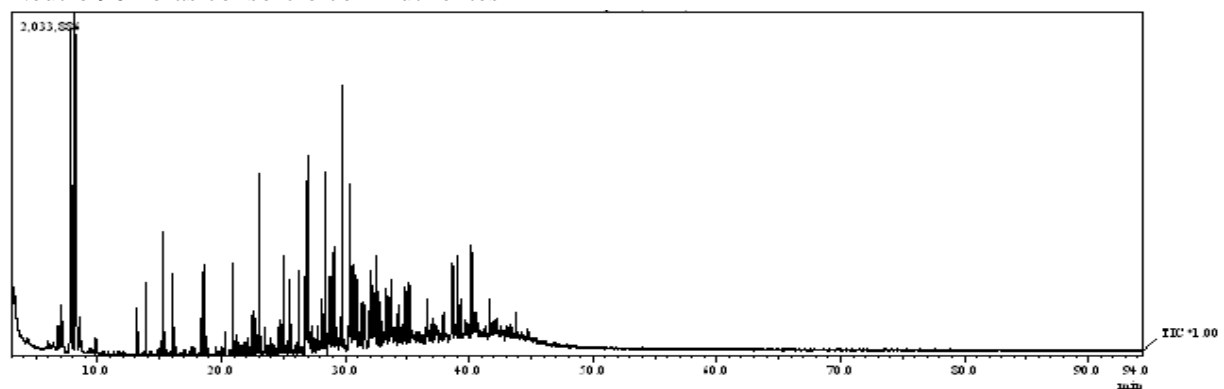
Neutro 96 horas controle com nutrientes



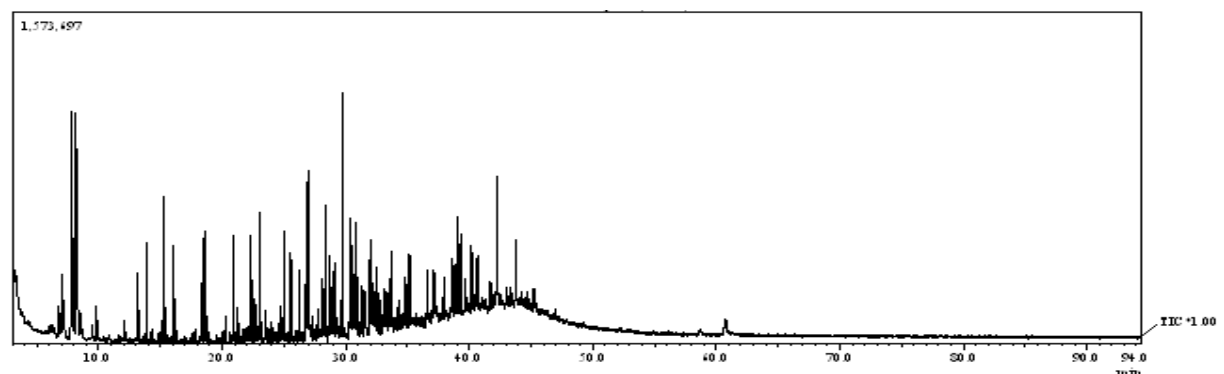
Neutro 96 horas consórcio com nutrientes 1



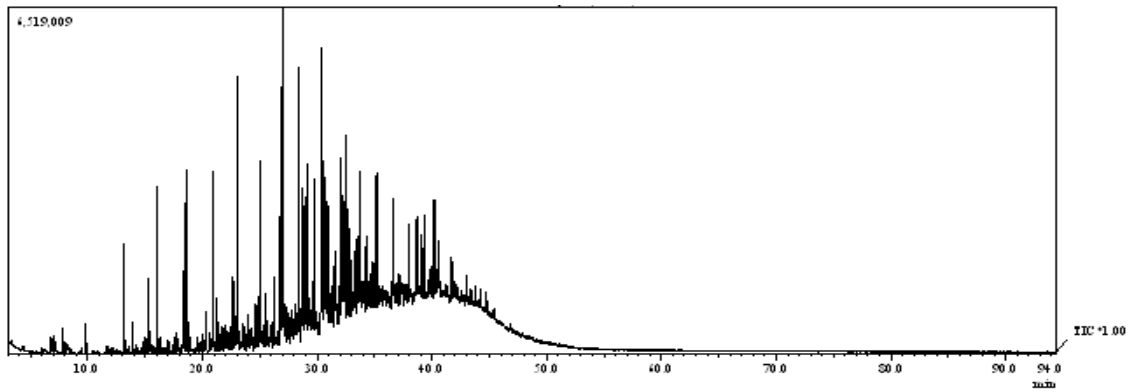
Neutro 96 horas consórcio com nutrientes 2



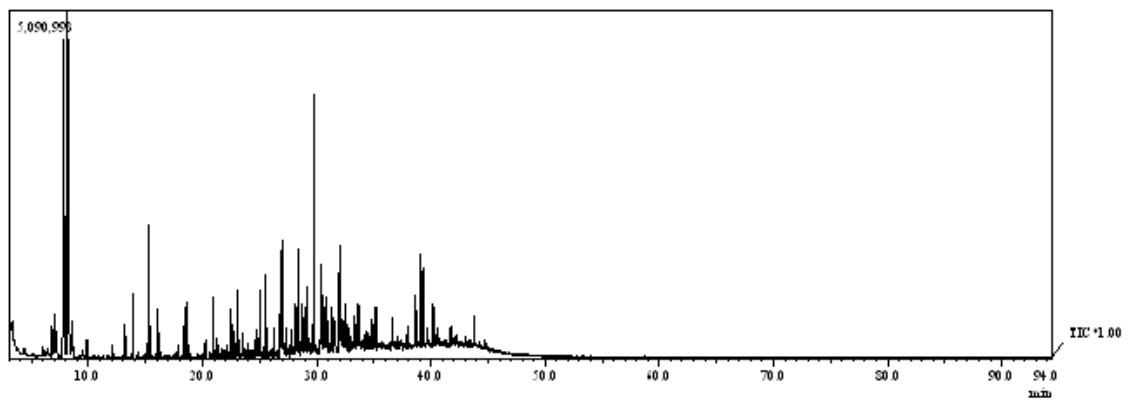
Neutro 96 horas consórcio com nutrientes 3



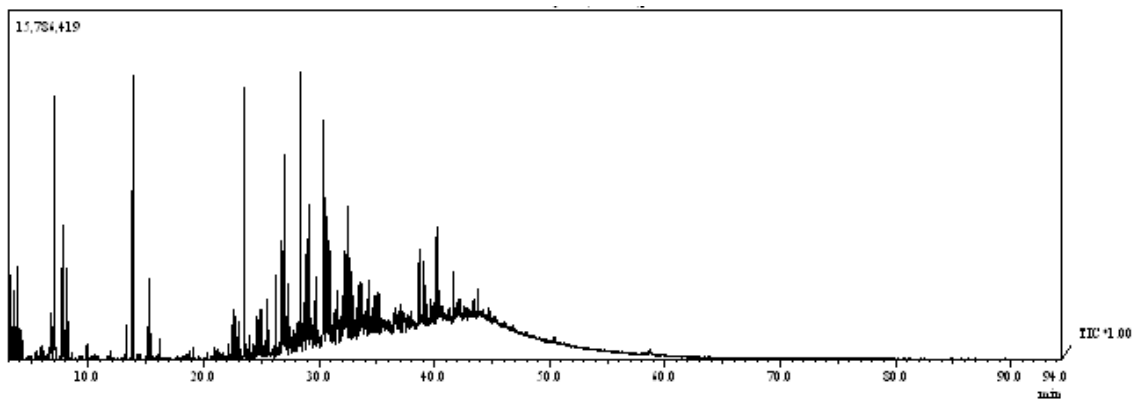
Neutro 96 horas controle sem nutrientes



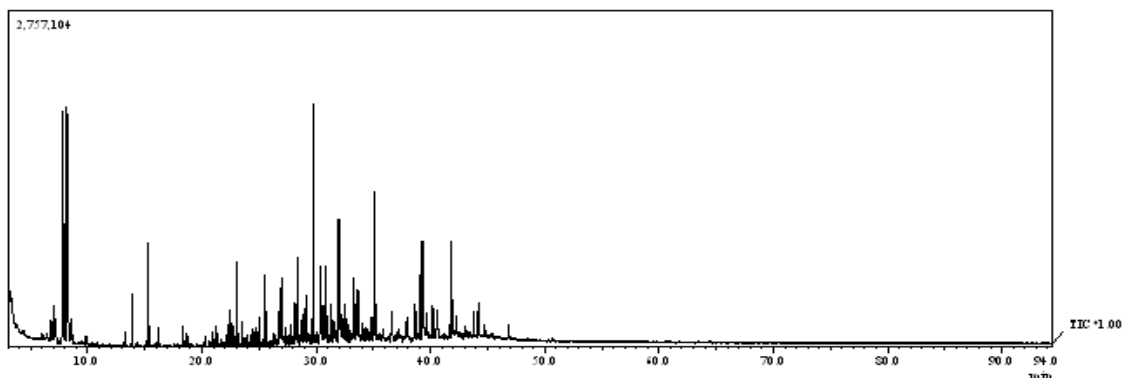
Neutro 96 horas consórcio sem nutrientes 1



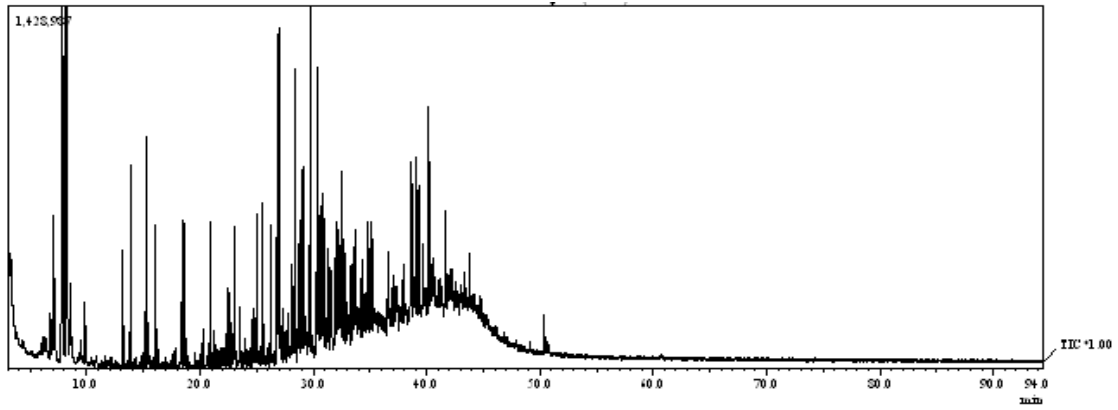
Neutro 96 horas consórcio sem nutrientes 2



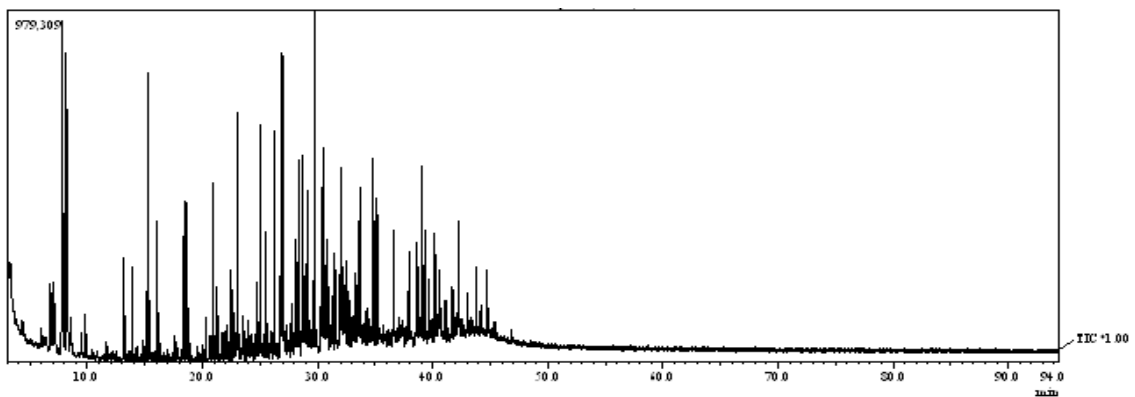
Neutro 96 horas consórcio sem nutrientes 3



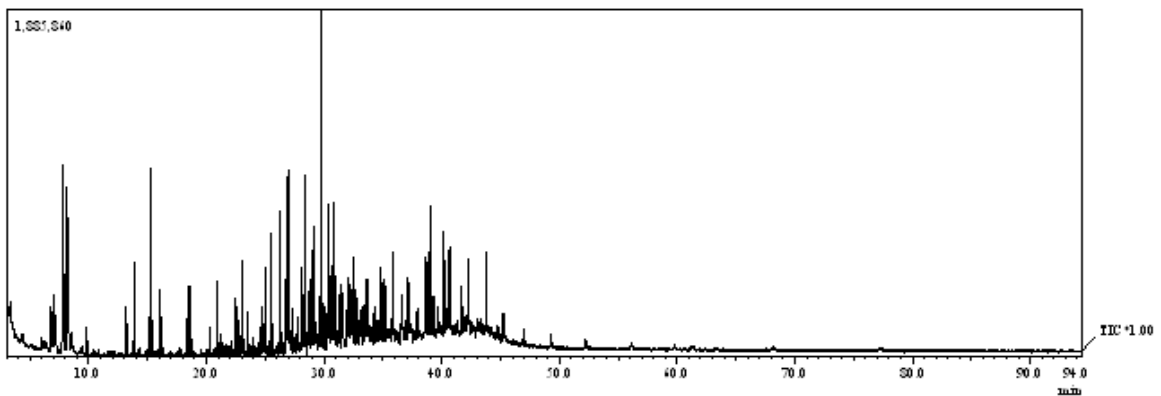
Neutro 48 horas controle com nutrientes



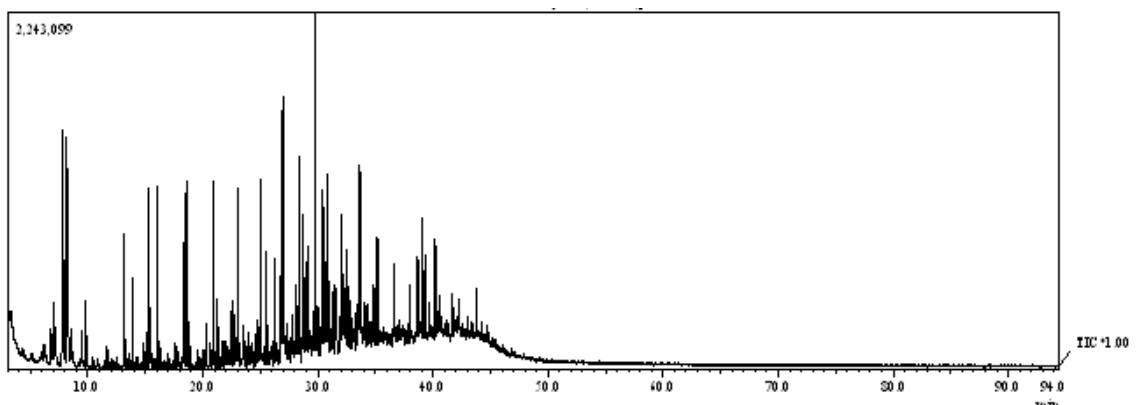
Neutro 48 horas consórcio com nutrientes 1



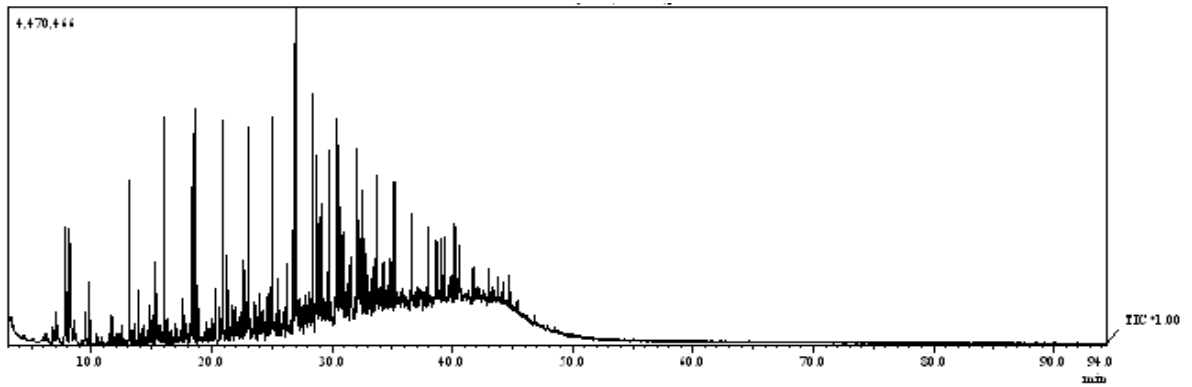
Neutro 48 horas consórcio com nutrientes 2



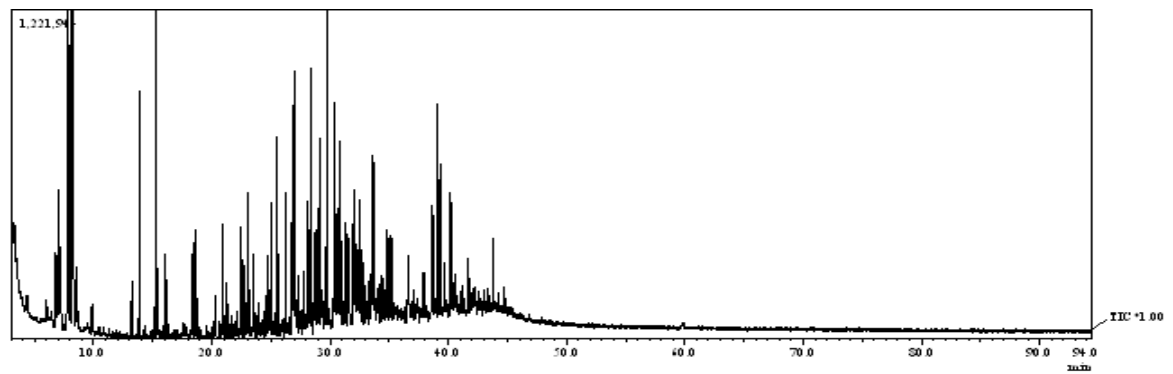
Neutro 48 horas consórcio com nutrientes 3



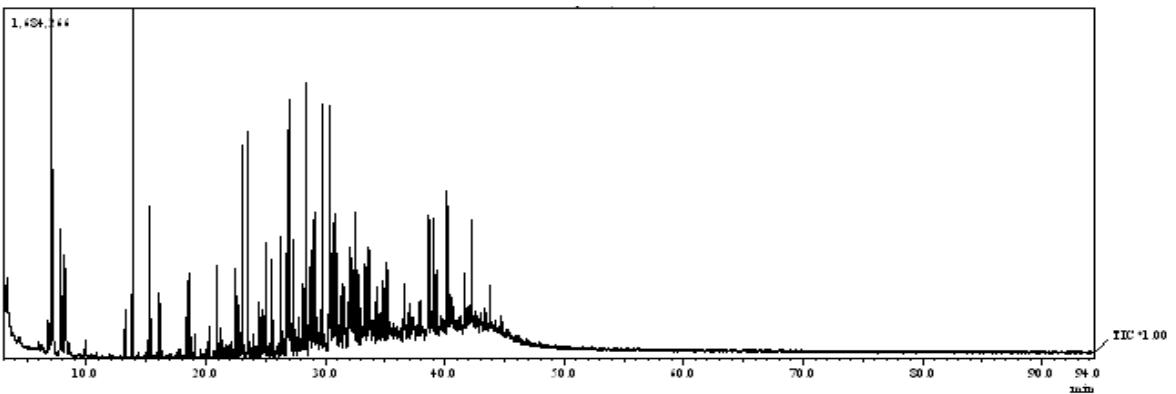
Neutro 48 horas controle sem nutrientes



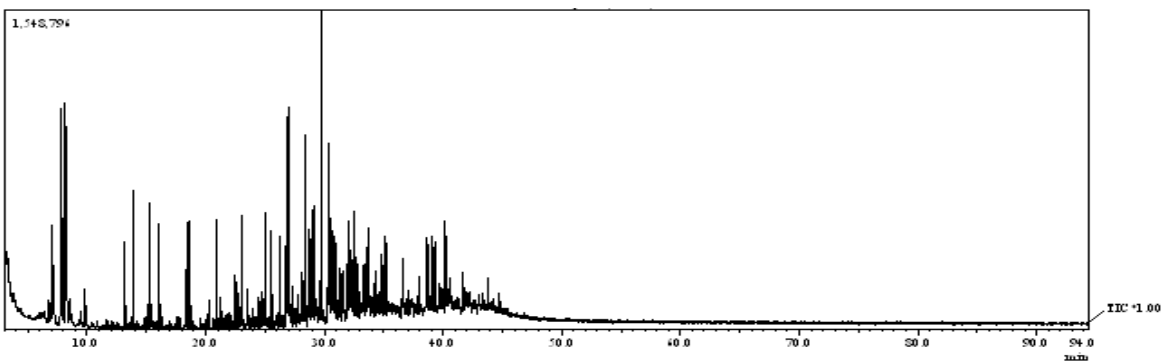
Neutro 48 horas consórcio sem nutrientes 1



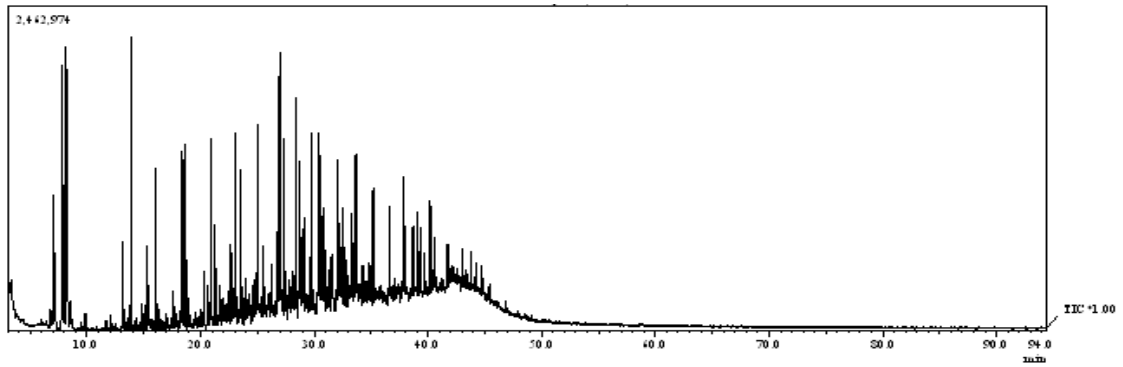
Neutro 48 horas consórcio sem nutrientes 2



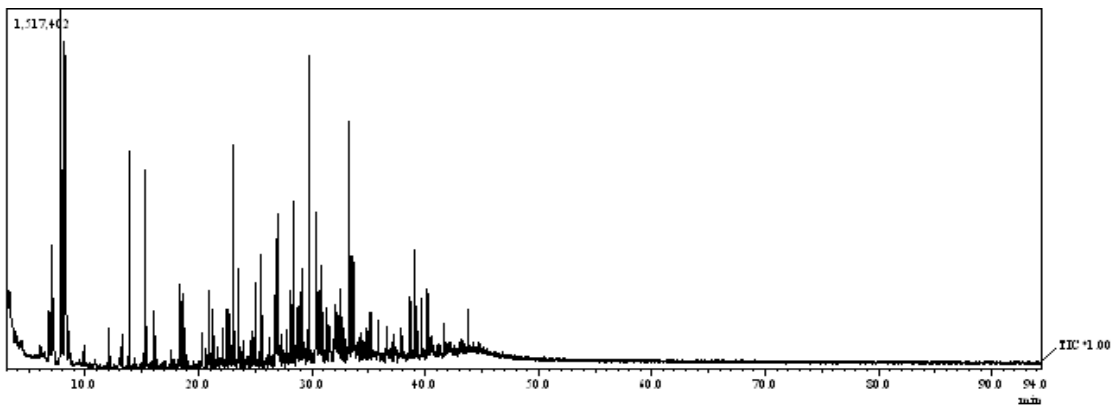
Neutro 48 horas consórcio sem nutrientes 3



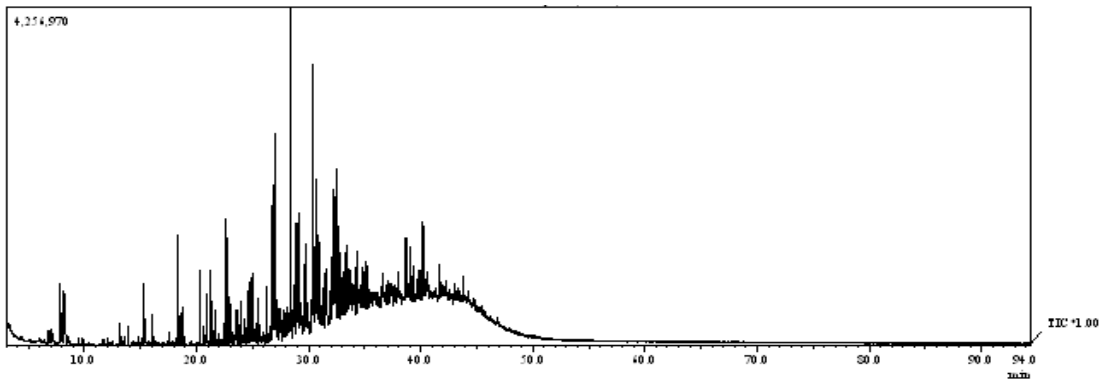
Neuro tempo 0 controle com nutrientes



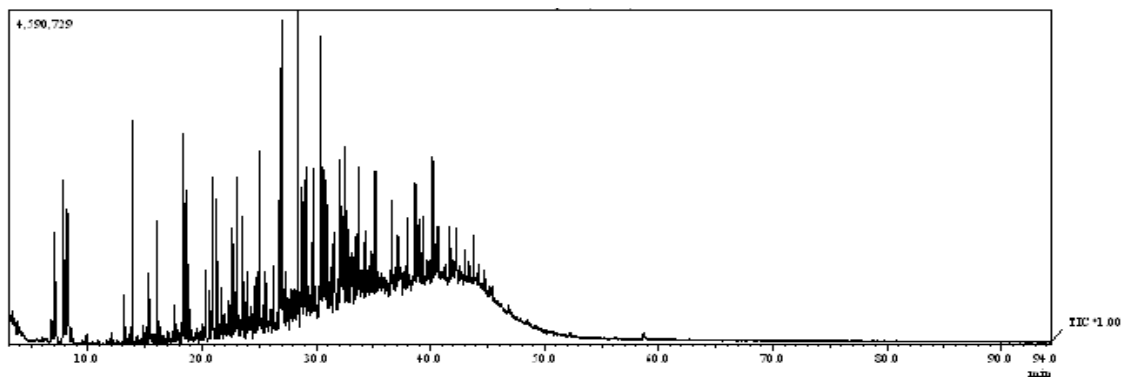
Neuro tempo 0 consórcio com nutrientes 1



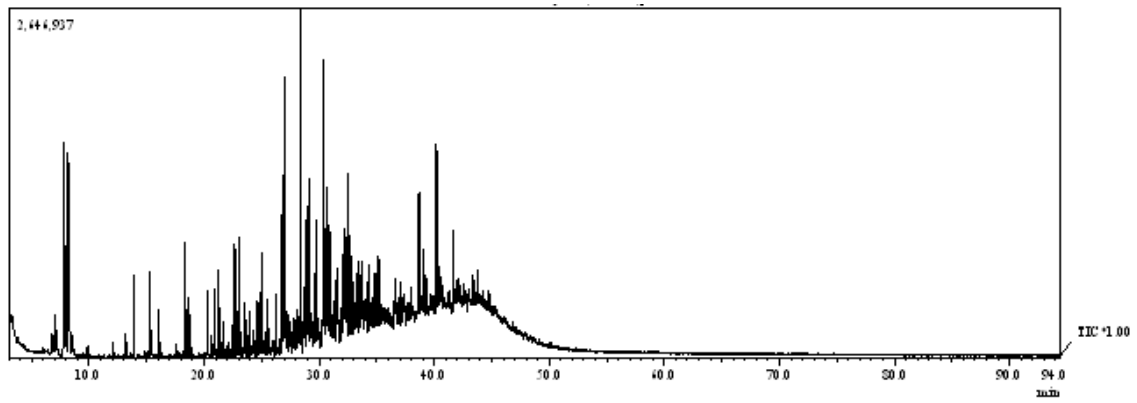
Neuro tempo 0 consórcio com nutrientes 2



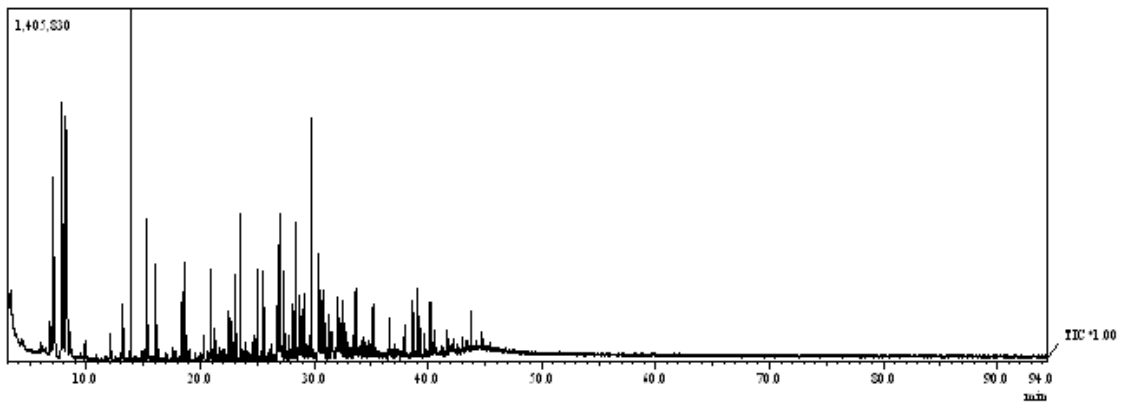
Neuro tempo 0 consórcio com nutrientes 3



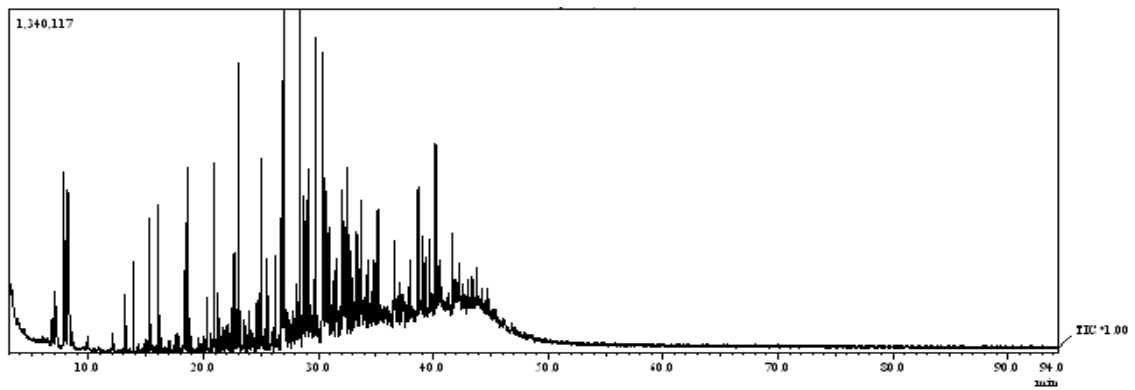
Neuro tempo 0 controle sem nutrientes



Neuro tempo 0 consórcio sem nutrientes 1



Neuro tempo 0 consórcio sem nutrientes 2



Neuro tempo 0 consórcio sem nutrientes 3

